



**İlk Yerli Üretim Ultrason Kontrast Maddesi Olan
Mikroköpükçüklerin *in-vitro* ve *in-vivo*
Karakterizasyonlarının Yapılması**

Program Kodu: 1001

Proje No: 113M270

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

Araştırmacılar:

Doç. Dr. Ekrem ÖZDEMİR
Uz.Dr. Mustafa Mahmut BARIŞ
Prof. Dr. Osman YILMAZ

Danışman:

Prof. Dr. Mustafa SEÇİL

EKİM 2016
İZMİR



Önsöz

Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen bu proje ile, 2010-2012 yılları arasında TÜBİTAK tarafından desteklenen 109M494 nolu proje kapsamında geliştirilen farklı kompozisyonda ilk yerli üretim mikroköpükçüklerin morfoloji ve ultrason altında *in-vitro* ve *in-vivo* stabiliteleri araştırılmıştır. Mikroköpükçük formülasyonlarına eklenen PEG₄₀St miktarı ile mikroköpükçüklerin ekojenitelerinde artış olduğu saptanmış; ancak, mikroköpükçüklerin yüzeylerinde PEG₄₀St miktarı arttıkça mikroköpükçüklerin ultrason altında stabilitelerinin azaldığı bulunmuştur. Ticari mikroköpükçük olan Vevomarker® ile karşılaştırmalarda, araştırma kapsamında geliştirilen mikroköpükçüklerin mukayese edilebilir düzeyde oldukları gösterilmiştir.

Bu projenin gerçekleşmesinde mali destek veren TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU (TUBİTAK)'a, deneylerin gerçekleştirildiği İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ ve DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ Birimlerine'ne, projenin gerçekleştirilmesinde emeği geçen Doktora öğrencileri Umur AYAZ ve Gülşah KÜRKCÜ'ye, *in-vivo* çalışmaların planlanması ve gerçekleştirilmesinde katkı koyan Prof. Dr. Şule KALKAN, Doktora öğrencisi Meryem ÇALIŞIR ve teknisyen Adem ULU'ya, patoloji sonuçlarının değerlendirilmesinde katkı koyan Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a ve Biyokimya laboratuvar sorumlusu Doç. Dr. Murat ÖRMEN'e teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Önsöz.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
Özet.....	xiv
Abstract.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Ultrason Kontrast Ajanı Mikroköpükçükler.....	3
2.2. Mikroköpükçüklerin Akustik ve Morfolojik Özellikleri.....	10
2.3. Ultrason Görüntüleme.....	22
2.4. Mikroköpükçük Morfolojisi ve Floresan Mikroskop ile Görüntüleme.....	24
2.5. Bolus Enjeksiyon Yöntemi ile Analiz.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Kimyasallar	32
3.2. Mikroköpükçüklerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu	33
3.3. Mikroköpükçüklerin Floresan Mikroskopu ile Morfolojilerinin İncelenmesi:	34
3.4. Mikroköpükçüklerin Yüksek Hızda Osilasyonları.....	35
3.5. Mikroköpükçüklerin Hidrostatik Basınç Altında Stabiliteleri	36
3.6. Mikroköpükçüklerin Ultrason Altında Stabiliteleri.....	37
3.7. Farklı Kompozisyonda Mikroköpükçüklerin <i>In-Vitro</i> Ekojenitelerinin Belirlenmesi	43
3.8. Mikroköpükçüklerin <i>Ex-Vivo</i> Görüntüleri.....	44
3.9. Mikroköpükçüklerin <i>In-Vivo</i> Toksisiteleri.....	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	50
4.1. Ultrason Kontrast Ajanı Mikroköpükçüklerin Üretilmesi ve Verimi	50
4.2. Mikroköpükçüklerin Yüzey Morfolojisi	56
4.2.1. Floresan Boya Konsantrasyonu Etkisi	59
4.2.2. Mikroköpükçük Yüzey Morfolojisine pH Etkisi.....	62
4.2.3. Mikroköpükçük Kompozisyonu ile Yüzey Morfolojisi.....	66
4.2.4. Mikroköpükçük Monotabaka Yapısı ve Morfoloji Oluşum Mekanizması	70
4.3. Mikroköpükçüklerin Yüksek Hızda Osilasyonları.....	77
4.4. Mikroköpükçüklerin Hidrostatik Basınç Altında Stabiliteleri	87
4.5. Mikroköpükçüklerin Ultrason Altında Stabiliteleri.....	95
4.5.1. Ultrason Düzeneginin Karakterizasyonu.....	95
4.5.2. Mikroköpükçüklere Kayma Gerilimi (Shear) Etkisi	104
4.5.3. Mikroköpükçüklerin Ultrason Altında Stabiliteleri.....	108
4.6. Farklı Kompozisyonda Mikroköpükçüklerin Ekojeniteleri	113



4.6.1	Bolus Enjeksiyon Yöntemi için Hesaplama Metodu Geliştirme	114
4.6.2	Bolus Enjeksiyon Yöntemi ile Mikroköpükçük Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	117
4.6.3	Farklı Mikroköpükçüklerin Ekojeniteleri.....	125
4.7	Mikroköpükçüklerin Darlık Fantomunda Ekojenitelerinin Belirlenmesi.....	127
4.8	Mikroköpükçüklerin <i>Ex-Vivo</i> Görüntüleri.....	128
4.9	Mikroköpükçüklerin <i>In-Vivo</i> Toksisiteleri.....	132
4.9.1	Sıçanda Optimum Mikroköpükçük Dozu Belirleme	133
4.9.2	Referans Ticari Form ile Karşılaştırma.....	134
4.9.3	Sıçanda Toksik Doz Çalışması	137
4.9.4	Tavşanda Toksik Doz Çalışması.....	137
4.9.5	Mikroköpükçüklerin Toksisitelerinde Biyokimya ve Hemogram Sonuçları.....	138
4.9.6	Patoloji Sonuçları.....	146
5.	SONUÇLAR.....	152
	KAYNAKLAR.....	155



TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Geliştirilmiş/Geliştirilmekte olan Ultrason Konrast Ajanı Mikroköpükçükler (Alzaraa vd. 2012).....	8
Tablo 2. Kullanılan mikroköpükçük malzemeleri ve kimyasal yapısı.	32
Tablo 3. Farklı frekanslarda mikroköpükçük kalibrasyon denklemleri. Burada, 'x', konsantrasyonu, 'y' ise normalize genlik değerini belirtmektedir.	104
Tablo 4. Sıçan Biyokimya Değerleri.....	141
Tablo 5. Sıçan Hemogram Değerleri	142
Tablo 6. Tavşan Biyokimya Değerleri	143
Tablo 7. Tavşan Hemogram Değerleri.....	145

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Bir tavşanın kalçasında oluşan tümörün ultrason kontrast ajanı enjekte edilmeden önce (a) ve sonra (b) görüntüsü. Kontrast ajanı enjekte edildiğinde tümörün varlığı daha net bir şekilde görülebilmektedir (Schutt vd. 2003). 3	3
Şekil 2. Bir hastanın kalp sol ventrikülünün (LV) ultrason kontrast ajanı enjekte edilmeden önce (a) ve sonra (b) görüntüsü. Sol ventrikül, endokardiyal border ve papiller kaslar, kalp kaslarında meydana gelen kasılmalar kontrast ajanının varlığında daha net görüntülenebilmektedir. Normal çalışan bir kalpte kasılma sırasında kalp kasları duvarlarında kalınlaşma olurken, abnormal bir kalpte kalınlaşma olmamaktadır (Schutt vd. 2003). 4	4
Şekil 3. Mikroköpükçük zar yapısının (a) elastisite ve (b) vizkositesinin mikroköpükçük çapı ile değişimi (Tu vd. 2009). 11	11
Şekil 4. Mikroköpükçüklerin ultrason altında farklı morfolojilerde osilasyonları(De Jong vd. 2009). 13	13
Şekil 5. Farklı floresan boya konsantrasyonda (a) mikroköpükçük yüzeyinden ölçülen floresan görüntü, (b) normalize floresan ışık yoğunluğu, ve (c) floresan moleküllerinin kendilerini sönmülendirmesi (self-quenching)(Benchimol vd. 2013). 14	14
Şekil 6. Mikroköpükçüklerin floresan mikroskop yüzey morfoloji görüntüleri (A) Soğutma hızı 100 °C/dak, (B) Soğutma hızı 1000 °C/dak, (C) mikroköpükçük zar yapısının TEM görüntüsü (Kim vd. 2003). 15	15
Şekil 7. Mikroköpükçüklerin çözünmesi esnasında zar yapılarından lipit atma mekanizmaları, (A) vezikül oluşumu, (B) katlanma (folding), (C) yüzey katlanması (buckling) ve akabinde yüzeyden ayrılma (shedding), (D) genel görünüş (Borden vd. 2005, Pu vd. 2006). 17	17
Şekil 8. Mikroköpükçüklerin çözünmesi esnasında mikroköpükçük boyutlarında ve yüzey morfolojilerinde değişimler, A-C: yüzeyde genişleme ve fazların birbiri içerisinde çözünmesi, C-E: fazların sıkışması ve yüzey morfolojilerin yeniden oluşması (Kwan ve Borden 2012). 18	18
Şekil 9. Mikroköpükçüklerin zar yapısında fırça ya da mantar formunda bulunan PEG'lenmiş lipid moleküllerinin mikroköpükçük stabilitesine etkisi, (A) Lipo-polimer oranı düşük mantar formunda, (B) Lipo-polimer oranı artırıldığında, fırça formunda, (C) PEG molekül ağırlığı artırıldığında (Wrenn vd. 2012). 19	19

Şekil 10. Mikroköpükçüklerin lipid karışımı ile zar yapısı bileşenleri arasındaki ilişkinin ¹ H-NMR yöntemi ile belirlenmesi (Borden vd. 2006).....	19
Şekil 11. (a) Mikro-akış üretim yönteminde PEG% oranlarında mikroköpükçük üretim miktarı ve stabiliteleri, (b) Mikroköpükçüklerin PEG% miktarına göre dayanımları(Abou-Saleh vd. 2014).	20
Şekil 12. (A) Sonikasyon yöntemi ve mikro-akış yöntemi ile üretilen mikroköpükçükler için ölçülen vizkosite değerleri, (B) farklı zar yapısında bulunan lipidleri için ölçülen vizkosite değerleri, (C) DSPC:PEG oranı 9:1, 8:2 ve 5:5 olan mikroköpükçükler için ölçülen vizkosite değerleri, (D) farklı oranlarda DSPC:PEG oranında hazırlanan mikroköpükçüklerin yansıttığı ölçülen ultrason sinyal gücü (Hosny vd. 2013).....	21
Şekil 13. Mikroköpükçüklerin atomik mikroskop ile dayanımının ölçülmesi(Chen vd. 2013).....	22
Şekil 14. Şematize edilmiş mikroköpükçük oluşum mekanizması(Kwan ve Borden 2012).....	25
Şekil 15. Mikroköpükçük çapının en yüksek olduğu orta düzlem (mid-plane) görüntüsü	35
Şekil 16. Hidrostatik sabit basınç sistemi. 1. Su, 2. Pompa, 3. Basınç regülatörü, 4. Tekyön vana, 5. Numune kabı, 6. Mikroskop, 7. Kamera, 8. Bilgisayar.....	36
Şekil 17. Ultrasonik prob için odak bölgesinin hidrofona ile belirlenmesi.....	38
Şekil 18. Ultrasonik ekoskop ile karakterizasyon deney düzeneği	39
Şekil 19. Farklı kayma gerilimlerinde ve ultrason altında mikroköpükçük stabilite deney düzeneği.....	41
Şekil 20. Ultrason kontrast maddesi mikroköpükçüklerin ultrason altında <i>in-vitro</i> stabilitelerinin belirlenmesi için laboratuvar ölçeğinde tasarlanan deney düzeneği.	42
Şekil 21. Deneylerde kullanılan Vevo 2100 deney hayvanlarına dedike ultrasonografi sistemi, üç boyutlu transducer konumlandırma sistemi ve deney hayvanı stabilizasyon tablası.	43
Şekil 22. (a) ATS Laboratories Model VP-3 Üç damar eğitim fantomu (b) ATS Laboratories Model 525 periferel vasküler doppler akım darlık fantomu.	43
Şekil 23. Ultrason kontrast maddelerin Akış Fantomu ile ekojenitelerinin tespiti için deney düzeneği.....	44
Şekil 24. Sıçan metabolizma kafesi.....	46
Şekil 25. Üç boyutlu konumlandırma sistemi ve sıçanda abdominal değerlendirme.	48

- Şekil 26.** Farklı DSPC:PEG₄₀St oranlarında hazırlanan içi hava dolu mikroköpükçüklerin (a) mikroskop görüntüleri, (b) boyut dağılımları, (c) üretim miktarları, (d) kümülatif boyut dağılımları, (e) ortalama boyutları..... 52
- Şekil 27.** Farklı DSPC:PEG₄₀St oranlarında hazırlanan içi PFC dolu mikroköpükçüklerin (a) boyut dağılımı, (b) üretim miktarları. 53
- Şekil 28.** DSPC:PEG₄₀St oranı 5:5 olan mikroköpükçük kompozisyonu için farklı toplam lipid miktarlarında hava, N₂, ve PFC gazlar ihtiva eden mikroköpükçüklerin (a) üretim miktarları (b) ortalama boyutları. 54
- Şekil 29.** Elde edilebilecek maksimum mikroköpükçük konsantrasyonun hesaplanması, (a) mikroköpükçük boyutuna göre, (b) toplam lipid miktarına göre..... 56
- Şekil 30.** Mikroköpükçük morfoloji çalışmalarında kullanılan floresan problemlerin moleküler yapısı ve %0.5 FITC-DHPE ve NBD-PC problemleri işaretlenmiş 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG₄₀St mikroköpükçüklerinin floresan mikroskop görüntüleri. 58
- Şekil 31.** %1 NBD-PC ilave edilmiş 9:1 Mikroköpükçüklerinin genel (a) optik mikroskop (b) birleştirilmiş optik-floresan mikroskop (c) floresan mikroskop görüntüleri 59
- Şekil 32.** DSPC:PEG₄₀St 5:5 mikroköpükçüklerinin farklı FITC-DHPE oranlarında (a) popülasyonun floresan mikroskop görüntüleri, (b) temsilen tek bir mikroköpükçüğün floresan mikroskop görüntüsü, (c) floresan boya konsantrasyonuna karşı normalize floresan ışık yoğunluğu verilerini gösteren grafik, 100X/1.25 objektif, pH=7.2. Beyaz oklar ile faz ayrımı başlangıcını ve lipidler arası birleşme ve topaklaşmaları gösterilmektedir. 61
- Şekil 33.** DSPC:PEG₄₀St 5:5 mikroköpükçüklerinin (a) farklı pH ve (b) farklı oranlarında FITC-DHPE boya yüklenmiş mikroköpükçüklerin yüksek pH=8.40 değerinde floresan mikroskop görüntüleri. 63
- Şekil 34.** Sabit FITC-DHPE boya konsantrasyonunda hazırlanmış DSPC:PEG₄₀St 5:5 mikroköpükçüklerin (a) farklı pH'larda alınmış orta düzlem (mid-plane) floresan görüntüleri, (b) farklı pH'larda ölçülen normalize floresan ışık yoğunluğu ve model Denklem-(27) ile karşılaştırılması. 65
- Şekil 35.** Farklı pH değerlerinde kullanılan FITC-DHPE boya konsantrasyonuna göre elde edilen "ortalama" normalize floresan ışık yoğunluğu..... 66
- Şekil 36.** Farklı DSPC:PEG₄₀St oranlarında mikroköpükçüklerin (a) genel floresan mikroskop görüntüleri (Büyütme: 40X) (b) mikroköpükçüklerin yüzey morfolojilerinin görüntüleri (Büyütme: 100X)..... 68

- Şekil 37.** Farklı DSPC:PEG₄₀St oranlarında mikroköpükçüklerin yüzey morfolojilerinin görüntüsü (Büyütme: 100X). 69
- Şekil 38:** % 0.5 FITC-DHPE içeren değişen DSPC/PEG oranlarındaki mikroköpükçüklerinin 100X/1.25 ve 63X/0.75 objektif ile alınan görüntülerinden hesaplanan normalize floresan yoğunlukları..... 70
- Şekil 39.** Bir Mikroköpükçüklerin 3 Boyutlu (3D) Floresan görüntüleri (büyütme: 100X)..... 71
- Şekil 40.** Bir mikroköpükçüğün 3 boyutlu (3D) floresan görüntüsünün farklı açılardan görünümü. Oklar lipid-emülsifiyer-boya kümeleşmelerini göstermektedir. (Büyütme: 100X). 72
- Şekil 41.** Bir mikroköpükçüğün 3 boyutlu (3D) floresan görüntüsünün farklı açılardan görünümü (a) X düzlemine göre alınmış z-stack görüntüsü (b) sola (c) sağa (d) aşağıdan yukarı (e) yukardan aşağı çevrilmiş hali. (Büyütme: 100X)..... 73
- Şekil 42.** 5:5 DSPC:PEG₄₀St mikroköpükçüğün yüzeyde (a) sınırlarla çevrili bölgelerin oluşumu, (b) floresan ışık yoğunluğu. (Büyütme: 100X) 74
- Şekil 43.** Mikroköpükçüklerin boyutları ve yüzey morfolojilerinin floresan mikroskop görüntüleri. (Büyütme: 100X) 75
- Şekil 44.** Mikroköpükçük yüzeyinde oluşan karanlık ve aydınlık bölgeler için önerilen mikroköpükçük yüzey morfolojisi oluşum mekanizmasının şematik çizimi. 77
- Şekil 45.** University of Pittsburgh Medical Center (UPMC)'de "Ultra Yüksek Hızlı Kamera Sistemi" ile kaydedilmiş video görüntüsü..... 78
- Şekil 46.** Yüksek hızlı kamera sisteminde ilk osilasyon esnasında farklı zamanlarda mikroköpükçüklerin boyutlarındaki küçülme ve büyüme hareketi. 79
- Şekil 47.** (a) 2.6 µm ve 1.6 µm boyutlarında 1 ve 2 No'lu mikroköpükçüklerin ultrason altında davranışlarının hızlı kamera görüntüsü, (b) 2.6 µm boyutunda 1 No'lu mikroköpükçüğün boyutlarında meydana gelen değişme ve osilasyon davranışı, (c) 1.6 µm boyutunda 2 No'lu mikroköpükçüğün boyutlarında meydana gelen değişme ve osilasyon davranışı. 81
- Şekil 48.** (a) 4.2 µm boyutlarında 3 No'lu mikroköpükçüğün ultrason altında davranışının hızlı kamera görüntüsü, (b) 4.2 µm boyutlarında 3 No'lu mikroköpükçüğün boyutlarında meydana gelen değişme ve osilasyon davranışı. 83
- Şekil 49.** (a) 4 No'lu mikroköpükçüklerin ultrason altında davranışlarının hızlı kamera görüntüsü, (b) 4 No'lu mikroköpükçüğün boyutlarında meydana gelen değişme ve osilasyon davranışı. 85
- Şekil 50.** (a) Mikroköpükçüklerin boyutlarında meydana gelen değişmelerin karşılaştırılması, (b) Mikroköpükçüklerin normalize edilmiş boyutlarında

- meydana gelen değişmelerin karşılaştırılması. 1. Mikroköpükçük birleşmesi, 2. Yapısal oryantasyon, 3. Mikroköpükçük çözünmesi ile boyutta küçülme, ve 4. Komşu mikroköpükçük ile temas ile esnek çarpışma sonucu sönümlenme davranışı..... 86
- Şekil 51.** (a) Farklı boyutlarda hava kabarcıklarının basınç ile boyutlarında meydana gelen değişmelerin mikroskop görüntüleri, (b) Farklı basınçlarda hava kabarcıklarının boyutlarında meydana gelen değişmeler..... 88
- Şekil 52.** Basınç ile hava kabarcıklarının davranışı 89
- Şekil 53.** Farklı basınçlarda ve farklı boyutlarda hava kabarcıklarının zamanla boyutlarındaki değişim. 90
- Şekil 54.** Lipid mikroköpükçüklerin basınç altında davranışları. 91
- Şekil 55.** Lipid mikroköpükçüklerin 0.11 bar basınç altında davranışları. 92
- Şekil 56.** Lipid mikroköpükçüklerin 0.19 bar basınç altında davranışları, (a) basınç, (b) zamanla mikroköpükçük sayısı ve boyutlarında değişim, ve (c) mikroköpükçüklerin ışık, floresan, ve birleştirilmiş mikroskop görüntüleri..... 93
- Şekil 57.** Mikroköpükçüklerin kısa süreli basınç pulslarında davranışları, (a) basınç değişimi, (b) zamanla mikroköpükçük sayısı ve boyutlarında değişim, ve (c) mikroköpükçüklerin ışık, floresan, ve birleştirilmiş mikroskop görüntüleri..... 94
- Şekil 58.** Farklı frekanslardaki problemler için ölçülen odak noktaları 95
- Şekil 59.** (a) Tampon çözelti dolu boruda tipik genlik profili, (b) Çıkış gücü 10 dB'de farklı alıcı güçlerinde tampon çözelti ve boru duvarından ölçülen genlik değerleri ve oranlar , (c) Farklı çıkış gücü değerlerinde boru içerisinde farklı alıcı güçlerinde tampon çözeltide ölçülen genlik değerleri, (d) Tampon çözeltisinin farklı çıkış ve alıcı güçlerde ölçülen maksimum genlik değerleri ve oranlar. 97
- Şekil 60.** (a) Ultrason altında A-scan modda mikroköpükçüklerin karakterize edilmesi, (b) Hava, tampon çözelti, ve mikroköpükçüklerin B-scan modda görüntülenmesi..... 98
- Şekil 61.** (a) Mikroköpükçüklerin boru içerisinde yükselmesini gösteren fotoğraf kareleri. (i) FTÇ tampon çözelti, (ii) mikroköpükçük solüsyonunun enjekte edildiği anki görüntü, (iii) enjekte edildikten 2 dakika sonraki görüntü, (iv) enjekte edildikten 5 dakika sonraki görüntü, (b) zamanla boru içerisinde yukarı doğru çıkan mikroköpükçüklerin genlik değerlerindeki azalma, (c) mikroköpükçüklerin maksimum genlik değerleri, borunun ön duvarından yansıyan genlik değeri, ve bunların birbirine oranlarının zamanla değişimi.. 100

- Şekil 62.** (a) Mikroköpükçükler için A-scan mod kalibrasyon grafiği, (b) A-scan mod kalibrasyonda yüksek konsantrasyonda mikroköpükçük konsantrasyonun logaritması arasında doğrusal ilişki. 101
- Şekil 63.** (a) 1 MHz'lik, (b) 2 MHz'lik, ve (c) 4 MHz'lik frekansta farklı çıkış güçlerinde kalibrasyon eğrileri. 103
- Şekil 64.** (a) Peristaltik pompa ile kapalı devre sirküle edilen mikroköpükçüklerin B-mod görüntüsü (b) Peristaltik pompa ile sürekli modda zamana karşılık stabilite grafiği, (c) Peristaltik pompa ile 8.1 ml/dk akış hızında mikroköpükçüklerin stabilitesinin zamana bağlı değişim grafiği. 105
- Şekil 65.** Farklı akış hızlarının mikroköpükçüklerin stabilitesine etkisi. 106
- Şekil 66.** Farklı dB'lerin stabiliteye etkisi. 107
- Şekil 67.** Mikroköpükçüklerin stabilitelerinin belirlenmesinde kullanılan peristaltik pompa döner aksamının mikroköpükçükleri ezdiğinin göstergesi. Beyaz ok ile ezilen mikroköpükçüklerden arta kalan lipid agregatları görülmektedir. 108
- Şekil 68.** (a) Küvette sadece FTÇ var iken küvetin ön ve arka yüzeyinden geri yansıyan ses dalgalarının görüldüğü sinyal pikleri, (b) mikroköpükçük atanüasyon kalibrasyon grafiği. 109
- Şekil 69.** Farklı frekanslarda mikroköpükçük kalibrasyon grafikleri, (a) konsantrasyona-genlik değerleri, (b) konsantrasyona-atenüasyon değerleri. 110
- Şekil 70.** Farklı (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; ve 5:5) kompozisyonlarda mikroköpükçüklerin ultrason altında zamanla konsantrasyon ve atenüasyon katsayısındaki değişim. 112
- Şekil 71.** Farklı kompozisyonda mikroköpükçükler ultrason altında stabilitelerinin karşılaştırılması. 113
- Şekil 72.** Ekojenite-zaman grafiğinde ilk pik, akışta önde gelen ve yüzeydeki mikroköpükçükleri temsil etmektedir. Ardından oluşan düşük ekojenitedeki kısa plato yoğun mikroköpükçüklere ait gölge ve atenüasyonu temsil etmektedir. Daha sonrasında konsantrasyonun düşmesi ile atenuasyon oluşturmayan ancak yüksek konsantrasyondaki mikroköpükçüklerden veri alınabilmekte ve ikinci bir pik izlenmektedir. 115
- Şekil 73.** Bolus enjeksiyon yöntemi için hesaplama metodu geliştirilmesi, (a) model düzenek, (b) elde edilen deneysel intensite-zaman eğrileri. 115
- Şekil 74.** (a) Farklı bolus enjeksiyon hacimlerinde Vevo2100 ile elde edilen zaman-intensite eğrileri, (b) farklı akış hızlarında bolus enjeksiyon için elde edilen zaman-intensite eğrileri, (c) farklı konsantrasyonlarda bolus enjeksiyon için elde edilen zaman-intensite eğrileri, (d) farklı mikroköpükçük

- kompozisyonlarında bolus enjeksiyon için elde edilen zaman-intensite eğrileri. Düz çizgi ile gösterilen eğriler model denklem eğrileridir. 118
- Şekil 75.** Farklı koşullarda bolus enjeksiyon sonucu elde edilen AUC ve MTT parametrelerinin (a) farklı bolus enjeksiyon hacimlerinde (b) farklı akış hızlarında, (c) farklı konsantrasyonlarda, ve (d) farklı mikroköpükçük kompozisyonlarında bolus enjeksiyon için değerlendirilmesi. 119
- Şekil 76.** (a) AUC ve (b) MTT değerlerinin ölçülen tüm parametreler için birlikte değerlendirilmesi. 120
- Şekil 77.** DSPC:PEG₄₀St 9:1 mikroköpükçükleri için farklı konsantrasyonlarda farklı bolus hacmi ve farklı akış hızları için AUC değerleri. 121
- Şekil 78.** Farklı konsantrasyonlarda DSPC:PEG₄₀St 9:1 mikroköpükçükleri için (a) elde edilen eğim değerleri (b) aynı mikroköpükçük için ölçülen eğim değeri. 122
- Şekil 79.** (a) Ölçülen mikroköpükçük konsantrasyonuna ile hesaplanan mikroköpükçük konsantrasyonunun arasındaki sapmalar, (b) Ölçülen mikroköpükçük konsantrasyonuna ile ultrason yöntemi ile hesaplanan mikroköpükçük konsantrasyonunun karşılaştırılması, (c) farklı formülasyonlarda hazırlanmış ultrason kontrast maddesi mikroköpükçükler için elde edilen Eğri Altındaki Alan (AUC) ile hesaplanan mikroköpükçük konsantrasyonları. 124
- Şekil 80.** Mikroköpükçüklerin konsantrasyonlarının logaritması AUC ile doğru orantılıdır. 125
- Şekil 81.** Farklı kompozisyonda mikroköpükçüklerin ekojenitesi. 126
- Şekil 82.** Karaciğer dokusuna ex-vivo enjekte edilen ultrason kontrast maddesi ile ölçülen ekojenite artışı. 129
- Şekil 83.** Tavuk göğsü 16 mm derinliğe uygulanan enjeksiyonda yapılan ölçümde enjeksiyon hızına bağlı hızlı bir ekojenite artışı ve sonrasında azalarak plato çizen eğri izlenmektedir. Zamana bağlı ekojenite değişikliğini gösteren grafikte pik ekojenite değeri sonrasında ekojenitenin plato çizdiği düzeye dek ekojenite azalması; programın yazılım özelliklerine ve ex vivo dokuda enjeksiyon bölgesi dışına sızarak alandan temizlenen mikroköpükçüklere sekonder olarak değerlendirilmiştir. Sonrasında plato çizen eğrinin plato fazı ise görüntü düzleminde sebat eden ve ve akım olmadığı için temizlenmeyen mikroköpükçükleri göstermektedir. 130
- Şekil 84.** Patlayan mikroköpükçüklere ait zaman intensite eğrisi çizdirildiğinde yukarıdaki rafikte izlendiği gibi en fazla ilk uygulama sonrasında ekojenite azalması saptanmaktadır. Diğer patlatma uygulamaları arasındaki fark ise güçlülükle seçilebilecek düzeydedir. 131



- Şekil 85.** Zaman ekojenite ağrisinde mikroköpükçük uygulaması sonrasında ROI çizilen hedef alanlarda belirgin ekojenite artışı saptanmıştır..... 133
- Şekil 86.** Böbrek parankimi korteks düzeyine yerleştirilen ROI'ler izlenmektedir. 136



Özet

Ultrasonografi tıpta yaygın olarak kullanılan tanı yöntemlerinden biridir. Ancak, ultrasonografide bazı durumlarda görüntü kalitesi istenen düzeyde değildir. Görüntünün daha net ve açıklayıcı olabilmesi için ultrason kontrast maddesi mikroköpükçüklerin kullanılması gerekmektedir. Bu çalışmada, 2010-2012 yılları arasında TÜBİTAK tarafından desteklenen 109M494 nolu proje kapsamında geliştirilen farklı kompozisyonda ilk yerli üretim mikroköpükçüklerin morfoloji ve ultrason altında *in-vitro* ve *in-vivo* stabiliteleri araştırılmıştır. Floresan mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, her bir mikroköpükçüğün kendine özgü yüzey kompozisyonuna ve yüzey morfolojisine sahip olduklarını gösterilmiştir. Gözlenen yüzey morfolojilerinin mikroköpükçüklerin üretim aşamasından görüntüleme anına kadar geçen sürede olduğu kanaatine varılmıştır. Mikroköpükçüklerin yüzeyinde monotabaka yapısı yanında kümelenmiş moleküllerin de olduğu bölgeler tespit edilmiştir. Mikroköpükçük formülasyonlarına eklenen PEG₄₀St miktarı ile mikroköpükçüklerin ekojenitelerinde artış olduğu saptanmış; ancak, mikroköpükçüklerin yüzeylerinde PEG₄₀St miktarı arttıkça mikroköpükçüklerin ultrason altında stabilitelerinin azaldığı bulunmuştur. Mikroköpükçüklerin ultrason ile konsantrasyonlarının tespit edilebilmesi için yöntem geliştirilmiştir. Mikroköpükçüklerin, sıçan ve tavşan modellerinde *in-vivo* uygulamalarında, dolaşıma verilen mikroköpükçüklerin stabil olarak akciğer bariyerini geçebildiği, kalp tarafından arterial sistemik dolaşıma pompalanarak aortada ekojenite oluşturabildiği, ve vasküler yatağın tüm alanlarını doldurabildiği gösterilmiştir. Ticari mikroköpükçük olan Vevomarker® ile karşılaştırmalarda, araştırma kapsamında geliştirilen mikroköpükçüklerin mukayese edilebilir düzeyde oldukları gösterilmiştir.



Abstract

Ultrasonography is a one of the widely used diagnostic modality in medicine. The image quality of the ultrasound however, under some circumstances, is not at the desired level. It is need to use microbubbles as ultrasound contrast agent in order the images to be neat and in high resolution. In this project, it was investigated the surface morphology and in-vitro and in-vivo stability of the microbubbles of different compositions under ultrasound, which was developed through a project funded by The Scientific and Research Council of Turkey (TUBITAK) with a project number of 109M494 between years of 2010-2012. In fluorescence microscopy studies, it was shown that each microbubble has its own composition and surface morphology. It was concluded that the observed morphologies have formed during the period from their manufacture to imaging. It was shown that there were domains composed of not only monolayer but also aggregated molecules on the surface. With the increase in the amount of PEG₄₀St added to the microbubble formulation, it was observed an increase in echogenicity, but decrease in stability of the microbubbles under ultrasound. It has been developed a method to determine the concentration of microbubbles via ultrasound. In in-vivo studies of rat and rabbit models, it has been shown that, when these agents has been injected into systemic circulation, these microbubbles can pass pulmonary barrier, create echogenicity in the aorta when pumped into the arterial systemic circulation by the heart and fill all areas of the vascular bed. The developed microbubbles were found to be comparable with the commercial Vevomarker® microbubbles.



1. GİRİŞ

Ultrasonografi tıpta tanısal radyolojik yöntem olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Hemen her hastanede bulunması sebebiyle ultrason temel görüntüleme yöntemi olarak yaygın bir kullanıma sahiptir. Ancak, bazı durumlarda, amaçlanan bölgeyi çevreleyen dokulardan gelen arka plan sinyaller, yöntemin hassasiyetini azaltmakta, ve böylece, net bir görüntü elde edilememektedir. Doğru teşhis için görüntü kalitesinin iyileştirilmesi yönünde, yeni ve kullanışlı yöntemler geliştirilmesi önem arz etmektedir. İçeri gaz dolu küresel bir monotabakadan oluşan mikroköpükçüklerin görüntüleme kullanılması bu yöntemlerden bir tanesi olabilir.

Görüntüleme esnasında sistemik dolaşıma enjekte edilen ultrason kontrast ajanı mikroköpükçükler, kontrast yaratarak, elde edilen görüntünün netliğini, kalitesini, ve çözünürlüğünü artırmaktadırlar. Böylece, olabildiğince çok hastalığa daha erken ve net bir tanı konulması mümkün olabilmektedir (Moriyasu ve Itoh 2009). Ayrıca, bu ajanların belirli bir intravasküler hastalık reseptörüne duyarlı antikör (antibody-Ab) veya ligandlarla hedeflendirilmeleri durumunda, incelenen dokuda mikroköpükçüklerin tutunması sonucu gerçek zamanlı hedeflendirilmiş görüntüleme (real-time targeted imaging) yapılabilmektedir (Dayton ve Ferrara 2002, Villanueva vd. 2007). Bunların yanında, hedeflendirilmiş ajanlar tedavi/terapötik amaçlı olarak, ilaç, gen, enzim, DNA, vs. ile yüklenerek, lokal madde transferinde kullanılabilmektedir (Wang vd. 2009). Üstelik, ultrasonografi bu ajanlar ile birlikte, hücre duvarında geçici gözenekler oluşturarak (sonoporasyon) ilaç, gen, DNA gibi biyolojik moleküllerin hücre içine alınmasını daha da kolaylaştırmaktadır (Van Wamel vd. 2006). Mikroköpükçüklerin bu ve benzeri amaçlarla kullanımı stabil ve robast mikroköpükçüklerin tasarımı ve üretimi ile mümkün olabilmektedir.

2010-2012 yılları arasında TÜBİTAK tarafından desteklenen 109M494 No'lu ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin geliştirilmesi projesinde, ilk yerli üretim ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin üretimi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, yerli üretim mikroköpükçüklerin ultrason altında *in-vitro* ve *in-vivo* davranışlarının karakterize edilmeleri amaçlanmıştır.

Mikroköpükçükler, medikal görüntüleme kullanılan önemli kontrast ajanlardır ve hedeflenmiş ilaç salınımı için taşıyıcı rolünü üstlenirler. Mikroköpükçükler fizyolojik bir sıvı içinde dağıtılmış mikron boyutlarındaki gaz kabarcıklarının bir fosfolipid tabakası ile enkapsülasyonu sonucu oluşmaktadır. Gerek ultrason altında moleküler görüntüleme, gerekse ilaç yüklenerek terapötik amaçlı kullanılabilmeleri için mikroköpükçüklerin stabil olmaları gerekmektedir. Mikroköpükçüklerin stabiliteilerinin iyileştirilmesinde gaz seçiminin önemli olduğu gösterilmiştir.(Schutt vd. 2003) Yapılan pek çok çalışmada,

mikroköpükçüklerin merkezinde yer alan gazın fizyolojik sıvı içinde çözünmeyen yada kısmen daha az çözünebilir özellikte olması ile bağlantılı olarak stabilitenin iyileştirilebildiği düşünülmektedir.(Gerber vd. 2006) Mikroköpükçük stabilitesini etkileyen diğer bir parametre ise gazı enkapsüle eden lipid tabakasının yoğunluğudur. Hali hazırda mikroköpükçüklerin oluşumunda doymuş açil zinciri içeren bir fosfokolin ve emülsifiyer %90-%10 mol oranlarında kullanılmaktadır ve mikroköpükçük yüzeyinde homojen bir şekilde dağıldıkları ve yüzey kompozisyonun karışım kompozisyonu ile aynı olduğu kabul edilmektedir(Borden vd. 2006). Ancak, mikroköpükçüklerin mikroyapısı ve stabiliteyi ile ilişkisi üzerine çalışmalar bilginiz dahilinde yeterli değildir. Bu çalışmada, mikroköpükçüklerin mikroyapısının statik ve dinamik şartlarda incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, değişen kompozisyonlarda fosfolipid ve emülsifiyer kullanılarak, mikroköpükçükler oluşturulmuş ve mikroyapıları floresan mikroskopu ile nitel ve nicel olarak analiz edilmiştir.

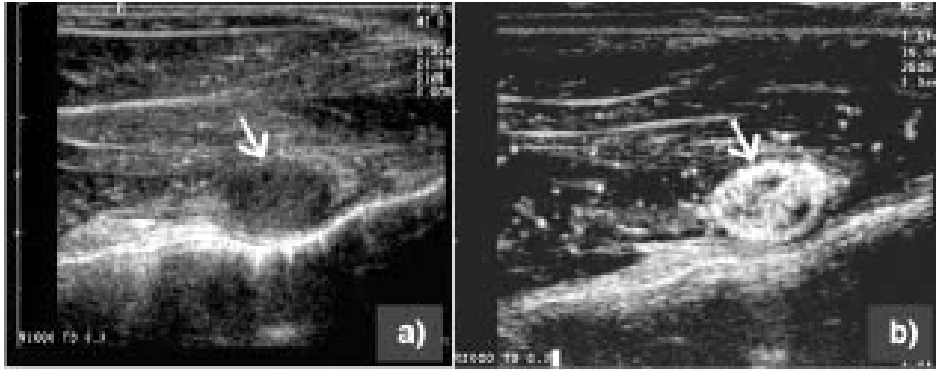
Literatürde, ultrason kontrast ajanlarının moleküler teşhis ve görüntüleme üzerindeki etkinliğine işaret eden klinik çalışmaların sayısının günden güne artmaktadır. Bu, bu alanda önemli buluşların olacağını göstermektedir. Ancak, ürün tasarımı konusunda çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalar daha çok mevcut bir ticari mikroköpükçük türünün ultrason altındaki uygulamalarda performanslarının anlaşılması üzerinedir. Mikroköpükçüklerin ultrason altında kararlılıklarının düşük olduğundan daha kararlı mikroköpükçüklerin tasarımlarının ve üretimlerinin yapılması gerekmektedir.

Ultrasonografik kontrast maddeler görece daha yenidir. Kontrast maddeler manyetik rezonans (MR) ve bilgisayarlı tomografi (BT) gibi diğer görüntüleme yöntemlerinde olası patolojilerin saptanması ve tanınması için sıklıkla kullanılmaktadır. ABD ve Avupanın bazı ülkelerinde genel kullanım izni almış SonoVue®, Optison®, Vevomarker® gibi birkaç ultrason kontrast ajanı mevcuttur. Ülkemizde ultrasonografik kontrast madde ithal edilerek kullanılabilir durumdadır ancak maliyetinin yüksek oluşu ve düzenli ithali olmaması sebebiyle ülkemizde pratikte kullanımı yoktur. Ülkemizde yerli üretim ve ucuz bir ultrasonografi kontrast maddesinin bulunmaması bu durumun sebeplerinden biri olarak belirtilebilir. Bağlantılı olarak, ülkemizde bu konuda yapılan çalışma sayısı oldukça kısıtlı olup literatürde yer alan çalışmalar ultrason kontrast maddesi üretimi bulunan ülkelerin hakimiyeti altında görünmektedir. Ucuz ve yerli üretim ultrason kontrast maddesi varlığında bu konuda yapılan çalışmaların artması ve oluşan yerli literatüre bağlı olarak rutin kullanım imkanı doğması beklenmektedir.

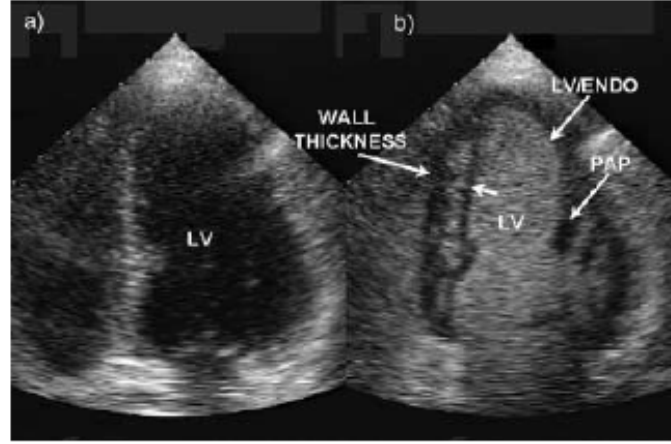
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Ultrason Kontrast Ajanı Mikroköpükçükler

Ultrasonografi vücudun birçok alanına uygulanabilen temel radyolojik tanı yöntemlerinden birisidir. 1970'li yıllarda kliniğe girmeye başlayan ultrasonografinin, vücut organlarının görüntülenmesi ve hastalık tanısının konmasındaki kullanımı giderek artmaktadır. Ayrıca, rutin kullanımda bilinen yan etkisi olmadığı için, bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans (MR), ve anjiyografi gibi diğer radyolojik görüntüleme yöntemlerine kıyasla ultrason daha sık tercih edilmektedir. Ultrasonda görüntü, transduserden gönderilen ses dalgalarının geriye yansımaları sonucu oluşur. Ancak, bazı durumlarda çevre dokulardan gelen arka plan sinyalleri ile, akustik dirençleri birbirine yakın dokulardan gelen sinyaller, yöntemin hassasiyetini azaltmakta, doğru teşhis için yeterince net bir görüntü elde edilememektedir (Klibanov 2002). Bu da tanının konmasını güçleştirebilmekte ve/veya yanlış tanıların konmasına sebebiyet verebilmektedir. Görüntüleme esnasında sistemik dolaşıma enjekte edilen ve kan dolaşım sistemi ajanları (blood pool agents) olarak bilinen ultrason kontrast ajanları (mikroköpükçükler), ekojenik olup çevre dokulardan gelen akustik sinyallerden daha farklı frekanslarda ultrason dalgaları yayarak kontrast yaratmakta; dolayısıyla, Şekil 1 ve Şekil 2'de görüldüğü üzere, elde edilen görüntünün netliğini, kalitesini ve çözünürlüğünü artırmaktadırlar (Schutt vd. 2003). Ultrason kontrast ajanları, mikron boyutunda küresel bir monotabaka içerisine hapsedilmiş gazlardan oluşmaktadır.



Şekil 1. Bir tavşanın kalçasında oluşan tümörün ultrason kontrast ajanı enjekte edilmeden önce (a) ve sonra (b) görüntüsü. Kontrast ajanı enjekte edildiğinde tümörün varlığı daha net bir şekilde görülebilmektedir (Schutt vd. 2003).



Şekil 2. Bir hastanın kalp sol ventrikülünün (LV) ultrason kontrast ajanı enjekte edilmeden önce (a) ve sonra (b) görüntüsü. Sol ventrikül, endokardiyal border ve papiller kaslar, kalp kaslarında meydana gelen kasılmalar kontrast ajanının varlığında daha net görüntülenebilmektedir. Normal çalışan bir kalpte kasılma sırasında kalp kasları duvarlarında kalınlaşma olurken, abnormal bir kalpte kalınlaşma olmamaktadır (Schutt vd. 2003).

Mikroköpükçüklerin ultrason görüntülemeye kullanılması hikayesi ilginçtir: Bundan yaklaşık 30-40 yıl önce, bir tesadüf eseri fizyolojik olarak kabul edilebilir bir maddenin sudaki çözeltisinin iyice çalkalanıp vücuda enjekte edilmesiyle elde edilen serbest hava kabarcıklarıyla görüntü kalitesinde elde edilen iyileşme, gaz/hava kabarcıklarının ultrasonda kontrast yaratmak ve dolayısıyla görüntünün çözünürlüğünü artırması, bu alanda atılan adımların ilki olmuştur (Nanda vd. 1976). Fakat oluşan gaz kabarcıkları vücutta yeteri kadar stabil olarak kalamadıkları için çok kesin bir çözüm olamamıştır. Gaz kabarcıklarının amfifilik lipitler, polimerler, veya denature edilmiş protein bazlı bir monotabaka (shell) içerisine hapsedilmek suretiyle vücuda enjekte edilmesi ultrason kontrast ajanlarının etkin bir şekilde kullanımı için bir çözüm olarak önerilmiştir. Epstein-Plesset teorisine göre (Epstein Ps 1950) bu monotabaka hem gaz-sıvı yüzey gerilimini düşürmekte ve hem de gazın sıvı içine difüzyonuna karşı direnç göstermektedir. O zamandan bu yana değişik gaz veya gaz karışımları (hava, nitrojen, oksijen, SF₆, ve florlanmış hidrokarbon gazları (C₃F₈, C₄F₁₀, C₅F₁₂ gibi) ve monotabaka materyali kombinasyonlarından oluşan kontrast ajanları tasarlanmış ve üzerinde *in-vivo* ve *in-vitro* testler yapılmıştır. Ancak, yapılan çalışmalarda denature olmuş protein ve polimerden oluşan mikroköpükçüklerde, elastik olmamalarından dolayı çevreleyen tabakada sonik etki ile yarılmaları olmuş ve dolayısıyla, gazın hızlı bir şekilde difüzyonla mikroköpükçüklerden ayrıldığı gözlenmiştir (Chomas vd. 2001, Leong-Poi vd. 2002, Bloch vd. 2004). Ayrıca, polimer ve proteinler yeterince elastik olmadıkları için polimer ve

proteinlerden oluşan mikroköpükçüklerin daha az ekojenik oldukları kanaatine varılmıştır. Halbuki, lipid molekülleri gaz etrafında elastik bir tabaka oluşturarak gazın ultrason altında kolaylıkla rezonans edebilmesine olanak sağlamaktadır; dolayısıyla lipid bazlı mikroköpükçükler oldukça ekojeniktir. Üstelik, lipid bazlı mikroköpükçükler endotel hücrelere yapışmadan kanda serbestçe akabildiğinden *in-vivo* uygulamalarda tercih edilmektedir. Lipid bazlı mikroköpükçüklerin diğer bir avantajı ise, ilaç, gen, ve DNA transferinde kullanılmak üzere mikroköpükçüklerin belli bir hastalık reseptörüne özgü ligand veya antikorlarla işaretlenerek hedeflendirilmeleri daha kolaydır (Borden vd. 2004) .

Moleküler teşhis ve görüntüleme ve hatta ilaç, DNA ve gen gibi lokal madde transferinde etkin bir şekilde kullanılabilmesi için kontrast ajanlarının uzun süreli kararlı (stabil) ve maksimum akustik sinyal için elastik olmaları gerekmektedir (Schutt vd. 2003, Ferrara vd. 2007, De Jong vd. 2009). Ajanların kana enjekte edildikten sonra yok olmasına sebep olan mekanizmanın tam olarak ne olduğu henüz bilinmemektedir. Fakat üzerinde birleşilen genel kanı gazın çözünerek kana karışmasıdır (Kabalnov vd. 1998, Kabalnov vd. 1998). Stabil, robast mikroköpükçüklerin tasarımı konusunda akla ilk gelen iki yaklaşımdan biri düşük çözünürlüklü gazlar kullanmak, diğeri ise çekim kuvvetlerinin yüksek olduğu (kohesif) bir tabakanın yeniden tasarlanmasıdır. Hava'nın sudaki çözünürlüğü perflorakarbon gazlarına kıyasla daha yüksektir. Dolayısıyla, perflorakarbon gazları ile elde edilen mikroköpükçüklerin daha uzun süreli olarak kan dolaşımında kalabilmeleri beklenebilir. Nitekim yapılan deneysel çalışmalarda bu gözlenmiştir (Schutt vd. 2003). Örneğin, ticari olarak ilk etapta Alunex® adı altında üretilen içleri hava dolu insan albumin'den üretilen mikroköpükçükler, daha sonra Optison® adı altında içleri oktafluoropropan gazı ile dolu olarak üretilmiş olup yarı ömürlerinde iyileşme olduğu belirtilmektedir (Mayer ve Grayburn 2001).

İdeal bir kontrast ajanından beklenen minimum dozda kullanım ile görüntüleme işleminin tamamlanmasıdır. Bu durum, mikroköpükçüklerin ekojenitelerinin yüksek olmasının yanısıra stabil olmalarını da gerektirmektedir. Minimum doz aynı zamanda uygulama maliyetini de düşürmektedir. Klinik uygulamalarda mikroköpükçüklerin henüz rutin olarak kullanılmama sebeplerinin başında, mikroköpükçüklerin sınırlı yarı ömre sahip olmasıdır. Bu, tekrar tekrar kontrast ajanının enjeksiyonunu gerektirmektedir.

Literatürde, mikroköpükçüklerin ultrason altında kullanımlarının avantajlarına işaret eden çok sayıda çalışma mevcuttur. Öte yandan, mikroköpükçüklerin geliştirilmesi daha çok ticari amaçlı olarak firmalar tarafından yapılmaktadır. Literatürde rapor edilen klinik çalışmaların çoğunda ticari olarak geliştirilen ya da geliştirilmekte olan mikroköpükçükler kullanılmaktadır. Firmalar, geliştirmekte oldukları mikroköpükçükleri ticarileştirmek için FDA gibi ilgili ilaç dairesinin onayını almak zorunda olduklarından gerekli testleri yaptırmak

amacıyla araştırma hastanelerine başvurumaktadırlar. Bu durumda, bazı mikroköpükçüklerin formülasyonları gizli tutulmaktadır.

Bir derleme makalede, ticari amaçlı geliştirilmiş ya da geliştirilmekte olan kontrast ajanlarının özellikleri ve kullanımları ile ilgili bilgiler özetlenmiştir (Mayer ve Grayburn 2001). Burada görüleceği üzere, geliştirilen mikroköpükçüklerin stabiliteleri oldukça düşüktür. Örnek vermek gerekirse, FDA onayı almış olan ve ticari olarak piyasada mevcut olan Definity® homojenize edilmiş bir lipid çözeltisi ve çözelti üzerinde oktafluropropan gazı içeren özel flakonlarda kullanıcıya ulaşmaktadır. Hastaya tatbik öncesinde dental uygulamalarda kullanılan yüksek devirli bir cihaz ile çözelti agitasyon edilerek mikroköpükçükler oluşturulmaktadır. FDA tarafından kalbin sol ventrikülünü görüntülenmesi için onaylanmış olan Definity® mikroköpükçüklerinin bir bolus enjeksiyonu ile sadece 5 dakika görüntüleme yapılabilmektedir (Williams vd. 2011). Diğer bir FDA onaylı kontrast ajanı olan Optison®'da oktafluropropan gazı denatüre edilmiş insan serum albümin ile stabilize edilmiştir ki, burada zar matris formunda olup kovalent bağlar içermektedir. Optison® mikroköpükçükleri istem dışı kan damarlarında hücre duvarlarına yapışmaktadırlar ve yaklaşık yarı ömürleri 31-78 saniyedir (Mayer ve Grayburn 2001). Üstelik zar tabakadaki kovalent bağlar nedeni ile polimer mikroköpükçüklerinde olduğu gibi ekojeniteleri oldukça düşüktür (De Jong vd. 2009). Avrupa'da kullanımı onaylanan kontrast ajanı SonoVue®, kalbin sol bölümünün görüntülenmesi için uygundur. Başlıca Palmitik asit, DSPC, ve DPPG'den oluşan lipid çözeltisinin dondurularak kurutulmasıyla elde edilen toz formundaki SonoVue® mikroköpükçükler, ardından sülfür hekzaflorid gazı ile doldurularak özel küçük flakonlarda saklanır. Hastaya uygulanmadan önce farmasötik olarak kabul edilebilir bir sıvı ile yeniden süspansiyon formuna dönüştürülen SonoVue® mikroköpükçükler hastaya görüntüleme amaçlı olarak tatbik edilir. SonoVue® bayanlarda 7 dakika, erkeklerde 5 dakikalık bir yarı ömüre sahiptir (Mayer ve Grayburn 2001).

Mulvana ve ark.(Mulvana vd. 2011) tarafından yapılan bir çalışmada SonoVue® mikroköpükçüklerin akustik davranışlarında sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Ultrason altında SonoVue® mikroköpükçüklerin 25 milisaniye içinde oda sıcaklığında osilasyonu sırasında küresel formunu koruyabildiği, fakat vücut sıcaklıklarında zar yapısının bozulduğu hatta çöktüğü gözlenmiştir. Diğer bir geliştirilmekte olan Imagent® kontrast ajanı, içlerisinde perfluroheksan/hava içeren lipid bazlı mikroköpükçüklerden oluşmaktadır. Imagent mikroköpükçükleri ile kalbin ventrikül odacıklarında ortalama 2.6 dakikalık bir görüntüleme yapılabildiği bilinmektedir. Borden ve ark. tarafından değişik hidrokarbon uzunluklarında kolin içeren fosfolipid ve emülsifiyer olarak polietilen oksit konjüge edilmiş yağ asitinden oluşan sıvı içinde süspanse edilmiş formda hazırlanmış mikroköpükçükler ile ilgili çok sayıda çalışmaya rastlanmaktadır (Borden ve Longo 2002, Borden ve Longo 2002, Borden vd. 2003, Borden vd. 2004, Borden vd. 2004, Borden vd. 2005, Borden vd. 2005, Borden vd.

2006). Bu çalışmalarda daha çok mikroköpükçükleri oluşturan zar yapının faz davranışları incelenmiştir. Bu mikroköpükçüklerin ultrason altındaki davranışları ilgili olarak sınırlı sayıda çalışma vardır (Borden vd. 2006). Cox ve ark. tarafından yapılan çalışmada fosfolipidlerin kuyruk kısmındaki hidrokarbon zincirinin doymunluk derecesinin ultrason altındaki davranışları incelenmiştir (Cox ve Thomas 2010). Genel olarak, 10 mikron ve üzerindeki boyutlarda fosfolipidin hidrokarbon zincirindeki doymunluk derecesinin ultrason altında bir fark yaratmadığı, fakat 2-10 mikron arası boyutlardaki mikroköpükçüklerde, hidrokarbon zincirde doymamış bağ içeren fosfolipidlerden oluşan mikroköpükçüklerin ultrason altında boyutlarının hızla düştüğü görülmüştür.

Proje yürütücüsünün daha önceki içinde bulunduğu bir çalışmada (University of Pittsburgh Medical Center-Cardiovascular Institute, ABD), değişik formulasyona sahip, deka-florakarbon gazı (n-C₄F₁₀) içeren mikroköpükçükler hazırlanmış ve bunların intra-vital mikroskobu kullanılarak in-vivo farmakokinetik davranışları incelenmiştir (Kilic vd. 2005, Villanueva vd. 2007). Mikroköpükçüklerin farmakokinetik davranışları ve ultrason altındaki ekojeniteleri birbirinden farklılık göstermiş ve buradan, monotabakanın bileşiminin mikroköpükçüklerin özelliklerini yakından etkilediği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmalarda FDA onaylı olan Definity® ve Optison® mikroköpükçükleri karşılaştırma amacı ile kullanılmıştır ve mikroköpükçüklerin hem ekojenite hemde yarı ömür olarak Definity® ve Optison® mikroköpükçüklerinden daha üstün performansa sahip oldukları görülmüştür (Kilic vd. 2005, Villanueva vd. 2007). Daha önceki yapılan çalışmalardan, mikroköpükçüklerin in-vivo stabilitesini etkileyen parametreler arasında, gazın zardan difüzyonlanması, mikroköpükçükleri oluşturan zar yapının ultrason altında mekanik olarak bozunması ve karaciğer ve dalakta retikülendotel sistem tarafından bertaraf edilmeleri gösterilmektedir. Mor-Avi ve ark. (Moravi vd. 1997) tarafından yapılan bir çalışmada, Albunex® mikroköpükçüklerinin stabilitesinin hem artan sıcaklıkla hemde akustik etki ile azaldığı gözlemlenmiştir. Albunex® ile aynı zar materyaline sahip perfluorakarbon gazı ihtiva eden mikroköpükçüklerin ise sıcaklık ve akustik etkiden daha az etkilendikleri gözlemlenmiştir.

Ultrason kontrast ajanları yeni bir konsept olup, ürün tasarımı ve geliştirilmesi önemli araştırma konularındandır. Konu ile ilgili literatürde büyük boşluklar bulunmaktadır. Literatürde farklı kontrast ajanlarının etkinliğini ve özelliklerini araştırmaya yönelik giderek artan sayıda *in-vivo* "klinik" çalışmaya rastlanmaktadır (Davidson vd. 2010, Fu vd. 2011, Bettinger vd. 2012, Inaba ve Lindner 2012, Khanicheh vd. 2012, Sorace vd. 2012). Ancak, bu klinik çalışmaları yapan araştırmacılar genelde klinisyenler olup, ürün tasarımı konusuyla ilgilenmemekte, daha çok firmalar tarafından geliştirilmekte olan ajanların moleküler görüntülemelerde kullanılıp kullanılmıyacağı ve etkinliği konularında araştırmalara yoğunlaşmaktadırlar. Bu amaçla, test edilen kontrast ajanları geliştiren firmadan temin edilmektedir. Öte yandan, ürün tasarımı ile ilgilenen araştırmacılar ise, ürünün fizyolojik

uygulamaları konusunda bilgi birikimi konusunda yetersiz kalmaktadırlar. Dolayısı ile, özellikli mikroköpükçüklerin geliştirilmesi ile ilgili çok disiplinli çalışmalar gerekmektedir.

Ultrason kontrast ajanlarının hastalık teşhis ve tedavisinde kullanımına yönelik çalışmaların sayısı literatürde günden güne artmaktadır. Bu, büyük bir pazar potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Ultrason kontrast ajanları ülkemizde yeni bir konsept olup, ürün geliştirilmesi konusunda **Tablo 1**' de görüldüğü üzere, ABD ve Avrupa'da girişimler mevcuttur.

Tablo 1. Geliştirilmiş/Geliştirilmekte olan Ultrason Kontrast Ajanı Mikroköpükçükler(Alzaraa vd. 2012)

Microbubble	Company	Shell	Gas	Size, μm	Charge	Storage	Preparation	Approval
Albunex	Mallinckrodt, Inc (St Louis, MO)	Albumin	Air	—	—	—	—	—
Cardiosphere/ Bisphere	Point Biomedical, Corp (San Carlos, CA)	Poly lactide/albumin	Nitrogen	4.0	Slight negative	—	Reconstitute with 2 mL H ₂ O per vial and dilute with 150 mL distilled water	No
AI-700	Acusphere, Inc (Lexington, MA)	Poly-L-lactide co glycolide	Perfluorocarbon	2	Negative	—	Reconstitute with water	No
Optison	Molecular Biosystems, Inc (San Diego, CA)	Albumin N-acetyltryptophan, Caprylic acid	Octafluoropropane	2-4.5	Slightly negative	Refrigerate 2°C-8°C	Hand agitate	United States/ Europe
Definity	Bristol-Myers Squibb Medical Imaging, Inc (New York, NY)	Lipids: DPPA, DPPC, MPEG5000 DPPE/surfactant	Octafluoropropane	1.1-3.3	Negative	Refrigerate 2°C-8°C	Activate through Vialmix agitation	United States
Imagent/ Imavist	Imcor Pharmaceuticals, Inc (San Diego, CA)	Lipid: DMPC/surfactant	Perfluorohexane/nitrogen	6.0	Neutral	Room temperature 15°C-30°C	Reconstitute with 10 mL water	United States
Sonovue	Bracco Diagnostics (Princeton, NJ)	Lipids: Macrogol 4000, DSPC, DPPG, Palmitic acid	Sulfurhexafluoride	2-3	Negative	No special storage conditions required	Reconstitute with 5 mL saline	Europe
Levovist	Shering AG (Berlin, Germany)	Galactose/palmitic acid	Air	2-4	Negative	Room temperature 15°C-30°C	Reconstitute with 5-17 mL water	Europe/Japan
Sonazoid	GE Healthcare (Piscataway, NJ)	Lipid	Perfluorobutane	2.4-3.6	Negative	—	Reconstitute with 2 mL water	No
Sonovist	Shering AG (Berlin, Germany)	Cyanoacrylate (polymer shell)	Air	1-2	—	—	—	No
Echovist	Shering AG (Berlin, Germany)	D-galactose	Air	—	—	<30°C	Reconstitute with water	Europe
BR14	Bracco diagnostic (Princeton, NJ)	Lipid	Perfluorobutane	2.5-3.0	Negative	—	—	—
EchoGen	Sonus pharmaceuticals (Bothell, WA)	—	Dodecafluoropentane	—	Negative	Refrigerate 2°C-8°C	—	—

Çok yakın zamanda, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (America Food and Drug Administration (FDA)) tarafından oluşturulan bir danışma kurulunca yapılan bir çalışmada, kontrast ajanlarının hiç bir yan etkisi olmadığını, konvensiyonel ultrasonun çok yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen, bazı durumlarda manyetik rezonans veya bilgisayarlı tomografi gibi daha pahalı ve daha riskli tekniklerin de beraberinde kullanılması gerektiğini,

ancak kontrast ajanı kullanımı ile bunlara ihtiyaç kalmayarak maliyetin düşeceğini vurgulamaktadır (Asch ve Weissman 2009). Yaptıkları maliyet analizlerinde, acilden servise kabul edilen hastaların sayısında %22 oranında bir düşme gözleneceği ve böylece yatan hasta sayısında düşme görüleceği ve gerçekten gerekli olmayan testlerin yapılmamasıyla, hasta başına yaklaşık \$900'lık bir tasarruf elde edileceğini ileri sürmektedir. Bu demektir ki, kontrast ajanlı ultrason ABD'de pek yakında kullanılan rutin testler arasına girebilecektir. Nitekim Yürütücünün de aralarında bulunduğu Kardiyolog Dr. Villanueva tarafından yayınlanan bir makalede ultrason kontrast ajanlarının artık rutin uygulamalarda kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır (Villanueva 2010). Şu anda, FDA onaylı lipid bazlı tek bir mikroköpükçük mevcuttur, Definity® , ve bunun da bir kullanımlığı rakip olmadığı için pahalıdır.

Ülkemizde diğer radyolojik uygulamalarda (MR ve BT) kontrast maddeler yaygın olarak kullanılmakla birlikte ultrasonografi alanında kontrast madde kullanımı yaygın değil hatta yok denecek kadar azdır. Bunun başlıca nedeni yerli üretim ultrason kontrast maddesi mevcut olmaması ve yabancı kaynaklı ultrason kontrast maddelerinin ülkemizde kolaylıkla bulunmamasıdır. Üstelik, bu kontrast maddelerin fiyatları da çok yüksektir. Bu sebeplerle pratik uygulamada ultrason tetkikleri rutin olarak kontrast madde kullanılmadan gerçekleştirilmektedir. Bu durum ultrasonografik olarak özellikle bazı karaciğer kitleleri gibi sınırları güçlükle seçilebilen lezyonların saptanmasında uygulayıcının deneyimine göre farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Yerli üretim, güvenli bir ultrason kontrast maddesinin bulunmasının, bu maddeye kolay erişilebilir olmasının ve ultrason kontrast maddelerinin yaygın kullanımının ultrasonografik değerlendirmelerde lezyon saptama oranında artışa neden olması beklenebilir. Ultrason kontrast madde kullanımı ile BT ve MR kontrast maddeleri ile aynı etki sağlanabileceğinden tek bir yöntemle, aynı seansta tanıya ulaşma oranı artacak, ek inceleme gereği azalacaktır.

Öte yandan, Türkiye'de ultrason kontrast ajanları ile yapılmış yok denecek kadar az sayıda klinik çalışmaya rastlanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda ise daha çok, Avrupa'da geliştirilen Levovist®, Echovist® gibi mikroköpükçükler kullanılmıştır. Mesela, proje danışmanının içinde bulunduğu bir çalışmada, Avrupa'da geliştirilen bir kontrast madde kullanılarak bir araştırma gerçekleştirilmiştir (Algül A. 2003). Oysa özellikle ABD'de olmak üzere ve çoğunlukla da hedeflendirilmiş görüntülemeye yönelik sayısız klinik çalışma bulunmaktadır. Bunun sebebi, üretici firmaların daha çok ABD ve Avrupa ülkelerinde bulunması ve ticari olarak piyasaya çıkarılmadan önce bu firmaların FDA gibi ilgili Gıda ve İlaç Dairesinin Onayını almak üzere çeşitli araştırma hastanelerine başvurarak bir takım testleri yaptırmak zorunda olmalarıdır. Ancak bu testler yapılırken ürünün formülasyonu firma tarafından gizli tutulmaktadır. Örneğin, Point Biomedical firması tarafından geliştirilmekte olan Cardiosphere® olarak bilinen mikroköpükçüklerin bazı klinik testleri, proje yürütücüsünün

de içinde bulunduğu University of Pittsburgh Medical Center (UPMC)-Cardiovascular Institute'de yapılmıştır (Wang vd. 2005). Daha önce de belirtildiği gibi, Türkiye'de üretimi olmadığı, yeterli sayıda yetişmiş insan gücü olmadığı, ve çok pahalı olduklarından ülkemizde ultrason kontrast ajanları ile ilgili yapılmış çalışmaların sayısı Avrupa ve ABD ile karşılaştırılmayacak seviyelerdedir.

2.2. Mikroköpükçüklerin Akustik ve Morfolojik Özellikleri

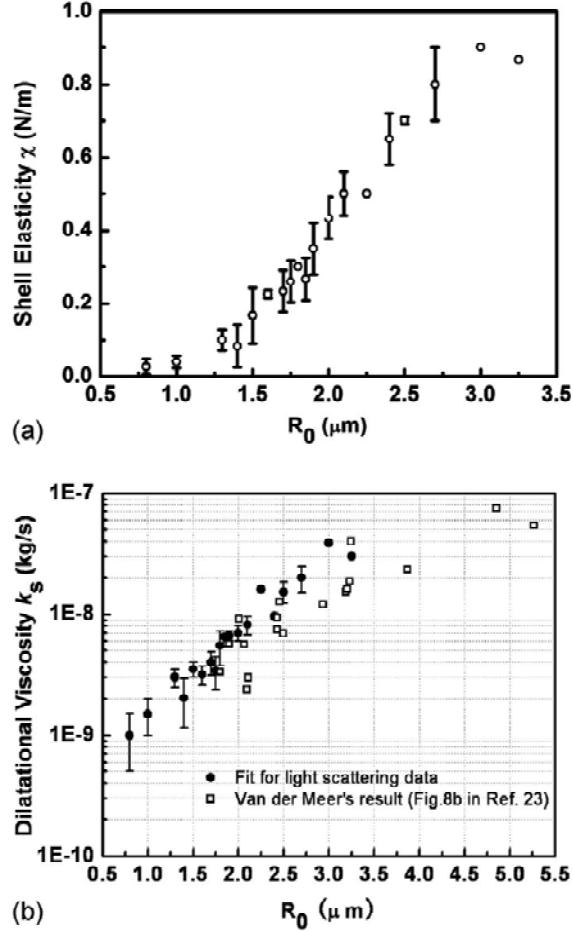
Bir mikroköpükçüğün ultrason altında osilasyonu Denklem (1) ile verilebilir (De Jong vd. 2009, Qin vd. 2009, Tu vd. 2009, Sijl vd. 2011, Helfield vd. 2016).

$$\rho_l \left(R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \right) = \left(P_o + \frac{2\sigma(R_o)}{R_o} \right) \left(\frac{R}{R_o} \right)^{-3\kappa} \left(1 - \frac{3\kappa}{c} \dot{R} \right) - \frac{2\sigma(R)}{R} - \frac{4\mu\dot{R}}{R} - \frac{4\mu_s\dot{R}}{R^2} - P_o - P(t) \quad (1)$$

Burada, R , \dot{R} , \ddot{R} , sırayla mikroköpükçüğün yarıçapı, osilasyon esnasında zar zarın hızı, ve ivmesi, ρ_l sıvı fazın yoğunluğu, P_o atmosferik basınç, σ yüzey gerilimi, κ politropik gas üstel katsayısı, μ mikroköpükçüğü çevreleyen sıvının vizkositesi, c sıvıda ses yayılma hızı, ve $P(t)$ uygulanan ultrason basıncının zamanla değişimini göstermektedir. Denklemde $\frac{4\mu_s}{R^2}$ mikroköpükçük zar yapısı için ilave bir vizkosite terimidir ve osilasyonu yavaşlatan bir faktör olmaktadır (damping etkisi) (De Jong vd. 2009, Tu vd. 2009, Sijl vd. 2011). Zar yapısının direnci aynı zamanda, mikroköpükçük rezonans frekansını (f_r) artıran da bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır (Doinikov vd. 2009). Bahse konu bu terim Denklem (1)'den çıkartıldığında yalın hava kabarcığı için önerilen osilasyon denklemi elde edilmektedir (De Jong vd. 2009). Denklemde yüzey gerilimi (σ) mikroköpükçük çapına bağlıdır. Mikroköpükçüklerin osilasyonu esnasında üç farklı durum ortaya çıkabilir (Sijl vd. 2011): Bunlardan ilki, osilasyon esnasında mikroköpükçük çapının yeterince büyümemesi ve mikroköpükçüğün esnek osilasyon içinde olması durumudur. Bu durumda yüzey gerilimi sabit ya da sıfır değeri alabilir. İkinci durum, mikroköpükçük boyutunun kritik boyutu aşması ve bu esnada zar yapısını oluşturan monotabakanın kırılmasıdır. Bu durumda, mikroköpükçük yüzeyinde lipid azalacağı ve gaz doğrudan sıvı ile temas edeceği için yüzey gerilimi değeri su için verilen yüzey gerilim değerine eşit alınabilir. Üçüncü durum ise, mikroköpükçüğün bu iki durum arasında elastik bir osilasyon yapmasıdır.

Mikroköpükçükler için hem vizkosite hem de elastik modülüs Şekil 3'de görüleceği üzere mikroköpükçük boyutu ile artmaktadır (Tu vd. 2009, Parrales vd. 2014). Şekilden anlaşılacağı üzere, büyük çaplı mikroköpükçükler ultrason altında daha esnek osilasyon yapabilirler. Ancak, boyutları kritik boyutun üzerine çıktığında parçalanmaya gitmekte ve kendilerinden daha küçük boyutlarda yavru mikroköpükçüklerin sayıca ortamda artmasına sebebiyet vermektedirler (Qin vd. 2009). Şekilden görüleceği üzere, küçük boyutlardaki

mikroköpükçükler daha az elastik ve vizkositeleri düşük olduklarından, ultrason altında daha rijit davranmakta ve osilasyona iştirak etmemektedirler.



Şekil 3. Mikroköpükçük zar yapısının (a) elastisite ve (b) vizkositesinin mikroköpükçük çapı ile değişimi (Tu vd. 2009).

Mikroköpükçüklerden yansıyan ultrason intensite değeri Denklem (2) ile verilmektedir (Kabalnov vd. 1998, Schutt vd. 2003).

$$\frac{I}{I_0} \approx \frac{1}{9} nV \frac{k^4 R^6 (\gamma_c + \gamma_d \cos\theta)^2}{d^2} \quad (2)$$

Burada, I geri yansıyan intensite, I_0 gelen intensite, n taneciklerin sayısı, V hacim, k dalga sayısı, ve R taneciğin yarıçapı, γ_c kompressibilite terimi, ve γ_d yoğunluk terimi olarak verilmektedir. Denklemden görüleceği üzere bir küresel tanecikten yansıyan ultrason sinyali taneciğin yarı çapının 6.ncü kuvveti ile orantılıdır. Denklemden, mikroköpükçüklerin boyutu gelen ultrason ses dalgalarının dalga boyundan çok küçük olmasına rağmen, mikroköpükçükler osilasyon yapabilmektedirler. Ultrason altında mikroköpükçüklerin

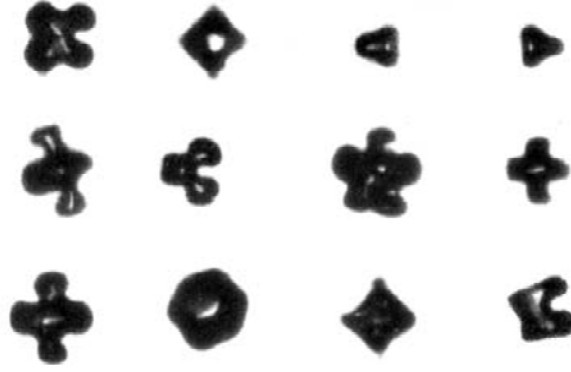
boyutlarının 4 katı artabildiği dikkate alındığında (May vd. 2002, Qin vd. 2009), geri yansıyan ses intensitesinin de katlanarak artacağı görülmektedir (Stride ve Edirisinghe 2009).

Bir taneciğin ya da mikroköpükçüğün ses dalgalarını yansıtma kesit alanı Denklem (3) ile verilebilir(Dejong vd. 1992).

$$\sigma_s = \frac{4\pi R^2}{\left[\left(\frac{f_r}{f}\right)^2 - 1\right]^2 + \delta^2} \quad (3)$$

Burada, σ_s yansıtma kesit alanı, f_r taneciğin rezonans frekansı, f uygulanan ultrason frekansını ve δ toplam damping değerlerini göstermektedir. Denklemden görüleceği üzere, mikroköpükçüklerin ultrason intensitelerine etki eden faktörlerin başında mikroköpükçüklerin rezonans frekansı (f_r) ve esnek yapılarından dolayı damping katsayısı (δ) değeri olmaktadır. Mikroköpükçüklerin rezonans frekansları boyutlarına bağlıdır. Bir mikroköpükçüğün uygulanan frekansda osilasyon yapabilmesi için boyutunun belli bir değerin üzerinde olması gerekir. Mikroköpükçüklerin esnek yapılarından dolayı damping etkisi kesit alanını ters yönde etkilemektedir. Bir mikroköpükçüğün kesit alanı yalın bir hava kabarcığının kesit alanından küçüktür. Diğer bir ifade ile, yalın bir hava kabarcığının yansıtacağı ultrason intensitesi, damping etkisinden dolayı aynı boyutlarda bir mikroköpükçüğün yansıtacağı ultrason intensitesinden daha yüksektir.

Bir mikroköpükçüğün 1 MHz frekansda ultrason altında osilasyonu, saniyede 10^6 atım (cycle) olarak tanımlanır. Her bir atım için mikroköpükçüğün boyutlarında artma ve küçülme beklenir. Dolayısı ile mikroköpükçüklerin osilasyon esnasında büyüüp küçülmeleri çok hızlıdır. Örneğin, mikroköpükçüğün zar yapısında bulunan bir lipidin 2.4 MHz frekansta hızı yaklaşık 700 m/s ve ivmesi $1.2 \cdot 10^{12}$ m/s² olarak hesaplanmıştır(Chomas vd. 2000). Newton yasasından $\vec{F} = m \cdot \vec{a}$ bağıntısı düşünüldüğünde, mikroköpükçük zar yapısı üzerinde bulunan herhangi bir kütleye etki eden kuvvet taşıdığı kütleye denk olacaktır(Chaline vd. 2015). Eğer mikroköpükçüklerin zar yapısını oluşturan lipidler eşit ve dengeli bir dağılım içinde olurlarsa, osilasyon esnasında mikroköpükçüğün boyutlarındaki daha çok küresel bir büyüme ve küçülme davranışı gözlenecektir. Ancak, zar yapısı üzerinde farklı molekül ağırlığında farklı moleküllerin bulunması, moleküller arası topaklaşma, mikroköpükçüklere bağlanmış olan lipozom ve başka işaretleyici moleküller, mikroköpükçüğün çözünmesi esnasında zar yapısında oluşacak faz değişimleri ve topaklaşmalar zar yapısında bir dengesizliğe neden olacağından, Şekil 4'de görüleceği üzere, yüksek atım hızlarından küresel olmayan boyutsal değişimlere sebebiyet verecektir(De Jong vd. 2009). Bu durum, mikroköpükçüklerin fragmentasyonuna sebebiyet vermekte ve daha küçük yavru mikroköpükçüklerin ortamda artmasına neden olmaktadır (Chomas vd. 2000, May vd. 2002, Stride ve Saffari 2003, Borden vd. 2005).



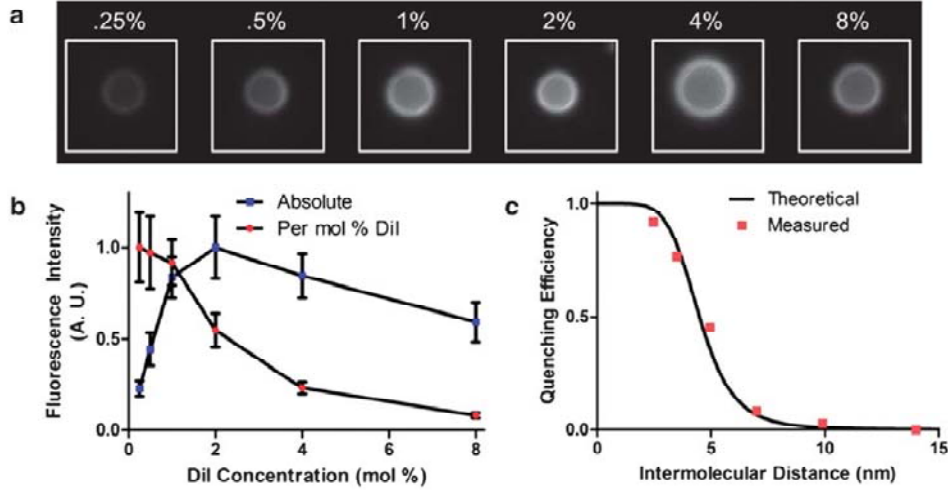
Şekil 4. Mikroköpükçüklerin ultrason altında farklı morfolojilerde osilasyonları(De Jong vd. 2009).

Mikroköpükçüklerin parçalanması ortama verilen ultrason sinyallerinin mekanik indeks değerleriyle alakalıdır. Mekanik indeks (MI) $MI = P_r / \sqrt{f_c}$ olarak tanımlanır ve belli bir frekansta pik-negatif basınç ile orantılıdır (Yeh ve Su 2008). Burada, P_r ultrasonik basınç, 0.3dB/cm/MHz olarak tanımlanır, f_c frekansın merkez değeridir. Düşük mekanik indeks değerlerinde mikroköpükçükler daha çok elastik osilasyon hareketi yaparken, daha yüksek MI değerlerinde mikroköpükçükler parçalanarak fragmantesyona uğramaktadırlar. Örneğin, mikroköpükçükler 2.25 MHz frekansta yaklaşık 25 atım (pulse) ultrason bombardımanı sonucu, yaklaşık 1.5µm-2.5µm boyutlarında fragmanlara dönüşmüşlerdir (Borden vd. 2005, Cox ve Thomas 2010, Tang vd. 2011). Mikroköpükçüklerin ultrason altında bozunmalarında uygulanan güç ve ultrasona maruz kalma süresi önemli derecede rol oynamaktadır. Ultrason altında mikroköpükçüklerin 2 dakika gibi bir sürede bozdukları ve küçük fragmanlara ayrıldıkları rapor edilmektedir (Tinkov vd. 2009).

Mikroköpükçüklerin boyutları ses dalgasını geri yansıtma önemli bir parametredir. Ancak genel bir mikroköpükçük popülasyonunda mikroköpükçükler bir boyut dağılımı içinde bulunacağından, yapılan analizlerde tutarlı olmayan sonuçlara rastlanmaktadır. Mikroköpükçüklerin aynı boyut dağılımında üretilmesi için yöntemler geliştirilmiştir (Talu vd. 2006, Hettiarachchi vd. 2007, Segers vd. 2016). Ancak, bu yöntemlerde mikroköpükçüklerin stabilite beklenen ölçüde yüksek değildir (Kovalenko vd. 2014).

Mikroköpükçüklerin yüzey morfolojisi çalışmalarında mikroköpükçük kompozisyonlarına eklenecek floresan boya miktarı önemlidir. Dil-C20 floresan boya kullanılan bir çalışmada, optimum floresan boya konsantrasyonunun mol cinsinden %2 civarında olduğu bulunmuştur (Benchimol vd. 2013). Burada, daha düşük floresan boya konsantrasyonlarında boya molekülleri arasında sinyali düşüren bir quenching etkisi görülmezken, yüksek konsantrasyonlarda, her bir floresan molekülü, komşu floresan molekül tarafından ışığı absorplanarak floresan verimini düşürmektedir. Yüzey morfolojisi

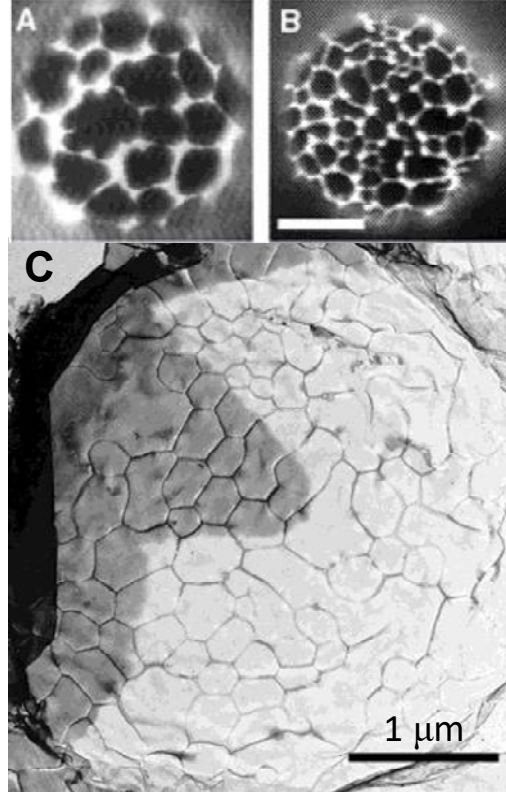
araştırmalarında, boya konsantrasyonunun optimum değerlerin altında tutulmasına özen gösterilmelidir.



Şekil 5. Farklı floresan boya konsantrasyonunda (a) mikroköpükçük yüzeyinden ölçülen floresan görüntü, (b) normalize floresan ışık yoğunluğu, ve (c) floresan moleküllerinin kendilerini söndürmesi (self-quenching)(Benchimol vd. 2013).

Mikroköpükçük zar yapısı literatürde incelenmiştir. Mikroköpükçüklerin yüzeylerinde karanlık ve aydınlık bölgeler olmak üzere zar yapısının bileşenlerine bağlı olarak floresan mikroskop yardımıyla farklı faz yapıları olduğu rapor edilmiştir(Borden vd. 2004, Veatch ve Keller 2005). Açıl-zincir uzunluğu 16 ve daha küçük olan lipidler için oluşturulan mikroköpükçüklerde yüzey tamamen aydınlık olmakta ve floresan boya ile lipidlerin iyi karıştığı rapor edilmektedir (Borden vd. 2004). Ancak, lipidlerin açıl-zincir uzunluğu arttığında daha çok sıkıştırılmış (kondens) bir faz bölgesi olduğu ve floresan boya moleküllerin bu faz içerisinde dağılamadığı ifade edilmektedir(Borden vd. 2004). Şekil 6(a) ve Şekil 6(b)'de görüleceği üzere floresan boya varlığında mikroköpükçüklerin sentezi ve akabinde soğutulması ile farklı büyüklüklerde karanlık bölgeler oluşmaktadır(Kim vd. 2003). Bu bölgeler daha çok sıkışmış (kondens) lipid bölgeleri olduğu ifade edilmektedir. Aydınlık bölgeler ise daha çok akışkan (expanded) bölgeler olduğu ve floresan boyanın akışkan faz yapısında bulunan lipidler ile karıştığı raporlanmaktadır (Borden vd. 2005). Sıkıştırılmış faz bölgelerinin büyüklükleri mikroköpükçük soğutma hızına bağlı oldukları ifade edilmektedir. Çok hızlı soğutmalarda daha küçük ve çok sayıda sıkıştırılmış faz bölgeleri elde edilirken, daha yavaş soğutmalarda daha büyük fakat daha az sayıda sıkışmış faz bölgeleri elde edilmektedir(Kim vd. 2003, Borden vd. 2004, Borden vd. 2005). Öte yandan, mikroköpükçük zar yapısı Şekil 6(c)'de görüleceği üzere, TEM ile doğrudan

görüntülenmiştir(Kim vd. 2003, Borden 2009). Mikroköpükçüklerin zar yapısının TEM görüntüsünde, zar yapısını oluşturan lipid moleküllerinin yüzeyde sürekli bir diziliş içerisinde olmadığı, ancak çatlaklara benzer fazlara ayrılmış bölgeler oluşturduğu görülmektedir. Çatlakların gaz transportu ve mikroköpükçük çözünmesi üzerine etkisi literatürde yeterince tartışılmamıştır. Ancak görünen o ki, lipid-açil zincir uzunluğu arttıkça mikroköpükçüklerin gaz geçirgenliği logaritmik olarak azalmaktadır(Pu vd. 2005).



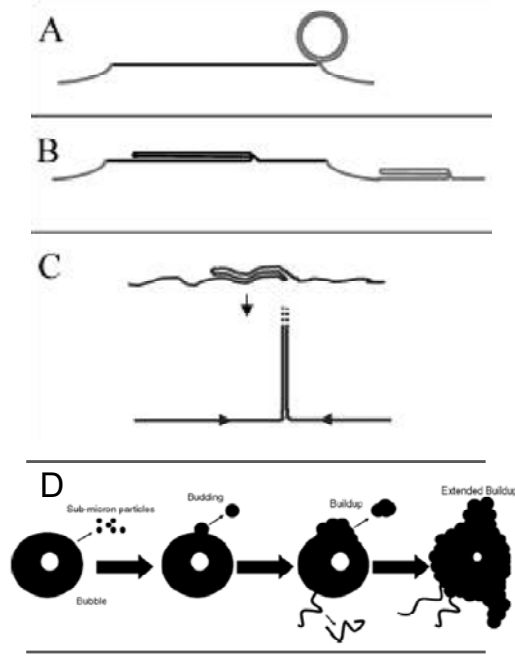
Şekil 6. Mikroköpükçüklerin floresan mikroskop yüzey morfoloji görüntüleri (A) Soğutma hızı 100 °C/dak, (B) Soğutma hızı 1000 °C/dak, (C) mikroköpükçük zar yapısının TEM görüntüsü (Kim vd. 2003).

Mikroköpükçüklerin stabiliteyi, içinde bulundukları ortam koşullarına bağlıdır. Mikroköpükçüklerin süspansiyon edildiği sıvının gaz çözünürlüğü bakımından doymuş olup olmadığı, ortamda çözünmüş olan başka gazların varlığı, sıcaklık gibi koşullar mikroköpükçüklerin stabiliteyi etkilemektedir (Borden ve Longo 2001, Borden ve Longo 2002, Borden vd. 2003, Borden ve Longo 2004, Shen vd. 2008). Bir mikroköpükçüğün doymuş olmayan bir sıvıda çözünme kinetiği Borden ve ark.(Borden ve Longo 2002) tarafından incelenmiş ve mikroköpükçüğün boyutlarındaki değişim ile ilgili Denklem (4) önerilmiştir.

$$-\frac{dR}{dt} = \frac{H}{\frac{R}{D_w} + R_{shell}} \left[\frac{\left(1 + \frac{2\sigma}{P_a R}\right) - f}{1 + \frac{4\sigma}{3P_a R}} \right] \quad (4)$$

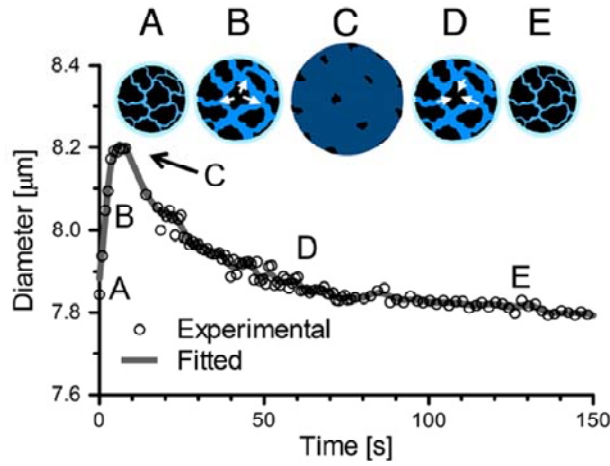
Burada, H sıvı içerisinde gaz çözünürlüğü için Henry Sabiti, σ mikroköpükçüğün yüzey gerilimi, P_a atmosferik basıncı, f sıvının gaz için doygunluk yüzdesi, D_w havanın su içerisindeki difüzyon katsayısı, ve R_{shell} mikroköpükçük zar yapısının gaz transportuna karşı direnci göstermektedir. Genel olarak gaz çözünürlüğünün düştüğü sıvılarda mikroköpükçüklerin boyutlarında küçülme olmakta ve mikroköpükçükler çözünerek ortamdan kaybolmaktadırlar. Mikroköpükçüklerin boyutlarında küçülme zamanla hızlanarak devam etmektedir (Borden ve Longo 2002). Bunun nedeni, mikroköpükçüklerin zar direncinin mikroköpükçük boyutu azaldıkça azalıyor olmasıdır (Shen vd. 2008). Başka bir ifade ile, mikroköpükçüklerin çözünme esnasında boyutu küçüldükçe, çözünmeye karşı mikroköpükçük zar direnci azalacağından, mikroköpükçük çözünme hızı zamanla artmaktadır. Mikroköpükçüklerin gaz transportuna karşı direnci zar yapısında bulunan açıl-zincir uzunluğu ile arttığı ve mikroköpükçüklerin daha stabil oldukları gösterilmiştir (Borden ve Longo 2002, Lozano ve Longo 2009).

Mikroköpükçüklerin çözünmesi esnasında yüzeylerinde bulunan zar yapısından lipidlerin ortama salıverilemesi konusunda Şekil 7'de görüleceği üzere bazı mekanizmalar öne sürülmüştür (Borden vd. 2005, Pu vd. 2006). Şekilde mikroköpükçüklerden gaz çözünmesi ile mikroköpükçük hacminde bir küçülme olacağı ve bu esnada yüzeyde bulunan lipidlerin sıkışarak sıkışık (kondens) faza geçecekleri düşünülmektedir. Mikroköpükçüklerden daha fazla gaz çözünmesi, yüzeyde bulunan lipidlerin vezikül oluşumu ile yapıdan atılması önerilen mekanizmalardan biridir. Bu gerginliğin lipidler tarafından yüzeyde katlanarak (folding) azaltma yönüne gitmesi de mümkündür. Bu katlanma belli bir boyutun üzerine çıktığında, yüzeyden ayrılarak rahatlama gerçekleştirilebilir (Lozano ve Longo 2009). Bu esnada, yüzeyde meydana gelecek bu tür topaklaşmalar yüzeyde farklı faz yapıları olarak da algılanabilir.



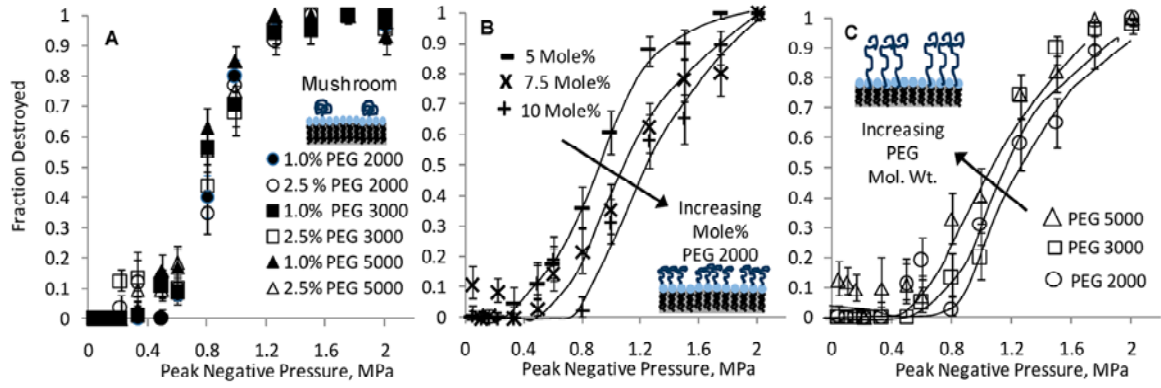
Şekil 7. Mikroköpükçüklerin çözünmesi esnasında zar yapılarından lipit atma mekanizmaları, (A) vezikül oluşumu, (B) katlanma (folding), (C) yüzey katlanması (buckling) ve akabinde yüzeyden ayrılma (shedding), (D) genel görünüş (Borden vd. 2005, Pu vd. 2006).

Mikroköpükçüklerin çözünmesi esnasında meydana gelen boyutsal ve morfolojik değişimler Şekil 8'de gösterilmektedir (Kwan ve Borden 2012). Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçükler çözünmeden önce ilk olarak boyutlarında bir büyüme olmaktadır. Boyutlardaki bu büyümenin mikroköpükçüğü çevreleyen sıvıda bulunan çözünmüş gazın mikroköpükçük içerisine difüzyonu dolayısıyla olduğu ifade edilmektedir. Bu süreç ilk 20 s içerisinde gerçekleşmektedir. Bu durumda, yüzey alanında meydana gelen elastik genişlemeden dolayı fazlar arasında bir yırtılma olmaktadır ve fazlar birbirlerinin içerisine dağılmakta ve homojen bir yüzey oluşmaktadır. Gazın tekrar mikroköpükçükten sıvı faza difüzyonu ile mikroköpükçük boyutlarında bir küçülme olmaktadır. Bu durumda, fazlar arasında elastik bir sıkışma olmakta ve yüzey morfolojileri tekrar oluşmaktadır. Burada üzerinde durmamız gereken bir husus, mikroköpükçüklerin morfolojilerinin oluşmasında geçen süre 20 s civarındadır. Oysa mikroköpükçüklerin floresan mikroskop altında ölçümler için yıkama, tablaya koyma, ve görüntünün netleştirilmesi için geçen zaman bu sürenin çok çok üstündedir. Eğer mikroköpükçüklerde bir yüzey morfolojisi oluşacaksa, bir deney esnasında yüzey morfolojilerinin zaten oluşmuş olması beklenir.



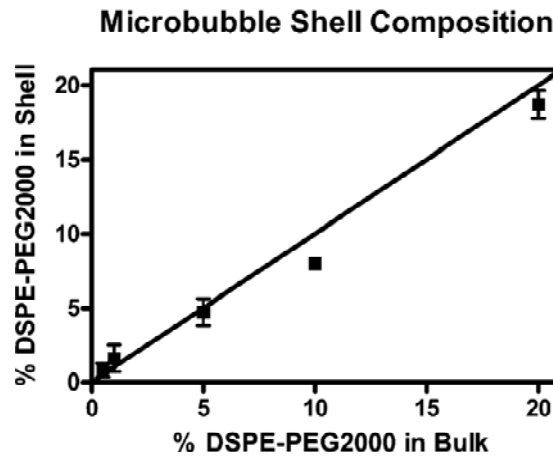
Şekil 8. Mikroköpükçüklerin çözünmesi esnasında mikroköpükçük boyutlarında ve yüzey morfolojilerinde değişimler, A-C: yüzeyde genişleme ve fazların birbiri içerisinde çözünmesi, C-E: fazların sıkışması ve yüzey morfolojilerinin yeniden oluşması (Kwan ve Borden 2012).

Mikroköpükçük zar yapısında emülsifiyer PEG₄₀St molekülleri yüzeyde fırça (brush) ya da mantar (mushroom) yapısında olabilirler (Wrenn vd. 2012, Dicker vd. 2013, Abou-Saleh vd. 2014). Yüzeyde PEG'lenmiş lipid (örneğin, DSPE-PEG2000) molekülleri miktarı arttıkça PEG zincirlerinin daha çok fırça yapısında olacağı rapor edilmektedir (Wrenn vd. 2012, Abou-Saleh vd. 2014). **Şekil 9**'de mikroköpükçüklerin zar yapısında fırça ya da mantar formunda bulunan PEG zincirlerinin mikroköpükçük ultrason stabilitesine etkisi gösterilmektedir. **Şekil 9** (A)'da, DSPE-PEG2000 oranı düşük olduğunda moleküller mantar formundadırlar. Bu durumda, mikroköpükçüklerin ultrason altında bozunmasında ultrason gözle görülür bir fark yaratmamıştır. **Şekil 9** (B)'de DSPE-PEG2000 oranı artırıldığından moleküller fırça formuna dönmüşlerdir. Bu durumda PEG miktarı arttıkça, mikroköpükçüklerin ultrason ile stabilitesinde bir artış meydana gelmiştir. **Şekil 9** (C)'de DSPE-PEG2000 konsantrasyonu yüksek olduğundan PEG molekülleri fırça formundadırlar. Molekül ağırlığı artırıldığında, yani daha uzun PEG zincirler kullanıldığında, mikroköpükçüklerin ultrason altında stabilitesinde bir azalma olduğu görülmektedir. Analşılan, mikroköpükçüklerin üzerindeki yükler ve zincir uzunluklarının mikroköpükçüklerin stabilite üzerine önemli etkisi bulunmaktadır.



Şekil 9. Mikroköpükçüklerin zar yapısında fırça ya da mantar formunda bulunan PEG'lenmiş lipid moleküllerinin mikroköpükçük stabilitesine etkisi, (A) Lipo-polimer oranı düşük mantar formunda, (B) Lipo-polimer oranı artırıldığında, fırça formunda, (C) PEG molekül ağırlığı artırıldığında (Wrenn vd. 2012).

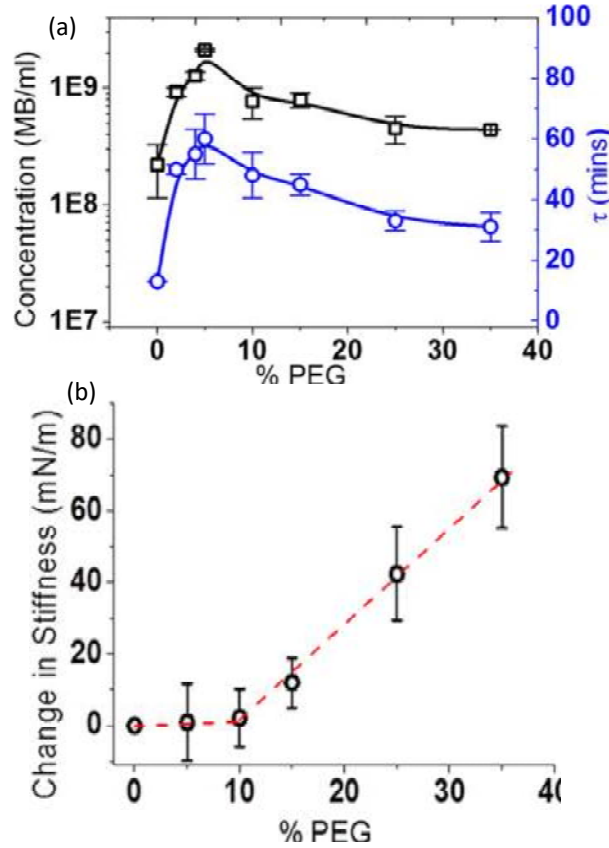
Mikroköpükçüklerin oluşumunda lipid karışımına konulan oranların, **Şekil 10**'de görüleceği üzere, mikroköpükçük zar yapısında da olduğu rapor edilmiştir (Borden vd. 2006). Bu sonuç daha yüksek lipo-polimer oranları için tekrar edilmemiştir. Genel kanı, lipid karışımında bulunan yüzdelerin mikroköpükçük yüzeyinde de aynı oranda olmasıdır.



Şekil 10. Mikroköpükçüklerin lipid karışımı ile zar yapısı bileşenleri arasındaki ilişkinin ¹H-NMR yöntemi ile belirlenmesi (Borden vd. 2006).

Farklı PEG miktarları ile mikro-akış yöntemi ile hazırlanan mikroköpükçük üretim verimi ve mikroköpükçük stabiliteyi **Şekil 11(a)**'da verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere mikroköpükçük üretim miktarı %5 PEG oranına kadar artmış, %40'a kadar çalışılan PEG oranlarında üretim miktarı hafif azalmakla birlikte neredeyse sabit kalmıştır. Mikroköpükçüklerin stabiliteyi %5 DSPE-PEG2000 oranında en yüksek değere ulaşmış,

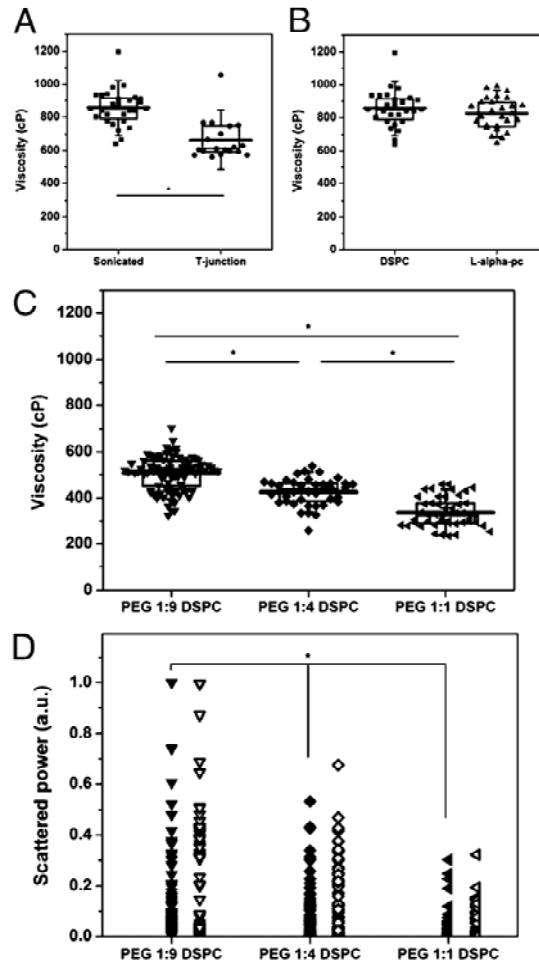
daha yüksek PEG miktarlarında stabilite azalmıştır. Bu nedenle literatürde genel mikroköpükçük kompozisyonu 9:1 oranı olarak rapor edilmektedir. Öte yandan, mikroköpükçüklerin dışarıdan gelen kuvvetlere dayanımı **Şekil 11(b)**'de görüleceği üzere PEG miktarı ile artmaktadır. Mikro-akış yöntemi ile elde edilen bu sonuçların, sonikatör yöntemiyle elde edilecek mikroköpükçüklerde ne olacağı merak konusudur.



Şekil 11. (a) Mikro-akış üretim yönteminde PEG% oranlarında mikroköpükçük üretim miktarı ve stabiliteleri, (b) Mikroköpükçüklerin PEG% miktarına göre dayanımları(Abou-Saleh vd. 2014).

Mikroköpükçüklerin zar yapısını oluşturan lipid ve emülsifiyer miktarları mikroköpükçüğün zar yapısının vizkositesini, osilasyonunu, ve yansıttığı ultrason sinyal gücünü etkilemektedir. **Şekil 12'**de farklı üretim metodu ve farklı mikroköpükçük kompozisyonu için vizkosite ve yansıyan ultrason sinyal gücü değerleri verilmiştir (Hosny vd. 2013). **Şekil 12(A)**'da görüleceği üzere, sonikasyon yöntemi ile üretilen mikroköpükçüklerin yüzey vizkositeleri mikro-akış yöntemi ile üretilen mikroköpükçüklerin yüzey vizkosite değerlerinden yüksektir. Mikro-akış yönteminde lipidlerin mikroköpükçük yüzeyine homojen bir yapıda adsorplanmadığı ve yüzeyde farklı kümelenmelerin olabileceği değerlendirilmektedir. **Şekil 12(B)**'de farklı zar yapısında bulunan lipidler için ölçülen vizkosite değerleri verilmektedir. DSPC lipidin L-alfa-PC lipide kıyasla daha rijid zar yapısına

sahip mikroköpükçükler üretebileceğini göstermektedir. **Şekil 12(C)**'de DSPC:PEG oranı 9:1, 8:2 ve 5:5 olan mikroköpükçükler için ölçülen vizkosite değerleri verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere mikroköpükçük zar yapısında PEG miktarı arttıkça, yüzey vizkosite değeri azalmaktadır. Bu durumda, yapıya katılan PEG miktarının mikroköpükçükleri daha rijit yapmakta ve osilasyonda damping etkisini artırmaktadır. Bu durum, **Şekil 12(D)**'de gösterilen ultrason sinyal gücündeki düşme ile kendini göstermektedir. PEG miktarı arttıkça mikroköpükçüklerin osilasyon güçleri azalmaktadır.

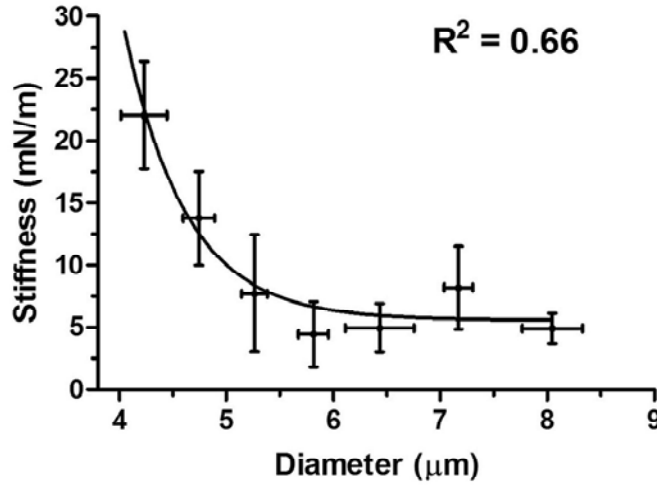


Şekil 12. (A) Sonikasyon yöntemi ve mikro-akış yöntemi ile üretilen mikroköpükçükler için ölçülen vizkosite değerleri, (B) farklı zar yapısında bulunan lipidleri için ölçülen vizkosite değerleri, (C) DSPC:PEG oranı 9:1, 8:2 ve 5:5 olan mikroköpükçükler için ölçülen vizkosite değerleri, (D) farklı oranlarda DSPC:PEG oranında hazırlanan mikroköpükçüklerin yansıttığı ölçülen ultrason sinyal gücü (Hosny vd. 2013).

Mikroköpükçükler bir çok alanda kullanılmaktadır (Tinkov vd. 2009, Suzuki vd. 2011). Oksijen (Borden ve Longo 2004, Swanson vd. 2010), Nitrik Oksit (NO) (Postema vd. 2006),

ilaç/gen/DNA (Borden vd. 2007, Ferrara vd. 2007, Suzuki vd. 2011) transferinde mikroköpükçüklerin kullanıldığı rapor edilmiştir. Mikroköpükçükler sonoporasyon etkisiyle hücelere ilaç/gen/DNA yüklenmesinde etkin olarak kullanılmaktadırlar(Kudo vd. 2009). Sonoporasyonda, hücre membranına yakın yada yüzeye adsorplanmış mikroköpükçüklerin ultrason altında jet oluşturmaları sonucu transportun arttığı gösterilmektedir (Kudo vd. 2009, Qin vd. 2009, Wang vd. 2013, Yu vd. 2015).

Farklı boyutlarda mikroköpükçüklere atomik mikroskopun kantileveri ile bastırma ile ölçülen mikroköpükçük direnci **Şekil 13**'de verilmektedir(Chen vd. 2013). Şekilden görüleceği üzere, boyutları 6 μm 'dan küçük mikroköpükçüklerin kuvvete karşı verdiği direnç eksponensiyel olarak artmaktadır. Bu küçük boyutlardaki mikroköpükçükler daha rijid ve stabilitelelerinin daha iyi olabileceği izlenimi vermektedir.



Şekil 13. Mikroköpükçüklerin atomik mikroskop ile dayanımının ölçülmesi(Chen vd. 2013).

Bu bilgiler ışığında, mikroköpükçüklerin zar yapısı, ultrason altında stabiliteleleri, ve yüzey morfolojilerinin nasıl olacağı merak konusudur.

2.3. Ultrason Görüntüleme

Ses, cisimlerin titreşimi sonucu meydana gelir. Elektromanyetik dalgaların aksine ses boşlukta iletilemez. Ses dalgaları ancak moleküler ortamda iletilebilmektedir. Ultrason, kulağın duyacağı sınırdan (20 Hz - 20 kHz) daha yüksek frekanslı sese denir. Bir kaynaktan çıkan ses dalgası bir nesneye çarpıp geri yansır ve tekrar kaynağına ulaşır. Kaynağına ulaşan ses dalgası eko (yankı) olarak adlandırılır. Böylece ses dalgası kaynak ve nesne

arasındaki mesafeyi iki kez kat etmiş olur. Bu uzaklık L , sesin verildiği ortamdaki hızı V_s ve arada geçen süre t olarak isimlendirilirse Denklem (5) elde edilir:

$$L = V_s * t / 2 \quad (5)$$

Buna göre, eğer sesin ortamdaki hızı ve geçen süre bilinirse, nesne ile kaynak arasındaki mesafe bulunabilir. Herhangi bir ortam içerisinde ses dalgalarının hızı, frekans, dalga boyu, ve yönden bağımsız olarak, sabit kabul edilir. Ekoların intensitelerini belirleyen ses dalgalarının miktarı, akustik empedans olarak adlandırılır. Akustik empedans, z , sesin dağıldığı ortamın yoğunluğu ve hızının çarpımı sonucu bulunur (Zell vd. 2007):

$$z = \rho \times V_s \quad (6)$$

Bir ses dalgasının bir ortamda belli bir hızda hareket ederken başka bir ortama geçtiğinde hızının değiştiğini düşünelim. Arayüzeyde, ses dalgasının enerjisi ile geçtiği ortam arasında tam olarak bir eşleşme olmayacağı için bu durum dalganın geri yansımaya neden olur. İki madde arasındaki arayüzeyden yansıyan sesin intensitesi, farklı akustik empedans değerleriyle birlikte Denklem (7) ile gösterilir (Zell vd. 2007):

$$\frac{I_{refl}}{I_{total}} = \frac{(z_1 - z_2)^2}{(z_1 + z_2)^2} \quad (7)$$
$$\frac{I_{trans}}{I_{total}} = 100\% - \frac{I_{refl}}{I_{total}}$$

Burada, I_{total} ses dalgasının toplam intensitesi, I_{refl} yansıyan dalganın (eko) intensitesi, I_{trans} geçen dalganın intensitesi'ni göstermektedir. Dolayısıyla, akustik empedanstaki farklılıklar sesin yansımaya neden olan faktördür. Akustik empedandaki daha büyük farklılıklar, ekonun intensitesinin de daha büyük olmasını sağlamaktadır. Tam tersi de geçerlidir; eğer iki farklı madde bir arayüzeye sahipse ve aynı akustik empedans söz konusu ise bu durumda eko oluşmayacaktır.

Ultrasonografide kullanılan frekanslar yüksek olduğundan, bu kadar yüksek titreşimi elde etmek için piezo-elektrik (basınç-elektrik) olayından yararlanır. Görüntülemeyi sağlayan ultrasonik ses dalgaları pulslar (vurular) halinde üretilir. Bu olay, kuartz gibi bazı kristallerin elektrik enerjisi verildiğinde genişleyip daralarak titreşmeleri ve dolayısıyla ses oluşturmaları, kendilerine gelen sesi ise yine aynı yöntemle elektrik enerjisine çevirmeleridir. Bu şekilde enerji çevirici maddelere transdüser (çevirici) denir. Ultrason aygıtlarında transdüseri koruyucu olarak seramik diskler kullanılır. Transdüser'i taşıyan başlığa prob adı verilir. Bir ultrason sistemde ekoskop adında bir tarayıcı, medikal görüntülemeye kullanılan ultrason pulslarına benzer kısa voltaj pulslarını transdüser'e gönderir. Transdüser ise voltaj pulslarını ultrason pulslarına dönüştürerek ortamda yayar ve daha sonra geri dönen ekoları alıcı olarak algılar. Tarayıcı, dönen her bir puls için gereken zamanı kaydeder ve daha sonra sesin hızını ekoyu yansıtan nesneye olan uzaklığa dönüştürür. Intensite, amplitude=genlik, ya da A-mod

sinyal, geri dönen ekonun intensitesine karşılık zaman grafiği çizilerek oluşturulur(Sun vd. 2014). Eko intensitesi, uzaklığa bağlı olarak yansıtıcı (reflektif) arayüzeylerin olduğu bölgelerde pik verir. Zamana karşılık gelen böyle bir grafik, eğer ortamdaki sesin hızı bilirse derinlik/uzaklık grafiğine dönüştürülebilir.

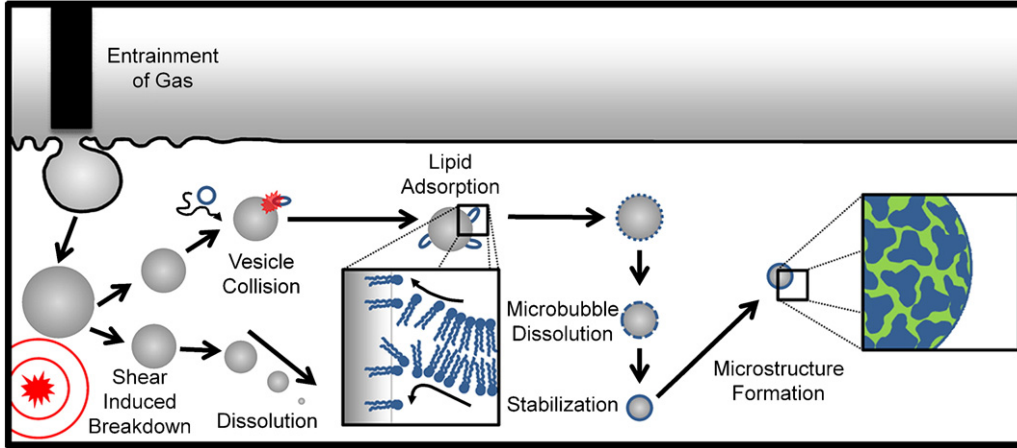
Gri-Skala (B-mod) görüntüde ise görüntü oluşturulurken dönen ekonunun yansıma miktarı (dönen dalganın genliği) ve proba ulaşan ses dalgasının gönderilmesiyle alınması arasındaki süre hesaplanarak, dönen dalga, dalga şiddeti (amplitude ya da genlik) değerine göre farklı gri tonlarda kodlanmaktadır. Bu bilgilere ek olarak, yansıyan ses dalgası ile B-mod görüntü oluşturulurken faz, dalga boyu ve frekans gibi bilgiler dikkate alınmamaktadır.

Ses maddeyi geçerken, absorpsiyon ve yansıma nedeniyle intensitesi azalır. Absorpsiyon sesin frekansı, sesin geçtiği maddenin absorpsiyon katsayısı ve kalınlık ile doğru orantılıdır. Suyun absorpsiyon katsayısı çok düşük, öte yandan içi dolu katı bir maddenin ise yüksektir. Bu nedenle ses sıvılardan zayıflamadan geçer. Yansıma ise sesin geçtiği maddenin atom ve moleküllerinin ses dalgasının oluşturduğu harekete gösterdiği direnç (akustik impedans) farklılıkları ile ilgilidir. Sesin yayılım yönündeki ortamlar arasındaki farklılık ne kadar fazla ise yansıma da o kadar çok olacaktır.

2.4. Mikroköpükçük Morfolojisi ve Floresan Mikroskop ile Görüntüleme

Fosfolipit mikroköpükçüklerinin sonikasyon ile oluşturulmaları sırasında, probun hava-sıvı arayüzeyinde hareketi sonucu sıvıda kaviteasyon ile gaz kabarcıkları oluşturulmaktadır. Sıvıda çok katmanlı (multilayer) ve/veya iki katmanlı (bilayer) veziküller halinde bulunan fosfolipitler, sıvıdaki gaz kabarcıkları ile biraraya geldiklerinde gaz kabarcıklarının etrafında kondense olarak mikroköpükçükleri oluşturmaktadır. Gaz-sıvı ara yüzeyindeki yüzey gerilim farkından dolayı, fosfolipitler veziküllerden ayrılarak gaz kabarcıklarının yüzeyine adsorbe olmaktadır. Fosfolipit adsorpsiyonunun gaz yüzeyindeki denge yüzey gerilimi 25 mN/m oluncaya kadar devam ettiği düşünülmektedir (Borden 2009, Kwan ve Borden 2012). Öte yandan, fosfolipit moleküllerinin yüzeye adsorbe olduktan sonra laplace basıncı altında mikroköpükçükler içindeki gaz çözünmeye gitmekte ve lipitler arası intermoleküler mesafeler belirli bir denge değerine ulaşınca kadar çözünme devam etmektedir. Molekülerin biraraya gelmesi ile beraber hidrofobik ve van der Waals kuvvetleri daha baskın hale gelmekte, yüzey gerilimini minimize edecek şekilde moleküller oriyante olmaktadır. Mikroköpükçükleri oluştururken hava yerine suda çözünürlüğü düşük perflorakarbon gibi gazların kullanılması, lipit adsorpsiyonunu artıracığı, dolayısıyla mikroköpükçüklerin stabilizasyonunu artıracığı bilinmektedir (Szijarto vd. 2012). Havaya kıyasla daha hidrofobik gazlarla üretilen mikroköpükçükler daha küçük boyutlarda olmaktadır (Szijarto vd. 2012). Mikroköpükçük

oluşum mekanizması Kwan ve Borden tarafından **Şekil 14**'deki şekilde şematize edilmiştir. Mikroköpükçüklerin yüzeyindeki moleküllerin bu sırada faz ayırımına giderek katı ve akışkan fazlar oluşturduğu kabul edilmektedir.(Kim vd. 2003, Borden vd. 2006, Borden 2009, Lozano ve Longo 2009, Kwan ve Borden 2012, Schutt vd. 2014)



Şekil 14. Şematize edilmiş mikroköpükçük oluşum mekanizması(Kwan ve Borden 2012)

Fosfolipitlere kıyasla çok daha büyük baş gruba sahip emülsifiyer moleküllerinin lipit kondensasyonuna karşı direnç göstererek, daha çok akışkan faza geçtiği kabul edilmektedir. Buradan emülsifiyer molekülleri mikroköpükçük stabilizasyonunu olumsuz etkilediği gibi bir görüş çıksada, emulsifier molekülleri mikroköpükçük oluşumu için gereklidir. Yapılan çalışmalarda fosfolipitlerin tek başına mikroköpükçük oluşturmadıkları görülmüştür (Borden vd. 2004, Abou-Saleh vd. 2014). Fosfolipitler tek başlarına sulu fazda dağıtıldıklarında termodinamik olarak en kararlı yapı olarak lipozomlar halinde bulunurlar (Kozlov vd. 1997). Lipozomlar, fosfolipit moleküllerinin sulu fazda oluşturdukları iki katmanlı yapıların küresel formudur. Mikroköpükçükler ise, gaz-sıvı arayüzeyinde monotabaka şeklinde absorbe olmasıyla oluşan küresel yapılardır. Gazın yoğunluğunun sıvıdan çok düşük olması sebebi ile köpükçük görünümündedirler. Fosfolipitler gaz-sıvı arayüzeyinde bir bariyer olarak gaz difüzyonunu engelleme görevini üstlenirler. Dolayısıyla, gaz-sıvı arayüzeyindeki yüzey gerilimini minimize etmek ve böylece mikroköpükçüklerin stabilizasyonunu artırmak için gaz kabarcık yüzeyinin tamamı ile moleküller tarafından kuşatılmış olması şart olmaktadır.

Mikroköpükçüklerde gaz-sıvı arayüzeyindeki yüzey gerilimini minimize etmek için değişik çalışmalar yapılmıştır. Borden ve ark. tarafından yapılan çok sayıda çalışmada fosfolipitlerin kuyruk açıl zincir uzunlukları artırıldığında fosfolipitler arasındaki hidrofobik ve van der Waals kuvvetleri arttığından, mikroköpükçüklerin stabilitelerinin arttığı savunulmaktadır (Borden ve Longo 2002, Borden ve Longo 2002, Borden ve Longo 2004,

Borden vd. 2004, Pu vd. 2005, Kwan ve Borden 2012). Ancak, DSPE-PEG5000 ile değişik açıl zincir uzunlukları sahip fosfolipin lipitlerle oluşturdukları mikroköpükçüklerin statik çözünme davranışlarını inceledikleri bir çalışmada, DPPC (n=16) den DBPC (n=22) e doğru stabilitede bir iyileşme olduğu, açıl zincir uzunluğu n=24 (DLiPC)'e artırıldığında stabilitenin azaldığı, mikroköpükçük içindeki gazın hızla çözüldüğü görülmüştür.(Garg vd. 2013) Maalesef, in-vitro ve in-vivo çalışmalarda benzer bir trend gözlenememiştir. Fosfolipitlerin açıl zincirleri arasındaki hidrofobik ve van der Waals kuvvetleri stabilize üzerinde etkilidir. Nitekim, Cox ve ark. (Cox ve Thomas 2010) tarafından yapılan bir çalışmada DSPE-PEG2000 emulsifier olarak kullanılarak DOPC ve DSPC mikroköpükçükleri üretilmiş ve ultrason altında tek bir mikroköpükçüğe ait çözünme davranışları incelenmiştir. DOPC mikroköpükçükleri hızla çözünür ve ortamdan yok olurken, DSPC mikroköpükçüklerinin ultrason altında daha stabil kaldıkları görülmüştür. Açıl zincirinin saturasyonunun stabilizeyi artırdığı görülmüştür. Açıl zincirinin uzunluğu mikroköpükçük boyut dağılımını etkisi ile çelişkili sonuçlar literatürde mevcuttur. Swanson ve ark. (Swanson vd. 2010) tarafından yapılan bir çalışmada DSPC ile üretilen mikroköpükçüklerin DPPC'ye kıyasla daha dar bir boyut dağılımına sahip oldukları, ancak DSPC mikroköpükçüklerinin daha fazla büyüme eğiliminde oldukları görülmüştür. Populasyondaki büyüme küçük mikroköpükçüklerin laplace basıncı altında daha çabuk çözünmeleri ve ortamdan daha erken yok olmalarından kaynaklanıyor olabilir ki, bu varsayım Epstein-Plesset teorisi ile uygunluk içindedir (Epstein ve Plesset 1950). Öte yandan, farklı bir çalışmada farklı emülsifiyer oranları ile hazırlanmış DSPC mikroköpükçüklerinin DPPC mikroköpükçüklerinden nisbeten biraz daha büyük oldukları bulunmuştur (Kooiman vd. 2014).

Mikroköpükçüklerin yüzeyindeki mikroyapılar ile stabilize ilişkisinin anlaşılması üzerine yapılmış çalışmalarda mevcuttur. Mikroköpükçüklerin yüzeyindeki mikroyapıları aydınlatmak üzere, Langmuir-Blodgett Film metodu ve Floresan mikroskobu yaygın olarak kullanılmaktadır (Kim vd. 2003, Borden vd. 2004, Borden vd. 2006, Pu vd. 2006, Borden 2009, Kwan ve Borden 2012). Mikroköpükçük üretiminde yaygın bir şekilde kullanılan PEG₄₀St'ın fosfolipitlerle oluşturdukları mikroköpükçüklerde, kullanılan floresan probun sıvı-düzensiz (liquid disordered, expanded) faz ile karıştığı kabul edilmektedir (Borden vd. 2004). Dolayısıyla, karanlık bölgelerin fosfolipitçe zengin, aydınlık bölgelerin ise emulsifier bakımından zengin bölgeler olduğu kabul edilmektedir. Borden ve ark. (Borden vd. 2004) tarafından değişik açıl zincir uzunluklarına sahip fosfolipin lipitlerle yapılan mikroköpükçüklerde, kısa açıl zincirli (n=12→14) fosfolipin lipitlerin emulsifier ile homojen bir dağılım içinde mikroköpükçük yüzeyinde dağıldıkları rapor edilmiştir. Zincir uzunluğu n=16 ve yukarı olan fosfolipin lipitlerle üretilen mikroköpükçüklerin floresan görüntülerinde karanlık ve aydınlık alanlar (domainler) görülmüş ve emulsifierin uzun açıl zincirli fosfolipin lipitlerle homojen bir şekilde karışmadığı sonucuna varılmıştır (Borden vd. 2004). Açıl zincir uzunluğu

n=18 ve üzeri fosfokolinler ile oluşturulan mikroköpükçüklerin ısıtma/soğutma altındaki morfolojik değişimleri incelendiğinde, faz geçiş sıcaklığının üstünde bir sıcaklığa ısıtıldıklarında floresan probun mikroköpükçük yüzeyinde homojen bir dağılım gösterdiği görülmüş, soğutma hızına bağlı olarak domain oluşumları gözlemlenmiştir (Borden vd. 2004, Borden 2009). Hızlı soğutma modunda karanlık (floresan prob içermeyen) domainlerin sayısının arttığı, ancak daha küçük domainlerin oluştuğu, yavaş soğutma modunda ise daha az sayıda fakat daha büyük karanlık domainlerin oluştuğu görülmüştür (Borden vd. 2004). Mikroköpükçüklerden gaz geçirgenliğinin oluşan bu domain oluşumları ile yakından ilgili olduğu görülmüş, küçük domain oluşumlarında gaz geçirgenliğinin arttığı görülmüş, dolayısıyla gazın monotabakanın sıvı-düzensiz fazı üzerinden çözüldüğü sonucuna varılmıştır.(Pu vd. 2005) Artan açıl zincir uzunluğu ile monotabakadan gaz geçirgenliğinin eksponensiyel olarak azaldığı görülmüştür (Pu vd. 2005). Artan soğutma hızı ile birlikte daha küçük domainlerin oluştuğu Kim ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da gözlemlenmiş ve bunun klasik çekirdek teorisi ile açıklanabilir bir durum olduğu dile getirilmiştir (Kim vd. 2003). DSPE-PEG5000'nin emulsifier olarak kullandığı bir çalışmada ise, yine faz geçiş sıcaklığının üstünde bir sıcaklığa ısıtıldıklarında, monotabakanın sıvı-düzensiz faza geçtiği ve floresan probunun homojen bir şekilde dağıldığı görülmüştür. Ancak, hızlı soğutulan mikroköpükçüklerin, herhangi bir domain oluşumuna gitmedikleri, floresan molekülünün mikroköpükçük yüzeyine homojen bir şekilde dağıldığı görülmüştür (Schutt vd. 2014).

Floresan mikroskop çalışmalarından, mikroköpükçükleri oluşturan monotabakada domain oluşumlarının gazın çözünmesine sebebiyet verdiği anlaşılmaktadır. Gazın çözünmesi ile birlikte monotabakada çökme (kollaps) başlamaktadır. Çökmede, sıvı-düzensiz fazında çoğunlukla yer alan emulsifier moleküllerinin veziküller oluşturarak monotabaka yapısından ayrıldığı ve bununla beraber yüzey deformasyonlarının başladığı kabul edilmektedir (Pu vd. 2006, Kwan ve Borden 2012).

Floresan mikroskobu, en yaygın biçimde, hücre biyolojisi araştırmalarında floresan moleküllerin lokalizasyonu belgelemek amacıyla kullanılmaktadır. Floresan mikroskobunun biyomedikal alanda kullanılan numunelerin yapısının ve nicel analizlerinin yapılmasında kullanımı ise giderek yaygınlaşmaktadır.(Wallace vd. 2001) Nicel analizleri etkileyen faktörlerden en önemlisi numunenin fazla floresan ışığına maruz kalması nedeniyle floresanın özelliğinin kaybolarak solmadır (photobleaching). Floresan mikroskobunda yapılan analizleri etkileyen temel parametreler: objektifin numerik açıklığı ve büyütmesi, soğutmalı kamera olması ve kameranın 1X1 bining modunda olması vb. sayılabilir. Bunlara ek olarak floresan ışık yoğunluğu (excitation light intensity), ışığa maruz kalma süresi (pozlama süresi: exposure time), sinyal/gürültü oranı, görüntü netliği de nicel analiz yapılabilmesi için optimize edilmesi gereken parametrelerdendir.(Waters 2009)

Floresan nicel analizler soğutmalı CCD kamera ile çekilen dijital görüntülerden yapılmaktadır. Ölçülen floresan yoğunlukları hem floresan boyanın özelliklerine ve konsantrasyonuna hemde uyarıcı ışık şiddetine bağlıdır. Yayılan ışığın intensitesi aşağıdaki bağıntı ile verilir:

$$F = \phi I_0 (1 - e^{-\epsilon bc}) \quad (8)$$

Burada, F yayılan ışık intensitesi, ϕ kuantum verimliliği (uyarılmış haldeki moleküllerin floresan emisyonu yaparak temel seviyeye dönme yüzdesi), ϵ molar absorpsiyon katsayısı, b ışık yol uzunluğu ve c floresan boyanın molar konsantrasyonunu göstermektedir. Derişik olmayan konsantrasyonlar için $\epsilon bc < 0.05$ kabul edilir ve eşitlik aşağıdaki basit forma indirgenebilir.

$$F = k \phi I_0 \epsilon bc \quad (9)$$

Görüldüğü üzere, diğer parametreler sabit tutulduğunda yayılan ışığın intensitesi floresan boyanın konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Buradan floresan boyanın konsantrasyonu ne kadar yüksekse yayılan ışığın intensitesi o kadar yüksek olur gibi düşünülse, yüksek floresan boya konsantrasyonlarında komşu floresan molekülleri tarafından ışığın sönümlenmesi (quenching) etkisi ile intesite azalmaktadır. Numunedeki floresan boya konsantrasyonu arttıkça, uyarılmış moleküller ışığı yaymak yerine birbiri ile etkileşerek enerjisini kaybetmektedir. Self quenching denilen bu etki, yüksek konsantrasyondaki floresan problemlerden yayılan ışığın detektör yerine diğer bir prob tarafından emilmesinden kaynaklanmaktadır.(Benchimol vd. 2013) Bu yüzden nicel analiz öncesi floresan boya konsantrasyonunun optimize edilmesi gerekmektedir.

Floresan mikroskobu ile nicel analiz yönteminde, yayılan ışığın intensitesi dedektöre ulaşan foton sayısı ile orantılıdır. Bu nedenle detektörün doygunluk seviyesi altında olmak gerekir. Kamera detektörünün topladığı foton miktarı uyarıcı ışık yoğunluğu, ışığın homojenizasyonu ve numunenin ışığa maruz kalma süresinden (pozlama süresi) etkilenmektedir.(Waters 2009) Belli bir uyarıcı ışık şiddeti aralığında, floresan ışığını artırdığımızda pozlama süresi (exposure time) azalmakta, düşürdüğümüzde de pozlama süresi (exposure time) artmaktadır ki, bu pozlama dengesi kuralı (reciprocity law) olarak bilinir.(Martin vd. 2003) Yüksek uyarıcı ışık yoğunluğuna bağlı olarak örnek solabilir (photobleach) ya da düşük ışık şiddeti yüksek pozlama süresine bağlı olarak dijital görüntüde çok fazla gürültü (noise) olabilir. Pozlama dengesi kuralının geçerli olmadığı durumlarda görüntülerden sağlıklı nicel analiz yapılması mümkün değildir.

Nicel analiz yapılacak dijital görüntülerde sinyal/gürültü (signal-to-noise) oranının yüksek olması gerekir. Dijital gürültünün 3 farklı bileşeni vardır. Bunlardan bir tanesi her kamera detektörünün dark noise olarak adlandırılan karanlık pixel yoğunluğudur. Hiç bir

foton ya da uyarı detektöre gelmemesine rağmen (örnek yok, uyarıcı ışık yok, ortam tamamen karanlık) alınan görüntülerde pozlama süresine bağlı olarak bir gürültü verir. İkincisi ise ışık ve pozlama süresinin birbiri ile uyumsuzluğundan kaynaklanır. Düşük ışık yüksek pozlama süresi dijital görüntüde gürültü oluşumuna sebep olmaktadır. Son olarak örneğin yeterli konsantrasyonda floresan içermemesi ve detektörün yeterli foton toplayamamasından kaynaklı gürültü oluşmaktadır. Bu parametrelerin optimize edilerek nicel analiz yapılması gerekmektedir.(Pang vd. 2012)

Sadece dijital görüntülerden görsel olarak mikroköpükçüklerdeki floresan yoğunluklarını, domain oluşumlarını ve buna bağlı olarak mikroyapılarını karşılaştırmak sağlıklı sonuçlar vermeyebilir. Zira, her ne kadar mikroköpükçük formülasyondaki floresan yüzdesi sabit tutulsa da, mikroköpükçük yapısına giren floresan miktarı kompozisyona göre değişim gösterebilir ve yapıya giren miktara göre de domain oluşumları ve morfolojiler farklılık gösterebilir. Mikroyapıda karanlık bölgelerin görülmesi o bölgede lipid ve/veya emülsiyon olmadığı anlamına gelmez. Sadece floresan probun var olmadığı söylenebilir.

2.5. Bolus Enjeksiyon Yöntemi ile Analiz

Bolus enjeksiyon yönteminde bir akış ortamına enjeksiyonu yapılan belirleyici (indikatör) moleküller akış ortamında yayılma, seyrelme, Brownian hareketi, laminar akış, veya türbülans dolaylı dilüsyona uğrarlar. Böylece, bolus enjeksiyon sonrası indikatör moleküller (mikroköpükçükler) ilgili bölgeden değişik zamanlarda geçer ve bir dilüsyon eğrisi üretirler. İndikatör dilüsyon eğrisi, mikroköpükçüklerin geçiş sürelerinin olasılık yoğunluk fonksiyonu ile tanımlanabilir(Harabis vd. 2013). Bu durum birim zamanda ilgili bölgeden geçen mikroköpükçüklerin miktarıyla orantılıdır. Bolus enjeksiyondaki mikroköpükçük miktarı, m , bilinirse ve zamanın bir fonksiyonu olarak mikroköpükçük konsantrasyonu ilgili bölgede ölçülebilirse hacimsel akış hızı (Q) ve kan hacmi (V), eğri altındaki alan (AUC) ve ortalama geçiş süresi (MTT) cinsinden aşağıda verilen denklemler vasıtasıyla hesaplanabilir(Strouthos vd. 2010, Harabis vd. 2013):

$$Q = m * (AUC)^{-1} \quad (10)$$

$$V = Q * MTT \quad (11)$$

Ultrason sisteminde, mikroköpükçük konsantrasyonu yerine geri saçılan akustik dalga intensitesi $I(t)$ ölçülür, dolayısıyla Q ve V değerlerini doğrudan ölçmek mümkün değildir. Bununla birlikte, düşük mikroköpükçük konsantrasyonlarında geri saçılan intensite konsantrasyonla orantılıdır. Bu, Q ve V ile orantılı olan miktarı ölçmemize olanak sağlamaktadır. Yüksek kan akışı hızlarında mikroköpükçükler ilgili bölgeye daha hızlı hareket ederler ve maksimum seviyeye (pik) ulaşma süresi (t_p) daha kısa olur. Dolayısıyla, kan akış

hızının yüksek olduğu vaskülarize kötü huylu tümör bölgelerinde, zaman-İntensite eğrisinde normal parenkimal bölgeye göre daha kısa bir yükselme beklenir.

Birtakım ön kabuller yapılarak bolus enjeksiyon sonrası oluşacak zaman-intensite eğrilerini modellemek üzere temel olarak 4 teorik model türetilmiştir(Strouthos vd. 2010). Bunlar; log-normal fonksiyon, Erlang ve Gamma değişkeni fonksiyonları, drift model difüzyon, ve gecikmeli normal fonksiyon modelleridir. Aşağıda bu modellerden bizim çalışmalarımıza en iyi uyan Log-Normal ve Drift Difüzyon Modelleri kısaca tanıtılacaktır.

Log-Normal Fonksiyon: İstatistikte, eğer bir değişken çok sayıda bağımsız rastgele değişkenin ürünü ise o değişken log-normal dağılım ile ifade edilebilir. Log-normal dağılım fonksiyonu (12) ile verilebilir.

$$I(t) = \frac{AUC}{\sqrt{2\pi}\sigma(t-t_0)} \cdot e^{([ln(t-t_0)-\mu]^2)/(2\sigma^2)} + I_0 \quad (12)$$

Burada, $I(t)$ zamanın bir fonksiyonu olarak geri saçılan sinyal intensitesini (mikroköpükçük konsantrasyonu ile orantılı) göstermektedir. μ ve σ değişkenleri ise sırasıyla, bağımsız değişken t 'nin logaritmasının normal dağılımının ortalama ve standard sapmasını göstermektedir. Zaman-İntensite eğrisi, μ 'yü değiştirerek yatay olarak ölçeklendirilebilir ve σ değerini arttırarak daha da eğriltilebilir. Taban çizgisi intensitesi, I_0 , temelde intensite off-set değeridir, bu da görüntüdeki gürültü seviyesinden kaynaklanır.

Ortalama geçiş süresi, MTT, olasılık yoğunluk fonksiyonundan $(I(t) - I_0)$ bolusun varış zamanının (t_0) çıkarılması sonucu bulunur. MTT ve t_p şu şekilde ifade edilir:

$$e^{\mu+\sigma^2/2} MTT = e^{\mu+\sigma^2/2} \quad (13)$$

$$t_p = e^{\mu-\sigma^2} \quad (14)$$

Drift Difüzyon Modeli: Bu modelde, mikroköpükçüklerin dolaşım sistemine doğru hareketi lineer konveksiyonun üzerine boylamsal difüzyonun eklenmesi olarak ele alınmaktadır. Sistemdeki çıkışta özel sınır koşulunun olmadığı durumlarda, geri saçılan sinyalin intensitesiyle orantılı olan herhangi bir pozisyon ve andaki mikroköpükçük konsantrasyonunu, $C(x,t)$, belirlemek için bu model kullanılmaktadır. Lokal yoğunluk rastlantısal hareket (LDRW) modeli olarak bilinen fonksiyon şu şekildedir:

$$I(t) = AUC \cdot \left(\frac{e^\lambda}{\mu}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{\mu}{(t-t_0)}\right) \frac{\lambda}{2\pi}} \cdot \exp\left[-\frac{1}{2}\lambda\left(\frac{\mu}{(t-t_0)}\right) + \left(\frac{(t-t_0)}{\mu}\right)\right] + I_0 \quad (15)$$

Burada, $\mu \equiv x_0/v$, x_0 ilgili bölgenin (ROI) girişi ve çıkışı arasındaki uzaklık, v , sıvı ya da kan akış hızıdır. Dolayısı ile μ bir mikroköpükçüğün x_0 uzaklığını katetmesi için gereken ortalama geçiş süresidir. Diğer bir parametre, λ , $\lambda \equiv \mu v^2/2D$ olarak ifade edilir. Burada, D efektif boylamsal difüzyon katsayısı'dır. Zaman-İntensite eğrisinin eğriliği λ^{-1} 'e eşittir. D parametresi, tümör mikrosirkülasyonundaki kan akışı gibi karmaşık sistemlerde, türbülanslı karışma ve Brownian hareketi gibi değişik fiziksel mekanizmalardan gelen katkıları yansıtan genel bir

parameterdir. Peclet sayısı (Pe), $Pe = \tau_D/\tau_c$ olarak ifade edilir. Burada, $\tau_D, \tau_D = x_0^2/D$ mikroköpükçüklerin difüzyon süresidir. τ_c ise toplam geçiş süresidir ve μ' 'ye eşittir. İşlemlerin yapılmasından $Pe = 2 \lambda$ bulunur. Bu λ 'nın doğrudan fizyolojik önemini belirtmektedir. Bu modelde, mikroköpükçüklerin ilgili bölgeye birçok kere girdiği ve çıktığı göz önüne alındığında, ilgili bölgede mikroköpükçüklerin ortalama kalış süresi (MRT) MTT'den büyük olacaktır. LDRW modelde MTT, MRT ve t_p parametreleri şu şekilde ifade edilir:

$$MRT = \mu \left(1 + \frac{1}{\lambda}\right) \quad (16)$$

$$MTT = \mu \quad (17)$$

$$t_p = \left(\frac{\mu}{2\lambda}\right) \left(\sqrt{1 + 4\lambda^2} - 1\right) \quad (18)$$

MRT ile MTT arasındaki fark $\mu/\lambda = 2D/v^2$ 'dir, bu da difüzyon sabiti olarak D değerinin büyük olmasının sistemden çıkıştaki mikroköpükçük geçişlerinin artışına neden olduğunu göstermektedir. Eğer $v^2, 2D$ değerinden daha büyük olursa, mikroköpükçük difüzyonunun etkisi ihmal edilebilir düzeyde olduğu ve MRT değeri ile MTT değerinin birbirine yaklaştığı söylenebilir.

LDRW modeli gibi, tek geçiş zamanı (FPT) modeli de drift model difüzyon denklem için bir çözüm olabilir. İki model arasındaki tek fark, çıkıştaki sınır koşuludur. FPT modeli, çıkış düzleminde absorbe edici bir bariyer olduğunda geçerlidir. Burada, indikatör sınırdan sadece bir kere geçebilirken, LDRW modelinde birçok geçiş söz konusudur. Dolayısıyla FPT modelinde, MRT MTT'ye eşittir. FPT modeli için deneysel datalara en iyi uyan model denklem şu şekildedir:

$$I(t) = AUC \cdot \left(\frac{e^{-\lambda t}}{\mu}\right) \cdot \sqrt{\frac{\lambda}{2\pi}} \cdot \left(\frac{\mu}{(t-t_0)}\right)^{3/2} \cdot \exp\left[-\frac{1}{2}\lambda\left(\frac{\mu}{(t-t_0)}\right) + \left(\frac{(t-t_0)}{\mu}\right)\right] + I_0 \quad (19)$$

Burada, ölçüm yapılan ilgili alanda (ROI) ortalama geçiş zamanı (MTT) ve intensitenin pik seviyesine ulaşma zamanı (t_p) aşağıdaki eşitliklerle verilebilir.

$$MTT = MRT = \mu \quad (20)$$

$$t_p = \left(\frac{\mu}{2\lambda}\right) \left(\sqrt{9 + 4\lambda^2} - 3\right) \quad (21)$$

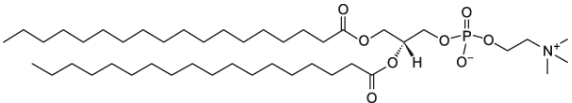
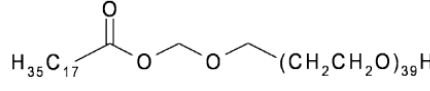
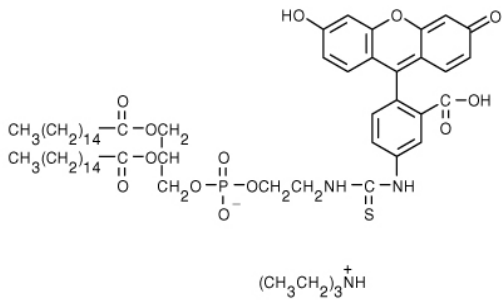
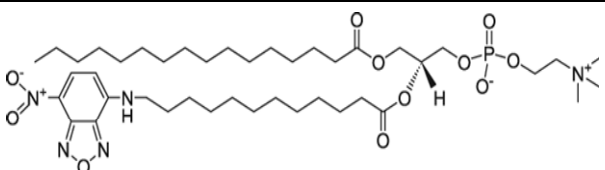
Bu modellerden elde edilecek eğri altında kalan alan (AUC) değeri ile Denklem (10)'da görüleceği üzere indikatör (mikroköpükçük) konsantrasyonu ve Denklem (11) ile ölçülen (ROI) alanın hacmi hesaplanabilir. Ancak, bu yöntemle elde edilen bilgilerin yeniden analiz edilmesi gerekmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

Projede kullanılan malzemelerden disterol-glisero-fosfokolin (DSPC, %99) Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), Polietilen glikol-40-stearat (PEG₄₀St), propilen glikol (PG, US Pharmaceutical grade) ve çözücü olarak kullanılan kloroform Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) firmasından, floresan işaretli mikroköpükçüklerin hazırlanmasında kullanılan FITC-DHPE Invitrogen'den ve NBD-PC Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) firmasından temin edildi. Bu malzemelerin kimyasal yapıları **Tablo 2**'de gösterilmiştir. Mikroköpükçüklerin üretiminde kullanılan perflorabütan gazının temini ise Synquest firmasından yapılmıştır. Karşılaştırma amacıyla ticari Vevomarker® marka mikroköpükçükler (Visualsonics) kullanılmıştır.

Tablo 2. Kullanılan mikroköpükçük malzemeleri ve kimyasal yapısı.

Kimyasal Adı	Kimyasal Yapısı
disterol-glisero-fosfokolin (DSPC)	
Polietilen glikol-40 Stearat (PEG ₄₀ St)	
Florescein-5-Thiocarbamoyl)- 1,2-Dihexadecanoyl-sn- Glycero-3- Phosphoethanolamine, Triethylammonium Salt (FITC-DHPE)	
2-(12-(7-Nitrobenz-2-Oxa- 1,3-Diazol-4-yl)amino) Dodecanoyl-1-Hexadecanoyl- sn-Glycero-3-Phosphocholine (NBD-PC)	

3.2. Mikroköpükçüklerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu

Mikroköpükçüklerin Hazırlanışı: Mikroköpükçüklerin üretimi, 2010-2012 yılları arasında TÜBİTAK tarafından desteklenen 109M494 no'lu projede geliştirilen yöntem ve formülasyonlarda gerçekleştirildi. Mikroköpükçüklerin hazırlanmasında fosfolipid olarak distearol-glisero-fosfokolin (DSPC) ve emülsifiyer olarak Polietilen glikol-40-Stearat (PEG40St) kullanıldı. Farklı molar oranlarındaki lipid/emülsifiyer karışımları toplamda 40 µmol olarak hazırlanarak kloroformda çözüldü. Ortamdaki kloroform azot gazı ile uzaklaştırılarak lipid/emülsifiyer filmi elde edildi. Oluşturulan film fosfat tamponlu çözelti (FTÇ) ve propilen glikol (PG) karışımından oluşan (hacim oranı 4:1) çözelti ile 55 °C'deki su banyosunda 2 saat hidrasyona tabi tutuldu. Su banyosundan çıkarılan örnekler problu sonikatör (Misonix S4000) yardımı ile mikroköpükçük haline getirildi. Oluşan mikroköpükçükler solusyonuna fosfat tamponlu çözültiden eklenerek 1200 rpm'de 4 dakika santrifüj yapıldı ve flotasyon yöntemi ile ortamda var olabilecek istenmeyen büyüklükteki mikroköpükçükler ile mikroköpükçüklerin yapısına katılmamış olan lipidler, lipozomlar, miseller bir şiringa yardımı ile atıldı. Yukarıda asıltı halinde bulunan mikroköpükçükler pH=7.2 olan FTÇ tamponu ile yıkanıp tekrar santrifüj yapıldı. Yıkama sonucu, dipteki şeffaf sıvı şiringa vasıtası ile çekilerek atıldı. Üstte kalan mikroköpükçükler FTÇ ile ikinci bir yıkamaya tabi tutuldu. İkinci yıkamanın sonunda FTÇ:PG çözültisinden 1 mL eklenerek 2 mL hacimli tüp içerisinde saklandı. Mikroköpükçük içeren tüpler 4 °C'de buzdolabında saklandı. Mikroköpükçüklerin karakterizasyonları bir gün sonra 4 °C'de stabilize edildikten sonra yapıldı.

Mikroköpükçüklerin Boyut ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi: Mikroköpükçüklerin konsantrasyonu ve büyüklük dağılımları optik yöntemle tayin edildi. Bu amaçla, optik mikroskoba (Carl Zeiss AxioImager M2 model) bağlı dijital bir kamera (Carl Zeiss AxioCam 506 mono) kullanıldı. Daha önce hazırlanan mikroköpükçük süspansiyonları farklı oranlarda pH=7.2 olan fosfat tamponu (FTÇ) ile seyreltildi. Oluşturulan solusyondan 10 µL alınarak Thoma lamına aktarıldı ve optik mikroskopta 5X, 10X, 20X ve 40X büyütmelemlerde incelendi. Mikroköpükçüklerin yüksek sıcaklıklardaki stabilizasyonları vücut sıcaklığı olan 37 °C'de test edildi. Bu amaçla, mikroköpükçükler, sıcaklığı önceden 37 °C'ye set edilmiş termostatlı sıcak su banyosuna konuldu. Belli aralıklarla su banyosundaki mikroköpükçüklerden örnekler alınarak ve gerekli seyreltmeler yapılarak mikroskop altındaki görüntüleri alındı. Her bir örnek için thoma lamının tamamını tarayacak şekilde 9 farklı bölgeden fotoğraflar çekildi ve bu çekilen fotoğraflar ImageJ (NIH) programı ile analiz edilerek mikroköpükçüklerin büyüklük dağılımları saptandı. Thoma lamında lam ile lamel

arasındaki boşluğun kalınlığı 1/10 mm'dir. Mikroskopta bakılan alanın kenar uzunlukları saptanarak, hacmi mm³ cinsinden hesaplandı. mm³'ten mL'ye geçmek için bulunan sonuç 10³ ile çarpıldı. Bakılan alandaki mikroköpükçükler ImageJ programı ile sayıldı ve seyreltme faktörü ile çarpılarak mL'deki mikroköpükçük konsantrasyonu hesaplandı. Mikroköpükçüklerin zamana karşı boyut değişimleri ise 63X/0.75 objektif (Carl Zeiss Plan-Neofluar) ile lamel kullanılmadan takip edilerek incelendi. Aynı zamanda, mikroköpükçüklerin Beckman Coulter-Counter tanecik sayıcı cihazı ile doğrudan sayıları belirlenmiştir.

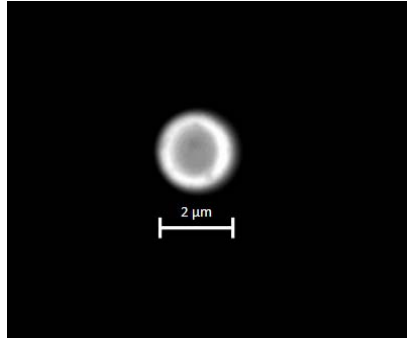
3.3 Mikroköpükçüklerin Floresan Mikroskopu ile Morfolojilerinin İncelenmesi:

Mikroköpükçüklerin yüzey morfolojilerinin değerlendirmeleri için 100X/1.25 yağlı objektif (Carl Zeiss Plan-Apokromat) kullanıldı. Bu amaçla, değişik oranlarda (% 0.1 ile % 1.5 arasında değişen oranlarda) FITC-DHPE içeren DSPC:PEG₄₀St mikroköpükleri hazırlandı. Morfolojik incelemeler için mikroköpükçükler stok solüsyonlarından çekilerek kendi pH'ındaki FTÇ solüsyonu ile seyreltme yapılarak lam-lamel arasında konuldu. Mikroköpükçükler içerdikleri hava nedeniyle buldukları solüsyon içinde yukarı doğru yükselme eğilimindedirler. Bu nedenle, lamel yüzeyine yapışmalarını engellemek için mikroköpükçükler lam üzerine konulmadan önce vakum yağı kullanılarak bir havuz oluşturuldu.^(Borden vd. 2004) Oluşturulan havuz içine mikroköpükçük solüsyonu konulduktan sonra lamel ile kapatıldı. Ters çevrilerek, mikroköpükçüklerin cama yapışmayan tarafından görüntüler alındı. Böylelikle mikroköpükçüklerin solüsyonda yükselmesi sonucu lamel ile temas etmesi sonucu olabilecek morfolojik değişimlerden kaçınılmış oldu. Vakum yağı ile oluşturulan yükselti sayesinde mikroköpükçükler lam ile lamel arasında ezilmeden üç boyutlu yapılarını korumaları sağlandı. Floresan probunun ışık altında solmasını engellemek için görüntüler aydınlık alanda bulundu ve sonrasında floresan mikroskop moduna geçilerek fotoğrafları çekildi.

Mikroköpükçüklerin Floresan Yoğunluğunun Nicel Analizi: Mikroköpükçüklerin yüzey morfolojisini incelemek üzere, mikroköpükçük karışımına floresan molekülü olarak **Tablo 2**'de verilen FITC-DHPE ve NBD-PC'den değişik oranlarda ilave edildi ve mikroköpükçükler benzer şekilde hazırlandı. Üretilen floresanlı mikroköpükçükler, kamera ataçmanlı yukardan aydınlatmalı floresan mikroskobu (Carl Zeiss AxioImager M2 model) altında incelenerek dijital kamera (Carl Zeiss AxioCam 506 mono) ile fotoğrafları çekildi. Floresan mikroskobu ile nicel floresan yoğunluk ölçümleri için 100X/1.25 yağlı objektif (Carl Zeiss Plan-Apokromat) ve 63X/0.75 objektif (Carl Zeiss Plan-Neofluar) kullanarak orta düzlemden görüntüleri alındı.

Floresan yoğunluğunu ölçmek için mikroköpükçükler stok solüsyonlarından çekilerek kendi pH'ındaki FTÇ solüsyonu ile seyreltme yapılarak lam-lamel arasında konuldu. Floresan

probonun ışık altında solmasını engellemek için görüntüler aydınlık alanda bulundu ve sonrasında floresan mikroskop moduna geçilerek fotoğrafları çekildi. Floresan mikroskobu ile görüntüleme, floresan görüntüsünün kalitesi dedektörün quantum verimliliği ve dedektöre ulaşan fotonların sayısı ile orantılıdır. Diğer bir değişle dedektöre ulaşan fotonların sayısının artması ile görüntünün floresan yoğunluğu artmaktadır. Genel olarak, kamera pozlama süresinin artırılması dedektöre ulaşan foton sayısını artırmaktadır. Ancak, dedektör doygunluğa ulaştıktan sonra gelen fotonlar piksel yoğunluğuna bir katkı bulunmayıp, dedektörün lineeritesini etkileyeceği için nicel ölçümlerde hatalı sonuçlar verecektir. (Waters 2009) Kameranın doygunluk seviyesinin altında kalmak üzere, tüm floresan mikroskop çalışmalarında dedektör doygunluk yüzdesi %50 olarak set edilerek görüntüleri alındı. Mikroköpükçük floresan yoğunluğu, mikroköpükçüklerin görüntüde çapının en büyük olduğu orta düzlemde (mid-plane, Şekil 15) alınarak (Elmas vd. 2005, Benchimol vd. 2013) ve Denklem 1’de verilen formül kullanılarak hesaplandı. (Pang Z 2012) Böylelikle fokusa bağlı farklılıklar elimine edilmiş oldu.



Şekil 15. Mikroköpükçük çapının en yüksek olduğu orta düzlem (mid-plane) görüntüsü

$$\text{Normalize FL.Yoğ} = \frac{(\text{Mikroköpükçük FL.Yo}) - (\text{Arkaplan FL.Yo})}{\text{Kamera Pozlama Süresi}} \quad (22)$$

pH’in mikroköpükçüklerin floresan yoğunlukları üzerindeki etkisini incelemek üzere +4°C saklanan mikroköpükçüklerin alt fazı çekildi ve değişik pH’larda hazırlanan FTÇ ile karıştırılarak görüntüleri alındı ve floresan yoğunlukları hesaplandı.

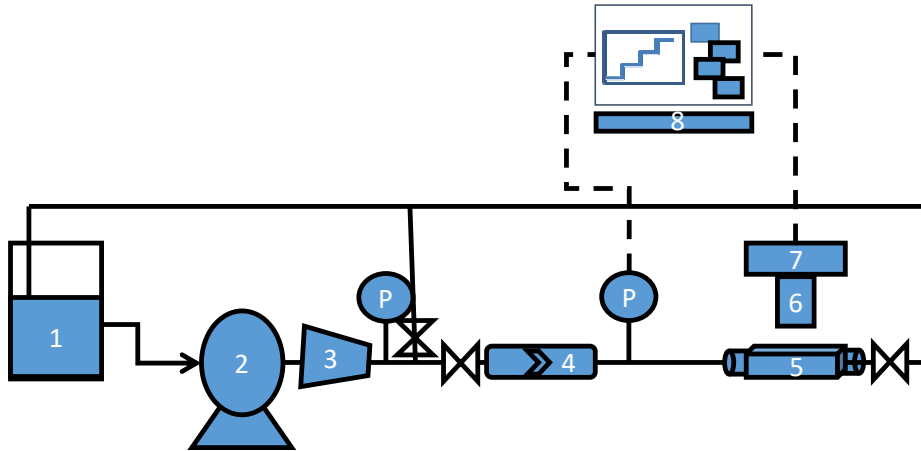
3.4 Mikroköpükçüklerin Yüksek Hızda Osilasyonları

Mikroköpükçüklerin ultrason altında yüksek hızlı osilasyonları University of Pittsburgh-Medical School (UPMC)’da Dr. Flordeliza Villanueva’nın laboratuvarında bulunan,

“Ultra Yüksek Hızlı Kamera Sistemi” ile görüntülendi. Ultra yüksek hızlı görüntü sisteminde, lipid mikroköpükçükler bir kapiler tüp içerisine yerleştirildi. 1 MHz frekansında (saniyede 10^6 salınım) ultrason mikroköpükçükler üzerine gönderildi. Bu esnada bölgesel basınç, kurulan deneysel düzenek üzerinden 0.5 MPa’a ayarlandı. Video kayıt hızı $5 \cdot 10^6$ fps olacak şekilde kameraların resim alma hızları ayarlandı ve video kaydı yapıldı. Toplanan resimlerden saniyede 16 resim olmak üzere 16 fps hızında yeni bir video oluşturuldu. Elde edilen video görüntüleri kullanılarak mikroköpükçüklerin osilasyonları esnasında boyutlarındaki değişimler ImajeJ programı kullanılarak tespit edildi.

3.5 Mikroköpükçüklerin Hidrostatik Basınç Altında Stabiliteleri

Mikroköpükçüklerin basınç altında boyutsal değişimleri ve bu esnada zar yapısında olabilecek değişimleri anlamak üzere Şekil 16’de görülen hidrostatik sabit basınç sistemi tasarlanmış ve geliştirilmiştir. Hidrostatik sabit basınç sistemi basınç yaratmak üzere bir pompa, istenilen seviyede basınç değeri elde edebilmek üzere bir basınç regülatörü, basınç değerlerini ölçebilmek için basınç sensörleri, basıncı istenilen seviyede sabit tutabilmek üzere bir geri basınç kontrol vana ve numunenin konulduğu bir görüntüleme hücresinden oluşmaktadır. Görüntüleme hücresi iki akrilik plaka arasında yerleştirilmiş mikroskop lamellerinden oluşmaktadır. Mikroköpükçükler görüntü hücresine yerleştirildikten sonra farklı basınçlarda kamera’lı mikroskop altında görüntüleri bilgisayar vasıtasıyla kaydedilmiştir. Sabit basınç sistemmi ile ilk olarak farklı boyutlarda hava kabarcıklarının basınç ile boyutlarında meydana gelen değişimler incelenmiştir. Daha sonra, hazırlanan mikroköpükçüklerin basınç altında boyutlarında meydana gelen değişimler ve yüzey morfolojilerinde oluşan farklılıklar önce ışık mikroskopu ile ve daha sonra floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir.

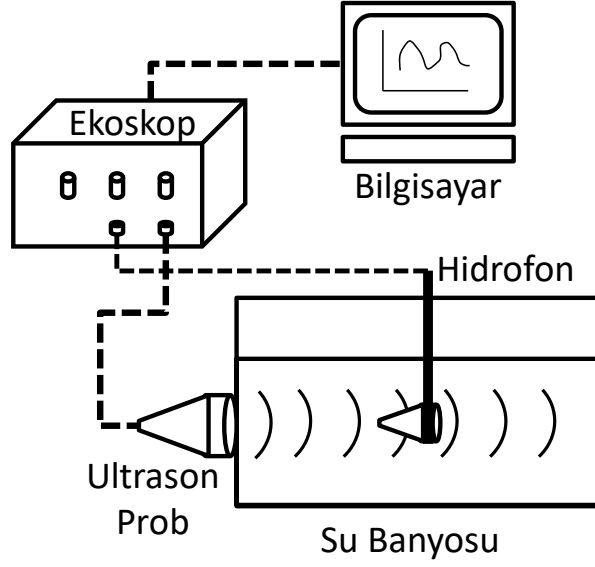


Şekil 16. Hidrostatik sabit basınç sistemi. 1. Su, 2. Pompa, 3. Basınç regülatörü, 4. Tekyön vana, 5. Numune kabı, 6. Mikroskop, 7. Kamera, 8. Bilgisayar.

3.6 Mikroköpükçüklerin Ultrason Altında Stabiliteleri

Hazırlanan mikroköpükçüklerin ultrason altında stabilitelerini belirlemek üzere laboratuvar ölçeğinde kurulan ultrason düzeneği, ve küçük hayvan deneylerine dedike çok amaçlı Vevo2100 ultrasonografi cihazı kullanılmıştır. Laboratuvar ölçeğinde tasarlanan ultrason deney düzeneği Şekil 17’da görülmektedir. Deney düzeneği GamPT model ultrason cihazı kullanılarak hazırlanmıştır. Laboratuvar deney düzeneği kısaca, sesin iletildiği bir su kabı, bir ultrasonik prob, ultrasonik ekoskop, ultrasonik jel, hidrofon, peristaltik pompa, plastik boru, ve şırınga’dan oluşmaktadır.

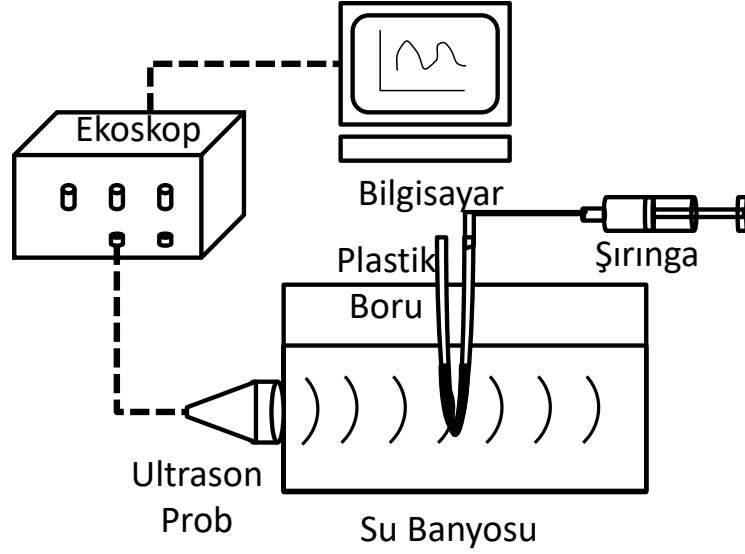
Ultrasonik prob için hidrofon ile odak bölgesi belirlenmesi: Laboratuvar ultrason deney düzeneğinde üç farklı 1 MHz, 2 MHz ve 4 MHz frekanslarda ultrason prob için odak bölgeleri (maksimum intensite bölgesi) akustik eksen boyunca hidrofon yardımı ile ölçüldü. Şekil 17’da görüldüğü üzere, içi deiyonize su dolu bir kapda ultrason probun karşısına gelecek şekilde hidrofon yerleştirildi. Prob ise ultrasonik jel yardımıyla kabın yanal yüzeyine herhangi bir hava boşluğu kalmayacak şekilde yerleştirildi. Prob ultrasonik ekoskopun vericisine, hidrofon ise alıcıya bağlandı. Ekoskop ise bilgisayara bağlandı. Ses hızının deiyonize su içerisinde 25°C’de 1496 m/s olduğu bilindiğinden, bütün laboratuvar çalışmalarında bu değer kullanılmıştır. Ekoskop üzerinde ses dalgalarının doğrultusunu belirleyen iki mod bulunmaktadır. Bunlar, Yansıma (Reflectance) ve Geçirgenlik (Transmittance) modudur. Bu deneyde, probdan çıkan ses dalgaları hidrofona ulaştıktan sonra, hidrofon, gelen ses dalgalarını elektriksel olarak ekoskopa ilettiği için geçirgenlik modu kullanılmaktadır. Ölçülen değerler, ekoskop ile birlikte verilen bir program ile A-scan modunda grafiksel olarak görüntülenmiştir. Ekoskoptaki vericinin çıkış güç düğmesi 10, 20 ve 30 desibel (dB) olarak üç farklı konumda kullanılabilir. Ses şiddeti üç prob için de 10 dB olarak ayarlanmıştır. Hidrofonun ucu probun tam karşı pozisyonunda yerleştirildikten sonra, hidrofon proba yakın bölgeden başlayıp kabın yatay eksenini boyunca en uzak bölgeye doğru sürülerek gidilen her noktadaki volt (V) cinsinden maksimum genlik değeri ve hidrofonun ucu ile prob arasındaki mesafe kaydedilmiştir. Elde edilen verilere göre voltaja karşılık uzaklık grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 17. Ultrasonik prob için odak bölgesinin hidrofon ile belirlenmesi

Ultrasonik ekoskopun karakterizasyonu: Ekoskopta iki farklı güç düğmesi bulunmaktadır. Verici düğmesi, çıkış dB değerini, dolayısı ile ses çıkış gücünü; alıcı düğmesi ise giriş dB değerini, yani yansıyan sesin alıcıdaki şiddetini ayarlamakta kullanılmaktadır. Verici düğmesinde 3 farklı kademe bulunmaktadır: 10, 20 ve 30 dB. Alıcı düğmesinde ise 7 farklı kademe bulunmaktadır: 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 dB. Deney sisteminde, mikroköpükçüklerin farklı güçlerde ultrasona maruz bırakılması, verici düğmesindeki çıkış dB'ler ile ayarlanabilmektedir. Alıcı düğmesindeki giriş dB'leri, sistemden geri yansıyan sesin genlik değerinin volt (V) cinsinden ayarlanmasında kullanılmaktadır. Ultrason ekoskopun karakterizasyonu için **Şekil 18**'de gösterilen deney düzeneği tasarlanmıştır. Deneyde içi deiyonize su ile doldurulmuş bir kap ve su içerisine daldırılmış bir plastik boru kullanılmıştır. İlk denemelerde, 2 MHz'lik ultrason prob bir jel ile kabın yanal yüzeyine yerleştirilmiştir. Daha önce problar için elde edilen odak bölgesi bilgisi kullanılarak, boru ile prob arası maksimum genlik değerinin olduğu bölge olacak şekilde seçilmiştir. Ekoskop üzerinde yansıma modu seçilerek, borudan yansıyan ultrason ses dalgaları bir bilgisayar vasıtasıyla kaydedilmiştir.

Deneylerde önce boru boş iken karakterizasyonlar yapılmıştır. Daha sonra boru içerisine fosfat tampon çözelti (FTÇ) konularak denemeler yapılmıştır. Son olarak da, FTÇ içerisinde mikroköpükçükler ihtiva eden solüsyon ile denemeler yapılmıştır.



Şekil 18. Ultrasonik ekoskop ile karakterizasyon deney düzeneği

Mikroköpükçüklerin ultrason altında A-scan ve B-scan mod'da karakterizasyonu: Ultrason ekoskop ile mikroköpükçüklerin karakterizasyonunda **Şekil 18**'de gösterilen deney düzeneği kullanılmıştır. Deneylerde 2 MHz'lik prob kullanılmış ekoskopdaki vericinin çıkış gücü 10 dB olarak ayarlanmıştır. İlk aşamada, borunun içi boş iken A-scan modda genlik değerleri ve B-scan modda elde edilen resim sürekli modda kaydedilmiştir. İkinci aşamada, şırınga yardımı ile FTÇ (pH 7.2) borunun içerisine yüklendikten sonra tampon çözelti için A-mod genlik değerleri ve resimler kaydedilmiştir. Üçüncü aşamada ise, mikroköpükçük FTÇ solüsyonu içerisinde 1/10 oranında seyreltildikten sonra şırınga ile borunun içine enjekte edildi ve veriler ve resimler bilgisayar ile kaydedildi.

Başka bir deneyde, borunun içerisine mikroköpükçük solüsyonu enjekte edildikten hemen sonra, hem A-scan hem de B-scan modda veriler ve resimler kaydedildi. Daha sonra, karıştırma durduruldu ve mikroköpükçüklerin borunun üst kısmına doğru yükselmesi gözlemlendi. Bu süre içerisinde belirli aralıklarla A-scan ve B-scan modda veriler ve resimler kaydedildi.

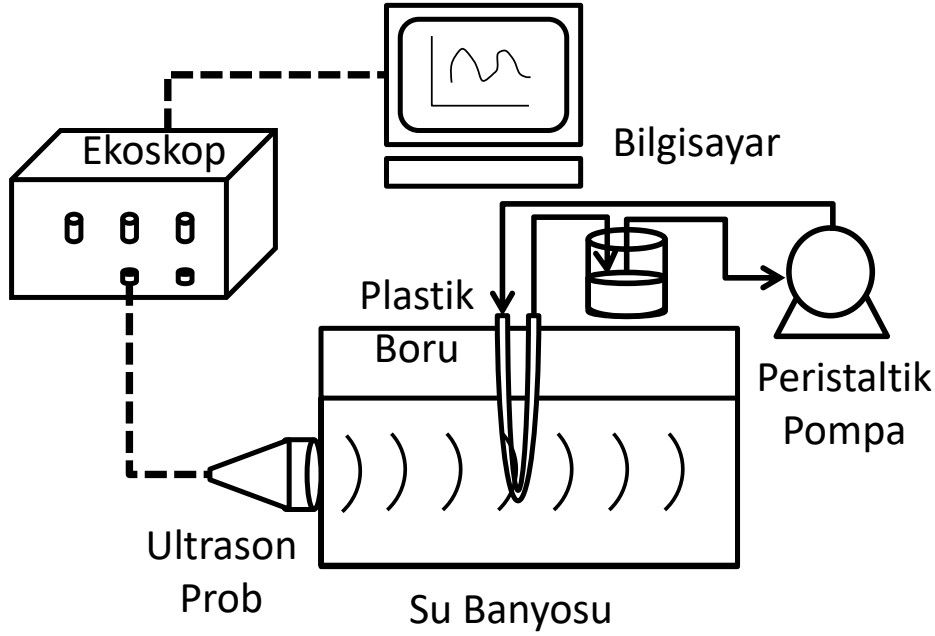
A-scan modda kalibrasyon çalışması: Mikroköpükçüklerin solüsyon içindeki konsantrasyonlar A-scan'deki maksimum genlik değerine göre kalibrasyon çalışmaları yapıldı. Bunun için **Şekil 18**'de gösterilen deney düzeneği kullanıldı. Ekoskopta vericinin çıkış gücü 10 dB olarak ayarlandı. İlk deneyde, borunun içerisine şırınga ile FTÇ enjekte edildi ve A-scan modda veriler kaydedildi. Daha sonra, stok mikroköpükçük solüsyonundan alınan mikroköpükçükler 1/100, 3/100, 7/100, 4/100, 5/100, 7/100 ve 10/100 oranında FTÇ içerisinde seyreltmeler yapılarak her bir seyreltilmiş solüsyon ayrı ayrı boruya enjekte edildi ve A-scan modda sinyal beklemeksizin kaydedildi. Mikroköpükçüklerin konsantrasyonunu

belirlemek üzere stok solüsyonundan 1/100 oranında seyreltme yapılarak optik mikroskopta 10X büyütmede belli bölgelerden resimler çekildi ve daha sonra ImageJ programında mikroköpükçüklerin sayımları yapıldı.

Mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteilerinin belirlenmesi: Mikroköpükçüklerin stabiliteilerini belirlemek üzere belli bir konsantrasyonda mikroköpükçükler bir şırınga ile ultrasona maruz bırakıldı. Zamanla konsantrasyondaki farklar gözlemlendi. Bu amaçla **Şekil 18**'de gösterilen deney düzeneği kullanıldı. 2 MHz frekansta, 10 dB çıkış gücünde ultrason etkisi gözlenmeye çalışıldı. Stok mikroköpükçük solüsyonu FTÇ içerisinde 1/25 oranında seyreltilerek boruya şırınga ile enjekte edildi. Yaklaşık 1 saat süre boyunca belirli aralıklarla karıştırma yapılarak o andaki B-scan modda elde edilen resimler kaydedildi. İkinci deneyde ise, bu sefer mikroköpükçükler FTÇ yerine deiyonize su içerisinde aynı oranda seyreltildi ve deney tekrarlandı.

Mikroköpükçüklerin farklı kayma gerilimlerinde ve ultrason altında stabiliteilerinin belirlenmesi: Mikroköpükçüklerin stabiliteileri bir peristaltic pompa vasıtasıyla ultrason bölgesine sürekli modda devridaim yapılarak test edildi. Deneyde, peristaltik pompa ile sirkülasyon yapılarak plastik boru içerisinde sürekli karıştırma sağlandı ve ultrason altında mikroköpükçüklerin zamanla stabilitesine bakıldı. Bu amaçla, **Şekil 19**'de gösterilen deney düzeneği tasarlandı. Şekilde, 2 MHz'lik prob jel ile içi deiyonize su dolu olan kabın yanıl yüzeyine, 2 mm çapındaki plastik boru ise kabın içerisine probun karşısında ve odak bölgesinde olacak şekilde yerleştirildi. Ekoskoptaki vericinin çıkış gücü 10 dB olarak ayarlandı. Plastik boru yardımıyla ependorf tüp içerisinden örnekler alınarak peristaltik pompaya ve pompa çıkışı ultrason bölgesine akacak şekilde düzenek sağlandı. Ultrason bölgesinden dönen akış ise tekrardan ependorf tüpe aktarıldı. Böylece sirkülasyon esnasında oluşacak hava kabarcıkları sistemden atılmış oldu. İlk deneyde, borunun içi boş iken ve daha sonra içi FTÇ ile doldurularak B-scan modda resimler kaydedildi. Daha sonra, stok mikroköpükçük solüsyonundan FTÇ içerisinde 1/10 seyreltme yapıldı, ve peristaltik pompa FTÇ sirkülasyona devam ederken, ependorf tüp içerisine 1 ml mikroköpükçük solüsyon eklendi. Pompa sürekli modda yaklaşık 4 dakika çalıştırıldı ve B-scan modda elde edilen resimler kaydedildi.

Başka bir deneyde, peristaltik pompadaki akış hızı daha düşük olan 8.1 ml/dk olarak ayarlandı. Stok solüsyonundan 1/20 seyreltme yapıldı, ependorf tüpün içerisine 1 ml eklendi ve sistem çalıştırıldı. Yaklaşık 80 dakika boyunca sirkülasyon gerçekleştirildi ve B-modda elde edilen resimler kaydedildi.



Şekil 19. Farklı kayma gerilimlerinde ve ultrason altında mikroköpükçük stabilite deney düzeneği.

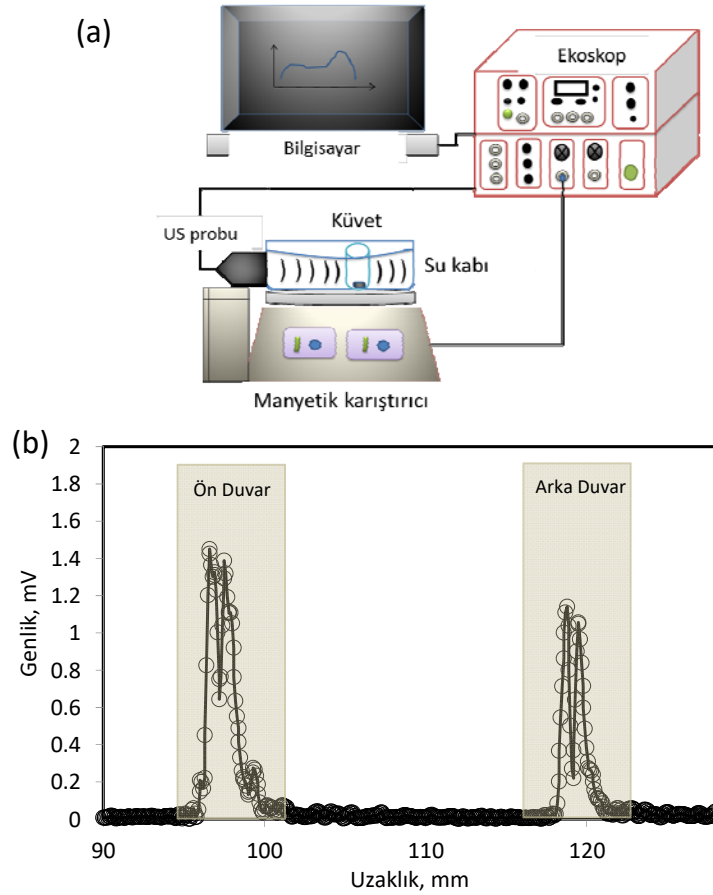
Ultrason kontrast maddesi mikroköpükçüklerin *in-vitro* stabilitelerinin belirlenmesi: Mikroköpükçüklerin *in-vitro* stabilitelerinin analiz edilmesi için Şekil 20(a)'da gösterilen yeni bir karıştırmalı kap deney düzeneği tasarlandı. İçi saf su dolu bir su kabının yanal yüzeyine ultrasonik prob jel yardımı ile yerleştirildi. Probun tam karşısında ve odak bölgesinde olacak şekilde duvarları düz olan polipropilen malzemeden yapılmış 20 ml'lik bir küvet, su dolu kabin içine daldırılarak kabin tabanına yapıştırıcı ile yapıştırılmış ve ortası oyulmuş köpük içerisine yerleştirildi. Deney sırasında küvetin yüzeyinden yansıyacak olan ses sinyallerinin cismin hareketiyle değişmesi istenmeyen bir durum olduğundan, deney süresince küvetin tamamen hareketsiz kalması sağlandı. Su kabı manyetik karıştırıcının üzerine konuldu. Manyetik karıştırıcı ile mikroköpükçüklerin ultrason altında homojen bir şekilde karışması sağlandı.

Küvet içerisinde sadece fosfat tampon çözeltisi (FTÇ) varlığında küvetten geri yansıyan akustik sinyaller karakterize edildi. Şekil 20(b)'de görüleceği üzere, küvetin ön ve arka duvarından iki ses sinyalinin pik verdiği görüldü. Küvetin iki duvar arasındaki genişliği yaklaşık 22 mm olarak ölçüldü. Buna göre iki sinyal arasındaki uzaklığın da 22 mm olduğu teyit edildi. Küvet içerisinde sadece FTÇ var iken küvetin arka yüzeyine ulaşan ses dalgası herhangi bir enerji kaybına uğramadan geri sisteme belli oranda yansırken, küvetin içerisine belirli konsantrasyonlarda mikroköpükçükler konulduğunda küvetin ön duvarından geçen ses dalgası ortamdaki mikroköpükçüklerden dolayı enerji kaybına uğramakta ve küvetin arka duvarına geçememektedir. Buradaki enerji kaybı atenüasyon olarak adlandırılmaktadır.

Böylece arka duvardaki ses sinyali azalmakta ve yüksek konsantrasyonlarda mikroköpükçükler varlığında sinyal kaybolmaktadır. Mikroköpükçük konsantrasyonuna bağlı atanüasyondaki azalma Denklem (23) ile verilebilir. (Dejong vd. 1992, Frinking ve De Jong 1998):

$$\frac{I_{Atten}}{I_{Ref}} = e^{-\mu_e d C} \quad (23)$$

Burada, I_{Atten} küvet içerisinde mikroköpükçük koyulduktan sonra arka duvardan geri yansıyan ses dalgasının intensitesi, I_{Ref} küvet içerisinde sadece FTÇ var iken arka duvardan geri yansıyan ses dalgasının intensitesi, μ_e sönümlenme katsayısı, d küvet içerisinde ses dalgasının geçtiği aralık, ve C mikroköpükçük konsantrasyonu'nu göstermektedir. Tıpkı UV absorplamada olduğu gibi, burada da intensite oranının eksi loaritması ortamda bulunan mikroköpükçük konsantrasyonu ile doğru orantılı olacağı görülmektedir. Bu özellikten faydalanarak, mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteyi belirlenmiştir.



Şekil 20. Ultrason kontrast maddesi mikroköpükçüklerin ultrason altında *in-vitro* stabiliteyi belirlenmesi için laboratuvar ölçüğünde tasarlanan deney düzeneği.

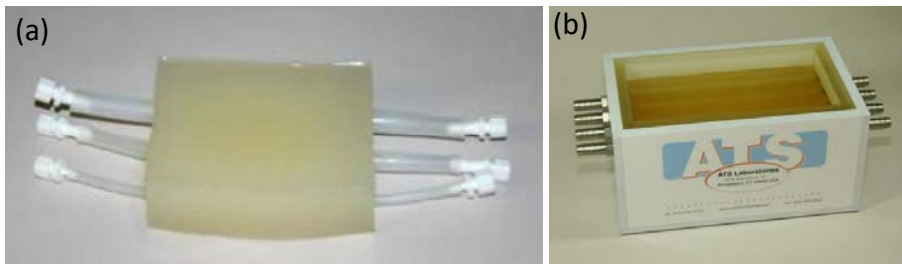
3.7 Farklı Kompozisyonda Mikroköpükçüklerin *In-Vitro* Ekojenitelerinin Belirlenmesi

Ultrason kontrast maddesi mikroköpükçüklerin *in-vitro* ekojeniteleri **Şekil 21**'de gösterilen hayvan deneylerine dedike yüksek çözünürlüklü Visual Sonics Vevo 2100 model ultrasonografi cihazı ile tespit edilmiştir. Cihaz, kalp ritmi ve solunum fonksiyonlarını takip edebilen sensörler ihtiva eden ve sabit sıcaklık sağlayan bir tabla, sonikatör probu, bu probun X-Y-Z düzleminde ayarlamasını yapabilen bir kaldırma ve sabitleme platformu, ve sabit voltaj ünitesi ihtiva etmektedir. Ölçümler, bu cihazın yüksek çözünürlüklü problarından biri olan 9-18 MHz MS 200 prob ile gerçekleştirilmiştir.



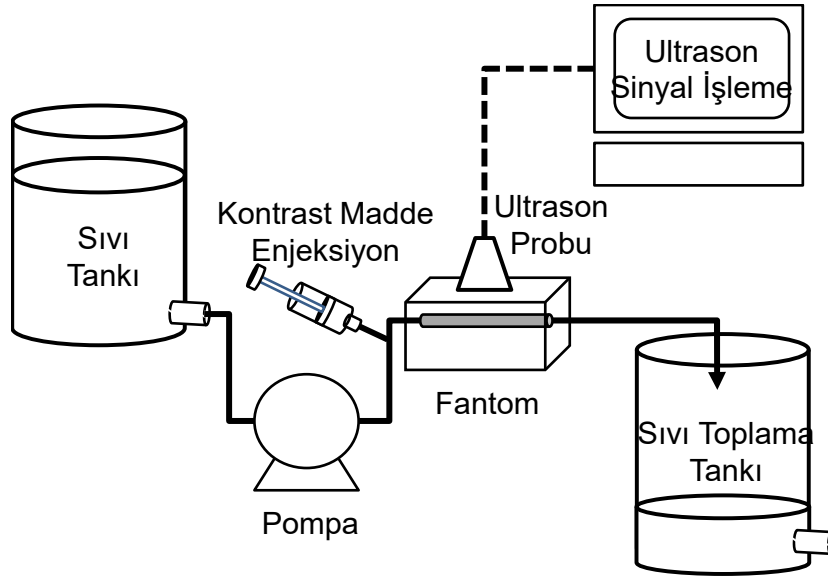
Şekil 21. Deneylerde kullanılan Vevo 2100 deney hayvanlarına dedike ultrasonografi sistemi, üç boyutlu transducer konumlandırma sistemi ve deney hayvanı stabilizasyon tablası.

Mikroköpükçükler 2 adet vasküler fantom modeli içerisinde farklı akış hızlarında **Şekil 22**'de gösterilen üç damar eğitim fantomu ve periferel vasküler doppler akım darlık fantomundan geçirilerek ultrason altında ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 22. (a) ATS Laboratories Model VP-3 Üç damar eğitim fantomu (b) ATS Laboratories Model 525 periferel vasküler doppler akım darlık fantomu.

Ultrason kontrast maddelerin ekojenitelerin belirlemek üzere Şekil 23'da gösterilen Akış Fantomu deney düzeneği kullanılmıştır. Ultrason prob akış fantomu üzerine yerleştirilmiş ve bir pompa vasıtasıyla sabit akış sıvısına ultrason kontrast maddeleri belli bir bolus hacimde enjekte edilmiştir. Ultrason kontrast madde mikroköpükçüklerin boru içerisinde yayılması sonucu, geriye yansıyan ultrason sinyaller B-mod'da kaydedilmiştir. Akış daha sonra bir toplama kabında toplanmıştır. *In-vitro* deney ile mikroköpükçüklerin değişik akış hızı, konsantrasyon ve hacimde davranış şekillerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla %10'dan %90'a kadar değişik oranlarda PEG₄₀St oranlarına sahip mikroköpükçükler deneylerde kullanılmıştır. Bu deneyde çoğunluğu 40 µl olmak üzere 10 ila 60 µl arasında değişen hacimlerde enjeksiyonlar yapılmıştır. Ayrıca %10-%90 arasında değişen PEG oranlarına sahip kontrast maddelerin 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ #/ml düzeyinde değişik konsantrasyonları uygulanmıştır. Akış hızları (1080-4000 rpm) arasında değişen enjeksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Her enjeksiyon serisinde bir değişken değiştirilmiş, diğer değişkenler sabit tutulmuştur.



Şekil 23. Ultrason kontrast maddelerin Akış Fantomu ile ekojenitelerinin tespiti için deney düzeneği.

3.8 Mikroköpükçüklerin *Ex-Vivo* Görüntüleri

Uygulayıcının deneyimini arttırmak ve mikroköpükçüğün *ex-vivo* dokudaki davranış şeklini değerlendirmek amacıyla *ex-vivo* deneyler planlanmış ve gerçekleştirilmiştir. *Ex-vivo* deney modelleri olarak tavuk göğsü, kuzu karaciğeri, rat karaciğeri, rat gluteal kası, rat dalağı

seçilmiştir. *Ex-vivo* deneyler Vevo2100 yüksek çözünürlüklü ultrasonografi cihazı altında 9 - 18 MHz prob ile gerçekleştirilmiştir.

Başka bir çalışma sonucu sakrifiye edilen bir sıçanın karaciğeri eksize edilerek çıkartılmış ve portal venden 24G branül yerleştirilerek enjeksiyona uygun bir sistem hazırlanmıştır. Hazırlanan girişten 0,02 mL hacimde 3×10^7 #/mL konsantrasyonda mikroköpükçük uygulanarak eş zamanlı olarak ultrasonografi altında değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Bu enjeksiyon ile portal ağaç vasküler yatağı mikroköpükçükler ile doldurulmuş ve dokunun vaskülarizasyonu ve perfüzyonu ultrasonografik olarak görüntülenmiştir. Görüntüler video olarak kaydedilmiştir. Bu karaciğer dokusundan 5,4 mm² alana sahip ROI ile ölçümler yapılmış ve dokudaki ekojenite artışı gösterilmiştir.

3.9 Mikroköpükçüklerin *In-Vivo* Toksisiteleri

In-vitro ve *ex-vivo* deneylerin ardından mikroköpükçüklerin hayvan modelindeki uygulanımına yönelik deneyim kazanmak amacıyla tek bir sıçan(rat)'da enjeksiyon uygulaması yapılmıştır. Başka bir çalışmadan çıkartılan rat üzerinde deneme amaçlı enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Visual Sonics Vevo 2100 model hayvan deneylerine dedike yüksek çözünürlüklü ultrasonografi cihazı deney düzeneğinde rat'ın stabilizasyonu ve monitorizasyonu için büyük hayvan tablası yer almaktadır. Sıçana planlanan oranda ketamin hidroklorid ve ksilazin ile genel anestezi uygulanmıştır. İdame anesteziye gerek kalmamıştır. Sıçan büyük hayvan tablasında stabilize edilmiştir. Kuyruk veninden iğne ile kataterizasyon gerçekleştirilmiştir. Üst abdomen düzeyine yerleştirilen MS 200 prob, aynı kesitte vena kava inferior(VCI), abdominal aorta ve portanın görüntülenebileceği şekilde konumlandırılarak sabitlenmiştir. Sıçanın kuyruk veninden hazırlanan mikroköpükçüklerden yaklaşık 10^8 #/ml konsantrasyonda 0,1 ml volümde uygulanmıştır. Eş zamanlı olarak ultrasonografi görüntüleri kaydedilmiştir. Görüntüler bu veri değerlendirmesi için dedike olarak hazırlanmış Vevo CQ yazılım programı ile işlenerek değerlendirilmiştir. VCI, aorta ve vena portaya yerleştirilen ROI (region of interest)'ler ile Vevo CQ yazılımı kullanılarak damarlardaki mikroköpükçük dağılımı zaman-ekojenite intensite eğrisi şeklinde grafiğe dökülmüştür.

In-Vivo deneylerde ağırlıkları 200-400 g arasında değişen Wistar Albino Hannover soyu erkek sıçan ile ağırlıkları 2-3 kg arasında olan erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanılmıştır. Hayvanlar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisiplin Laboratuvarı Deney Hayvanları Biriminden temin edilmiş, çalışma süresince aynı laboratuvarında 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 ve Yerel Etik Kurulun belirlediği kurallara uygun olarak bakım ve beslenmeleri yapılmıştır.

Hayvanların kafeslenmesi ve etiketleme: Sıçanlar yeni ortamlarına alışmaları için deneye başlamadan iki gün önce her kafeste 4 hayvanı geçmeyecek şekilde gruplandırılmış ve kuyruk işaretleme yöntemi ile etiketlenmiştir. Tavşanların kulaklarına renkli kalemlerle işaretleme yapılmış ve her kafeste iki hayvan olacak şekilde barındırılmıştır.

Sıçanların bazal kan ve idrarlarının alınması: Hayvanların ultrasonografi ile görüntülemeleri yapılmadan önce bazal kan ve idrar örnekleri alınmıştır. Hayvanlar Ketamin/Ksilazin 80-100/5-10 mg/kg kombinasyonu ile i.p olarak anestezide alınmıştır. Ketamin/Ksilazin'in vazokontrüksiyon yarattığı gözlenmiş, bazı durumlarda eter ile anaestezi uygulanmıştır. Her hayvandan anestezide 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 24**'de gösterilen metabolizma kafeslerine alınmış ve 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 24. Sıçan metabolizma kafesi

Tavşan bazal kanlarının alınması: Hayvanlar Ketamin/Ksilazin 35/5 mg/kg kombinasyonu ile i.m. olarak anestezide alınmış ve her hayvandan anestezide altında kulak veninden 4'er ml kan alınarak biyokimya ve hemogram testlerinin analizi için biyokimya laboratuvarına gönderilmiştir. Tavşanlarda idrar ve dışkı ölçümleri yapılmamıştır.

Ultrasonografik Görüntüleme: Ultrasonografi ile görüntüleme, karaciğer ve böbrek görüntüleme olmak üzere iki farklı şekilde yapılmıştır. Bazal kanları alınmış ve etiketlenmiş

sıçanlar Ketamin/Ksilazin 80-100/5-10 mg/kg kombinasyonu ile i.p. olarak anesteziye alınmıştır. İnceleme yapılacak bölgeye göre değişmekle birlikte supin pozisyonda karaciğeri veya pron pozisyonda sol böbreği görüntüleyecek şekilde bölgedeki tüyler, tüy dökücü kremle (Nair, Church&Dwight Co. Inc.-Princeton) temizlenmiştir. Kuyruk veni kataterize edilmiştir. Hayvan, ultrason görüntülemenin yapılacağı tablaya, karaciğer için sırt üstü pozisyonda, böbrek görüntülemesi için yüz üstü pozisyonda yatırılmış ve sabitlenmiştir. Rektal prob takılmıştır. Ultrason görüntüleme için enjekte edilecek madde olarak serum fizyolojik, mikroköpükçük, ve karşılaştırma amaçlı piyasada bulunan Vevomarker mikroköpükçük kullanılmıştır. Ultrason görüntüleme için enjekte edilecek madde verilmiş ve ultrason ile görüntüleme yapılmıştır.

Ultrason görüntüleme bittikten sonra her hayvana 2 ml serum fizyolojik enjekte edilmiş ve ayrı bir kafeste ayılması beklenmiştir. Anestezinin etkisi geçtikten sonra hayvanlar tekrar metabolizma kafeslerine alınmış, 24 saat boyunca metabolizma kafesinde su ve yem tüketim miktarı ile idrar ve dışkı miktarı gözlemlenmiştir. Metabolizma kafesinde 24 saat tutulan hayvanların idrarları toplanmıştır. Hayvanlar yüksek doz anestezi madde kullanılarak sakrifiye edilmiş ve vena cava caudalisten biyokimya ve hemogram parametreleri için kan alınmıştır. Akabinde her iki böbrek, karaciğerin lobus hepatitis sinister, sağ akciğerin lobları ve beyin organları alınarak patoloji laboratuvarına gönderilmiştir.

Tavşanlar Ketamin/Ksilazin 35-50/5-10 mg/kg kombinasyonu ile i.m. olarak anesteziye alınmış ve kateterizasyon kulak veninden yapılmıştır. Görüntüleme karaciğer ve abdominal aortadan yapılacağı için batin tüy dökücü kremle temizlenmiştir. Hayvan ultrason görüntülemenin yapılacağı tablaya sırt üstü pozisyonda yatırılmıştır. Ultrason görüntüleme için enjekte edilecek mikroköpükçük verilmiş ve ultrason görüntüleme yapılmıştır. Tavşanlar metabolizma kafeslerine alınmamış, normal barındırma kafeslerinde tutulmuştur. Tavşanlar ultrason görüntülemeden 24 saat sonra yüksek doz anestezi madde kullanılarak sakrifiye edilmiştir. Hayvanlardan vena cava caudalisten biyokimya ve hemogram parametreleri için kan alınmıştır. Sonrasında her iki böbrek, karaciğerin lobus hepatitis sinister, sağ akciğer lobları ve beyin organları alınarak patoloji laboratuvarına gönderilmiştir.

İdrar örneklerinde kreatinin ve üre değerleri ölçülmüştür. Kan örneklerinde ölçülen biyokimya parametreleri kreatinin, üre, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), albümin, direkt, indirekt ve total bilirubindir. Kanda ölçülen hemogram parametreleri alyuvar sayısı (RBC), hemoglobin, hematokrit, ortalama alyuvar hacmi (MCV), ortalama alyuvar hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), alyuvar dağılım genişliği (RDW), trombosit, ortalama trombosit hacmi (MPV), PCT, akyuvar (lökosit), nötrofil, lenfosit, monosit, bazofil ve eozinofildir.

Sıçan'da Tanısal Doz Çalışması: Deney günü numaralandırılmış 7 sıçan deneye alınmıştır. Sıçanlar hayvan tablasına sabitlenmiştir. Hayvan tablasındaki sensörler ile

solunum ve kalp atışı ultrasonografi ekranında görüntülenebilmektedir. Solunum ve kalp ritmi görüntü kaydı sırasında eş zamanlı olarak da kayıt altına alınmıştır. Sıçanın vücut sıcaklık ölçümü için tabla ile uyumlu çalışan rektal prob uygulanmıştır. Solunum ve kalp ritmi gibi vücut sıcaklığı da bu prob aracılığı ile ultrasonografi ekranında izlenmiş ve görüntüler kaydedilmiştir. Tanımlanan şekilde hazırlanan ve stabilize edilen sıçanın kuyruk veninden 27G iğne ile kataterizasyon gerçekleştirilmiştir. Bir sıçan damar yolu açılmadığı için deney dışı bırakılmıştır. Üst abdomen düzeyine yerleştirilen MS 200 prob, aynı kesitte vena kava inferior (VCI), abdominal aorta ve vena portanın görüntülenebileceği şekilde konumlandırılarak sabitlemiştir. Konumlandırma ve sabitleme için **Şekil 25**'de görülen Vevo2100 model hayvan deneylerine dedike yüksek çözünürlüklü ultrasonografi cihazının komponenti olan üç boyutlu konumlandırma sistemi kullanılmıştır. Sıçanın kuyruk veninden, hazırlanan mikroköpükçükler değişik konsantrasyonlarda 50 µl hacimde uygulanmıştır. Eş zamanlı olarak ultrasonografi görüntüleri kaydedilmiştir. Her bir enjeksiyonda 20 dakika boyunca görüntü kaydı alınarak mikroköpükçüklerin ölçülebilen anlamlı ekojenite oluşturmadığı zamana dek beklenmiştir.



Şekil 25. Üç boyutlu konumlandırma sistemi ve sıçanda abdominal değerlendirme.

Görüntüler Vevo CQ yazılım programı ile işlenerek değerlendirilmiştir. VCI, aorta ve vena portaya yerleştirilen ROI (region of interest) ile Vevo CQ yazılımı kullanılarak damarlardaki mikroköpükçük dağılımı zaman-ekojenite eğrisi şeklinde grafiğe dökülmüştür.

Mikroköpükçüklerin Bilinen ticari form ile karşılaştırması: İkinci deney grubu olarak mikroköpükçüklerin referans ticari mikroköpükçük ile karşılaştırılması planlanmıştır. Bu amaçla, 4 sıçana mikroköpükçük, 3 sıçana ticari referans mikroköpükçük ve 3 sıçana ise sham olmak üzere toplam 10 sıçanlı deney grubu oluşturulmuştur. Referans ticari mikroköpükçük olarak Visualsonics Vevomarker® kullanılmıştır. Vevomarker® deney

hayvanlarına yönelik geliştirilmiş ve bu amaçla yaygın olarak kullanılan mikroköpükçük formülasyonudur. Bu deney grubu için de önceki grupta uygulanan bazal metabolizma kafesi süreci, anestezi, ilaç uygulama, takip metabolizma kafesi, sakrifikasyon ve patolojik değerlendirme basamakları aynen tekrarlanmıştır.

Sıçanlarda böbrek modeli ekojenite çalışması: Planlanan deney için 2 adet pilot sıçan üzerinde böbrek modelinin uygulaması gerçekleştirilerek deneyim kazanılmıştır. Başka bir çalışma sonucunda alınan iki sıçan üzerinde pilot çalışma yapılmıştır. Bu deney modelinde sıçan, benzer şekilde anestezide alınmış ve büyük hayvan tablasında yüz üstü pozisyonunda stabilize edilmiştir. Sol böbrek bakışı için sıçanın sırt ve sol yan bölgesi tüy dökücü krem ile tüylerden arındırılmıştır. Bu alana konumlanan ultrason probu ile değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Diğer tüm veri kayıt basamakları ve hazırlıklar, önceki deney düzeneğindeki gibi oluşturulmuştur. Bu deney grubu için de mikroköpükçük uygulaması ardından takip metabolizma kafesi, sakrifikasyon ve patolojik değerlendirme basamakları aynen tekrarlanmıştır.

Böbrek modeli deney grubunda 13 sıçan üzerinde tanısal doz çalışması ve ticari ürün ile karşılaştırma gerçekleştirilmiştir. Bu grupta 2 sıçan deney dışı kalmış olup 3 sıçana Vevomarker 5×10^8 konsantrasyonda, diğer 4 sıçana 2.5×10^8 ve 4 sıçana 5×10^8 konsantrasyonda mikroköpükçük konsantrasyonları uygulanmıştır. Tüm enjeksiyon volümleri 0,15 ml'dir. 2.5×10^8 ve 5×10^8 enjeksiyon gruplarından birer sıçan kuyruk problemi sebebiyle çıkarılmıştır. Bunun sonucunda her grupta 3 adet enjeksiyon bulunmaktadır. Tüm bu enjeksiyonlarda görsel olarak ekojenite artışı seçilebilmiştir. Tüm enjeksiyonlar Vevo CQ ve manuel yöntem olmak üzere iki yöntemle ölçülmüştür.

Sıçanlarda toksik doz çalışması: 12 enjeksiyon grubu ve 4 sham olmak üzere toplam 16 sıçan üzerinde deney gerçekleştirilmiştir. Bu sıçanlar önceki deneylerdeki gibi hazırlanarak aynı veri kayıt basamakları ile görüntülemeye tabi tutulmuştur. Bu görüntülemelerde verilen yüksek doz ile benzer şekilde atenüasyon olduğu izlenmiş olup yüksek dozda mikroköpükçük uygulandığının ultrasonografi ile sağlanması yapılmıştır. Enjeksiyon sonrasında sıçanlar akut toksik etkiler için metabolizma kafesine alınmıştır. Geç toksik etkiler için 14 gün boyunca takip edilen sıçanlar bu süreç sonunda sakrifiye edilerek organ örnekleri patolojik değerlendirmeye gönderilmiştir.

Tavşan toksik doz çalışması: Tavşan deneylerinde ilk olarak 2 pilot tavşan üzerinde deneyim kazanılmıştır. Bunun ardından toksik dozun sıçana göre daha büyük bir modelde değerlendirilmesi amacı ile 6 adet tavşana yüksek doz mikroköpükçük enjeksiyonu planlanmıştır. Tavşanların abdominal bölgelerindeki tüyler uzaklaştırıldıktan sonra 3 boyutlu konumlandırma sistemi ile ultrasonografik değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde ultrasonografik değerlendirmenin amacı kontrast maddenin sisteme ulaştığından ve beklenen şekilde yüksek dozda olduğunu düşündürecek şekilde atenüasyon oluşturduğundan emin

olmaktadır. Bu deney sonucunda 24 saat takip edilen tavşanlar sakrifiye edilerek dokuları patolojiye gönderilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Ultrason Kontrast Ajanı Mikroköpükçüklerin Üretilmesi ve Verimi

Mikroköpükçükler bir sıvı içerisinde süspansiyeye olmuş, içleri gaz dolu, yüzeyi farklı kompozisyonlarda lipid ve emülsifiyer ihtiva eden mikro boyutlarda taneciklerdir. İçleri gaz dolu olmasından dolayı yoğunlukları sıvı yoğunluğundan düşüktür ve sıvı yüzeyine yükselme eğilimindedirler. Daha kararlı mikroköpükçük üretebilmek için içinde bulunduğu sıvı ortamının, içeri dolduracak gaz türünün ve zar yapısını oluşturacak lipid kompozisyonunun her birinin dikkatlice seçilmesi ve tasarlanması gerekmektedir.

Mikroköpükçükler in-vivo çalışmalarda kullanılmak üzere vucuda verileceğinden, mikroköpükçükleri ortamda süspansiyede edecek sıvının distile su, serum fizyolojik sıvı (SF), ya da serum türü sıvılar olması gerekmektedir. Laboratuvar ölçekli çalışmalarda içinde süspansiyede edilecek sıvı ortamı hacimce 4:1 oranında fosfat tamponlu çözelti ile propilen glikol (PG) karışımından oluşmaktadır. Ortam pH'ı 7.2 olarak ayarlanmıştır.

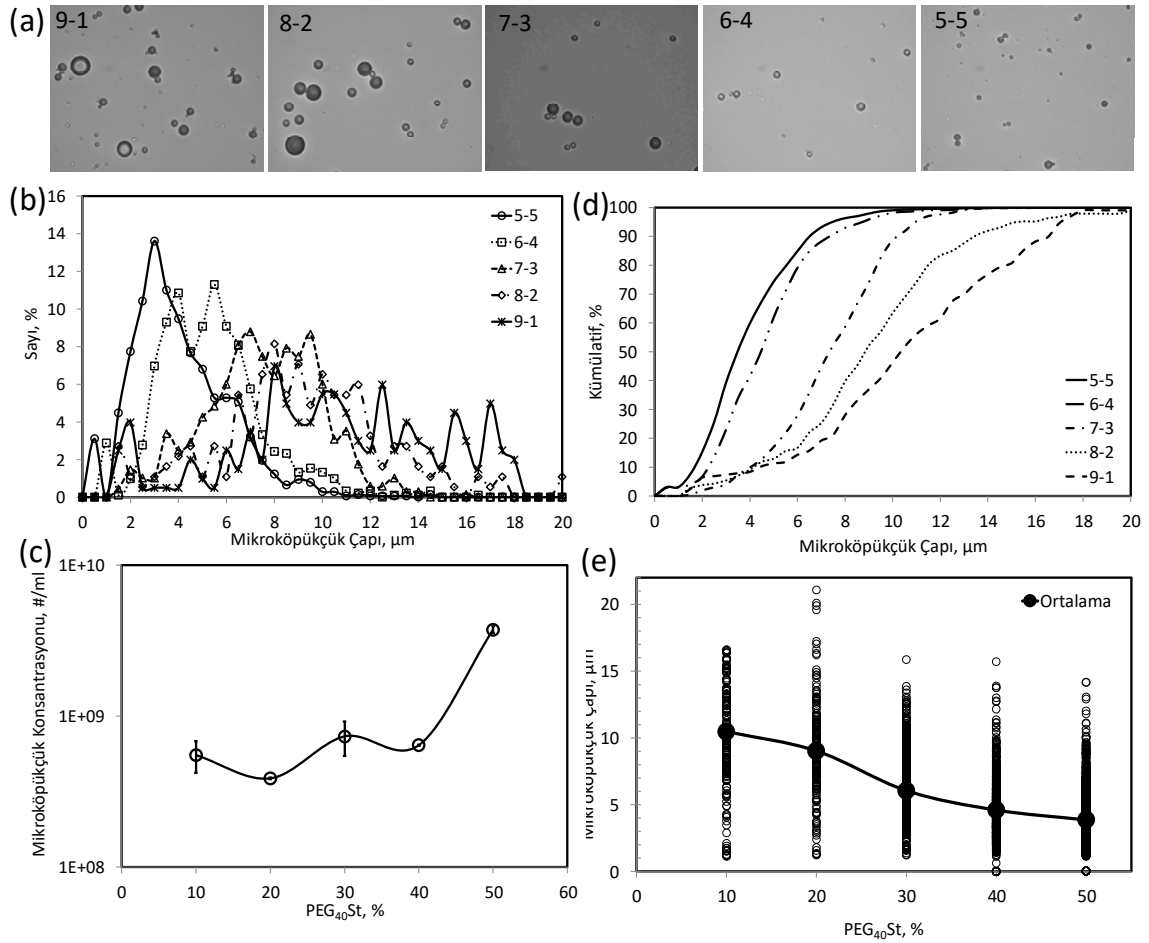
Mikroköpükçükleri oluşturan gaz fazı hava, azot (N₂), perflorokarbon gazları (PFC) olabilir. Bu gazlardan en ucuz ve bol olanı havadır. PFC gazı suda çözünmeyen bir gaz olduğundan mikroköpükçüklerin stabilitesini artırdığı bilinmektedir. Ancak, mikroköpükçüklerin üretim maliyetlerini önemli ölçüde artırmaktadır.

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 PEG₄₀St komponentlerden 9:1 oranında karıştırılarak mikroköpükçükler oluşturulmaktadır (Borden ve Longo 2002, Cox ve Thomas 2010, Kwan ve Borden 2010, Swanson vd. 2010). DSPC genel olarak pahalı bir lipid'dir ve üretilen mikroköpükçüklerin fiyatını artıran da bir unsur olmaktadır.

İçi Hava Dolu Mikroköpükçük Üretimi: Yapılan çalışmalarda ilk olarak içleri hava dolu, farklı DSPC ve PEG₄₀St kompozisyonlarında mikroköpükçükler hazırlanmıştır. Hazırlanan mikroköpükçüklerin ışık mikroskop görüntüleri **Şekil 26(a)**'da gösterilmektedir. Resimlerde görüleceği üzere, hava mikroköpükçüklerinin boyutları PEG₄₀St miktarı arttıkça azalmaktadır. DSPC:PEG₄₀St oranı 9:1 olduğunda, hem büyük hem de küçük boyutlarda mikroköpükçüklerin olduğu, DSPC:PEG₄₀St oranı 5:5'e gittikçe mikroköpükçüklerin

boyutlarının düştüğü ve daha homojen boyutlarda mikroköpükçükler üretildiği görülmektedir. Hava mikroköpükçüklerin boyut dağılımı optik yöntemiyle ölçülmüş ve **Şekil 26(b)**'de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere 9:1 mikroköpükçükleri 20 μm 'a kadar bir boyut dağılımına sahipken, 5:5 mikroköpükçükleri ancak 8 μm boyutlara kadar bir dağılım göstermektedir. PEG miktarı arttıkça boyut dağılımında bir daralma görülmektedir. 5:5 mikroköpükçüklerin daha dar bir tanecik boyut dağılımına sahip oldukları görülmektedir. **Şekil 26(c)**'de görüldüğü üzere, 5:5 mikroköpükçüklerin tanecik sayısı diğer kompozisyonlara göre daha fazladır. Farklı kompozisyonlardaki mikroköpükçüklerin kümülatif boyut dağılımları **Şekil 26(d)**'de verilmektedir. Farklı kompozisyonda hazırlanan hava mikroköpükçüklerin ortalama boyut dağılımları **Şekil 26(e)**'de özetlenmiştir. Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçük kompozisyonunda PEG₄₀St miktarı arttıkça, mikroköpükçüklerin boyutları küçülmekte ve daha homojen bir boyut dağılımı elde edilmektedir.

Bu bulgu önemlidir, çünkü mikroköpükçüklerin rezonans frekansları mikroköpükçüklerin boyutları ile değişmektedir (May vd. 2002). Mikroköpükçüklerin boyutları ile rezonans frekansları arasındaki ilişki pratikte $f \cdot 2R = 3 \text{ m/s}$ olarak verilebilir. Bu durumda, 1 MHz frekans için yaklaşık 3 μm üzeri boyutlarda mikroköpükçükler rezonansa geçerken, hayvan modeline dedike 18 MHz ultrason prob için daha çok 0.4 μm üzeri mikroköpükçükler rezonansa geçebileceklerdir.

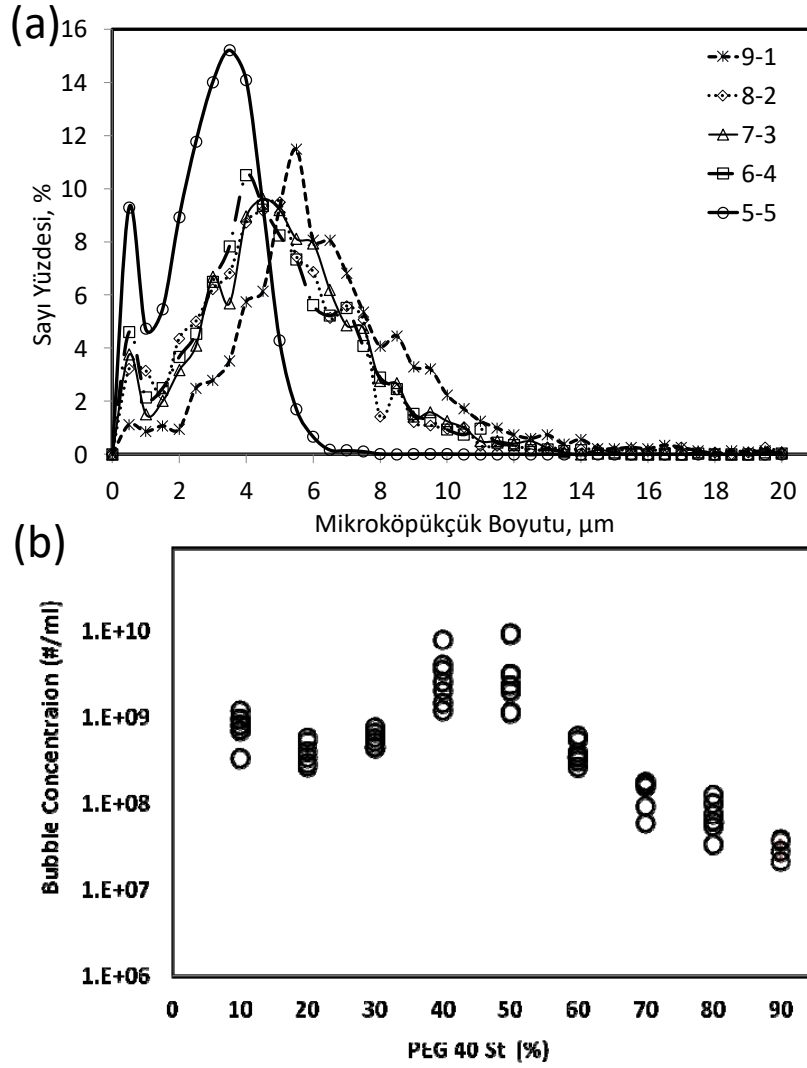


Şekil 26. Farklı DSPC:PEG₄₀St oranlarında hazırlanan içi hava dolu mikroköpükçüklerin (a) mikroskop görüntüleri, (b) boyut dağılımları, (c) üretim miktarları, (d) kümülatif boyut dağılımları, (e) ortalama boyutları.

İçi Perflorokarbon (PFC) Dolu Mikroköpükçük Üretimi: Farklı DSPC:PEG₄₀St oranlarında hazırlanan PFC mikroköpükçüklerin boyut dağılımları **Şekil 27(a)**'de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere PFC mikroköpükçüklerinin boyut dağılımları hava mikroköpükçüklerinin boyut dağılımlarından daha dar bir aralıkta seyretmektedir. 9:1 ve diğer oranlardaki PFC mikroköpükçükleri 12 µm'a kadar bir boyut dağılımı gösterirken, PFC 5:5 mikroköpükçükleri 6 µm boyutlara kadar bir dağılım göstermektedir. Ortalama mikroköpükçük boyutu ise yaklaşık 3.5 µm civarındadır. DSPC:PEG₄₀St oranı 5:5 PFC mikroköpükçük kompozisyonu diğer kompozisyonlar yanında en optimum boyut dağılımına sahip mikroköpükçük kompozisyonu olduğu anlaşılmaktadır.

DSPC:PEG₄₀St oranı 9:1'den 1:9'a kadar olan kompozisyonlarda mikroköpükçük üretim miktarlarına **Şekil 27(b)**'de verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, mikroköpükçük üretim miktarları PEG miktarı arttıkça artmaktadır. Ancak, DSPC:PEG₄₀St oranı 5:5 kompozisyonundan sonar daha yüksek PEG₄₀St miktarları ile üretilen mikroköpükçük

miktarlarında gözle görülür bir azalma olmuştur. Böylece mikroköpükçük kompozisyonu DSPC:PEG₄₀St oranı 5:5 olarak belirlenmiş ve birçok çalışmada 5:5 mikroköpükçük kompozisyonu kullanılmıştır.

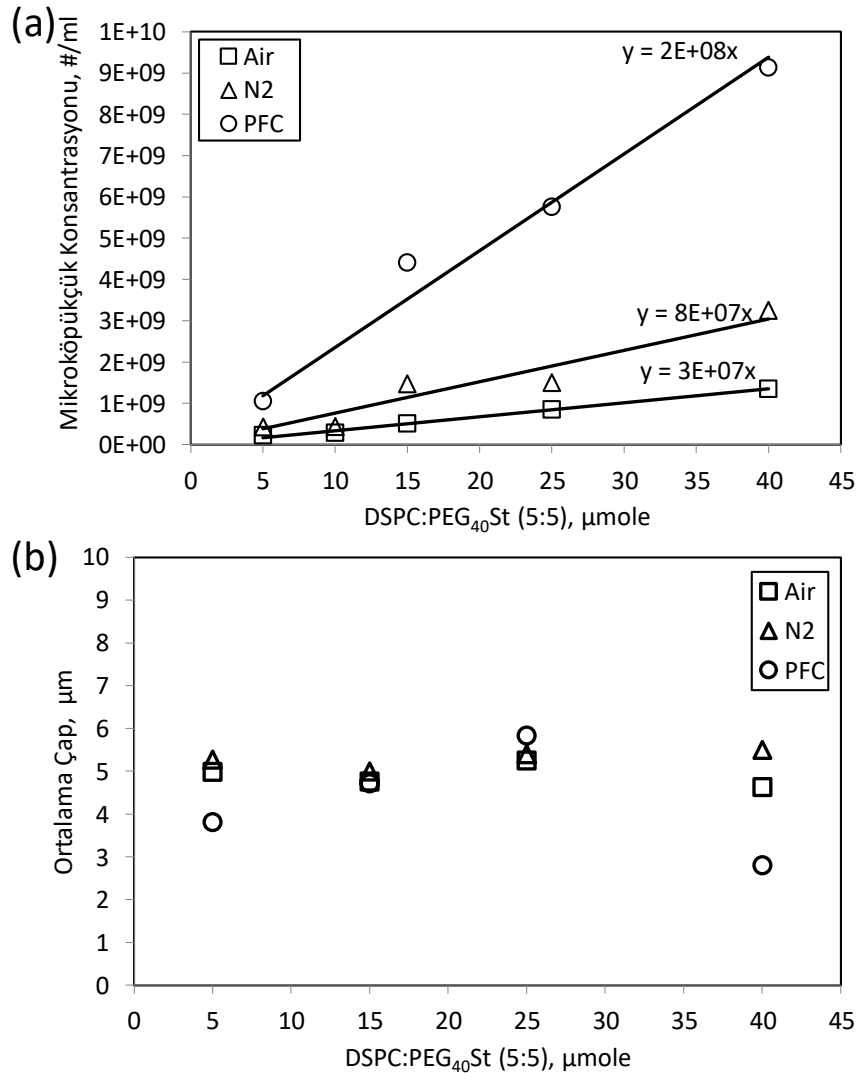


Şekil 27. Farklı DSPC:PEG₄₀St oranlarında hazırlanan içi PFC dolu mikroköpükçüklerin (a) boyut dağılımı, (b) üretim miktarları.

DSPC:PEG₄₀St oranı 5:5 olan mikroköpükçük kompozisyonu için farklı toplam lipid miktarlarında hava, N₂, ve PFC ihtiva eden mikroköpükçüklerin üretim miktarları **Şekil 28(a)**'da verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, her bir gaz ihtiva eden mikroköpükçük için, harcanan lipid miktarına göre mikroköpükçük konsantrasyonu doğrusal bir artış gözlenmiştir. Mikroköpükçükler için elde edilen lipid başına mikroköpükçük miktarı doğruların eğimlerinden bulunabilir. Bu, hava mikroköpükçükleri için 3.10⁷ #/ml, N₂ mikroköpükçükleri için 8.10⁷ #/ml, ve PFC mikroköpükçükleri için 20.10⁷ #/ml'dir. Mikroköpükçük

konsantrasyonunun kullanılan lipid miktarı ile doğrusal bir trend göstermesi, arzu edilen konsantrasyon için harcanması gereken lipid miktarı hakkında bilgi vermektedir.

Farklı gaz kompozisyonlarında hazırlanan mikroköpükçükler için ölçülen ortalama boyut değerleri **Şekil 28(b)**'de gösterilmektedir. Farklı gazlar için ölçülen ortalama boyut değerleri yaklaşık 5 μm civarındadır. En düşük ortalama mikroköpükçük boyutu, yaklaşık 2.5 μm ile 5:5 DSPC:PEG₄₀St kompozisyonun PFC gazı ihtive eden mikroköpükçükler için ölçülmüştür.



Şekil 28. DSPC:PEG₄₀St oranı 5:5 olan mikroköpükçük kompozisyonu için farklı toplam lipid miktarlarında hava, N₂, ve PFC gazlar ihtive eden mikroköpükçüklerin (a) üretim miktarları (b) ortalama boyutları.

Mikroköpükçük Üretimi için Verim Hesabı: Teorik olarak üretilebilecek maksimum mikroköpükçük konsantrasyon değerleri toplam harcanacak lipid miktarına ve mikroköpükçüklerin boyutlarına göre hesaplanmıştır. Bu amaçla, bir mikroköpükçüğün yüzey alanı S ve mikroköpükçük miktarı da ml'de $\#$ ise, lipidlerin yerleşebileceği toplam yüzey alan ($S.\#$) olur. Bir lipidin ortalama molekül başına alanı a ise, toplam lipid sayısı mikroköpükçüğün alanının toplam lipid alanına bölünmesiyle bulunabilir. Lipidleri mol olarak hesaplamak için lipid sayısını Avagadro sayısına, $N = 6.02.10^{23}$ molekül/mol, bölmek gerekir. Bu durumda, üretebilecek maksimum konsantrasyon için elde edilen teorik bağıntı, Denklem (24) ile verilebilir.

$$\# = (n. a. N) / (\pi. D^2) \quad (24)$$

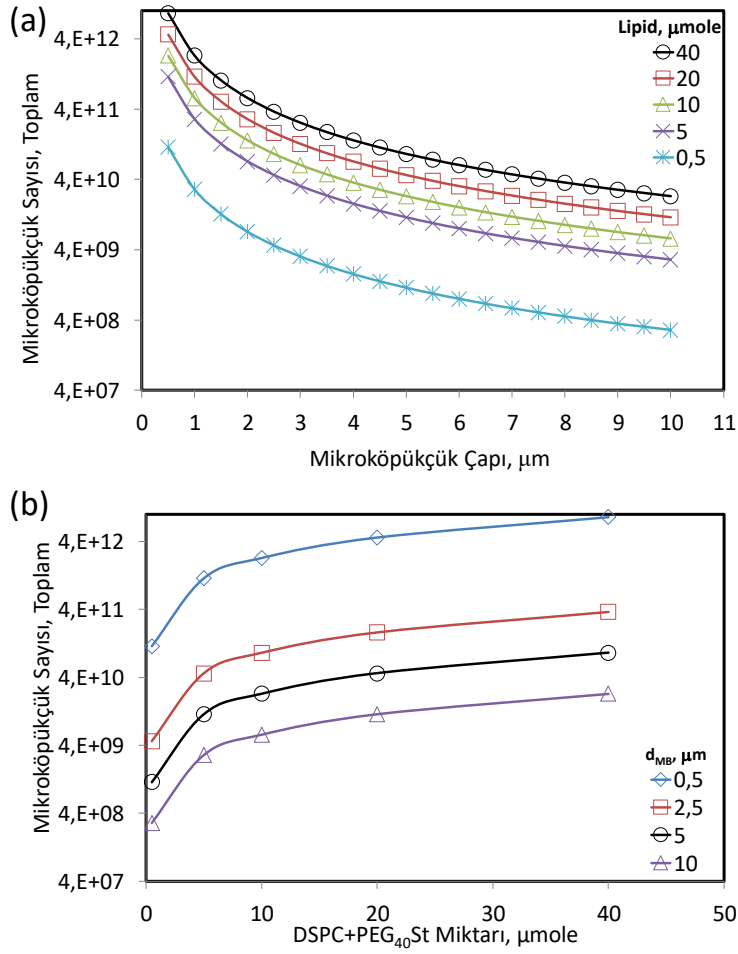
Burada, n mol olarak harcanan lipid miktarı, D mikroköpükçük boyutu ve lipid ve emülsifiyerin ortalama molekül alanı, sırasıyla DSPC için $40 \text{ \AA}^2/\text{molekül}$ ve PEG₄₀St için $30 \text{ \AA}^2/\text{molekül}$ 'dür (yayınlanmamış bilgi). Buna göre, elde edilebilecek maksimum mikroköpükçük konsantrasyonu, mikroköpükçük boyutuna göre ve toplam lipid miktarına göre ayrı ayrı **Şekil 29**'de hesaplanmıştır. Şekilde görüleceği üzere, yaklaşık 5 \mu m boyutta ve 40 \mu mole lipid miktarında yaklaşık 5.10^{10} mikroköpükçük üretilmesi mümkün olabilecektir.

Öte yandan, **Şekil 28(a)**'da elde edilen eğim değerleri kullanılarak Denklem (25) ile mikroköpükçüklerin üretimi için verim hesabı yapmak mümkündür.

$$\text{Verim}\% = (\text{eğim}) . (\pi. D^2) / (a. N) . 100 \quad (25)$$

Burada, mikroköpükçük üretim verimi mikroköpükçüklerin boyutunun karesi ile orantılı olduğu görülmektedir. Burada, değerler bilindiğine göre, **Şekil 28(a)**'da elde edilen eğim değerlerinden, 5 \mu m boyutlarında mikroköpükçük üretimi için verim değerleri hava mikroköpükçükleri için %1.12, N₂ mikroköpükçükleri için %2.98, ve PFC mikroköpükçükleri için %7.45 olarak hesaplanmıştır.

Hesaplanan verim değerlerinden görüleceği üzere, ortama konulan lipidlerin büyük bir kısmı mikroköpükçük yapısına girmeden yıkama esnasında atılmaktadır. Mikroköpükçük üretiminde verimin artırılmasının yollarına bakılmalıdır.



Şekil 29. Elde edilebilecek maksimum mikroköpükçük konsantrasyonunun hesaplanması, (a) mikroköpükçük boyutuna göre, (b) toplam lipid miktarına göre.

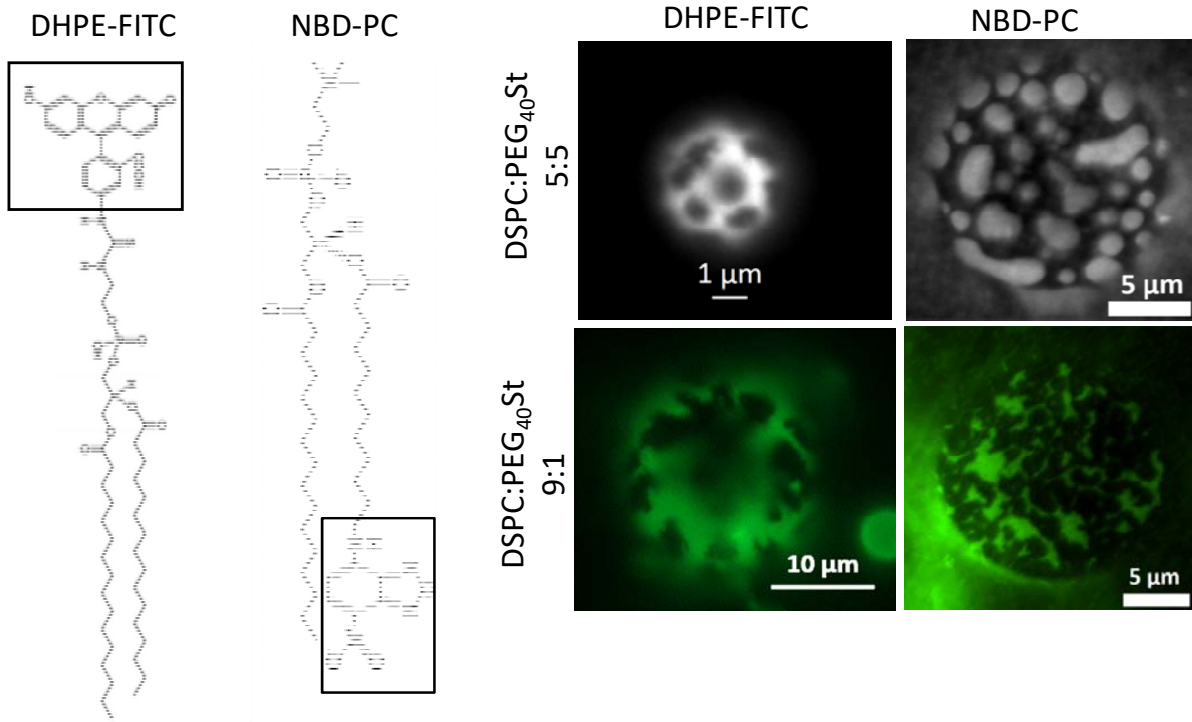
4.2 Mikroköpükçüklerin Yüzey Morfolojisi

Floresan mikroskopu ile yapılan çalışmalarda genel olarak floresan probun lipidlerin faz davranışlarını etkilemediği kabul edilmektedir. Proben, lipidlerin faz davranışlarını etkilemeyecek kadar az; ancak sinyal-gürültü oranı yüksek görüntü alınabilmesi için probun belli bir miktarın üstünde formulasyona katılması gerekir. Bu proje kapsamında, **Şekil 30'**de görüleceği üzere, Florescein-5-Thiocarbamoyl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine, Triethyl-ammonium tuzu (FITC-DHPE) ve 2-(12-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)amino) Dodecanoyl-1-Hexadecanoyl-sn-Glycero-3 Phosphocholine (NBD-PC) olmak üzere iki farklı floresan probu kullanılarak morfolojik değişimler incelenmiştir. NBD-PC literatürde mikroköpükçüklerin floresan mikroskopu ile yapılan çalışmalarda en sık kullanılan prob olarak karşımıza çıkmaktadır ve genel olarak %1 oranında mikroköpükçük karışımına

ilave edilmektedir (Borden vd. 2004, Borden vd. 2005, Borden vd. 2006). Şekilde görüleceği üzere, NBD-PC probunun floresan grubu fosfolipitin hidrofobik kuyruk kısmında yer alırken, FITC-DHPE'de hidrofilik baş grup kısmında yer almaktadır. NBD-PC mikroköpükçüklerin iç kısmında yer alması dolayısıyla, hidrocarbonlar arası hidrofobik ve van der Waals kuvvetlerin azalmasına sebebiyet verdiği, ve bu yüzdede sıvı-düzensiz fazı daha çok tercih ettiği ve o bölgelerde bir aydınlanma sağladığı düşünülebilir. FITC-DHPE'de floresan grup fosfolipidin baş kısmında yer almaktadır ve büyük baş grupları arasındaki sterik etkileşimler nedeniyle yine sıvı-düzensiz faz içinde karıştığı düşünülebilir. Bordovsky (Stefan S. Bordovsky) tarafından yapılan bir çalışmada, FITC-DHPE'nin sıvı-düzensiz faz içinde daha çok dağıldığı rapor edilmiştir. Baş grupta floresan grup içeren Texas Red-DHPE'nin de yine sıvı-düzensiz faz içinde karıştığı belirtilmektedir (Skaug vd. 2011). NBD-PC molekülünün mikroköpükçüklerde daha çok emülsifier bakımından zengin faz ile karıştırdığı, dolayısıyla aydınlık bölgelerde emulsifier yoğunluğunun daha fazla, karanlık bölgelerde de fosfolipit oranının yüksek olduğu ifade edilmektedir (Borden vd. 2004). Sonuç olarak, bu probun sıvı-düzensiz faz (liquid-disordered phase) içinde dağıldığı kabul edilmektedir (Borden vd. 2004, Pu vd. 2005). Şekilde görüldüğü üzere, kullanılan floresan probun türüne ve miktarına göre morfolojiler farklılık göstermektedir. FITC-DHPE ile hazırlanan mikroköpükçüklerde sürekli faz aydınlık görünürken, NBD-PC probu ile sürekli fazın karanlık bölgeler olduğu görülmektedir. FITC-DHPE ve NBD-PC floresan molekülleri ile üretilen mikroköpükçüklerde oluşan yüzey morfolojilerinde aydınlık bölge ile karanlık bölgeler birbirinin tamamlayıcısı gibi gözükmektedirler. Literatürde bahsedildiği üzere, NBD-PC molekülü daha çok emülsifier fazı içerisinde karışma eğilimi var ise, FITC-DHPE molekülünün DSPC lipid faz içinde dağıldığı gibi bir durum ortaya çıkmaktadır.

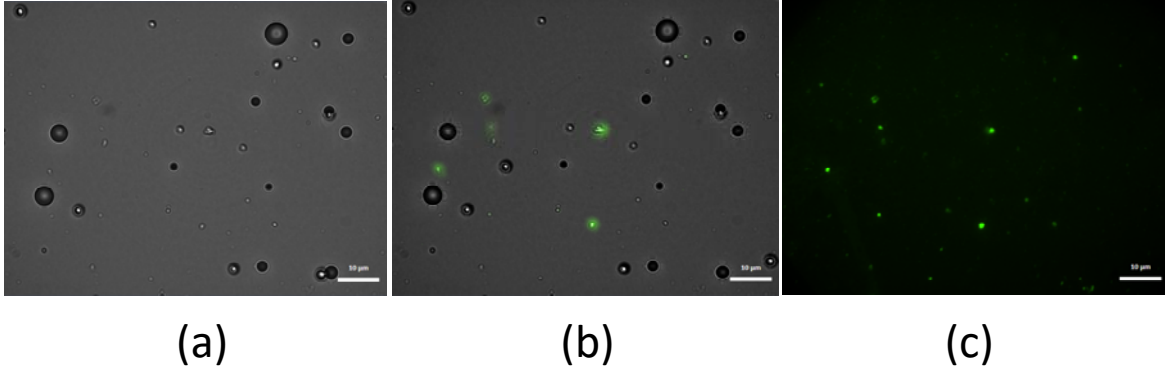
Literatürde, NBD-PC probunun sıvı-düzensiz faz içinde dağıldığı, bu yüzden mikroköpükçüklerde parlak bölgelerin emulsifier bakımından zengin, karanlık bölgelerin ise fosfolipit bakımından zengin olduğu kabul edilmektedir (Borden vd. 2004, Pu vd. 2005). Daha öncede bahsedildiği gibi, NBD-PC ile tüm mikroköpükçüklerin floresan işaretli olmadıkları, sadece belirli büyüklüklerdeki mikroköpükçüklerin işaretli oldukları görülmüştür

Morfoloji incelemelerinde probun yapısı önemli olmaktadır. Schutt ve ark. (Schutt vd. 2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada lipofilik katyonik bir floresan prob olan DiC18 kullanılmıştır. Yapılan çalışmada tüm mikroköpükçüklerin floresan işaretli oldukları, ancak mikroköpükçüklerin yüzeyindeki mikroyapıların belirgin bir şekilde görülemediği belirtilmiştir.



Şekil 30. Mikroköpükçük morfoloji çalışmalarında kullanılan floresan problemlerin moleküler yapısı ve %0.5 FITC-DHPE ve NBD-PC problemleri işaretlenmiş 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG₄₀St mikroköpükçüklerinin floresan mikroskop görüntüleri.

NBD-PC'nin %1 molar oranında ilave edilmesiyle elde edilen mikroköpükçüklerin optik mikroskop ve floresan mikroskop görüntüleri karşılaştırıldığında, **Şekil 31**'de görüleceği üzere tüm mikroköpükçüklerin floresan işaretli olmadıkları, sadece belirli büyüklüklerdeki mikroköpükçüklerin işaretli oldukları görülmüştür. Benzer gözlem, Borden ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada da rapor edilmiştir (Borden vd. 2004). Bu durumda, literatürde rapor edilen floresanlı mikroköpükçük görüntülerinin seçilmiş resimler olduğu anlaşılmaktadır. Öte yandan, FITC-DHPE ile hazırlanan mikroköpükçüklerde büyüklükleri ne olursa olsun tüm mikroköpükçüklerin floresan işaretli oldukları görülmüştür. Çalışılan mikroköpükçük boyutları 10 μm'den küçük olduğundan mikroköpükçüklerin yüzey morfolojilerinin incelenmesinde FITC-DHPE moleküler floresan probu ile devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 31. %1 NBD-PC ilave edilmiş 9:1 Mikroköpükçüklerinin genel (a) optik mikroskop (b) birleştirilmiş optik-floresan mikroskop (c) floresan mikroskop görüntüleri

4.2.1 Floresan Boya Konsantrasyonu Etkisi

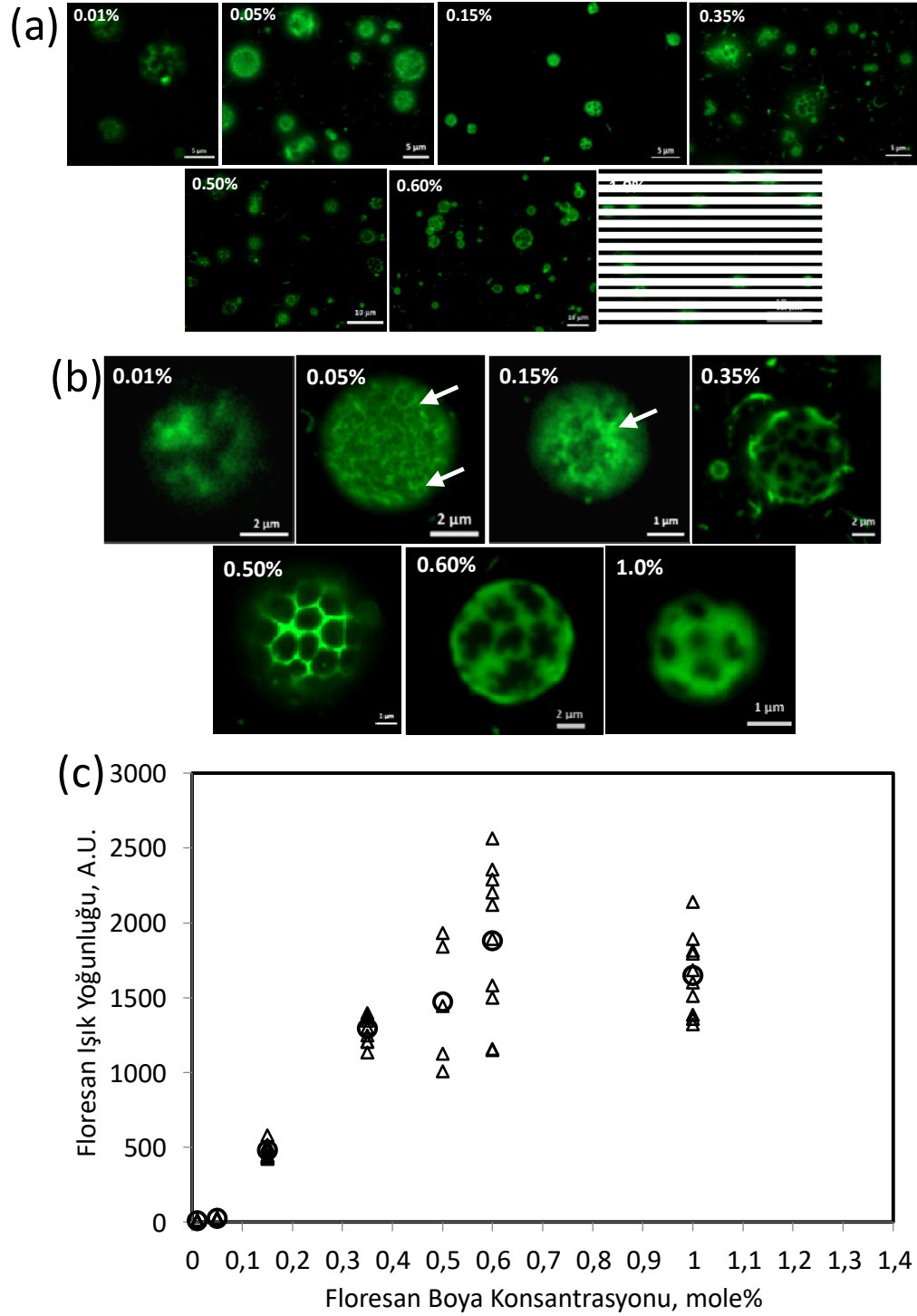
Floresan çalışmalarında elde edilen floresan yoğunluğu konsantrasyon ile doğru orantılıdır. Diğer bir deyişle, yüksek kontrast ve floresan ışık yoğunluğu için floresan konsantrasyonunun artırılması gerekmektedir. Ancak, belirli bir konsantrasyonun üzerinde floresan molekülleri yüzeyde birbirlerine yakın istifleneceğinden bir molekülün yaydığı ışık komşu diğer floresan molekülü tarafından absorplanacağı için kamera detektörüne beklenen miktarda ışık gelmeyecektir. ‘Self-quenching’ olarak bilinen bu olayda yüksek prob konsantrasyonlarında floresan yoğunluğunun düştüğü bilinmektedir (Benchimol vd. 2013). Dolayısıyla yüksek kontrast görüntü için floresan konsantrasyonunun optimize edilmesi gerekmektedir.

DSPC ve PEG₄₀St moleküllerinin molar oranlarının eşit olduğu 5:5 mikroköpükçükleri kullanılarak optimum floresan konsantrasyonu belirlenmiştir. Mikroskop ile yapılan çalışmalarda görüntüleme fokusu değiştiğinde mikroköpükçüklerden alınan floresan yoğunluğu değişmektedir. Bu nedenle, mikroköpükçük gibi küresel yapılarda, değişik kompozisyonlarda ve farklı çaplarda floresan yoğunluk karşılaştırmasının yapılabilmesi için görüntü fokusu hepsinde sabit ve mikroköpükçüğün aynı bölgesinden ölçülmelidir. Bu nedenle tüm mikroköpükçüklerin floresan yoğunluğunu hesaplamak için görüntü fokusu çaplarının en büyük olduğu orta kısımdan alınmıştır. Normalize floresan yoğunlukları Denklem (22) ile hesaplanmıştır (Pang Z 2012).

Farklı FITC-DHPE oranlarında DSPC:PEG₄₀St oranı 5:5 olan mikroköpükçükler sonikasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Her bir FITC-DHPE miktarı ihtiva eden mikroköpükçüklerin bir arada bulunduğu floresan mikroskop görüntüleri popülasyon olarak **Şekil 32(a)**’da verilmiştir. Şekilden görüleceği üzere, her bir boya konsantrasyonunda hemen hemen birbirlerine benzeyen morfolojilerde mikroköpükçükler bir arada bulunmaktadır. Farklı

FITC-DHPE konsantrasyonunda diğer mikroköpükçükleri temsilen seçilen mikroköpükçükler **Şekil 32(b)**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçüklerin yüzeyinde oluşan karanlık ve aydınlık bölgeler, literatürde gösterilen morfolojilere benzer şekilde 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, PEG₄₀St moleküllerinin ise expand fazda kalması, bu esnada FITC-DHPE boya moleküllerin expand faz olan PEG₄₀St ile karıştığı, dolayısı ile aydınlık bölgeler olarak görünen bu bölgelerin boya ihtiva eden PEG₄₀St 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 olarak karşımıza çıkmaktadır. Şekilde beyaz oklar ile gösterildiği üzere, düşük boya konsantrasyonu ihtiva eden mikroköpükçüklerde çokkenar bölgelerin kenar çizgilerini oluşturan floresan lipid yoğunluğunun artmaya başladığı görülmektedir. Bu artış, lipidler arasında bir faz ayrımının olduğunu göstermektedir. 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 homejen olduğu floresan boya karışımının oranı 0.5% olduğu anlaşılmaktadır. Karışıma daha fazla oranda boya yüklendiğinde, mikroköpükçük yüzeyinde aydınlık alanın arttığı ve karanlık bölge alanlarının küçüldüğü görülmektedir. Bu durum, yüksek boya konsantrasyonlarda kameraya gelen ışık yoğunluğunun yüksek olması nedeniyle görüntünün üzerinde bir gölgeleme etkisi olabileceğini de düşündürmektedir.

Şekil 32(c)'de farklı FITC-DHPE boya konsantrasyonları için ölçülen normalize floresan ışık şiddeti yoğunluğu değerleri verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, floresan ışık yoğunluğu 0.35% boya konsantrasyonu değerine kadar doğrusal olarak artmaktadır. Bu konsantrasyonlarda, farklı mikroköpükçük sayıları için ölçülen değişim oldukça küçüktür. Ancak, yüksek boya konsantrasyonlarında “quenching” etkiden dolayı floresan ışık şiddeti değeri düşmektedir. Ayrıca, mikroköpükçükler arasında floresan ışık yoğunluğu aynı konsantrasyon boya yüklenmiş mikroköpükçükler arasında birinden diğerlerine farklılıklar göstermektedir. Morfolojik yapı oluşsa da, floresan ışık yoğunluğu değerleri yüksek boya konsantrasyonlarında homojen bir dağılım vermemektedir.



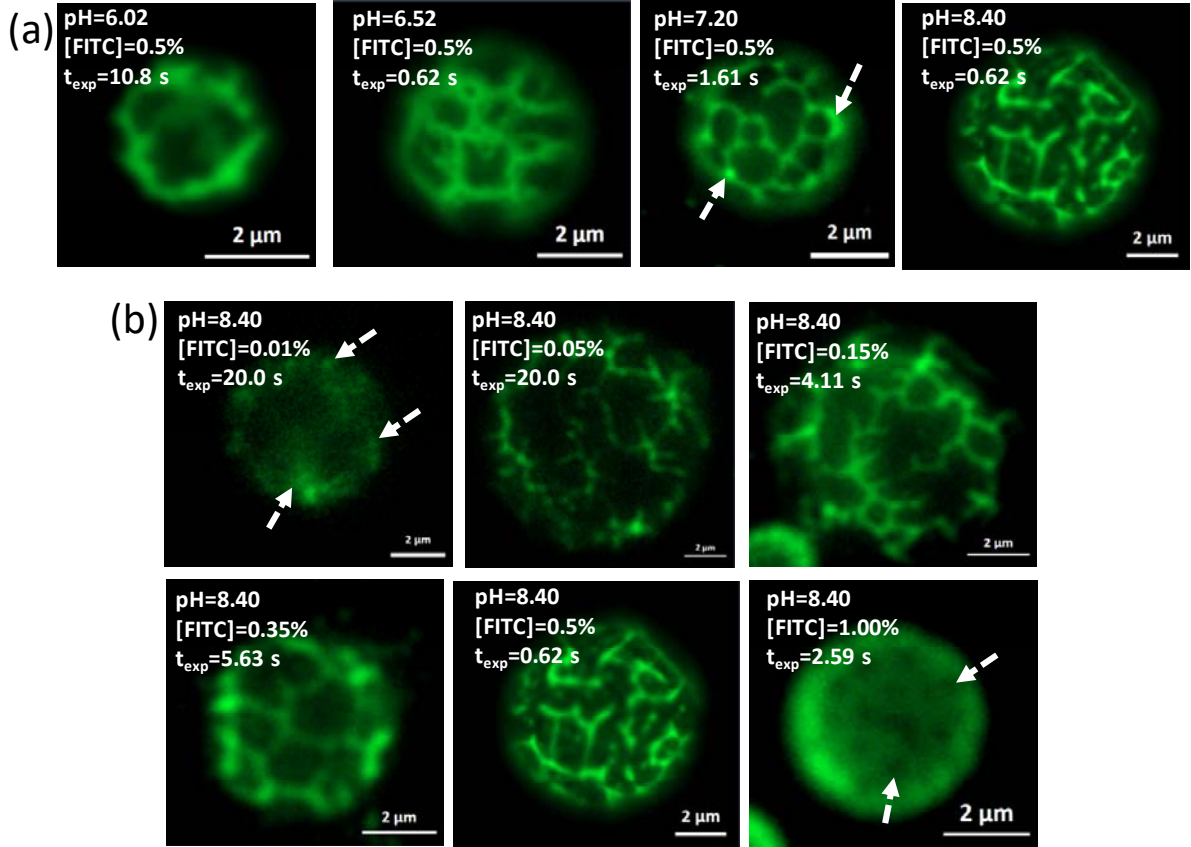
Şekil 32. DSPC:PEG₄₀St 5:5 mikroköpükçüklerinin farklı FITC-DHPE oranlarında (a) popülasyonun floresan mikroskop görüntüleri, (b) temsilen tek bir mikroköpükçüğün floresan mikroskop görüntüsü, (c) floresan boya konsantrasyonuna karşı normalize floresan ışık yoğunluğu verilerini gösteren grafik, 100X/1.25 objektif, pH=7.2. Beyaz oklar ile faz ayrımı başlangıcını ve lipidler arası birleşme ve topaklaşmaları gösterilmektedir.

4.2.2 Mikroköpükçük Yüzey Morfolojisine pH Etkisi

Bilindiği üzere FITC-DHPE pH'a duyarlı bir floresan probudur ve ancak iyon formunda olan FITC-DHPE ışımaya yapmaktadır. Buna göre, mikroköpükçüklerin yüzey morfolojisinin aydınlatılmasında pH bir parametre olabilir. Farklı oranlarında FITC-DHPE boya yüklenmiş DSPC:PEG₄₀St oranı 5:5 olan lipid karışımlarından sonikasyon yöntemiyle mikroköpükçükler üretilmiş ve bunlardan bir numune farklı pH'lara ayarlanmış fosfat tampon çözeltisi içerisinde dağıtılmışlardır. Her bir mikroköpükçüğün floresan mikroskop görüntüleri elde edilmiş ve **Şekil 33**'de gösterilmektedir. Boya oranı %0.5 ihtiva eden mikroköpükçükler farklı pH değerlerinde ortamlara konulduğunda oluşan yüzey morfolojileri **Şekil 33(a)**'da gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçükler farklı pH değerlerinde benzer yüzey morfolojileri göstermektedirler. Ancak, pH'a bağlı olarak floresan ışık yoğunluğu farklılıklar göstermektedir. Düşük pH değerlerinde floresan ışık yoğunluğu oldukça düşük, pozlama süresi ise yüksektir. Mikroköpükçük yüzeyinde karanlık ve aydınlık alanlar seçilebilmektedir. pH arttıkça, aydınlık alanların ip gibi uzandığı ve balpeteği yapısında yüzey morfolojilerin oluştuğu gözlenmektedir. Yüksek pH değerlerinde, floresan ışık şiddeti yoğunluğu artmıştır. Balpeteği şeklinde oluşan yüzey morfolojilerinin kenarlarını oluşturan aydınlık bölgeler yüksek pH'larda daha parlak görüntü vermektedir. Hatta, ok ile gösterilen bazı bölgelerde diğer bölgelerde olmayan ışımaların olması, bu bölgelerde floresan ve diğer moleküllerin dimer, polimer, çok-tabaka birleşmeler, ya da topaklaşma gibi yapılar oluşturdukları izlenimi vermektedir. Çok yüksek pH'larda, çok parlak arayüzey ışımlar yanında, karanlık bölgelerden de floresan ışığının geldiği görülmektedir. Bu durum, bir mikroköpükçüğün yalnızca karanlık ve aydınlık bölgeler ile fazlara ayrılmış bölgeler bulunmadığı, fakat belli oranlarda her iki fazın da karıştıkları yüzeyler olabileceklere sonucu doğurmaktadır.

Yüksek pH 8.40 değerinde farklı konsantrasyonlarda FITC-DHPE boya yüklenmiş mikroköpükçüklerin floresan mikroskop görüntüleri **Şekil 33(b)**'de görülmektedir. Şekilden görüleceği üzere, düşük konsantrasyonlarda boya ihtiva eden mikroköpükçüklerde görüntü alınabilmesi için geçen pozlama süresi 20 s civarındadır. Boya miktarı artırıldığında pozlama süresi 0.6 s mertebesine kadar düşmüştür. Çok düşük boya konsantrasyonunda yüzey morfolojisi belirgin değildir. Ancak, boya moleküllerinin bir araya gelerek morfoloji oluşturma eğilimi, ok ile gösterilen artan floresan ışık yoğunluğundan, anlaşılmaktadır. Bu durumda, her bir boya konsantrasyonunda boya miktarı arttıkça mikroköpükçüğün yüzey morfolojileri daha belirgin hale gelmektedir. Çok yüksek boya konsantrasyonunda, yüzey morfolojileri olmakla birlikte, aşırı floresan ışık yoğunluğu yüzeydeki morfolojiyi bir bulut gibi

örtmektedir. Çok yüksek boya konsantrasyonlarında, yüzey çamur gibi kaplanmakta ve yüzey morfolojisi gerektiği gibi analiz edilememektedir. Bu durumda, optimum pH ve optimum boya konsantrasyonlarında yüzey morfolojilerinin çalışılması gerektiği anlaşılmaktadır.



Şekil 33. DSPC:PEG₄₀St 5:5 mikroköpükçüklerinin (a) farklı pH ve (b) farklı oranlarında FITC-DHPE boya yüklenmiş mikroköpükçüklerin yüksek pH=8.40 değerinde floresan mikroskop görüntüleri.

FITC-DHPE floresan molekülünün iyonik formu floresan özelliği göstermektedir. Boyanın protonlu formu floresan ışığı yaymamaktadır. Boyanın protonlanması ise iyonik bir denge reaksiyonu olup Henderson-Hasselbalch denklemi ile verilebilir.

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right) \quad (26)$$

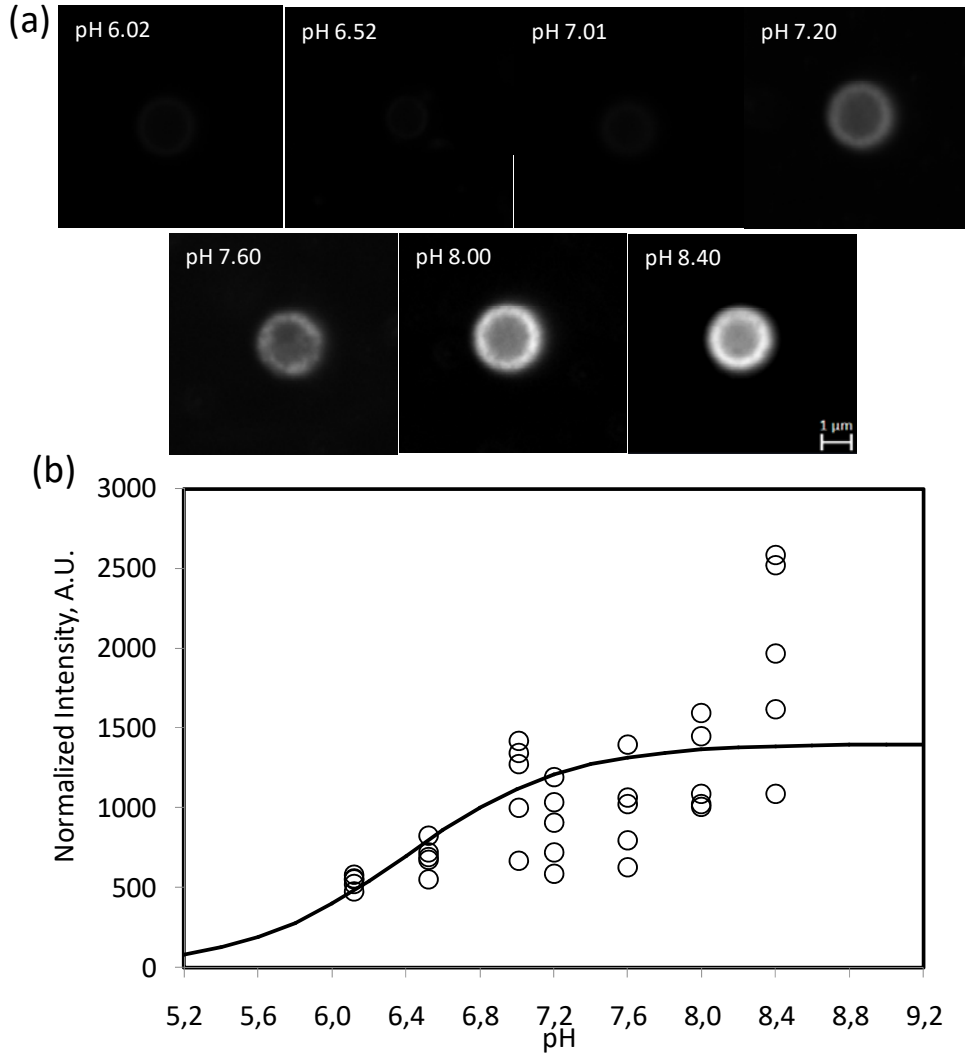
Toplam boya miktarı, $[HA]_o = [A^-] + [HA]$, Denklem (26)'ya ilave edildiğinde, boya konsantrasyonunun pH'a bağlı olduğu floresan ışık yoğunluğu Denklem (27) ile hesaplanabilir.

$$F \sim [A^-] = [HA]_o \frac{1}{[1 + 10^{(pK_a - pH)}]} \quad (27)$$

Burada, FITC-DHPE'nin pK_a değeri 6.2 olarak verilmektedir (Soucaille P 1988). pK_a değerinin üstündeki pH değerlerinde floresan ışık yoğunluğunun artması beklenmektedir.

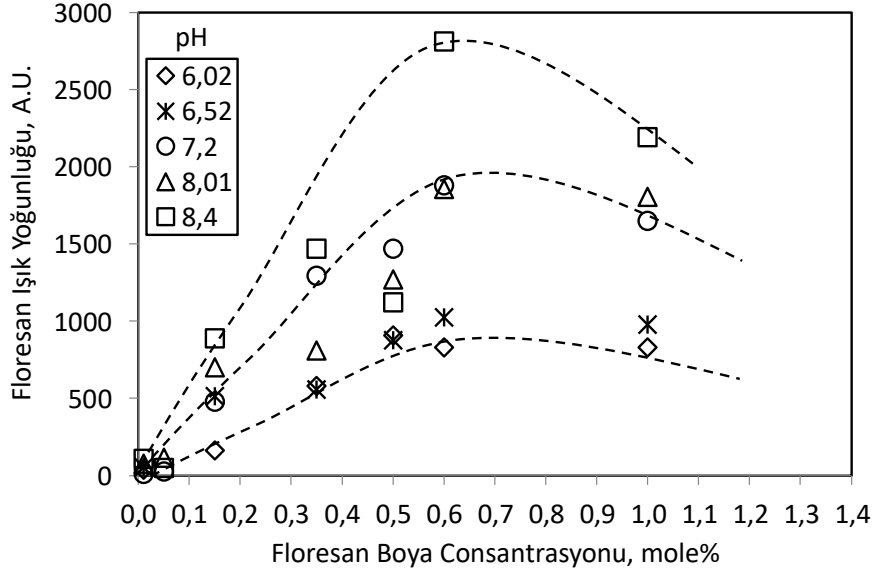
Sabit FITC-DHPE boya konsantrasyonunda hazırlanmış DSPC:PEG₄₀St 5:5 mikroköpükçüklerin farklı pH'larda alınmış orta düzlem (mid-plane) floresan görüntüleri ve seçilen mikroköpükçüklerin farklı pH'larda ölçülen normalize floresan ışık yoğunluğu değerlerinin model denklem ile karşılaştırılması **Şekil 34**'da verilmiştir. **Şekil 34(a)**'da görüleceği üzere, mikroköpükçük floresan yoğunluğu, mikroköpükçüklerin görüntülenmesinde çapının en büyük olduğu orta düzlemden (mid-plane) görüntüler alınmış, böylelikle fokusa bağlı farklılıklar elimine edilmiştir (Elmas vd. 2005, Benchimol vd. 2013). Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçüklerden alınan floresan ışık yoğunluğu pH ile artmaktadır. Çok küçük pH değerlerinde karanlık görüntü, yüksek pH değerlerinde ise daha parlak bir görüntü elde edilmektedir. Orta düzlem (mid-plane) görüntülerde yüzey morfolojileri, mikroskobun fokusu orta düzleme ayarlandığından belirgin bir şekilde görülememektedir. Düşük pH değerlerinde sinyal-gürültü değerleri birbirine yakın olduğundan, her ne kadar görüntü alınabilir ve morfoloji görülebilirse de, nicel bir analiz yapmak için yeterli olmayabilir.

Her bir pH değerinde süspansiyon edilen mikroköpükçüklerden alınan floresan görüntülerinden farklı mikroköpükçükler için ölçülen normalize floresan intensite değerleri **Şekil 34(b)**'de verilmektedir. Sabit bir boya konsantrasyon değeri için Denklem-(27)'den elde edilen sonuçlar da aynı grafik üzerinde karşılaştırılmıştır. Şekilden görüleceği üzere, düşük pH değerlerinde mikroköpükçük floresan ışık yoğunluğu değerlerinde farklı mikroköpükçükler için pek bir fark olmayıp hemen hemen benzer yoğunlukta floresan ışık vermektedirler. Ancak pH değeri arttıkça, mikroköpükçüklerden elde edilen ışık yoğunluklarında farklılıklar göze çarpmaktadır. Ayrıca, eğer her bir mikroköpükçük kompozisyonu aynı olsaydı, farklı mikroköpükçükler için farklı pH'larda ölçülen normalize floresan ışık yoğunluğu değerleri model denklem üzerinde olacaktı. Oysa, her bir pH solüsyonunda bulunan mikroköpükçüklerin sahip olduğu floresan miktarı da model denkleme göre farklılık göstermektedir. Burada, "her bir mikroköpükçüğün yüzey kompozisyonu aynı olmayıp, her bir mikroköpükçüğün yüzeyinde bulunan lipid, PEG₄₀St, ve FITC-DHPE kompozisyonları farklıdır" sonucuna ulaşılabilir. Bu sonuç, Borden ve ark. (Borden vd. 2006) tarafından **Şekil 10**'da verilen sonuç ile çelişmektedir. Bahse konu araştırma grubu, %20 DSPE-PEG2000 konsantrasyonlarına kadar lipid karışımı ile mikroköpükçük zar kompozisyonunu test etmiş ve lipid karışımındaki kompozisyonun aynen zar kompozisyonunda da olabileceğini ifade etmişlerdir. Burada elde edilen sonuçlara göre, DSPC:PEG₄₀St 5:5 oranında mikroköpükçükler için bu durumun geçerli olmadığı anlaşılmaktadır.



Şekil 34. Sabit FITC-DHPE boya konsantrasyonunda hazırlanmış DSPC:PEG₄₀St 5:5 mikroköpükçüklerin (a) farklı pH'larda alınmış orta düzlem (mid-plane) floresan görüntüleri, (b) farklı pH'larda ölçülen normalize floresan ışık yoğunluğu ve model Denklem-(27) ile karşılaştırılması.

Farklı pH değerlerinde kullanılan FITC-DHPE boya konsantrasyonuna göre elde edilen "ortalama" normalize floresan ışık yoğunluğu değerleri **Şekil 35**'de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, floresan ışık yoğunluğu 0.5% boya konsantrasyonu değerine kadar konsantrasyon ile artmakta ancak bu optimum değerden sonra azalmaktadır. Bu, diğer pH değerleri için de geçerli olduğu görülmektedir. Ancak, düşük pH değerlerinde yüksek boya konsantrasyonlarında floresan ışık yoğunluğu değerleri önemli ölçüde değişmemektedir. Bu durum, boya konsantrasyonu yüksek olsa dahi, düşük pH değerlerinde yüzey morfolojilerinin daha iyi gözlenebileceğini ortaya koymaktadır. Buradan çıkartılacak sonuç, "boya ile yüklenmiş mikroköpükçüklerin yüzey morfolojileri hem boya konsantrasyonu hem de pH ile ayarlanabilir".



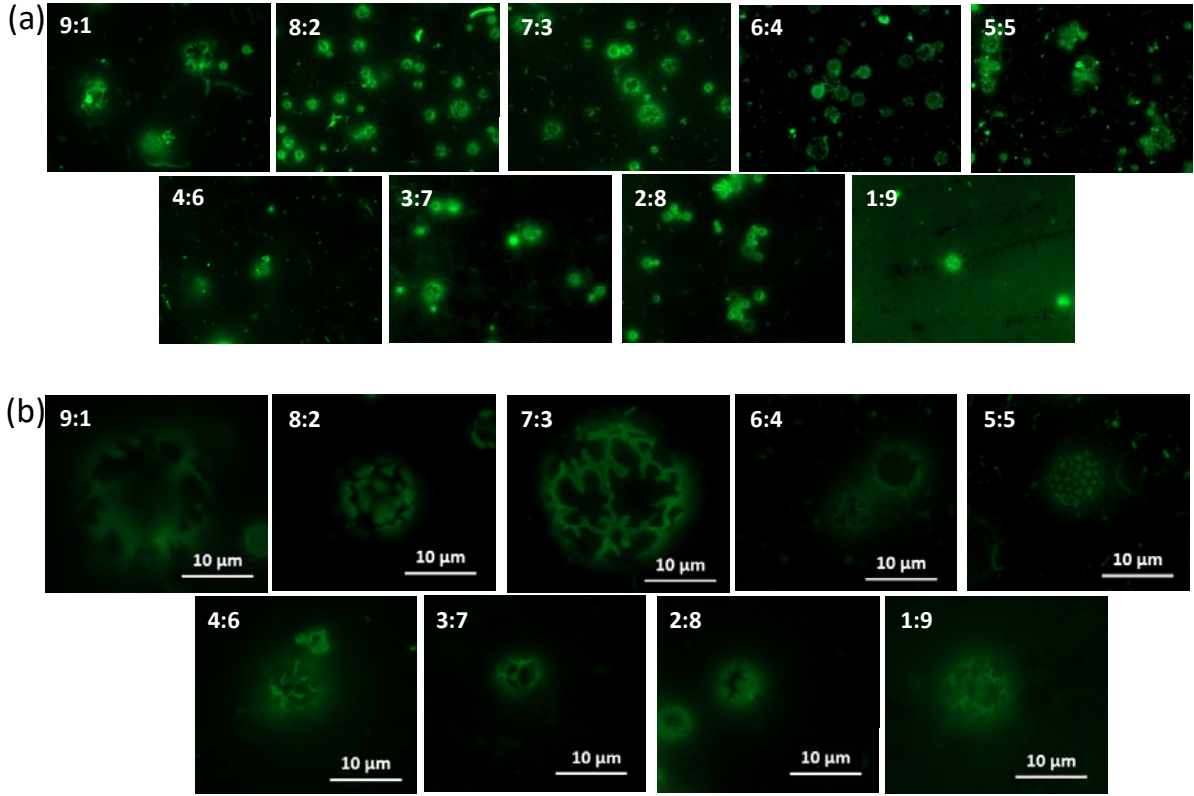
Şekil 35. Farklı pH değerlerinde kullanılan FITC-DHPE boya konsantrasyonuna göre elde edilen “ortalama” normalize floresan ışık yoğunluğu.

4.2.3 Mikroköpükçük Kompozisyonu ile Yüzey Morfolojisi

DSPC:PEG₄₀St karışımından 9:1'den 1:9'a kadar değişen oranlarda üretilen mikroköpükçüklerin yüzey morfolojileri incelenmiştir. **Şekil 36(a)**'da değişik kompozisyonlardaki mikroköpükçüklerin genel floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir. Her bir kompozisyonda floresan görüntülerinden seçilen benzer morfolojilerde mikroköpükçükler yine kompozisyonlarına göre **Şekil 36(b)**'de sıralanmıştır. Mikroköpükçüklerin genel popülasyonuna bakıldığında, artan PEG₄₀St oranı ile ortalama çapları azalmaktadır. İncelemelerde belli bir mikroköpükçük solusyonundan örnek alındığında farklı büyüklüklerdeki mikroköpükçüklerde yine de benzer morfolojiler görülmektedir. Sadece mikroskobun çözünürlüğü ile alakalı olarak morfoloji daha az belirgin olmaktadır. Fakat yine de morfolojiler görülebilmektedir. Bunun yanında, mikroköpükçüklerin büyüklükleri aynı olmasına rağmen, bir mikroköpükçükte morfoloji gözlenirken, diğerinde herhangi bir morfolojinin gözlenemediği durumlar da olabilmektedir. Herhangi bir morfoloji gözlenmemiş olması DSPC ve PEG₄₀St'nin homojen bir şekilde mi karıştırıldığını sorusunu akıllara getirmektedir. Floresan mikroskobu ile yapılan çalışmalarda diğer bir gözlemimiz ise, 5:5'den 9:1 DSPC:PEG₄₀St kompozisyonuna gidildikçe benzer morfoloji gözlenebilen mikroköpükçüklerin sayısındaki artıştır. 9:1, 8:2, 7:3 ve 6:4 mikroköpükçüklerinde büyüklükleri farklı olmasına rağmen çok sayıda mikroköpükçükte morfoloji gözlenmesine

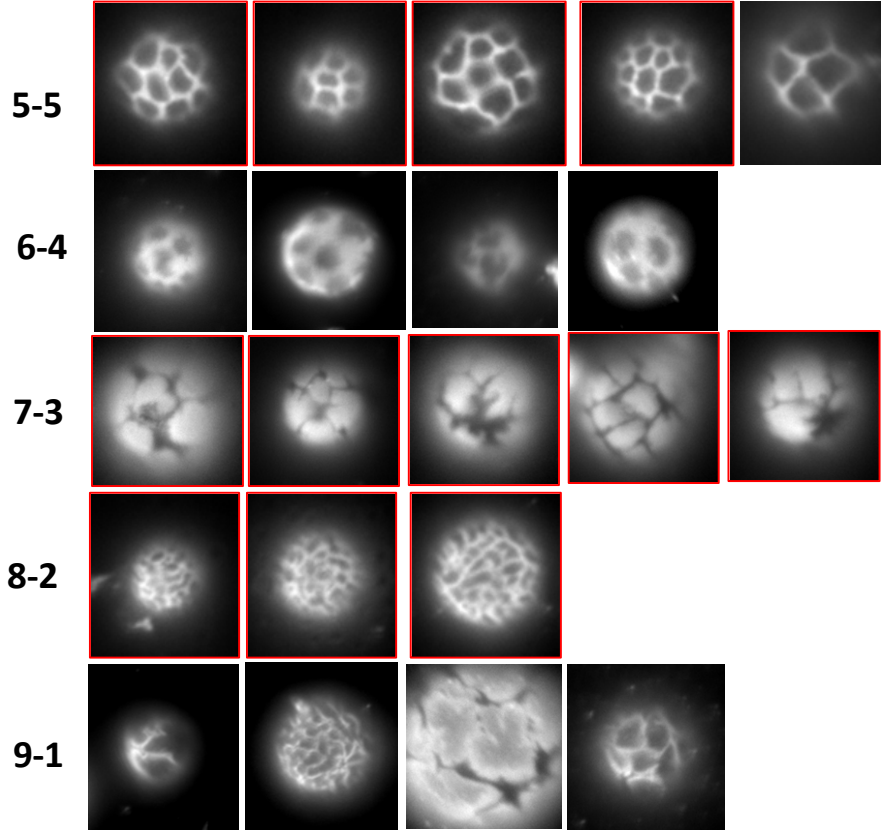
karşın, 5:5 mikroköpükçüklerinde futbol topu görünümünde morfolojili mikroköpükçükler görülmüştür. Bu gözlem, 5:5 mikroköpükçüklerinde artan PEG₄₀St yoğunluğu sonucu PEG zincirlerinin mikroköpükçük yüzeyinde fırça tipi bir konfigürasyon edinmesi (Abou-Saleh vd. 2014) ve tıpkı DSPC gibi daha düşük molekül başına düşen alana sahip olmasına atfedilebilir. PEG₄₀St moleküllerinin fırça konfigürasyonunda düşük molekül alana sahip olması, DSPC gibi bir moleküler konfigürasyona sahip olması dolayısıyla DSPC ile daha iyi karışabilmesi ve daha fazla molekülün yüzeye adsorbe olması, ve dolayısıyla stabilitenin artması anlamına gelir ki, 5:5 mikroköpükçükleri büyüklük ve konsantrasyonları bakımından daha stabil davranış göstermektedir. Aynı koşullarda sentezlenmesine rağmen verim 5:5 mikroköpükçüklerinde en yüksektir. Ayrıca, homojen dağılımdan ötürü, lateral kuvvetlerin daha dengeli olacağı ve bu yüzden de stabilitenin artmış olabileceği düşünülmektedir. Farklı kompozisyonlardaki örnekler floresan mikroskobundan incelendiğinde farklı yüzey morfolojilerinin hakim olduğu görülmektedir.

Şekil 36(b)'de 9:1'den 5:5 oranına kadar üretilen mikroköpükçüklerde belirgin yüzey morfolojiler gözlenmiştir. PEG₄₀St miktarı %50 oranından daha fazla olan mikroköpükçükler için, stabilitelelerinin düşük olması sebebiyle yüzey morfolojisi için yeterli gözlem yapılamamıştır. Bu mikroköpükçüklerde verim çok düşük ve mikroköpükçüklerin üretim sonrasında dayanıklılıkları çok azdır. Bu mikroköpükçükler +4 °C'de dahi stabilitelelerini koruyamamışlardır. Diğer kompozisyonlarda olduğu gibi, aynı tüpten örnek alınarak tekrarlayan gözlemler yapılamamıştır.



Şekil 36. Farklı DSPC:PEG₄₀St oranlarında mikroköpükçüklerin (a) genel floresan mikroskop görüntüleri (Büyütme: 40X) (b) mikroköpükçüklerin yüzey morfolojilerinin görüntüleri (Büyütme: 100X).

Labaratuvarımızda yapılan denemeler ışığında, DSPC:PEG₄₀St oranlarına göre mikroköpükçüklerin yüzey morfolojilerinin sınıflandırılması **Şekil 37**'de verilmiştir. 8:2 oranında hazırlanan mikroköpükçük yüzeyi yaprak gibi, 7:3 oranındaki mikroköpükçük yonca yaprağı, 6:4 oranında hazırlanan mikroköpükçük arıpeteğine ve 5:5 oranındaki mikroköpükçükler futbol topuna benzer bir morfolojiye sahiptir. Alınan her tüpte tanımlamamıza uymayan farklı yüzey şekline sahip mikroköpükçükler olmasına rağmen her oranın (8:2, 7:3, 6:4, 5:5) baskın bir morfolojide olduğu anlaşılmaktadır. Öte yandan, ilginç olarak 9:1 oranında hazırlanan mikroköpükçüklerden alınan örneklerde diğer kompozisyonlarda olan morfolojilerin yaygın olarak buldukları görülmüştür.

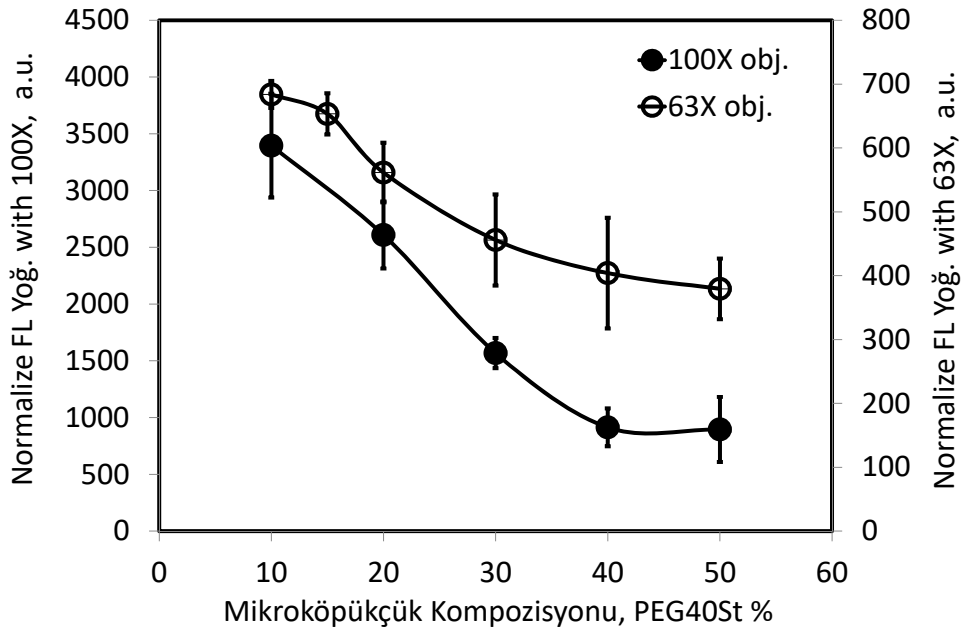


Şekil 37. Farklı DSPC:PEG₄₀St oranlarında mikroköpükçüklerin yüzey morfolojilerinin görüntüsü (Büyütme: 100X).

Floresan mikroskop ile nicel analizlerde, floresan ışığın intensitesi dedektöre ulaşan foton sayısı ile orantılıdır. Bu nedenle, detektörün doygunluk seviyesi altında ve lineer çalışıyor olması esastır. Kamera detektörünün topladığı foton miktarı uyarıcı ışık yoğunluğu, ışığın homojenizasyonu ve numunenin ışığa maruz kalma süresinden (pozlama süresi) etkilenmektedir (Waters 2009). Bunsen ve ark. (Greene 2013), kamera dedektörü lineer olduğu durumda, belirli bir uyarıcı ışık şiddetinde, floresan yoğunluğu ile pozlama süresinin ters olarak değişmesi gerektiğini, floresan yoğunluğu ile pozlama süresi çarpımının sabit kalması gerektiğini ifade etmektedir. Bu, pozlama denge kuralı (reciprocity law) olarak bilinir (Roেকেleın 1998, Martin vd. 2003). Yüksek pozlama süresinde numune solabilir (photobleach), düşük olduğunda ise dijital görüntüde çok fazla gürültü (noise) olabilir. Pozlama dengesi kuralının geçerli olmadığı durumlarda görüntülerden sağlıklı nicel analiz yapılması mümkün olmayacaktır.

%0.5 FITC-DHPE içeren değişen DSPC:PEG₄₀St oranlarındaki mikroköpükçüklerinin 100X/1.25 ve 63X/0.75 objektif ile alınan görüntülerinden yapılan nicel analiz sonuçları **Şekil 38**'de verilmektedir. Mikroköpükçük formülasyonunda DSPC:PEG₄₀St oranı değiştirilirken,

toplam lipid+emülsifiyer miktarı 40 μ mol olarak sabit tutulmuştur. Dolayısıyla, tüm mikroköpükçük kompozisyonlarında floresan miktarı %0.5 olacak şekilde formulasyona katılmıştır. Floresan yoğunluğunun artan PEG% ile azaldığı her iki objektif ile görülmüştür. Burada, PEG% miktarlarına göre oluşan mikroköpükçüklerin boyutları göz ardı edilmemelidir. 5:5 mikroköpükçüklere gidildikçe ortalama mikroköpükçük boyutu küçülmektedir. Dolayısıyla, **Şekil 38**'da artan PEG% ile birlikte floresan yoğunluğunun azalması, fosfolipit ve emülsifiyer moleküllerinin mikroköpükçük yüzeyinde daha düzenli ve kondens bir monotabaka oluşturacak şekilde adsorbe oldukları, dolayısıyla daha az FITC-DHPE'nin monotabaka yapısına girebildiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

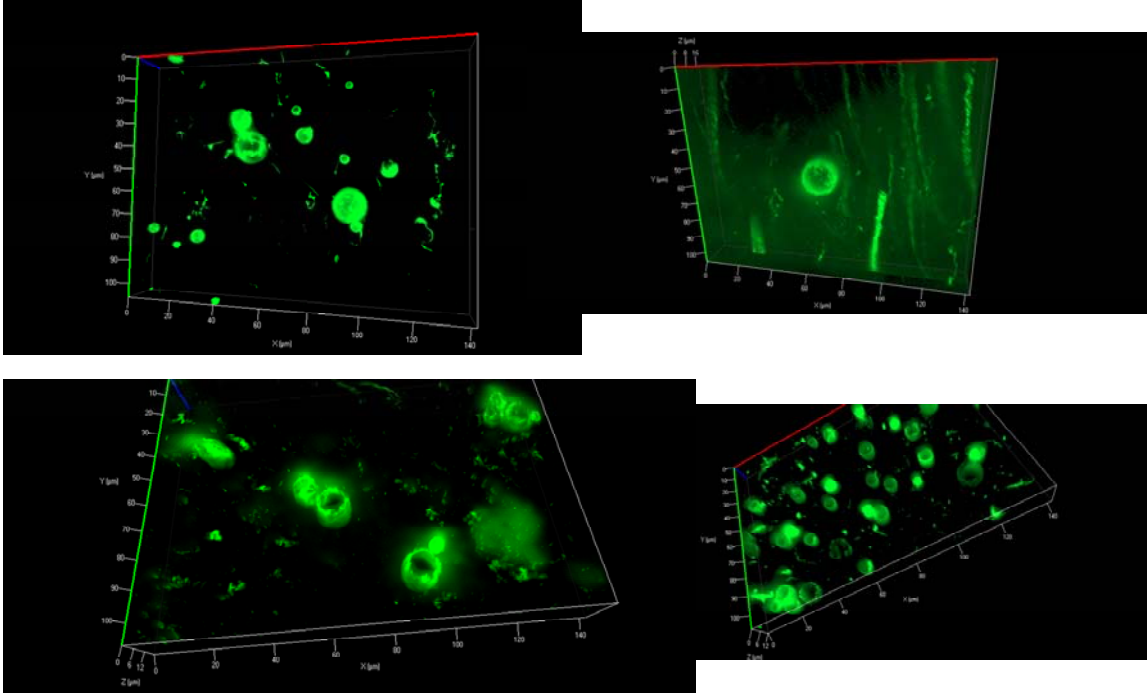


Şekil 38: % 0.5 FITC-DHPE içeren değişen DSPC/PEG oranlarındaki mikroköpükçüklerinin 100X/1.25 ve 63X/0.75 objektif ile alınan görüntülerinden hesaplanan normalize floresan yoğunlukları

4.2.4 Mikroköpükçük Monotabaka Yapısı ve Morfoloji Oluşum Mekanizması

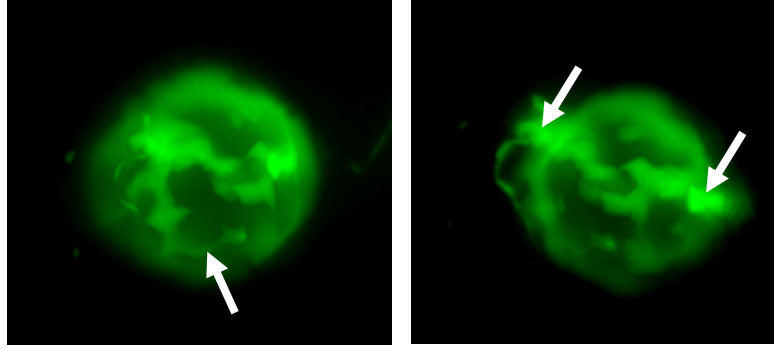
Ultrason kontrast maddesi stabil mikroköpükçük için en önemli kriter olarak gazı çevreleyen lipid tabakasının gaz difüzyonunu engelleyecek şekilde gaz etrafında kondens olması gerektiği düşünülmektedir (Borden ve Longo 2002, Borden ve Longo 2002). Mikroköpükçüklerin oluşumundaki genel kanı, lipid ve emülsifiyer moleküllerinin bir gaz kabarcığının etrafında adsorplanarak bir monotabaka oluşturduğu ve mikroköpükçük yüzeyindeki DSPC:PEG₄₀St oranının mikroköpükçük oluşumu için hazırlanan DSPC:PEG₄₀St

karışımının oranıyla aynı olduğu, lipid ve emülsifiyer moleküllerinin gaz-sıvı arayüzeyinde adsorplanırken hidrofilik tarafları sulu faza, hidrofobik tarafları ise gaz tarafına yönlenecek şekilde organize olduğudur. Mikroköpükçükler, genel olarak lipid ve emülsifiyer moleküllerinin mikron boyutlarındaki gaz kabarcıkları üzerine adsorbe olmuş hali olarak tanımlanır. Mikroköpükçüklerle yapılan z-kademe (z-stack) görüntülemeler bu görüşü destekler niteliktedir. **Şekil 39**'de mikroskopun z-stack özelliği kullanılarak çekilen mikroköpükçüklerin X,Y,Z düzleminde 3 boyutlu (3D) resimleri gösterilmektedir. Şekilden, mikroköpükçüklerin küresel bir yapıda olduğu ve içlerinin gaz ile dolu olduğu açık bir şekilde görülmektedir.



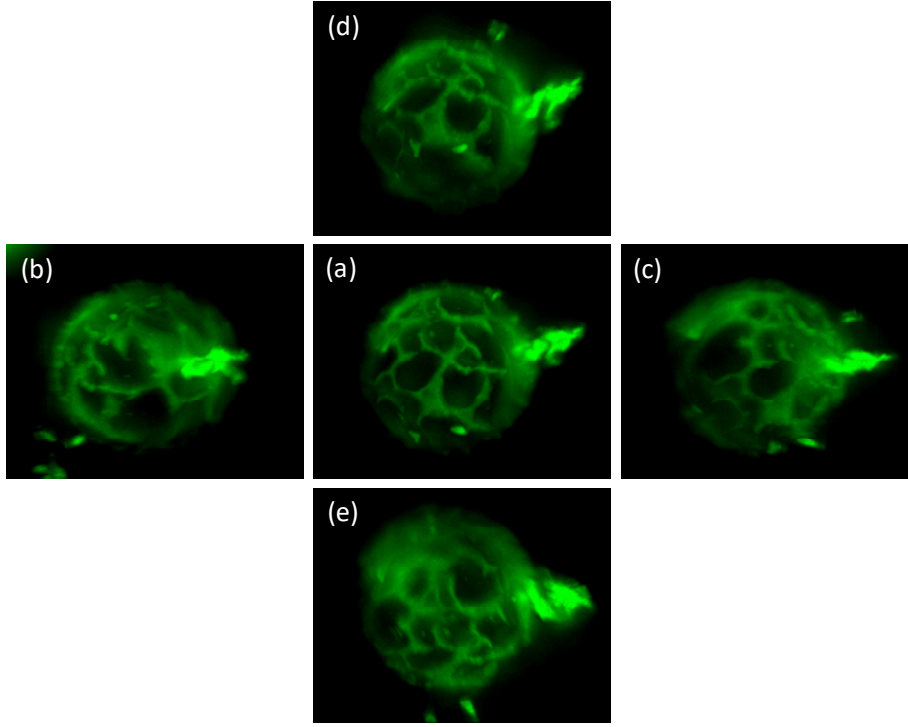
Şekil 39. Bir Mikroköpükçüklerin 3 Boyutlu (3D) Floresan görüntüleri (büyütme: 100X).

Üç boyutlu resimlerden seçilen bir mikroköpükçüğün değişik açılardan alınan görüntüleri **Şekil 40**'de verilmiştir. Mikroköpükçüğün yüzey şeklinin homojen ve değişik açılarda birbirine benzer ve küresel yapıda olduğu açıkça görülmektedir. Şekilde görüleceği üzere, mikroköpükçüklerin yüzeylerinde oklar ile gösterilen bölgelerde farklı oranlarda ve farklı dağılımlarda PEG₄₀St molekülleri, DSPC lipid molekülleri, ve floresan boya molekülleri yer almaktadır. Floresan probunun mikroköpükçükler üzerinde eşit dağılmadığı, belirli bölgelerde kümeleştiği şekilde belirgin bir şekilde gözlenmektedir. Hatta, bu kümeleşmelerin parlak floresan ışık yoğunluğundan farklı kalınlıklarda oldukları da anlaşılmaktadır. Kümeleşme sonucu, mikroköpükçük yüzeyinden lipidlerin ayrılmakta oldukları da 3D görüntüsünden tespit edilebilmektedir.



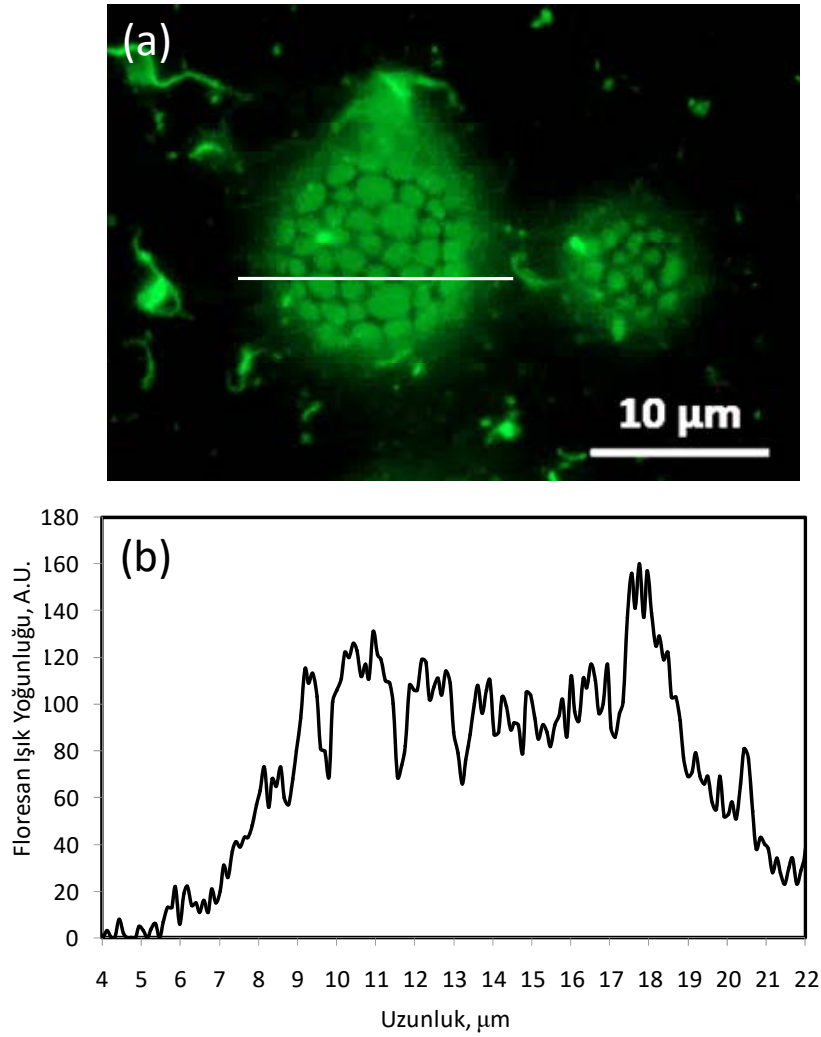
Şekil 40. Bir mikroköpükçüğün 3 boyutlu (3D) floresan görüntüsünün farklı açılardan görünümü. Oklar lipid-emülsifier-boya kümeleşmelerini göstermektedir. (Büyütme: 100X).

Z-stack 3D-görüntüsü alınan bir mikroköpükçüğün, X-X ve Y-Y düzlemlerinde 5 farklı açılardan bakıldığındaki resimleri **Şekil 41**'de görülmektedir. **Şekil 41** (a)'da 3D resim X- düzlemine göre alınmış, **Şekil 41**(b) X- düzlemine göre sola döndürülmüş, **Şekil 41**(c) 3D görüntü X- düzlemine göre sağa döndürülmüş; **Şekil 41** (d)'de Y- düzlemine göre yukarı, ve **Şekil 41** (e) Y- düzlemine göre aşağı döndürülmüş resimleri gösterilmektedir. Bütün resimlerde mikroköpükçüğün benzer yüzey morfolojisinin hakim olduğu görülmektedir. Mikroköpükçüğün 3D resimleri değişik açılarda incelendiğinde, mikroköpükçüğün küresel yapıda olduğu, floresan probunun mikroköpükçüğün bütün küresel yüzeyine dağılmadığı fakat kümeleşerek belirli bir yüzey morfolojisi oluşturduğu gözlenmiştir. Mikroköpükçük yüzeyindeki karanlık bölgenin ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Karanlık bölge, ya floresan molekülü bulunmayan kondens DSPC moleküllerinin bulunduğu alan, ya da hiçbir DSPC ve PEG₄₀St moleküllerinin olmadığı ve sadece gaz fazının sıvı faz ile temas içerisinde olduğu yalın yüzeyi gösteriyor olabilir. Literatürde TEM resimlerinden bu bölgenin DSPC tarafından kaplanmış alan olduğu anlaşılmaktadır (Kim vd. 2003). Şekilde, yüzey morfolojisi oluşumu esnasında, PEG₄₀St (ve belki DSPC) molekülleri ile birlikte floresan boya molekülleri belli bir alanın (domain) kenarlarına doğru difüzyon ve kenarlarda kümeleşerek morfoloji oluşturdukları görülmektedir. Bu kümeleşmenin moleküllerin monotabaka dizilişinde olmadığı anlaşılmaktadır. Hatta, topaklaşmış moleküllerin yüzeyden ayrılmakta oldukları da resimlerden görülmektedir.



Şekil 41. Bir mikroköpükçüğün 3 boyutlu (3D) floresan görüntüsünün farklı açılardan görünümü (a) X düzlemine göre alınmış z-stack görüntüsü (b) sola (c) sağa (d) aşağıdan yukarı (e) yukardan aşağı çevrilmiş hali. (Büyütme: 100X)

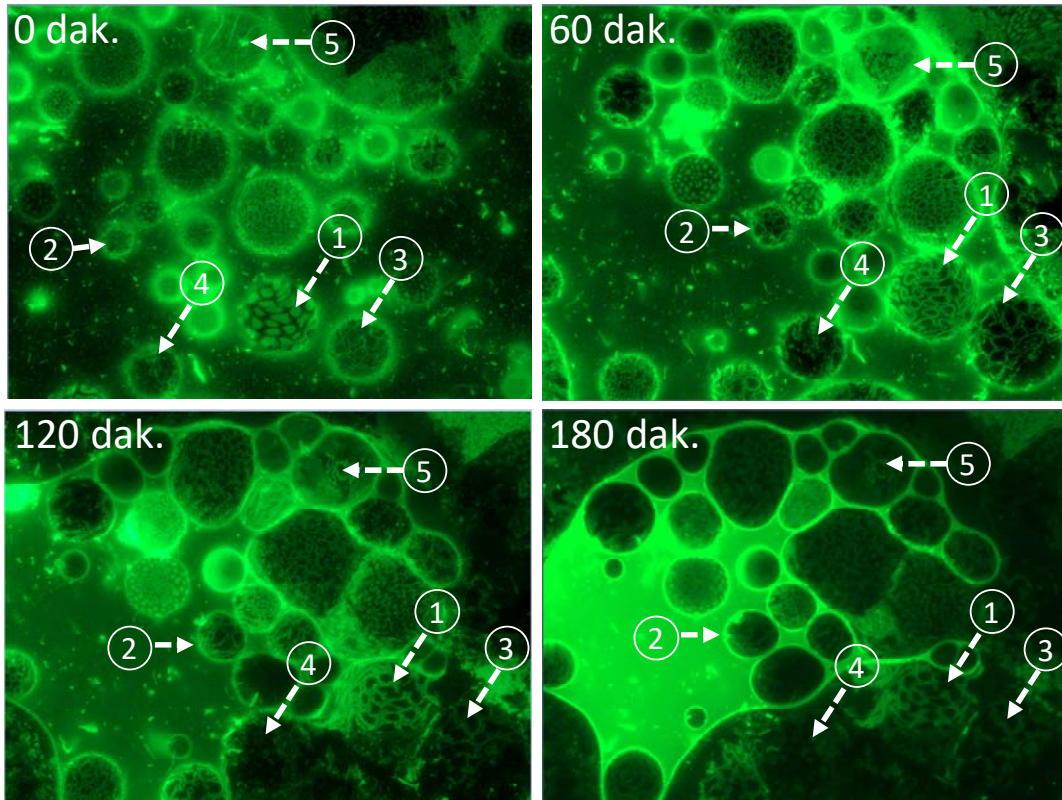
DSPC:PEG₄₀St 5:5 kompozisyonunda mikroköpükçüklerin floresan mikroskop görüntüsü ve floresan ışık yoğunluğu **Şekil 42**'de verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçüğün yüzey morfolojisi daha önce gösterilen içi karanlık etrafı aydınlık morfolojilere benzememektedir. **Şekil 42(a)**'da görüleceği üzere, mikroköpükçüklerin yüzeyinde sınırlarla çevrili bölgelerin oluştuğu görülmektedir. Bu bölgelerin içerisi floresan boya molekülleri ile kaplanmış ve bölgenin her bir noktasından ışık saçmaktadır. Çevrili bölgelerin sınırları ise karanlık bölgedir. Karanlık bölgenin DSPC molekülleri ile mi, yoksa su molekülleri ile mi doldurulduğu kesinlik kazanmamıştır. Bu tür oluşumlar mikroköpükçüğün zar yapısını gösteren TEM resimlerinde de görülmektedir (Kim vd. 2003). Kanaatimizce, sınır bölgeleri daha çok su fazı ile doldurulmuş olup, çevrili bölgelerin yüzey gerilimi etkisiyle stabil kalmalarını sağlamaktadır. **Şekil 42(b)**'de mikroköpükçük yüzeyinde floresan ışık yoğunluğu değerleri görülmektedir. Şekilden görüleceği üzere her bir çevrili alanın ışık yoğunlukları ve boyutları farklılık göstermektedir. Yaklaşık 10 µm boyutlarında bir mikroköpükçük için çevrili alan boyutları 0.5 µm ile 2.5 µm arasında değişmektedir. Çevrili alandan gelen ışık şiddetinin farklılık göstermesi, monotabaka yapısının homojen dağılmadığını göstermektedir.



Şekil 42. 5:5 DSPC:PEG₄₀St mikroköpükçüğün yüzeyde (a) sınırlarla çevrili bölgelerin oluşumu, (b) floresan ışık yoğunluğu. (Büyütme: 100X)

Başka bir çalışmada, mikroköpükçüklerin boyutlarında ve yüzey morfolojilerinde zamanla meydana gelen değişimler floresan mikroskop görüntüleriyle izlenmiştir. Mikroskop tablasına yerleştirilen mikroköpükçük süspansiyonu ışık enerjisi altında kurumaya bırakılmış, yüzey gerilimi etkisiyle sıkıştırılmakta olan mikroköpükçüklerin her saat başı floresan görüntüleri kaydedilmiştir. Floresan mikroskopu ile değişik yüzey morfolojisine sahip mikroköpükçükler **Şekil 43**'de gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, sıkışma etkisiyle birbiri ile sıkışan mikroköpükçükler aralarında bir birleşmeye gitmemekte, stabil yapılarını muhafaza etmektedirler. Her bir mikroköpükçüğün sınırları belirgin şekilde gözlenmektedir. Mikroköpükçükler birbirlerine dokunmuş ve sıkıştırılmış olmalarına rağmen aralarında birleşme olmaması, membran yapısının bozulmaması bu mikroköpükçükçüklerin statik koşullarda kararlı yapıda, dayanıklı olduklarını düşündürmektedir. Başlangıçta benzer morfoloji gösteren bu mikroköpükçüklerin, sıcaklık, basınç gibi termodinamik koşulların

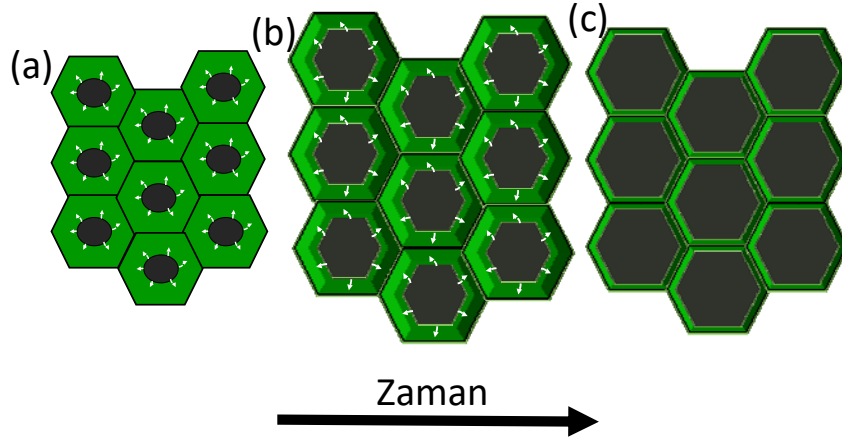
değişmesiyle farklı morfolojiler göstermesi dinamik bir sistemin olduğunu, faz geçişlerinin mikroköpükçüğün büyüklüğüne ve floresan probun düzenli (ordered) ve düzensiz (disordered) veya katı (solid) ve akışkan (fluid) fazlarda farklı hızlardaki difüzyonuna bağlı olabileceği değerlendirilmektedir. Buna göre, şekilde işaretlenen her bir mikroköpükçüğün davranışından dersler çıkartılabilir. Burada, 1 No'lu mikroköpükçük zamanla takip edildiğinde, yüzeyde sınırları çevrili alanlar olduğu ve bu alan içerisinde floresan molekülünün ker noktadan sinyal verdiği görülmektedir. İlerleyen zamanlarda, çevrili alanların ortaları karanlık bölgeye dönüşürken, kenar bölgeler aydınlık çizgiye doğru dönüşmektedir. Benzer şekilde, 2 No'lu mikroköpükçük yüzeyinde sınırları çevrili ve her noktasından floresan ışık saçılan alanlar izlenirken, zaman ilerlediğinde, mikroköpükçüğün boyutunun büyüdüğü ve ortada bulunan boyanın kenarlara doğru çekilerek ip şeklinde alanı çevreleyen sınırlar oluşturduğu görülmektedir. Benzer davranış, 3 ve 4 No'lu mikroköpükçüklerde de görülmektedir. 5 No'lu mikroköpükçük için ise, net bir yüzey morfoloji görüntüsü alabilmek için, mikroköpükçük yüzeyini, özellikle floresan molekülü ihtiva eden, bir sıvının kaplamaması gerektiği anlaşılmaktadır.



Şekil 43. Mikroköpükçüklerin boyutları ve yüzey morfolojilerinin floresan mikroskop görüntüleri. (Büyütme: 100X)

Mikroköpükçüklerin yüzey morfolojilerinin incelenmesi sonucu kazanılan bilgi ve tecrübeler ışığında **Şekil 44**'da görüleceği üzere, mikroköpükçüklerin yüzey morfolojisi oluşum mekanizması önerilmiştir. Şekilde, mikroköpükçük yüzeyini temsil eden sınırları çevrili bölgeler görülmektedir. Mikroköpükçükler, yapı taşı olan DSPC molekülünün T_m sıcaklığı olan 55 °C'ın üzerinde 65 °C sıcaklıkta sentezlenmektedirler. Mikroköpükçükler ilk sentezlendiklerinde lipid, emülsifiyer, ve floresan molekülleri yüzeyde sınırları çevrili bölge içerisinde homojen bir şekilde karıştığı farzedilmektedir. Hemen akabinde mikroköpükçükler soğutulmaktadır. Soğutma esnasında sıcaklığın düşürülmesiye mikroköpükçüklerin boyutları küçülmekte, ve aynı zamanda mikroköpükçüklerin süspansiyon edildiği sıvının gaz taşıma kapasitesi artacağından mikroköpükçüklerden gaz çıkışı ile mikroköpükçük boyutu daha da hızlı azalmaktadır. Soğutmanın hızlı yada yavaş yapılma derecesine göre sınırlarla çevrili alanın büyüklüğü küçük ya da büyük olabilmektedir. Soğuma esnasında, mikroköpükçüğün boyutu küçüleceğinden yüzeyde lipidler sıkışmakta ve sıkışmış (kondens) DSPC fazı oluşmaktadır. Diğer PEG₄₀St ve floresan molekülü için T_m sıcaklığı daha düşük olduğundan, bu iki molekül yüzeyde daha çok extended faz olarak kalmakta ve yüzeyde sıkışmış ve dağılmış olarak bulunmaktadır. **Şekil 44(a)**'da görüleceği üzere, floresan boya yüklü mikroköpükçükler görüntüleme için mikroskop tablasına konmadan önce yıkanmakta ve çoğunlukla fosfat tampon çözelti olan bir dağıtma sıvısı içerisinde süspansiyon olarak mikroskop altına konmaktadır. Bu sıvının çözünmüş gaz kapasitesi mikroköpükçüklerin orjinal olarak saklandığı sıvının özelliklerinden farklı olacağından, mikroköpükçüklerin boyutlarında bir artma olacak ve sınırlarla çevrenelmiş alanda bir genişleme olacaktır (Kwan ve Borden 2012). Bu durumda, extended fazda bulunan PEG₄₀St ve floresan molekülleri çevrili alanın kenar bölgelerine doğru difüzleneceklerdir. Böylece ilk karanlık ve aydınlık alanlar oluşacaktır. **Şekil 44(b)**'de görüleceği üzere, mikroköpükçüklerin boyutlarındaki artma devam ettiğinde ve difüzlendirme hızlandığında, PEG₄₀St ve floresan molekülleri çevrili alanın kenarlarında toplanarak ayrı bir faz oluşturacaklardır. En sonunda sınırları çevrili alanın kenarlarında kümeleşmiş PEG₄₀St ve floresan molekülleri **Şekil 44(c)**'de tasavvur edildiği şekilde mikroköpükçüğün morfolojisini oluşturacaktır.

Buradan çıkarılacak sonuç şudur: Mikroköpükçüklerin yüzeyleri beklendiği gibi monotabaka yapıdan oluşmamaktadır. Mikroköpükçüklerin yüzeylerinde farklı büyüklüklerde sınırlarla çevrili alanlar ve bu alanların etraflarında kümelenmiş bölgeler oluşmaktadır. Böylece, yüzeyde bir kütle farkı doğmaktadır. Bu da bir mikroköpükçüğün osilasyonunu, bu esnada homojen ya da farklı morfolojilerde boyutsal büyümelerini ve mikroköpükçüğün stabilitesini, yavru mikroköpükçüklere parçalanma davranışını ve ekojenitelerini etkilemektedir.

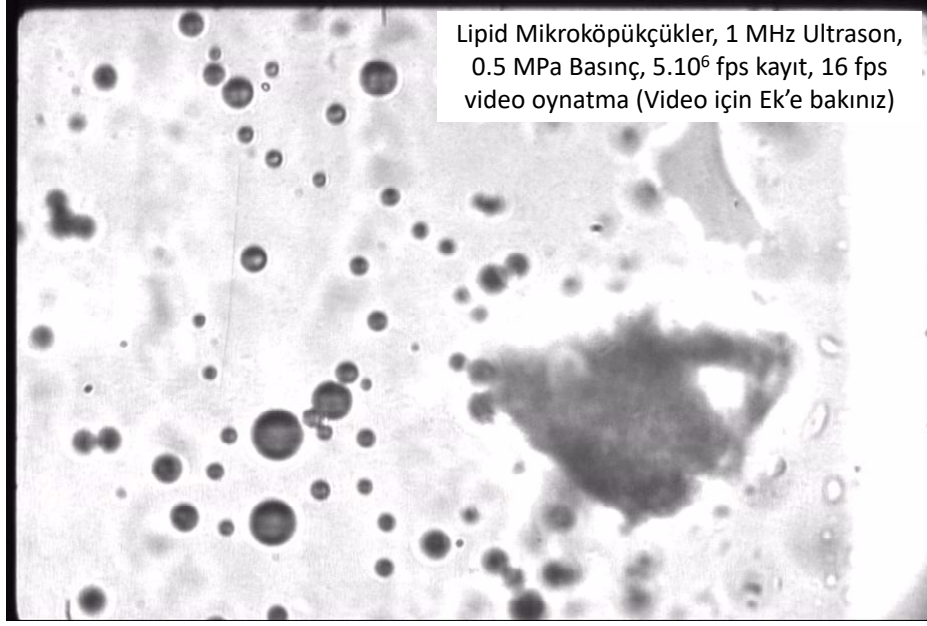


Şekil 44. Mikroköpükçük yüzeyinde oluşan karanlık ve aydınlık bölgeler için önerilen mikroköpükçük yüzey morfolojisi oluşum mekanizmasının şematik çizimi.

4.3 Mikroköpükçüklerin Yüksek Hızda Osilasyonları

Mikroköpükçükler'in ultrason altında davranışlarını anlamak ve bu çalışma kapsamında yeni yaklaşım tarzları oluşturabilmek için, University of Pittsburgh-Medical School (UPMC)'da Dr. Flordeliza Villanueva'nın laboratuvarında bulunan, "Ultra Yüksek Hızlı Kamera Sistemi" ile görüntüler elde edildi ve bu video görüntüler kullanılarak analizler yapıldı. Bu analizlerde amacımız, mikroköpükçüklerin ultrason altında davranışlarını belirlemek ve uygun yöntemler geliştirmektir.

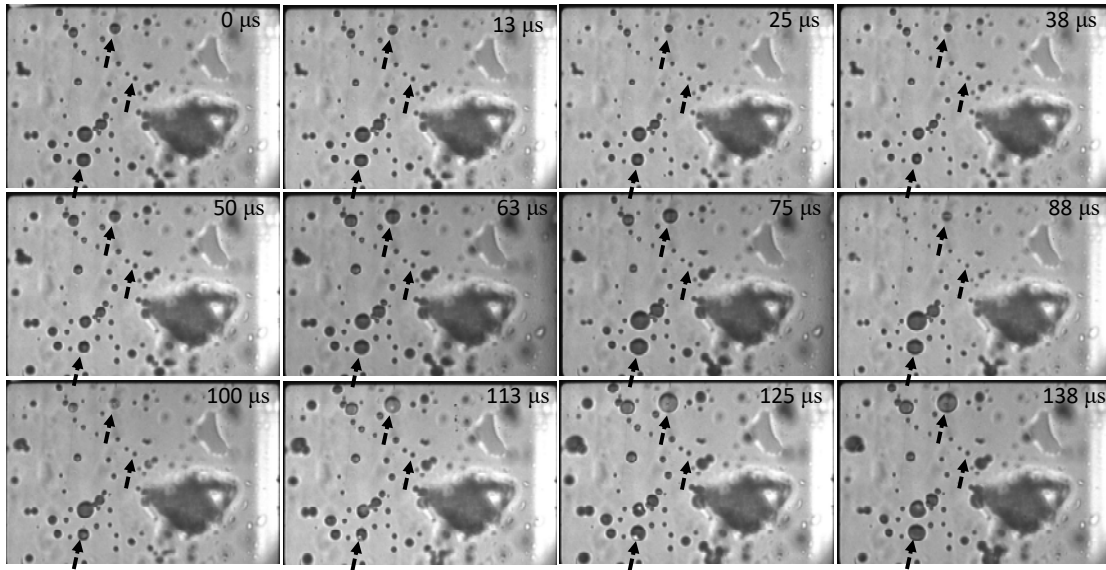
Ultra yüksek hızlı görüntü sisteminde, lipid mikroköpükçükler bir kapiler tüp içerisine yerleştirildi. 1 MHz frekansında (saniyede 10^6 atım) ultrason mikroköpükçükler üzerine gönderildi. Bu esnada bölgesel basınç, kurulan deneysel düzenek üzerinden 0.5 MPa'a ayarlandı. Video kayıt hızı $5 \cdot 10^6$ fps olacak şekilde kameraların resim alma hızları ayarlandı ve video kaydı yapıldı. Toplanan resimlerden saniyede 16 resim olmak üzere 16 fps hızında yeni bir video oluşturuldu. Bu video "UPitt-lipidsMB36s" isminde bir dosya olarak Ek'de verilmiştir. **Video 1**'de yer alan lipid mikroköpükçüklerin bir resmi Şekil 45'de gösterilmektedir.



Şekil 45. University of Pittsburgh Medical Center (UPMC)'de "Ultra Yüksek Hızlı Kamera Sistemi" ile kaydedilmiş video görüntüsü.

Video 1. "UPitt-lipidsMB36s" (Video için Ek'e bakınız)

Yüksek hızlı kamera sisteminde ilk osilasyon esnasında farklı zamanlarda mikroköpükçüklerin boyutlarındaki küçülme ve büyüme hareketi Şekil 46'de verilmektedir. Şekilden görüleceği belli bir boyutun altındaki mikroköpükçükler hiç osilasyon yapmaz iken, mikroköpükçüklerin osilasyonu için belli bir boyut eşik değerinin aşılması gerekmektedir. Bu mikroköpükçüklerin rezonans frekansı olarak bilinmektedir ve $f.d = 3$ m/s gibi tahmini bir eşitlikle verilebilir. Bu durumda, 1 MHz frekansa sahip ses dalgalarının 3 μ m boyutlarında mikroköpükçükleri osilasyona geçirebileceği anlaşılmaktadır.



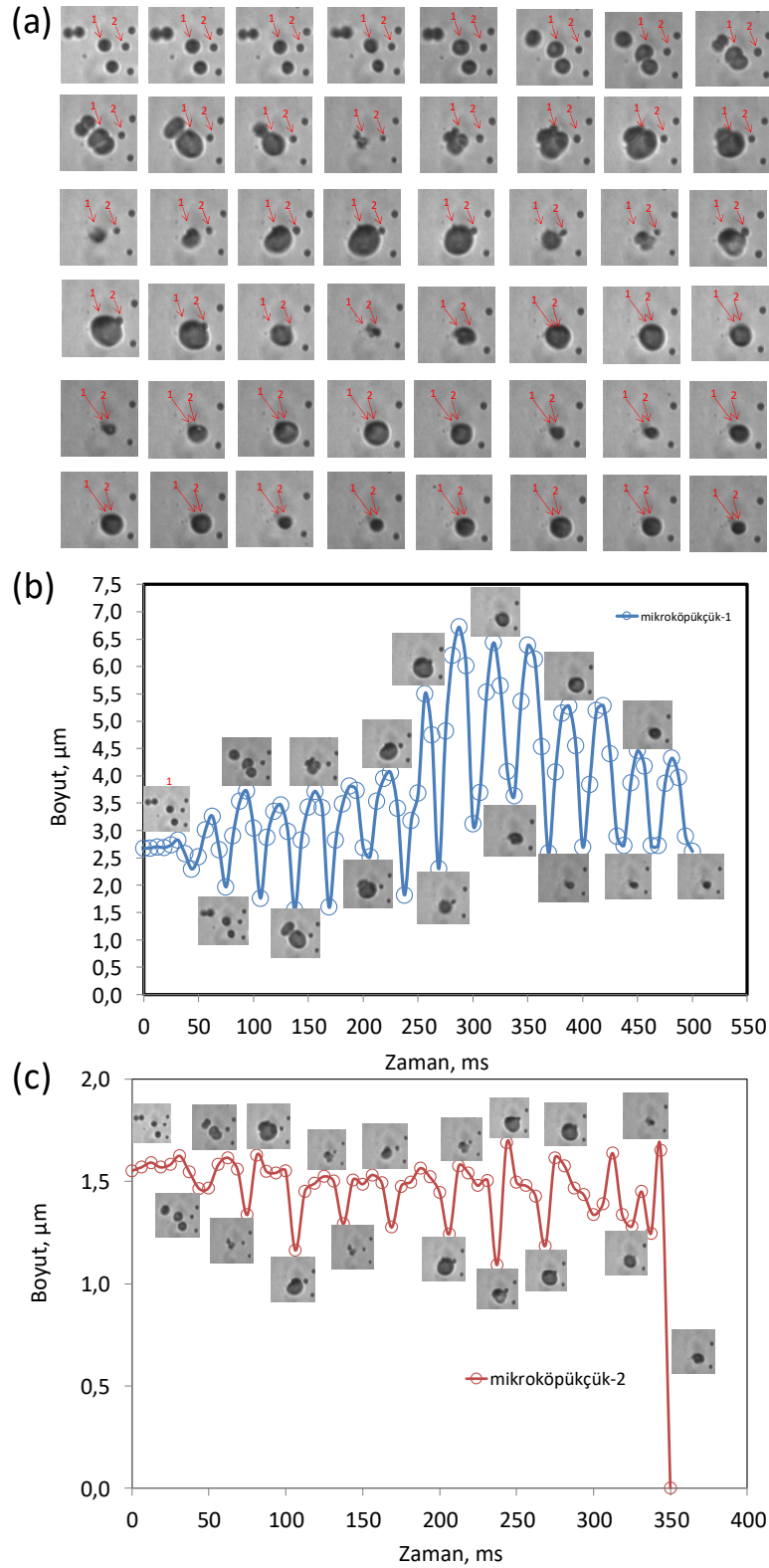
Şekil 46. Yüksek hızlı kamera sisteminde ilk osilasyon esnasında farklı zamanlarda mikroköpükçüklerin boyutlarındaki küçülme ve büyüme hareketi.

Video görüntülerini oluşturan her bir resim için farklı boyutlardaki mikroköpükçüklerin osilasyonları incelenmiştir. Ultrason altında sırasıyla yaklaşık 2.6 μm ve 1.6 μm boyutlarında mikroköpükçüklerden elde edilen görüntüler Şekil 47(a)'da gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, boyutu büyük olan mikroköpükçük ultrason altında boyutu artarak osilasyona başlamaktadır. Yakınında bulunan hemen hemen benzer boyuttaki başka bir mikroköpükçük ile birleşmekte ve daha sonra tek bir mikroköpükçük gibi hareket etmektedir. Yine, yakında bulunan başka iki mikroköpükçüğün birleşmesinden oluşan yeni birleşik yapı ile birleştikten sonra osilasyona tek bir mikroköpükçükmüş gibi devam etmektedir. Yüzey morfolojisinden her bir mikroköpükçüğün birleşerek homojen yüzey oluşturduğu değil, farklı mikroköpükçüklerin yer aldığı bir birleşik mikroköpükçük taneciğinin olduğu görülmektedir. Ancak, osilasyonun ilerleyen aşamalarında, mikroköpükçük homojen yüzeye sahip tek bir yüzey gibi hareket etmekte ve zamanla boyutu küçülmektedir. Bu davranış, ultrason altında mikroköpükçüklerin niçin konsantrasyonlarının azaldığı ve ekojenete değerlerinin düştüğünü de açıklayabilir.

Yukarıda bahsedilen bu durum Şekil 47(b)'de verilmektedir. Bahsedilen mikroköpükçüğün osilasyona başlamasıyla boyutlarında bir küçülme ve büyüme hareketi görülmektedir. Ne zaman mikroköpükçük yakınında bulunan benzer boyuttaki başka bir mikroköpükçük ile etkileşime girdiğinde, mikroköpükçüğün boyutlarında meydana gelen osilasyon periyodik bir osilasyon olmaktan çıkıp, damping etkisiyle periyodik olmayan bir osilasyon meydana gelmektedir. İki mikroköpükçüğün birleşmesiyle mikroköpükçük boyutu büyümüş ve osilasyon şiddeti artmıştır. Birleşik mikroköpükçüğün milisaniye mertebesinde

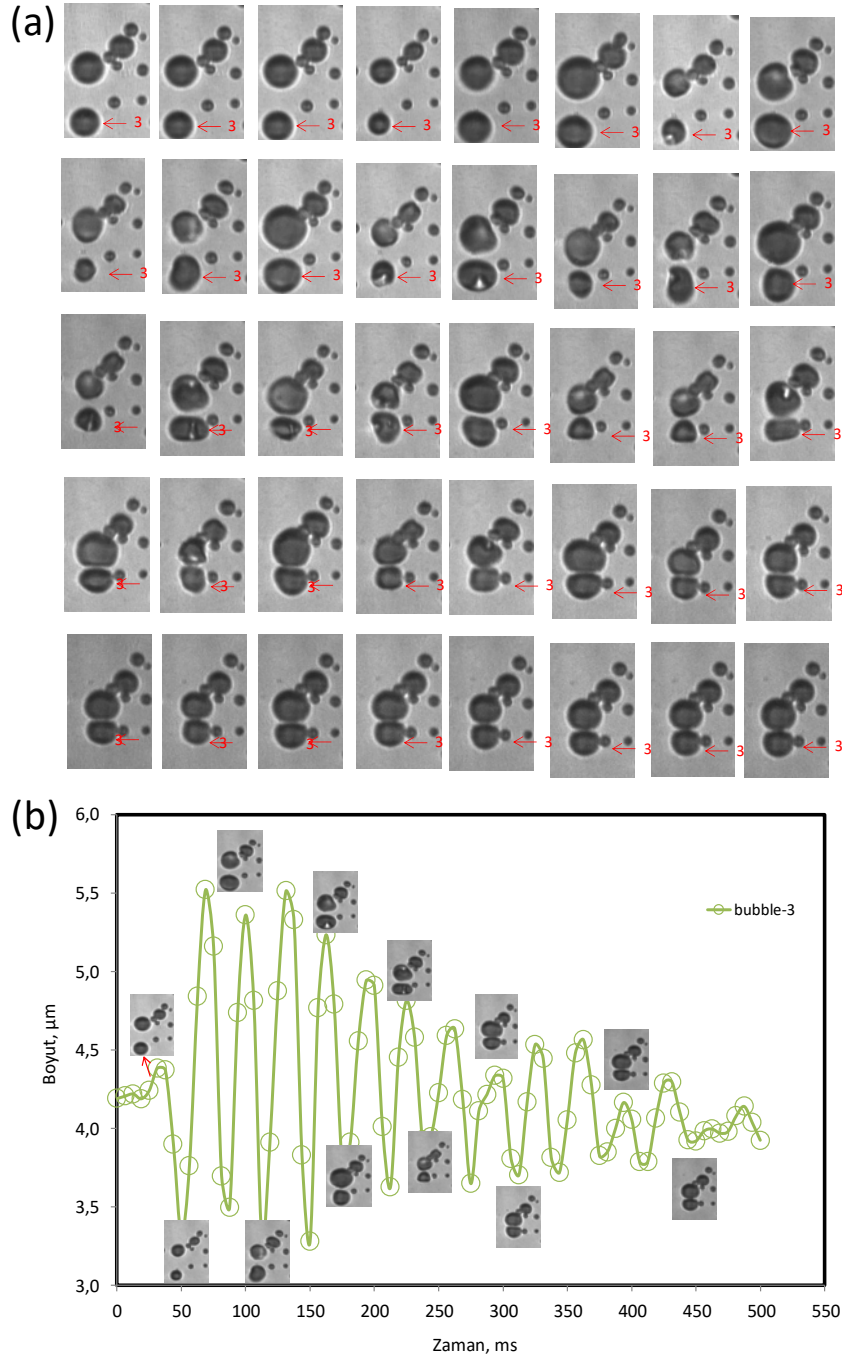
zamanla çözülmesiyle, mikroköpükçük boyutunda bir küçülme olmuş ve osilasyon şiddetinde bir düşme meydana gelmiştir.

1.6 μm boyutlarında 2 No'lu mikroköpükçüğün boyutlarında meydana gelen değişme ve osilasyon davranışı Şekil 47(c)'de gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, 1.6 μm gibi bir boyutta olan mikroköpükçükler beklenen osilasyonu göstermemekte, yalnızca kompresyon (compression-only) hareketi yapmaktadır. Küçük boyutlu bu mikroköpükçük başka bir mikroköpükçük ile birleşinceye kadar boyutlarında görünür bir artma gözlenmemektedir. Buradan, mikroköpükçüklerin ultrason altında osilasyonları mikroköpükçüklerin boyutlarına bağlıdır gibi bir sonuç çıkartılabilir. Öte yandan, ultrason ile görüntü elde edilmesinde, sinyal şiddeti mikroköpükçüğün boyutunun 6.ncı kuvveti ile orantılı olduğu dikkate alındığında,(Kabalnov vd. 1998) küçük boyutlu mikroköpükçüklerin sinyal şiddetlerinin düşük olabileceği de değerlendirilmektedir.



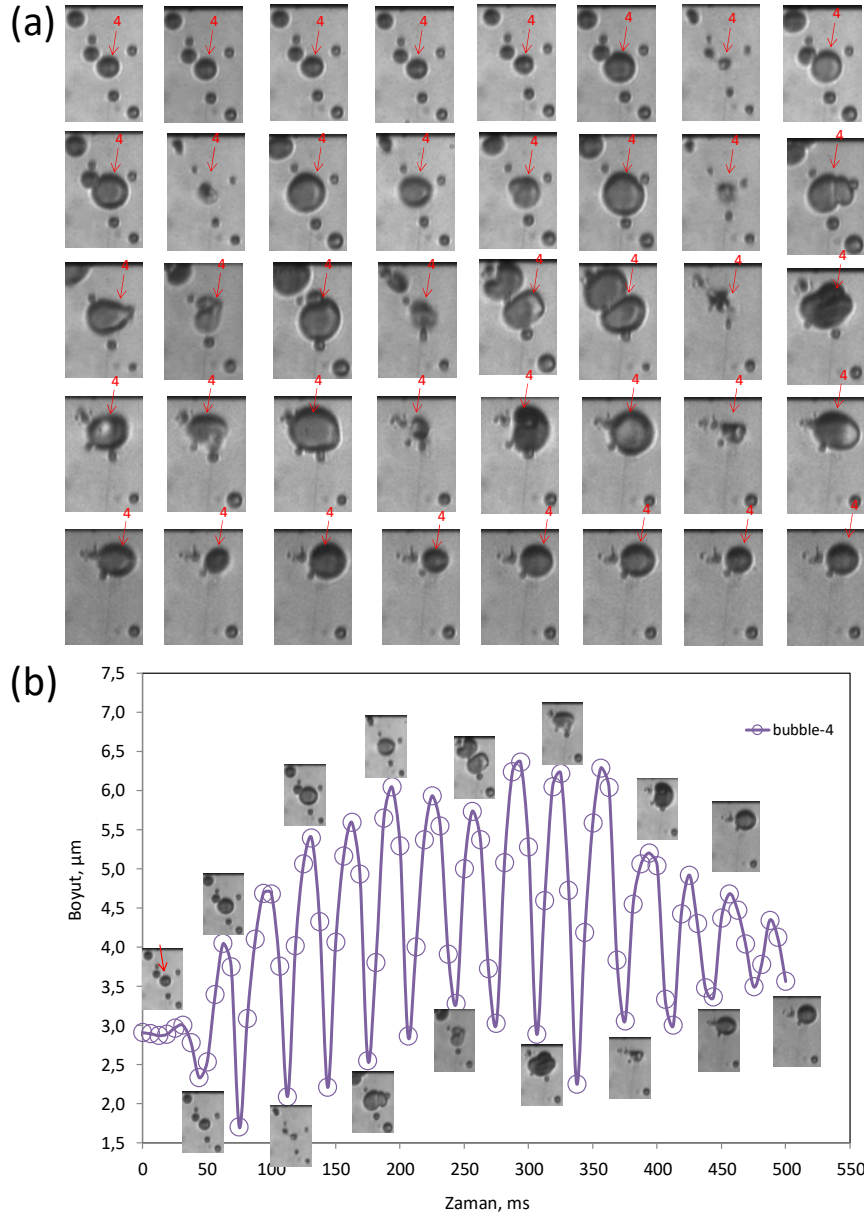
Şekil 47. (a) 2.6 μm ve 1.6 μm boyutlarında 1 ve 2 No'lu mikroköpükçüklerin ultrason altında davranışlarının hızlı kamera görüntüsü, (b) 2.6 μm boyutunda 1 No'lu mikroköpükçüğün boyutlarında meydana gelen değişme ve osilasyon davranışı, (c) 1.6 μm boyutunda 2 No'lu mikroköpükçüğün boyutlarında meydana gelen değişme ve osilasyon davranışı.

4.2 μm boyutlarında 3 No'lu mikroköpükçüğün ultrason altında osilasyonu Şekil 48(a)'da gösterilmektedir. Bahse konu mikroköpükçük etrafında bulunan herhangi bir mikroköpükçük ile birleşmemekte, ancak osilasyonun ilerleyen aşamalarında yakınında bulunan başka bir mikroköpükçük ile temasta bulunmaktadır. Bu durum iki mikroköpükçük arasında damping etkisi diyebileceğimiz esnek çarpışmaya neden olmaktadır. Osilasyon esnasında, mikroköpükçüğün yüzeyinde değişiklikler olduğu ve jet oluştuğu da görülmektedir (Ref). Burada önemli olabilecek bir bulgu da, her ne kadar mikroköpükçükler birbirleriyle temas halinde olsalar da, yüzey gerilimlerinden dolayı kendi sınırlarını korumakta ve birbirlerine difüzlenmeden yapılarını koruyabilmektedirler. Bahse konu mikroköpükçüğün ultrason altında boyutlarındaki değişim Şekil 48(b)'da gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçük ultrason ile birlikte osilasyona başlamakta ve mikroköpükçüğün osilasyon çapı çevrede bulunan başka bir mikroköpükçük ile teması sonucu zamanla azalmaktadır. Burada, iki mikroköpükçüğün birbirleriyle birleşmediği, osilasyon esnasında boyutlarında değişme olmasına rağmen stabil olarak zar yapılarını koruyabildikleri görülmektedir. Şekilde görüleceği üzere, mikroköpükçük tek başına iken sahip olunan osilasyon şiddeti damping etkisi nedeniyle esnek çarpışma sonucu zamanla sönüme doğru gitmektedir.



Şekil 48. (a) $4.2 \mu\text{m}$ boyutlarında 3 No'lu mikroköpükçüğün ultrason altında davranışının hızlı kamera görüntüsü, (b) $4.2 \mu\text{m}$ boyutlarında 3 No'lu mikroköpükçüğün boyutlarında meydana gelen değişme ve osilasyon davranışı.

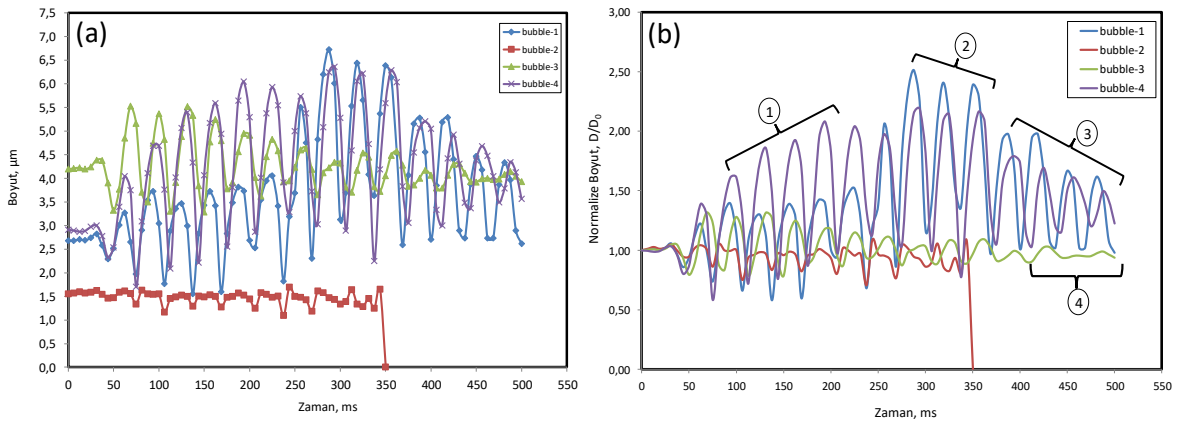
3.0 μm boyutlarında 4 No'lu mikroköpükçüğün ultrason altında davranışı Şekil 49(a)'da gösterilmektedir. 4 No'lu mikroköpükçük komşu mikroköpükçük ile temas halinde iken osilasyona başlamakta, boyutları küçüldüğünde iki mikroköpükçük arasındaki mesafe artmakta, ancak tekrar boyutları ilkinin göre daha fazla büyüdüğünde iki mikroköpükçük birleşmektedir. Bu birleşme ilk aşamada tek bir mikroköpükçüğe dönüşmediği, hala iki farklı mikroköpükçük gibi davrandıkları görülmektedir. Osilasyonu ileriki aşamalarında komşu yeni mikroköpükçükler ile birleşmelerin olduğu, bu esnada, mikroköpükçük içerisindeki gazın bir mikroköpükçükten diğerine aktarıldığı, ve bu mikroköpükçüğün zar yapısı dağılırken, diğer mikroköpükçüğün tek bir mikroköpükçük olarak osilasyona devam ettiği görülmektedir. Burada, bir arada bulunan mikroköpükçüklerin osilasyon esnasında birbirleri ile temasta bulunarak birleşmeye gittikleri, ortadan kayboldukları, ve sayıca azaldıkları anlaşılmaktadır. Zamana karşı 4 No'lu mikroköpükçük için boyut değişimi Şekil 49(b)'de verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, mikroköpükçük ultrason ile osilasyona başlamakta, komşu mikroköpükçük ile temasından dolayı periodik bir osilasyon yapmamaktadır. Komşu başka mikroköpükçük ile birleşmesinden dolayı osilasyon şiddeti artmaktadır. Ancak, sonlara doğru boyutlarındaki küçülme ve periodik osilasyon mikroköpükçüğün küçüldüğü ve yalnız başına hareket ettiğini göstermektedir.



Şekil 49. (a) 4 No'lu mikroköpükçüklerin ultrason altında davranışlarının hızlı kamera görüntüsü, (b) 4 No'lu mikroköpükçüğün boyutlarında meydana gelen değişme ve osilasyon davranışı.

Her dört mikroköpükçüğün ultrason altında boyutlarında meydana gelen değişmelerin karşılaştırmaların yapıldığı grafik Şekil 50(a)'da gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, mikroköpükçüklerin osilasyon frekanslarında ihmal edilebilecek derecede küçük bir fark olduğu, bunun mikroköpükçük boyutuna ve mikroköpükçüklerin komşu mikroköpükçükler ile temaslarından kaynaklandığı değerlendirilmektedir. Ayrıca, mikroköpükçüklerin boyutlarının ultrason altında orijinal boyutlarına göre 2 kat'a kadar arttığı ve azaldığı da görülmektedir. 2

No'lu 1.5 μm olan mikroköpükçüğün ise osilasyon davranışının sınırlı olduğu dikkati çekmektedir. Mikroköpükçüklerin ultrason altında boyutlarında meydana gelen değişim Şekil 50(b)'de daha belirgin olarak gösterilmiştir. Şekilde görüleceği üzere, mikroköpükçüklerin boyutlarına bağlı olarak osilasyona başlama zamanı farklıdır. Mikroköpükçüklerin çevredeki başka mikroköpükçükler ile birleşmesiyle osilasyon şiddeti artmaktadır. Birleşme sonrası mikroköpükçüğün zar yapısında meydana gelen yeniden düzenlemeler, birleşme ve birlikte hareket etmeler, mikroköpükçük boyutundaki küçülmeler, ve komşu mikroköpükçükler ile temas sonrası esnek çarpışmaların getirdiği sönümlenme hareketi şekilde görülmektedir.



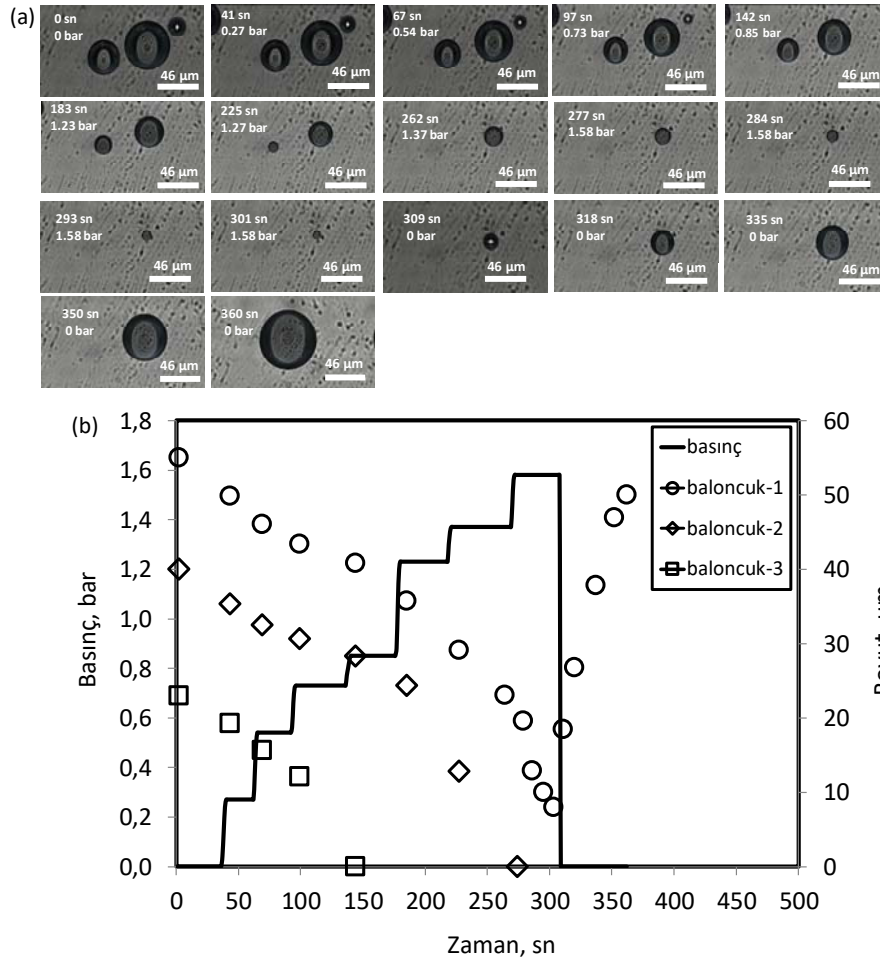
Şekil 50. (a) Mikroköpükçüklerin boyutlarında meydana gelen değişmelerin karşılaştırılması, (b) Mikroköpükçüklerin normalize edilmiş boyutlarında meydana gelen değişmelerin karşılaştırılması. 1. Mikroköpükçük birleşmesi, 2. Yapısal oryantasyon, 3. Mikroköpükçük çözünmesi ile boyutta küçülme, ve 4. Komşu mikroköpükçük ile temas ile esnek çarpışma sonucu sönümlenme davranışı.

Mikroköpükçüklerin ultrason altında osilasyon görüntülerinin analizi sonrasında, mikroköpükçüklerin 0.1 MHz – 20 MHz frekanslarda ultrason altında osilasyonlarını görüntüleyecek bir sistem Türkiye'de mevcut değildir ve sistem birkaç milyon dolar mertebesinde olduğundan alınma durumu da mümkün olmamaktadır. Mikroskop ataçmanlı kameralar yaklaşık 50 fps hızlarda (video kayıt hızı daha düşük) çekim yapabilmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada, ultrason frekanslarında hızlı görüntü alınamayacağından, mikroköpükçüklerin büyüme ve küçülme osilasyon davranışlarını oluşturmak üzere hidrostatik basınç düzeneği geliştirilmiştir.

4.4 Mikroköpükçüklerin Hidrostatik Basınç Altında Stabiliteleri

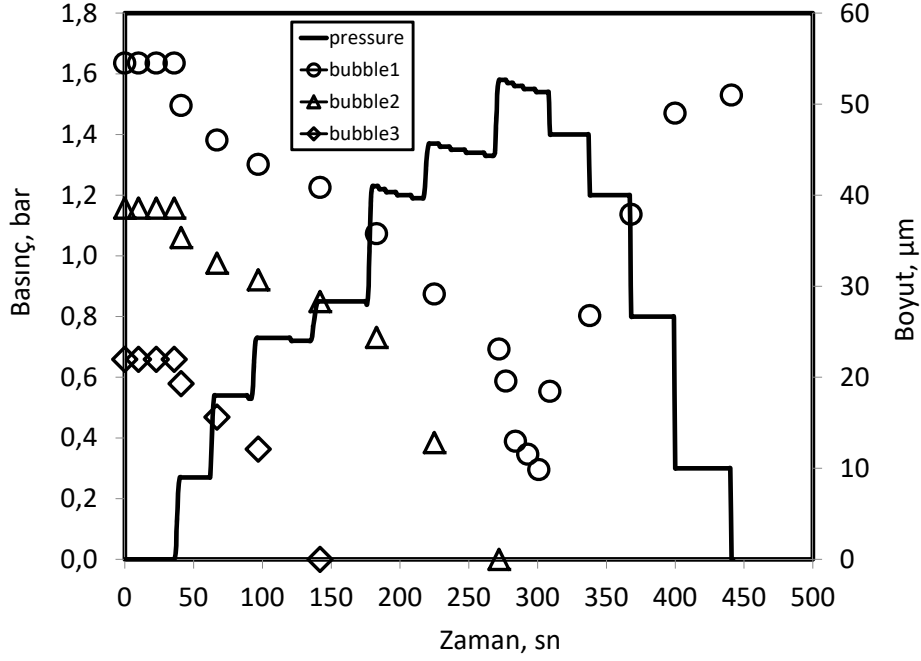
Mikroköpükçüklerin ultrason altında oluşan boyutsal değişimleri, bu esnada zar yapısında olabilecek değişimleri, mekanizmaları anlamak üzere Şekil 16'de görülen hidrostatik sabit basınç sistemi tasarlanmıştır. Hidrostatik sabit basınç sistemi ile ilk olarak, Şekil 51(a)'da görüleceği üzere, farklı boyutlarda hava kabarcıklarının basınç ile boyutlarında meydana gelen değişmelere bakılmıştır. Şekilde hava kabarcıklarının ortasında oval bir görüntü olduğu görülmektedir. Basınç arttıkça, hava kabarcıklarının boyutlarında küçülme meydana gelmektedir. Basınç yeniden azaltılınca, küçük hava kabarcıklarının tamamen çözündüğü ve büyük hava kabarcığının boyutunun arttığı ve yeniden eski boyutlarına ulaştığı görülmektedir.

Farklı basınçlarda hava kabarcıklarının boyutlarında meydana gelen değişimler Şekil 51(a)'de gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, basınç arttıkça, hava kabarcıklarının boyutlarında küçülme meydana gelmektedir. Bu esnada küçük hava kabarcıklarının tamamen çözündüğü görülmektedir. Büyük hava kabarcığının ise, basınç arttıkça boyutu küçülmemekte, ancak basınç yeniden düşürüldüğünde, bu hava kabarcığının boyutu hemen hemen orijinal boyutuna ulaşmaktadır. Burada görünen o ki, basınç artmakla birlikte hava kabarcığının yüzey gerilimi arttığından gaz fazında bulunan havanın sıvı içerisinde çözünmediği, ve basınç tekrar düşürüldüğünde orijinal boyutlarına dönebildiğidir. Öte yandan, küçük hava kabarcıkları, artan basınç ile belli bir kritik çapın altına kadar boyutları küçüldüğünde, ortamda tamamen çözünerek yok olmaktadır.



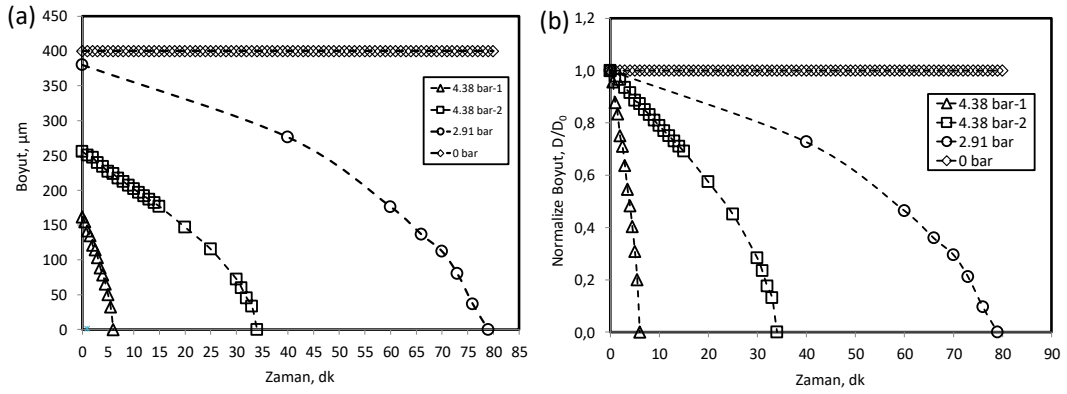
Şekil 51. (a) Farklı boyutlarda hava kabarcıklarının basınç ile boyutlarında meydana gelen değişmelerin mikroskop görüntüleri, (b) Farklı basınçlarda hava kabarcıklarının boyutlarında meydana gelen değişmeler.

Benzer bir deneyde, farklı boyutlarda hava kabarcıklarının basınç ile boyutlarındaki değişmelere bakılmıştır. Şekil 52'de görüleceği üzere, hava kabarcıklarının boyutları başlangıçta sabittir. Basınç kademeli olarak artırıldığında, hava kabarcıklarının boyutları küçülmektedir. Küçük boyutlara sahip hava kabarcıkları belli bir kritik çapın altına ulaştıklarında ortamdaki çözünerek kaybolmaktadırlar. Büyük boyuta sahip hava kabarcığının basınç ile boyutlarında küçülme gözlenmektedir, basınç kademeli olarak düşürüldüğünde hava kabarcığının boyutlarında orantılı olarak büyüme olduğu görülmektedir. Basınç tamamen atmosferik basınca düşürüldüğünde, hava kabarcığı orijinaline yakın bir boyuta yeniden büyümektedir.



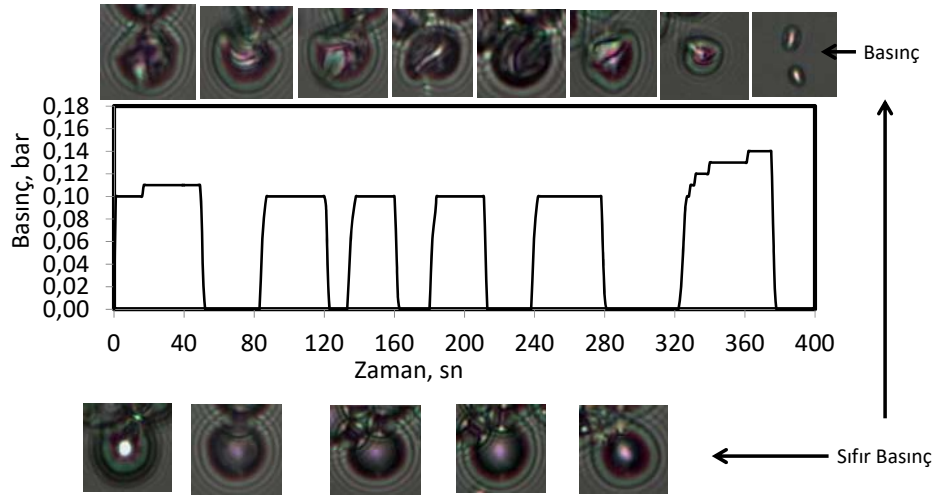
Şekil 52. Basınç ile hava kabarcıklarının davranışı

Öte yandan, hava kabarcıkları uzunca bir süre basınç altında bırakıldığında boyutlarının küçüldüğü görülmektedir. Şekil 53'de görüleceği üzere, bir hava kabarcığı atmosferik basınçta (0 bar) uzun süre bırakıldığında boyutlarında bir değişim görülmemektedir. Benzer boyuttaki başka bir hava kabarcığının, 2.91 bar basınçta boyutunun küçüldüğü ve sonunda ortamda çözüldüğü görülmektedir. Kabalnov ve ark. tarafından yapılan teorik modellemelerde de benzer bir davranış gözlemlenmiştir. (Kabalnov vd. 1998) Benzer olarak, farklı boyuttaki iki hava kabarcığı 4.38 bar basınç altında bırakıldığında, her iki hava kabarcığının boyutlarının küçüldüğü ve sonunda çözünerek ortamdaki kaybolduğu görülmektedir. Küçük boyuttaki hava kabarcıkları aynı basınçta daha hızlı çözünmektedirler. Basınç arttıkça çözünme hızı olmaktadır. Yine hava kabarcığının çapı azaldıkça, çözünme hızında bir artış trendi gözlenmektedir.



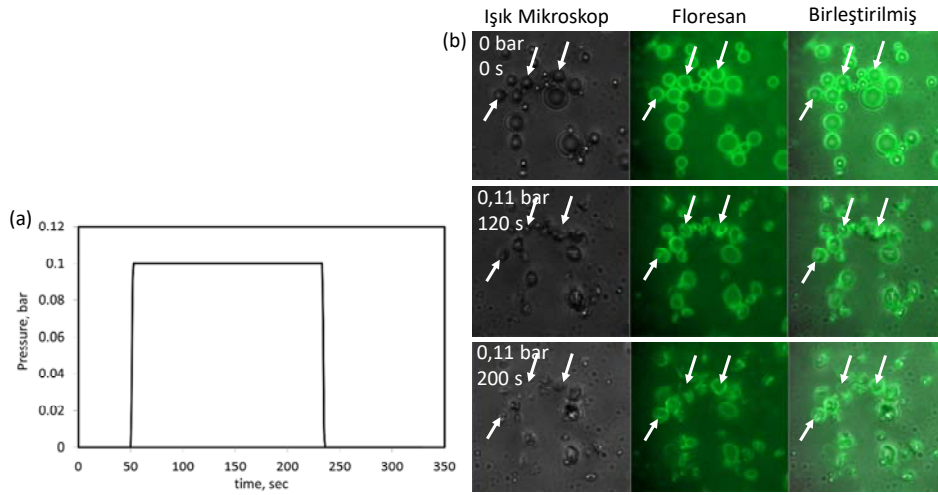
Şekil 53. Farklı basınçlarda ve farklı boyutlarda hava kabarcıklarının zamanla boyutlarındaki değişim.

Lipid mikroköpükçüklerin basınç ile boyutlarında meydana gelen değişimler gözlenmiştir. Basınç çok yüksek olduğunda, lipid mikroköpükçükleri çok hızlı çözünerek ortamdan kaybolmuşlardır. Ancak düşük basınçlarda, Şekil 54'da görüleceği üzere, mikroköpükçüklerin basınç ile boyutlarında meydana gelen değişimler gözlemlenebilmiştir. Şekilde görüleceği üzere, lipid mikroköpükçükleri atmosferik basınçlarda küresel şekilde düzgün zar yapısına sahip mikroköpükçüklerdir. Basınç artırıldığında, zar yapısında bir değişim meydana gelmekte, büzümekte, ve farklı bölgelerde çıkıntılar oluşmaktadır. Basınç yeniden düşürüldüğünde mikroköpükçükler pürüzsüz küresel yapılarına geri dönmektedirler. Basıncın artırıldığı ve azaltıldığı birçok süreç sonunda mikroköpükçükler basınç altında bırakıldığında boyutları küçülme, çözülmeye gitme, hatta farklı boyutlarda küçük mikroköpükçüklere ayrılmakta, ve en sonunda çözünerek ortamdan kaybolmaktadırlar.



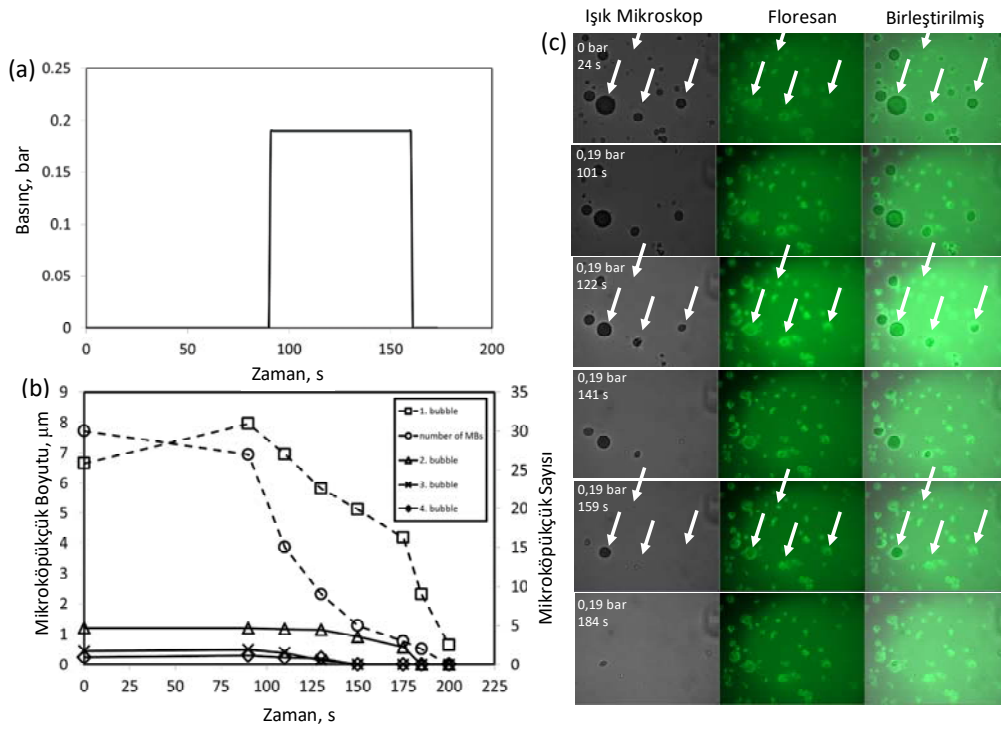
Şekil 54. Lipid mikroköpükçüklerin basınç altında davranışları.

Mikroköpükçüklerin basınç altında boyutlarında ve yüzey morfolojilerinde oluşacak değişimleri incelemek amacıyla hidrostatik basınç deneyleri yapılmıştır. Geliştirilen sabit basınç deney düzeneği ile istenilen düzeyde sabit basınç değerleri elde edilebilmiştir. Lipid mikroköpükçüklerin 0,11 bar basınç altında davranışları ışık mikroskop, floresan, ve birleştirilmiş görüntü olarak **Şekil 55**'de gösterilmiştir. Şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçüklere 0,11 bar basınç uygulandığında, mikroköpükçükler dış basıncın etkisiyle yüzeylerinde bükülmeler olduğu açıkça görülmektedir. Ancak bu bükülme, mikroköpükçüğün yüzeyinin bir çizgi gibi belirlemektedir. İlerleyen zamanda, bazı mikroköpükçükler çözünerek yok olurken, bazı mikroköpükçüklerin yeniden küresel formuna geri döndükleri görülmektedir.



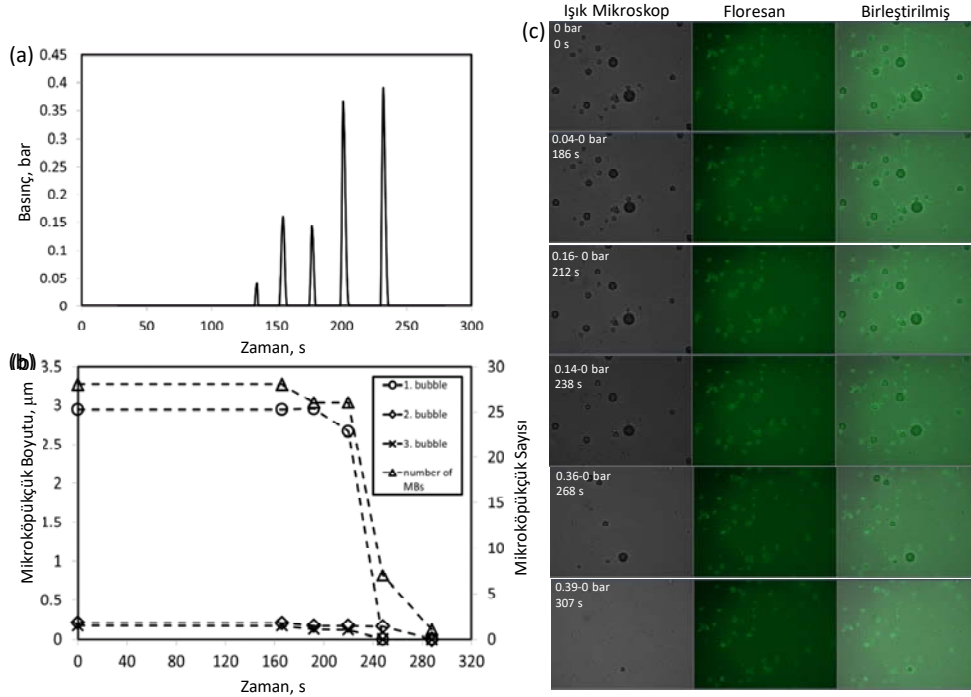
Şekil 55. Lipid mikroköpükçüklerin 0.11 bar basınç altında davranışları.

Şekil 56(a)'da görüldüğü üzere, basınç 0.19 bar seviyesine çıkarıldığında, **Şekil 56 (b)**'de görüldüğü üzere, mikroköpükçüklerin 2 dakika gibi bir sürede çözüldüğü ve ortamdaki yok oldukları görülmüştür. Şekilde, basınç atılmasıyla, mikroköpükçük boyutlarında hızlı bir düşme gözlenirken, mikroköpükçük sayıları da hızla azalmıştır. Ortamdan yok olan mikroköpükçükler basınç hücresinin üst camına yapışmışlardır. Lipidlerin bükülme ve katlanmalarından dolayı oluşan iplikçi kümeleşmeler **Şekil 56(c)**'de gösterilen floresan resimlerde açıkça görülmektedir. Doalysı ile ışık mikroskopunda görülmeyen bu topaklar, floresan mikroskopunda rahatça izlenebilmektedir.



Şekil 56. Lipid mikroköpükçüklerin 0.19 bar basınç altında davranışları, (a) basınç, (b) zamanla mikroköpükçük sayısı ve boyutlarında değişim, ve (c) mikroköpükçüklerin ışık, floresan, ve birleştirilmiş mikroskop görüntüleri.

Ultrason altında mikroköpükçüklerin osilasyonlarını anlamak üzere farklı basınç pulslarında mikroköpükçüklerin boyutlarında, sayılarında, ve morfolojilerinde meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. **Şekil 57(a)**'da görüleceği üzere, basınç kısa süreli pulslar halinde mikroköpükçüklere uygulanmıştır. İlk önce 0.04 bar basınç uygulanmış, **Şekil 57(b)**'de görüleceği üzere, ne mikroköpükçüklerin boyutlarında ne de sayılarında bir değişim gözlenmemiştir. Mikroköpükçüklerin boyutlarında da bir değişim olmamıştır. Basınç 0.16 bar seviyelerine çok kısa süre çıkarılıp tekrar normal şartlara geri getirilmiştir. Bu esnada, mikroköpükçüklerin boyutlarında küçülme görülmüştür. Basınç, çok kısa süreliğine 0.36 bar seviyelerine çıkarıldığı ve akabinde hemen normal seviyelere düşürüldüğünde, mikroköpükçük boyutlarındaki küçülme hızlanmış ve bir çok küçük boyutlu mikroköpükçük ortamdaki kaybolmuştur. İkinci basınç şokunda mikroköpükçükler tamamen çözünerek ortamdaki kaybolmuşlardır. Mikroköpükçüklerden geriye kalan zar yapılarında bulunan lipidler, **Şekil 57(c)**'de görüleceği üzere, cam yüzeyine yapışmış olarak floresan mikroskop ile izlenmiştir.



Şekil 57. Mikroköpükçüklerin kısa süreli basınç pulslarında davranışları, (a) basınç değişimi, (b) zamanla mikroköpükçük sayısı ve boyutlarında değişim, ve (c) mikroköpükçüklerin ışık, floresan, ve birleştirilmiş mikroskop görüntüleri.

Basınç çalışmalarından görüleceği üzere, basınç altında strese sokulan mikroköpükçükler, içlerindeki gazın sıkıştırılmasıyla hacimleri küçülmeye ve bu esnada yüzeylerinde katlanma ve bükülmeler meydana gelmektedir. Mikroköpükçüklerin süspansiyon edildiği sıvının basıncının artırılması ile sıvının taşıyabileceği doygunluk gaz konsantrasyonu artacağından, mikroköpükçüklerden sıvıya gaz aktarımı olacağından mikroköpükçüklerin hacimlerinde küçülmeye neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu esnada, mikroköpükçük yüzeyinde bulunan katlanma ve bükülmeler normal durumlarına geri dönerek, mikroköpükçüğün küresel yapısına geri dönmesi sağlanmaktadır. Ancak, yüksek basınçlarda, hem dış basınç etkisi, hem de çözünme etkisi ile çok kısa bir sürede mikroköpükçükler yok olmaktadır.

Yapılan deney sonucunda mikroköpükçüklerin basınç altında stabilitelerini kaybettiği de anlaşılmıştır. Mikroköpükçüklerin, özellikle fare deneylerinde kuruk veninden çok küçük çaplı 27G iğne ile enjeksiyonları esnasında şırıngada basınç birikmesi

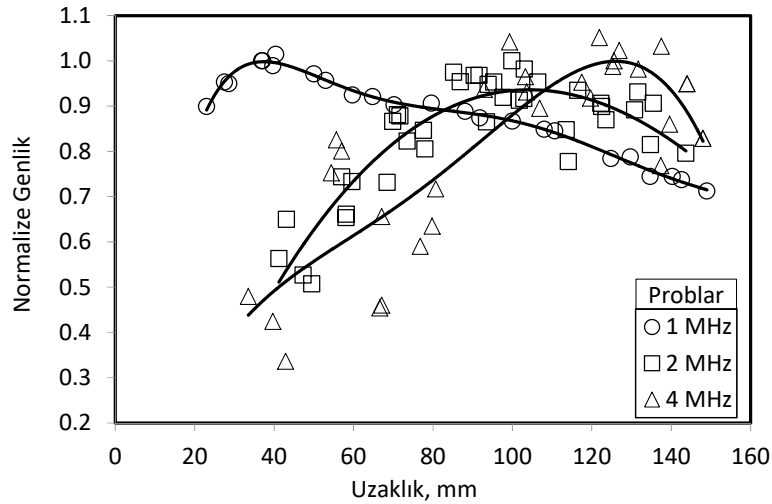
olacağından, mikroköpükçüklerin stabilitesinde azalmalara neden olacak, sayılarında azalmalar olabilecektir.

4.5 Mikroköpükçüklerin Ultrason Altında Stabiliteleri

Mikroköpükçüklerin ultrason altında stabilitelerini araştırmak üzere laboratuvar ölçeğinde çalışmalar yapılmıştır. Bu maksatla, farklı konfigürasyonlarda düzenekler tasarlanmış ve mikroköpükçüklerin stabiliteleri ölçülmüştür.

4.5.1 Ultrason Düzeneğinin Karakterizasyonu

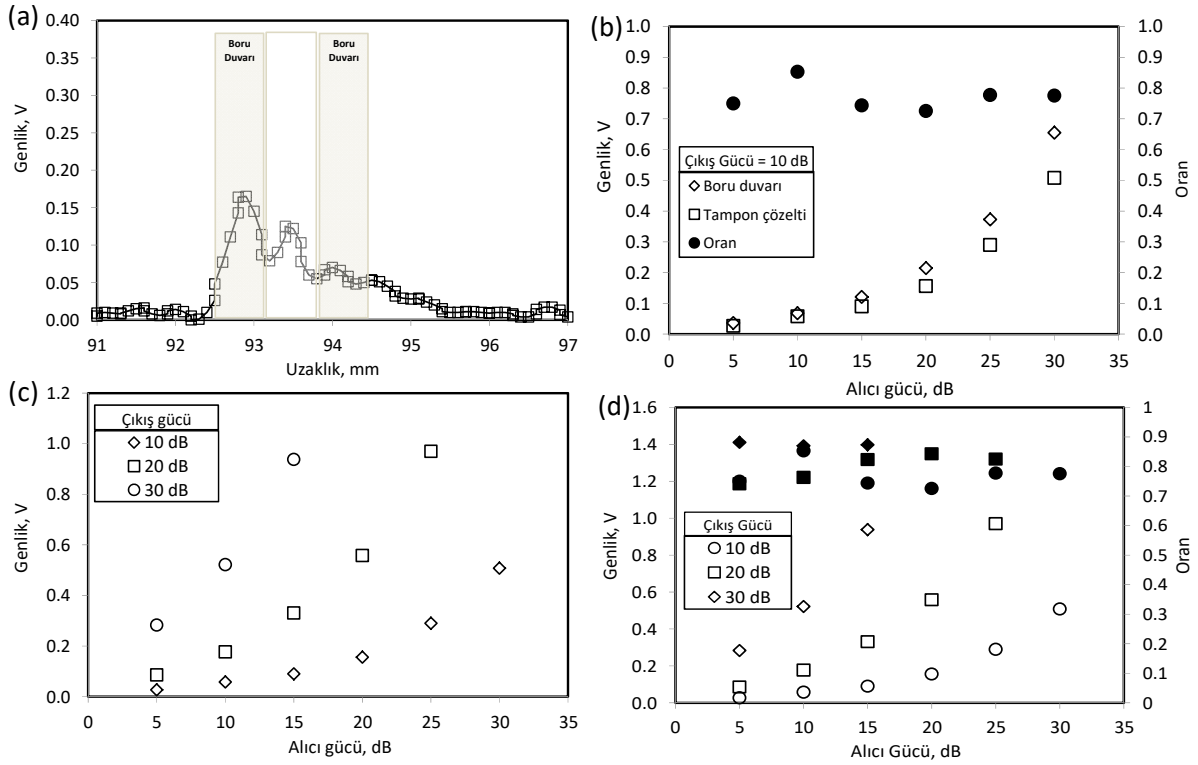
Ultrasonik problar için hidrofona ile odak bölgesi belirlenmesi : 1 MHz, 2 MHz ve 4 MHz'lik problar için odak bölgesi hidrofona yardımı ile **Şekil 17**'de gösterilen deney düzeneği ile belirlenmiştir. Her bir proba farklı uzaklıklarda genlik değerleri hidrofona yardımıyla ölçülmüştür. Her prob için vericinin çıkış gücü 10 dB, alıcının giriş gücü 15 dB olarak ayarlanmıştır. Genlik değerleri normalize ettiğimizde, **Şekil 58**'de görüleceği üzere, 1 MHz'lik prob yaklaşık 40 mm uzaklıkta, 2 MHz'lik prob yaklaşık 100 mm uzaklıkta, ve 4 MHz'lik prob yaklaşık 130 mm uzaklıkta maksimum genlik değerine ulaşmaktadır. Bu odak noktalarının dışında bir konumda, intensite değerlerinde bir azalma olduğu görülmektedir.



Şekil 58. Farklı frekanslardaki problar için ölçülen odak noktaları

Ultrasonik ekoskopun karakterizasyonu: Ultrasonik ekoskop düzeneğinin tanımlanması için **Şekil 18**'de gösterilen deney düzeneği kurulmuştur. Deneyde bir tampon çözeltisi ihtiva eden plastik borudan farklı kademelerde giriş ve çıkış dB'lerde ölçümler yapıldı. Şekil 59(a)'da tampon çözelti ihtiva eden boruda A-scan modda tipik genlik profili gösterilmektedir. A-scan modu genlik bilgisinden borunun proba yakın ve uzak olan duvarı ile borunun içinin ayrı ayrı pikler verdiği görülmektedir. Şekilde görüleceği üzere, deneyde kullanılan plastik borunun çapı yaklaşık 1.9 mm, duvar kalınlığı ise yaklaşık 0.5 mm'dir. Boru içerisine konulan numunelerden alınan sinyaller ayrıca değerlendirildi. Çıkış gücü 10 dB'de iken giriş gücü arttıkça borunun duvarının ve tampon çözeltisinin verdiği maksimum genlik değerlerinin Şekil 59(b)'de görüldüğü üzere eksponansiyel bir şekilde arttığı görülmektedir. Öte yandan, fosfat tampon çözelti ve borunun ön duvarının genlik değerlerini birbiriyle oranladığımızda, bu oranın yaklaşık 0.75 civarında sabit kaldığı görülmektedir. Bu yaklaşım, ortamda genlik değerleri değiştirildiği zaman dahi, genlik değerleri artmasına rağmen oran değerlerinin değişmediği ve oran değerlerine bakılarak karakterizasyon yapılabileceği izlenimi vermiştir.

Plastik borunun içi FTÇ ile doldurularak vericinin çıkış gücü farklı kademelerde (10, 20 ve 30 dB) sabit tutularak alıcı giriş gücü değiştirildi ve boru duvarından alınan pik ile tampon çözeltinin verdiği pik değerleri ölçüldü. Farklı çıkış gücü değerlerinde boru içerisinde farklı alıcı güçlerinde tampon çözeltide ölçülen genlik değerleri Şekil 59(c)'de gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, tampon çözeltisinin üç farklı çıkış gücünde (10, 20 ve 30 dB) değişik giriş güçlerine göre genlik değerlerinin giriş gücü arttırıldığında eksponansiyel olarak arttığı görülmektedir. Sabit alıcı gücünde çıkış gücü ile genlik değerleri aynı oranda artmaktadır. Üç farklı çıkış gücünde, tampon çözelti ve boru duvarına ait maksimum genlik değerleri birbiriyle oranlandığında Şekil 59(d)'de görüleceği üzere, artan giriş gücüne karşılık oranların 0.8 civarında sabit kaldığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre, çıkış gücü sabit olduğunda giriş güçlerini değiştirsek bile oran hemen hemen değişmediğine göre borunun duvarı ölçtüğümüz herhangi bir örnek için bir referans olarak kabul edilebileceği anlaşılmaktadır.

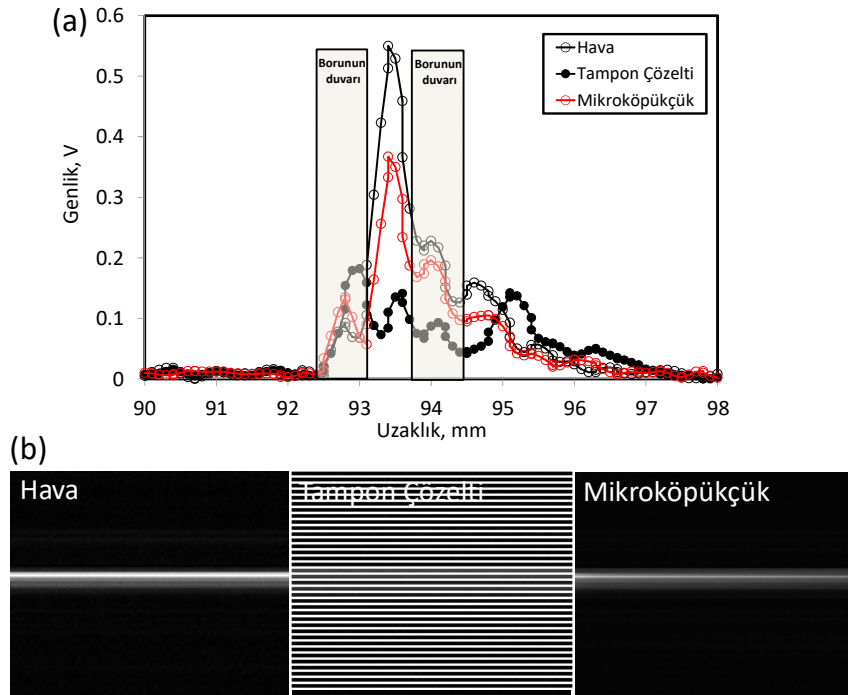


Şekil 59. (a) Tampon çözelti dolu boruda tipik genlik profili, (b) Çıkış gücü 10 dB’de farklı alıcı güçlerinde tampon çözelti ve boru duvarından ölçülen genlik değerleri ve oranlar , (c) Farklı çıkış gücü değerlerinde boru içerisinde farklı alıcı güçlerinde tampon çözültide ölçülen genlik değerleri, (d) Tampon çözültisinin farklı çıkış ve alıcı güçlerde ölçülen maksimum genlik değerleri ve oranlar.

Mikroköpükçüklerin ultrason altında A-scan ve B-scan mod’da karakterizasyonu: Yaklaşık 1.9 mm çapındaki plastik boru ile sırasıyla hava, tampon çözelti, ve mikroköpükçük süspansiyonu ihtiva eden çözelti varlığında A-scan modda alınan genlik değerleri **Şekil 60(a)**’da gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, boru duvar kalınlığı yaklaşık 0.5 mm olduğu için, A-scan modda 0.5 mm’lik aralığa karşılık gelen borunun ön ve arka duvarları ile borunun içinin verdiği pikler rahatça görülebilmektedir. Grafiği incelediğimizde, en yüksek pik borunun içi boş iken hava olduğu durumda görülmektedir. Ses dalgaları su ve hava arasında geçişe neden olduğunda, Denklem (7) ile verilen akustik impedans nedeniyle ortam değişikliği en yüksek kontrastı yaratmakta ve böylece genlik değeri maksimum seviyeler elde edilmektedir. Borunun arka duvarının verdiği pikten sonra oluşan iki pik ise ses dalgalarının ortamdaki uzaklaştıkça belirli bir yayılım göstererek ikinci, üçüncü eko ile sönümlenmeye gittiğini göstermektedir. Boru FTÇ ile doldurulduğunda ise genlik değeri minimuma inmektedir. Bunun sebebi kabın içindeki su ile borunun içindeki tampon çözelti sıvı olduğu için yeterince yansıma oluşmamakta, sesin büyük bir kısmı ortamdaki geçerek yansıma minimum düzeyde olmaktadır. Bunun sonucu olarak kontrast

oluşmamakta ve böylece sisteme geri dönen yanıt minimum değerdedir. Ayrıca, borunun duvarının genlik değerinin FTÇ'nin genlik değerinden daha yüksek olduğu gözlemlenmektedir. Öte yandan, borunun içi mikroköpükçük solüsyonu ihtiva ettiğinde genlik değeri belirli bir seviyeye kadar yükselmektedir. Bu sonuç, mikroköpükçüklerin ses dalgalarına karşı yanıt verdiğini ortaya koymaktadır.

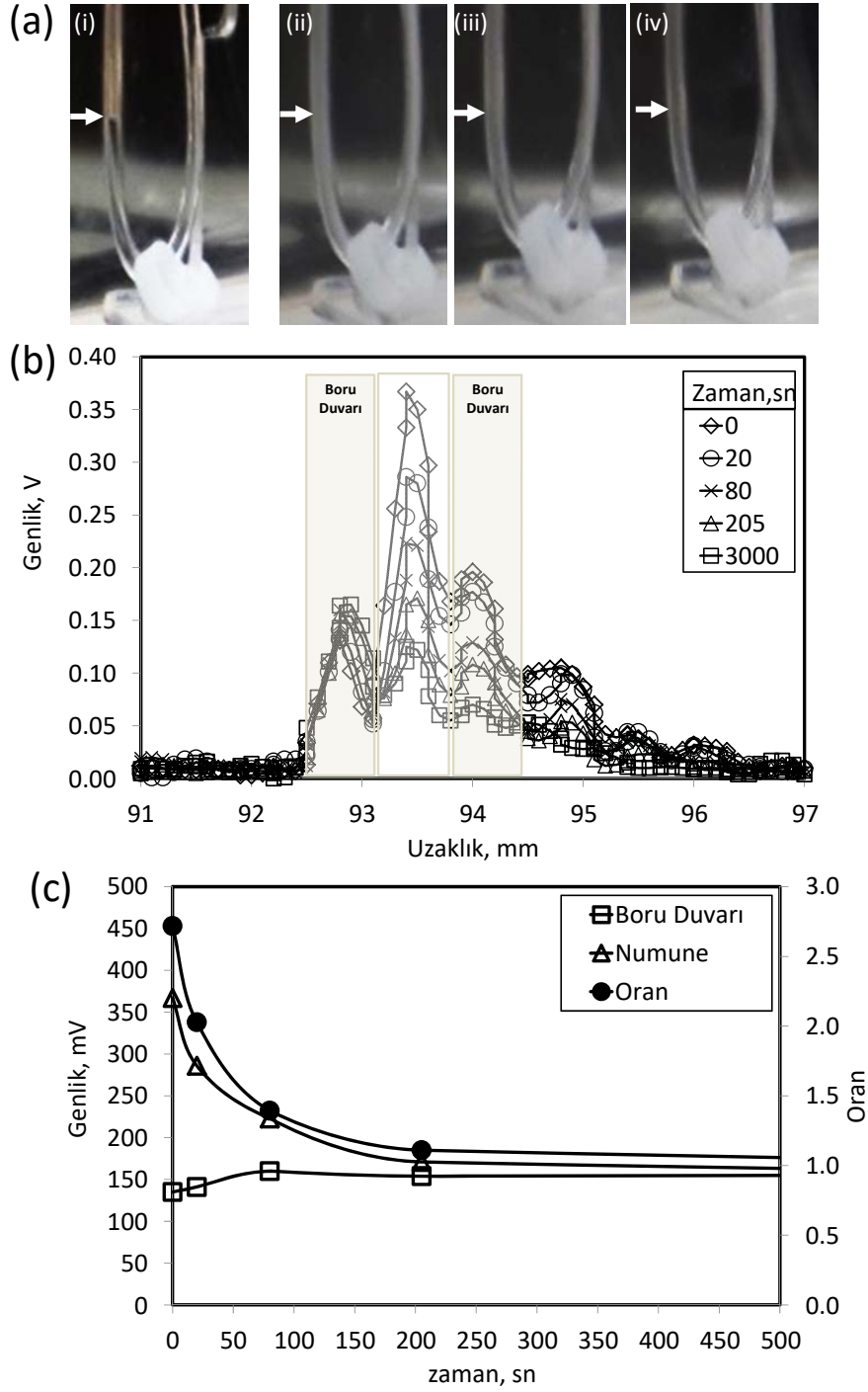
A-scan modda olduğu gibi, hava, FTÇ, ve mikroköpükçükler için B-scan mod görüntüleri bilgisayara kaydedildi ve **Şekil 60(b)**'de görüleceği üzere incelendi. B-scan modda resimler, her saniyede oluşturulan kareler ard arda birleştirilerek elde edilmektedir. B-Scan görüntülerde, ortamın verdiği genlik yanıtına göre parlaklık değişmektedir. Buna göre, genlik değeri ile resimdeki parlaklığın birbiriyle orantılı olduğu görülmektedir. Parlaklık aynı zamanda resimdeki piksel intensitesi hakkında bilgi vermektedir. Resimleri incelediğimizde, en fazla parlaklık A-scan'de olduğu gibi borunun içinde hava varken gözlemlenmektedir. Tampon çözeltide parlaklık en az, mikroköpükçükler olduğunda ise belirli oranda havaya göre daha düşük bir parlaklık görülmektedir. Ayrıca, tampon çözelti varlığında borunun arka duvarının da resimde belirdiği görülmektedir.



Şekil 60. (a) Ultrason altında A-scan modda mikroköpükçüklerin karakterize edilmesi, (b) Hava, tampon çözelti, ve mikroköpükçüklerin B-scan modda görüntülenmesi.

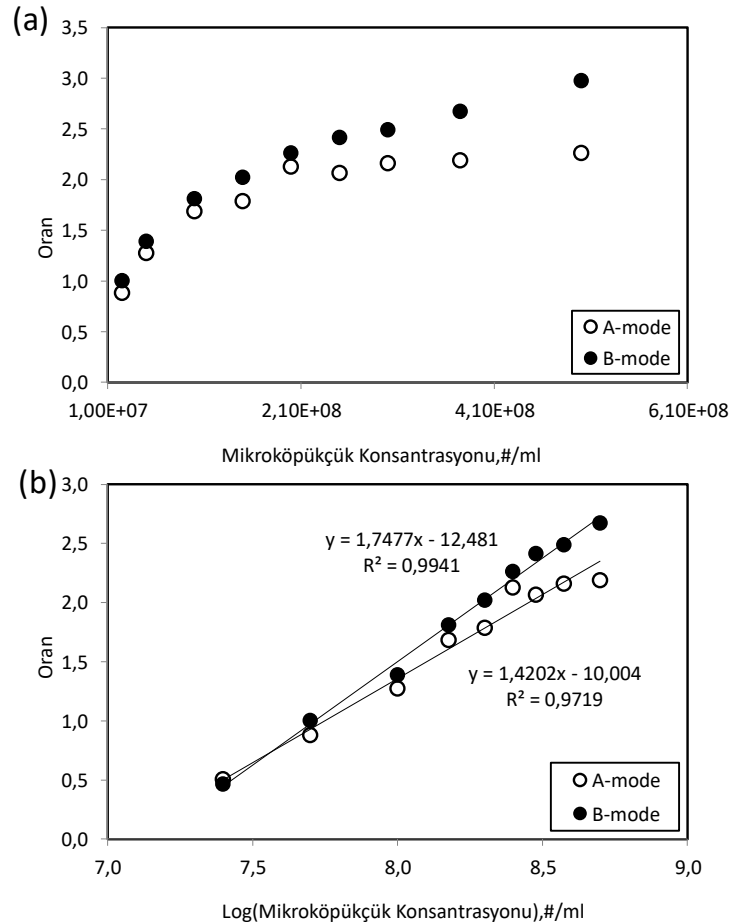
Başka bir çalışmada, FTÇ boruya enjekte edildi. A-scan modda genlik değerine bakılarak, Şekil 61(a)'de oklar ile görüleceği üzere, ultrasonun boru üzerinde odak noktası tespit edildi. Daha sonra borunun içi boşaltıldı ve mikroköpükçük solüsyonu enjekte edildi.

Karıştırma yapılmadığı durumda, mikroköpükçüklerin U-şeklinde olan boruda yukarı doğru yükseldikleri gözlemlendi. Resimlerde mikroköpükçüklerin solüsyona verdiği beyaz renk yukarı yükselmeden dolayı gitgide kayboldukları görülmektedir. Mikroköpükçüklerin yükselmeleri esnasında alınan A-scan modda genlik değerleri Şekil 61(b)'de gösterilmektedir. Şekilde, borunun merkezinin ultrason proba yaklaşık 93.5 mm uzaklıkta konumlandığı ölçülen pik değerinden anlaşılmaktadır. Ultrason proba yakın noktada alınan ilk pik boru duvarına aittir. Borunun merkezinde alınan pikler mikroköpükçüklere aittir. Şekilde, 5 dakika içerisinde mikroköpükçüklere ait genlik değerinin boru içerisinde mikroköpükçüklerin yukarı yükselmelerinden dolayı azaldığı ve minimuma indiği görülmektedir. Mikroköpükçüklerden alınan maksimum genlik değerleri, borunun ön duvarından alınan genlik değeri, ve bu iki değerlerin oranını gösteren veriler Şekil 61(c)'de verilmiştir. Şekilde görüleceği üzere, boru duvarından gelen genlik değerleri çok değişmemesine rağmen, numuneden gelen genlik değerinin önemli ölçüde ortamda bulunan mikroköpükçük konsantrasyonuna bağlı olduğu anlaşılmaktadır. Benzer şekilde, oran değerinin ortamda bulunan mikroköpükçük konsantrasyonu ile orantılı olduğu anlaşılmaktadır. Her ne kadar genlik değeri mikroköpükçük konsantrasyonu hakkında bilgi veriyor olsa da, oran değerlerinin daha güvenilir sonuç verdiği değerlendirilmiştir.



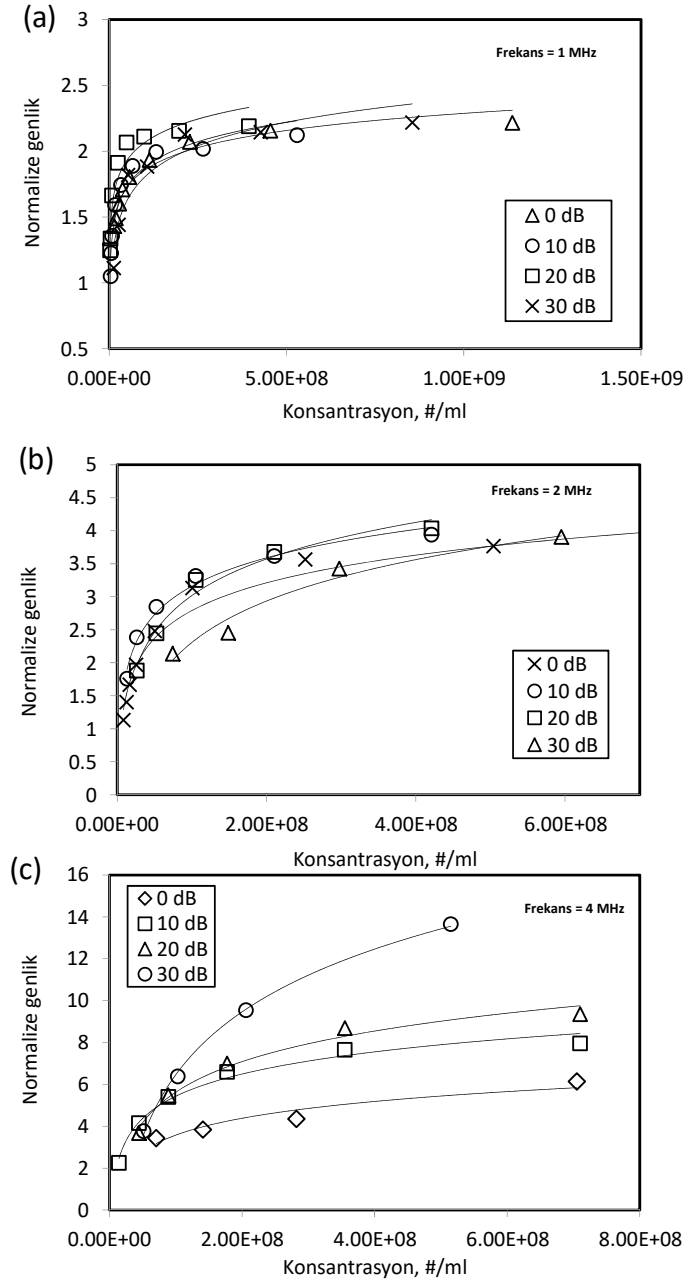
Şekil 61. (a) Mikroköpükçüklerin boru içerisinde yükselmesini gösteren fotoğraf kareleri. (i) FTÇ tampon çözelti, (ii) mikroköpükçük solüsyonunun enjekte edildiği anki görüntü, (iii) enjekte edildikten 2 dakika sonraki görüntü, (iv) enjekte edildikten 5 dakika sonraki görüntü, (b) zamanla boru içerisinde yukarı doğru çıkan mikroköpükçüklerin genlik değerlerindeki azalma, (c) mikroköpükçüklerin maksimum genlik değerleri, borunun ön duvarından yansıyan genlik değeri, ve bunların birbirine oranlarının zamanla değişimi.

A-scan ve B-scan modda mikroköpükçük kalibrasyonu: A-Scan ve B-Scan modda genlik değerlerinin mikroköpükçük konsantrasyonlarıyla orantılı olup olmadığını belirlemek için **Şekil 18**'deki deney düzeneği kullanılarak kalibrasyon çalışmaları yapılmıştır. Optik mikroskopta, toplam mikroköpükçük sayımı yapıldı ve sayıma göre konsantrasyon hesaplandı. Stok solüsyondan belirli seyreltmeler yapılarak deneyler gerçekleştirildi. Farklı mikroköpükçük konsantrasyonlarda solüsyonlar ve boru duvarı için A-Scan ve B-Scan genlik intensite değerleri ölçüldü. **Şekil 62(a)**'da mikroköpükçük konsantrasyonlarına karşı boru duvarı genlik değerine göre oranları alınan mikroköpükçük oran değerleri verilmektedir. Şekilden görüleceği üzere hem A-Scan ve hem de B-Scan ölçümlerinde mikroköpükçük konsantrasyonları arttıkça ölçülen genlik değeri oranlarında bir azalma olmaktadır. Bu oran, mikroköpükçük konsantrasyonun logaritması ile doğru orantılı olduğu **Şekil 62(b)**'de açıkça görülmektedir. Şekilde, yüksek mikroköpükçük konsantrasyonlarında konsantrasyon ile genlik değerleri arasında logaritmik bir ilişki olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 62. (a) Mikroköpükçükler için A-scan mod kalibrasyon grafiği, (b) A-scan mod kalibrasyonda yüksek konsantrasyonda mikroköpükçük konsantrasyonun logaritması arasında doğrusal ilişki.

Üç farklı frekansta ve dört farklı çıkış gücünde, mikroköpükçük konsantrasyonlarına karşılık normalize genlik değerleri **Şekil 18**'deki deney düzeneği ile ölçülmüştür. **Şekil 63(a)**'da 1 MHz, **Şekil 63(b)**'de 2 MHz ve **Şekil 63(c)**'de 4 MHz ultrason probalar ile elde edilen kalibrasyon grafiği verilmektedir. Şekillerden görüleceği üzere, genlik ile konsantrasyon arasında logaritmik bir ilişki olduğu anlaşılmaktadır. Çok düşük konsantrasyonlarda genlik değeri daha doğrusal bir artış göstermektedir. **Tablo 3**'de kalibrasyon eğrilerinden türetilen kalibrasyon denklemleri verilmektedir. Sonraki stabilite çalışmalarında elde edilen genlik değerleri kullanılarak denklemlerden konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra yapılan denemelerde, yüksek konsantrasyonlarda mikroköpükçükler kullanıldığında, ultrason ses dalgalarının boru yüzeyinde bulunan yoğun mikroköpükçük tabakası tarafından absorplandığı gözlenmiştir. Böylece, ses dalgasının büyük bir kısmının aslında yüzeyden geri döndürüldüğü, hedeflenen alanda bulunan mikroköpükçük konsantrasyonuna ulaşamadığı anlaşılmıştır. Sonuç olarak, ultrason çalışmalarında ultrason kontrast maddeleri için bir konsantrasyon limitinin olduğu ve düşük konsantrasyonlarda çalışılmasının gerekeceği ortaya çıkmıştır.



Şekil 63. (a) 1 MHz'lik, (b) 2 MHz'lik, ve (c) 4 MHz'lik frekansta farklı çıkış güçlerinde kalibrasyon eğrileri.

Tablo 3. Farklı frekanslarda mikroköpükçük kalibrasyon denklemleri. Burada, 'x', konsantrasyonu, 'y' ise normalize genlik değerini belirtmektedir.

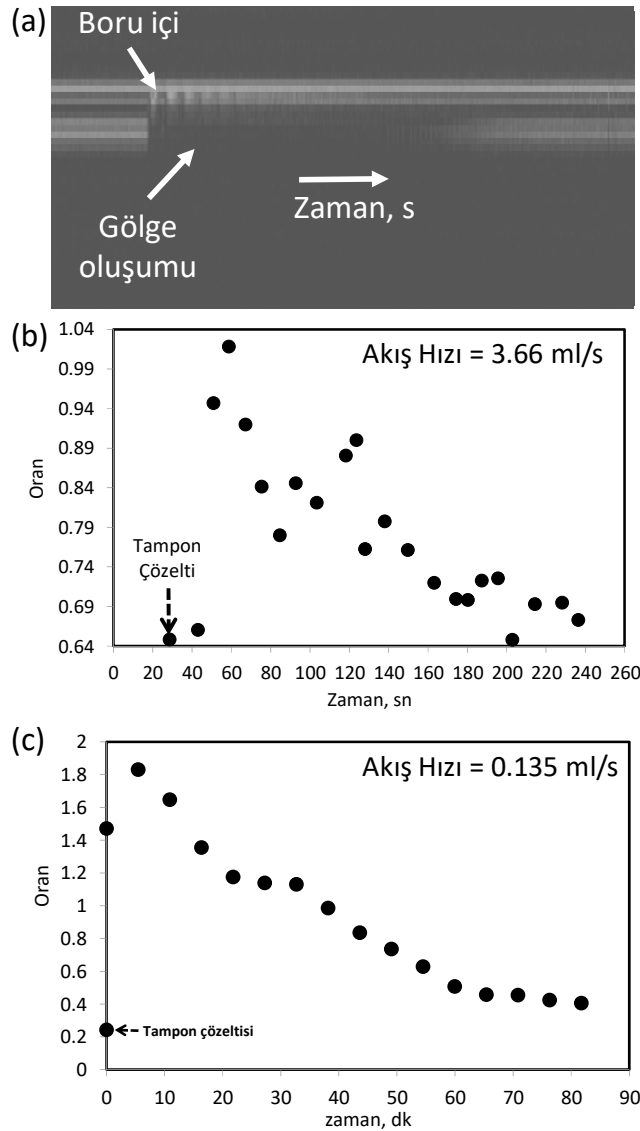
	1 MHz	2 MHz	4 MHz
0 dB	$y = 0.1879\ln(x) - 1.6064$	$y = 0.606\ln(x) - 8.3731$	$y = 1.1593\ln(x) - 17.776$
10 dB	$y = 0.2128\ln(x) - 2.043$	$y = 0.621\ln(x) - 8.2799$	$y = 1.5286\ln(x) - 22.723$
20 dB	$y = 0.1947\ln(x) - 1.52$	$y = 0.7998\ln(x) - 11.715$	$y = 2.1054\ln(x) - 33.154$
30 dB	$y = 0.2591\ln(x) - 2.9688$	$y = 0.9055\ln(x) - 14.372$	$y = 4.3267\ln(x) - 73.235$

4.5.2 Mikroköpükçüklere Kayma Gerilimi (Shear) Etkisi

Mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteleri **Şekil 19**'deki deney düzeneği kullanılarak ölçülmüştür. Peristaltik pompa ile kapalı devre sirküle edilen mikroköpükçüklerin B-mod görüntüsü **Şekil 64(a)**'da gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, kapalı devre sistemde yalnızca FTÇ dolaşırken B-mod intensite değeri sabit ve daha karanlıktır. Ayrıca, sıvı bölgeden geçmekte olan ses yankı sinyali açıkça görülmektedir. Ortama mikroköpükçükler verildiğinde, boru içerisinden alınan sinyaller daha beyazdır. Sensörün önünden her geçişte mikroköpükçük kümesinden gelen parlak sinyal rahatça görülebilmektedir. İlerleyen zamanlarda, ortamda bulunan mikroköpükçüklerin dilüsyona uğradığı ve beyaz sinyalin azaldığı görülmektedir. Bu esnada, mikroköpükçük varlığında sesin geri yansması sonucu görülemeyen borunun arka duvarı, mikroköpükçüklerin konsantrasyonu azaldıkça görünür duruma gelmiştir.

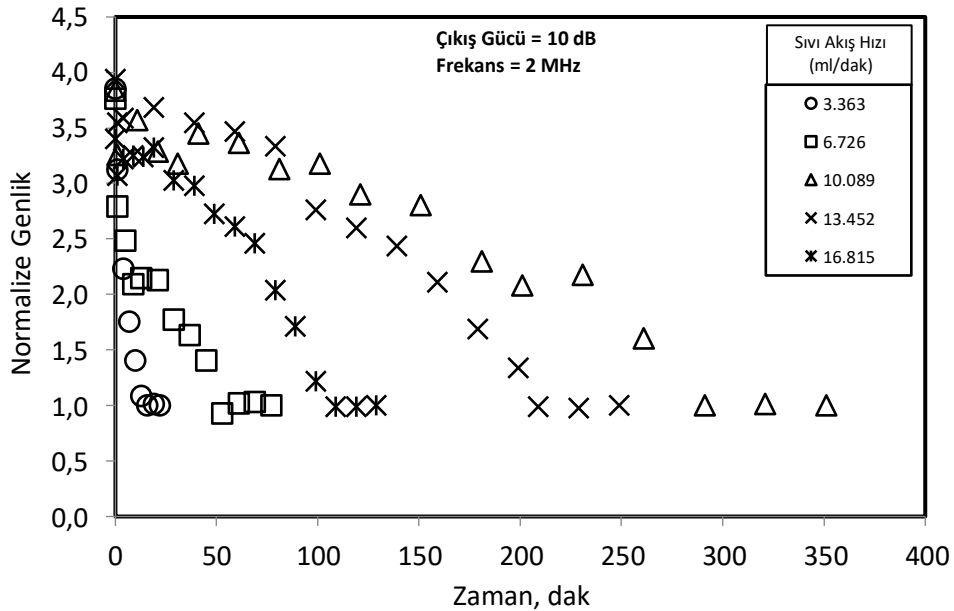
B-scan modda zamanla elde edilen mikroköpükçüklerin intensite değerleri, borunun duvarına ait intensite değerlerine oranlanmıştır. Sürekli modda 3.66 ml/s akış hızında zamanla mikroköpükçüklerin stabilitesindeki değişimi **Şekil 64(b)**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, ultrason ve kayma gerilimi (Shear) altında mikroköpükçüklerin konsantrasyonu azalmakta ve yüksek akış hızlarında yaklaşık 2 dak. sonra mikroköpükçüklerin ortamdaki tamamen yok oldukları anlaşılmaktadır.

Akış hızı düşük benzer başka bir çalışmada ultrason ve kayma gerilimi altında mikroköpükçüklerin stabilitesi test edilmiştir. Bu amaçla, bir deney tüpü içerisinde seyreltilmiş mikroköpükçükler kapalı sisteme verilmiş ve 0.135 ml/s akış hızında oran değerleri hesaplanmıştır. B-scan modda mikroköpükçük piksel intensitelerinin boru duvarı piksel intensitelere oranları zamana bağlı olarak **Şekil 64(c)**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, intensite oranı yaklaşık 80 dakika içerisinde azalarak hemen hemen tampon çözeltisinin seviyesine gelmektedir. Düşük akış hızlarında ve düşük kayma gerilimlerinde mikroköpükçükler daha stabil olarak ortamda kalabilmektedirler.



Şekil 64. (a) Peristaltik pompa ile kapalı devre sirküle edilen mikroköpükçüklerin B-mod görüntüsü (b) Peristaltik pompa ile sürekli modda zamana karşılık stabilite grafiği, (c) Peristaltik pompa ile 8.1 ml/dk akış hızında mikroköpükçüklerin stabilitesinin zamana bağlı değişim grafiği.

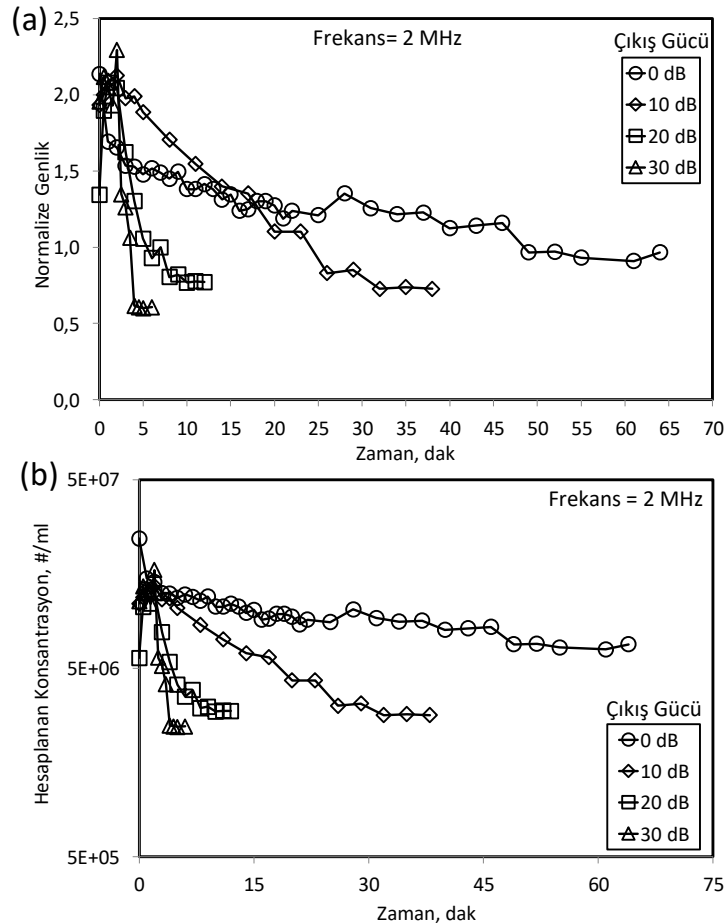
Sıvı akış hızının mikroköpükçük stabilitesine etkisi araştırılmıştır. 2 MHz frekans ve 10 dB çıkış gücünde farklı akış hızlarında mikroköpükçüklerin stabiliteyi ölçülmüştür. Şekil 65’de normalize genlik ve kalibrasyon denklemlerinden hesaplanan konsantrasyonların zamanla değişimleri gösterilmektedir. Şekilde düşük akış hızlarında mikroköpükçüklerin kısa zamanda ortamdaki kaybolduklarını görmektedir. Akış hızı arttıkça mikroköpükçüklerin stabiliteyi bir artış olduğu anlaşılmaktadır. Bunun sebebi, deney sırasında, gözle de görüldüğü üzere, mikroköpükçükler düşük akış hızlarında borunun içinde yavaş hareket ettiklerinden yukarı çıkma eğilimi göstermekte ve borunun iç duvarına yapışmaktadırlar. Bu peristaltik pompanın mikroköpükçükler üzerine etkisini artırmaktadır. Bundan dolayı, bir süre sonra mikroköpükçüklerin büyük çoğunluğu akustik bölgeye ulaşamadıklarından elde edilen sinyal düşmekte ve sifıra ulaşmaktadır. Peristaltik pompa akış hızı arttıkça, mikroköpükçüklerin daha uzun süre dolaşımında kaldığı görülmektedir. Mikroköpükçükler 10 ml/dk volümetrik akış hızında yaklaşık 5 saat dolaşımında kalabilmişlerdir. Bu bizim çalışmalarımız için oldukça uzun bir zamandır. Öte yandan, yüksek akış hızlarında hem kayma gerilimi etkisi ve hem de peristaltik pompanın dönen aksamalarının devirinin artmasından dolayı mikroköpükçüklerin sayısındaki azalma hızlanmaktadır. Grafikte görüldüğü üzere, en iyi sonucun 10.089 ml/min akış hızında olduğu ve bir optimum akışın söz konusu olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 65. Farklı akış hızlarının mikroköpükçüklerin stabilitesine etkisi.

Başka bir çalışmada, ultrason çıkış gücünün mikroköpükçük stabilitesine etkisi araştırılmıştır. Düşük 0.135 ml/s sıvı akış hızında 2 MHz frekans değerinde ve $6 \cdot 10^7$ #/ml

başlangıç konsantrasyonunda, farklı çıkış güçlerinde mikroköpükçüklerin stabiliteyi incelendi. Şekil 66'da normalize genlik ve kalibrasyon denklemlerinden türetilen mikroköpükçük konsantrasyonları değerleri gösterilmektedir. 0 dB değerinde mikroköpükçükler üzerinde minimum seviyede ultrason etki etmektedir. Bu nedenle, mevcut dB etkisini 0 dB ölçümlerine baz alınarak yapılabilir. Şekilde görüldüğü üzere, çıkış dB'i arttıkça mikroköpükçüklerin stabilitesi düşmektedir. 10 dB'd yaklaşık 30 dak, 20 dB'de yaklaşık 10 dak, ve 30 dB'de 5 dakikadan az bir süre sonra mikroköpükçükler stabiliteyi kaybetmektedirler. Bu sonuç beklenen bir durumdur. Normalde oda sıcaklığında mikroköpükçüklerin denge durumunda (sirkülasyon olmadan) 1 saatten çok daha uzun süre kaldığı daha önceki çalışmalarda ortaya konmuştur. Fakat ultrason etkisi yok denecek kadar az iken bile 0 dB'de mikroköpükçüklerin konsantrasyonunda az da olsa bir azalma olduğu görülmektedir.



Şekil 66. Farklı dB'lerin stabiliteye etkisi.

Peristaltik pompa ile stabilize çalışmasında mikroköpükçüklerin konsantrasyonlarındaki azalmada etkili olan iki nedenden söz edebiliriz. Birincisi, borunun bulunduğu peristaltik pompa haznesinde peristaltik pompa merdanesinin boruyu sıkıştırması sonucu

mikroköpükçüklerin patlamasıdır. Bu etki yüksek akış hızlarında çekiç etkisine dönüşmekte ve çok daha hissedilir oranda mikroköpükçük stabilitesini etkilemektedir. İkinci etken ise, sirkülasyon sonucu mikroköpükçüklerin akışkan içerisinde belirli bir kayma gerilimine maruz kalması sonucu gittikçe stabiliteyi kaybetmeleridir. Birinci yaklaşımda, peristaltik pompanın sıvı akışı sağlaması esnasında boru duvarını ve mikroköpükçükleri ezdiği ve böylece mikroköpükçüklerin stabiliteyi kaybettiği kullanılan borunun incelenmesinden anlaşılmıştır. **Şekil 67**'de peristaltik pompa döner aksamında kullanılan silikon borunun duvarı görülmektedir. Beyaz ok ile gösterilen kısımda mikroköpükçüklerin parçalanması sonucu silikon boru duvarında biriken lipid agregatları görülmektedir. Bu durum mikroköpükçüklerin zamanla stabiliteyi azalmasında rol oynadığının bir göstergesidir. Bundan sonraki çalışmalarda bu olumsuz etkiyi ortadan kaldırmak için peristaltik pompa yerine daha başka düzenekler kullanılması amaçlanmıştır.



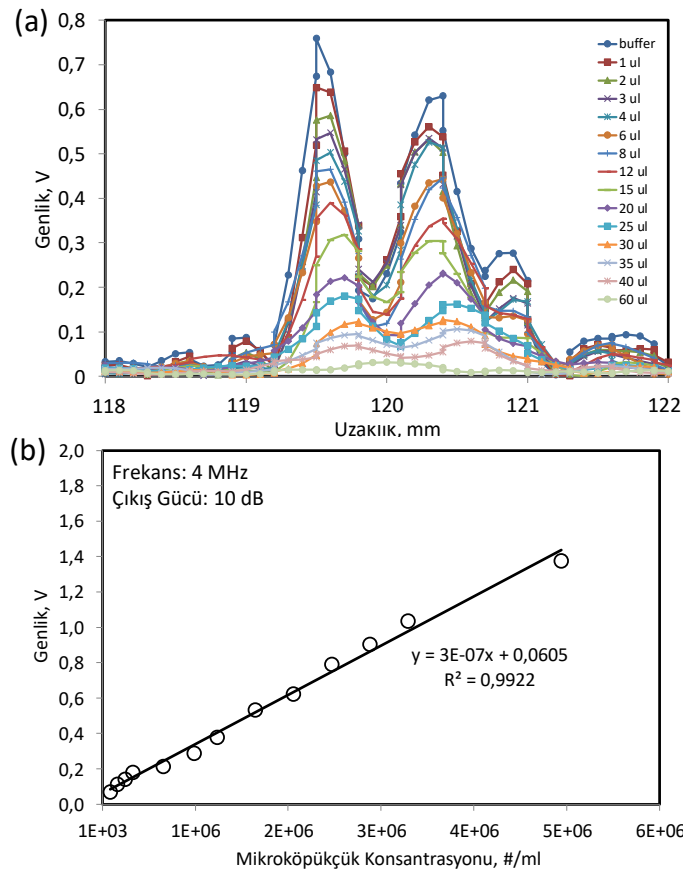
Şekil 67. Mikroköpükçüklerin stabiliteyi belirlemede kullanılan peristaltik pompa döner aksamının mikroköpükçükleri ezdiğinin göstergesi. Beyaz ok ile ezilen mikroköpükçüklerden arta kalan lipid agregatları görülmektedir.

4.5.3 Mikroköpükçüklerin Ultrason Altında Stabiliteyi

Mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteyi için **Şekil 20**'de gösterilen karıştırmalı kap deney düzeneği geliştirilmiştir. Bu yeni deney düzeneğinde, farklı kompozisyonlarda mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteyi ölçülmüştür.

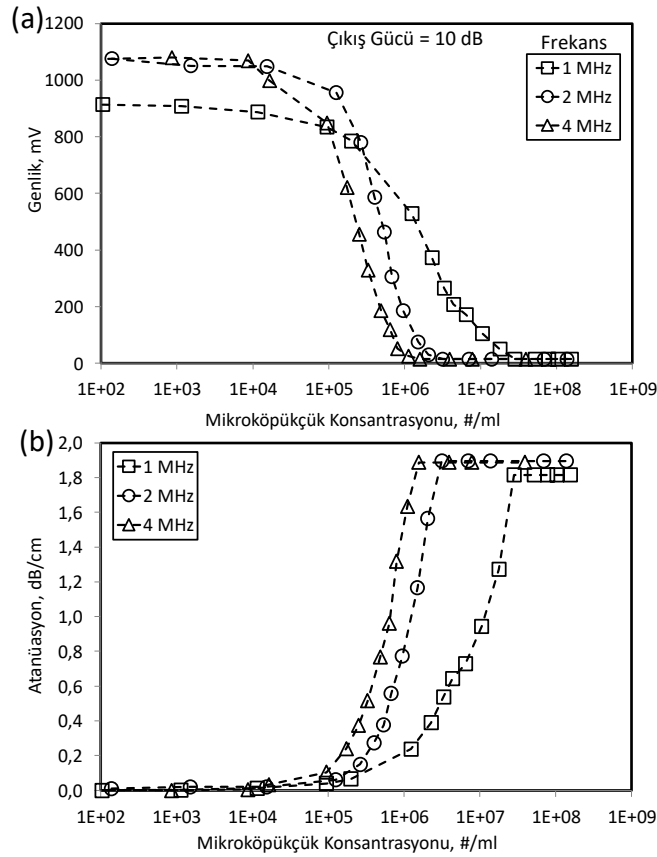
Mikroköpükçük Kalibrasyonu: Yeni deney düzeneği ile farklı frekanslarda mikroköpükçük konsantrasyonu kalibrasyonları yapıldı. Bu amaçla 10 dB çıkış gücünde 1, 2 ve 4 MHz'lik problar kullanıldı. Her frekansa ait odak bölgelerinde olacak şekilde probun tam karşısına içi FTÇ dolu küvetler yerleştirildi ve ilk önce MK olmadan arka duvarın referans genlik değerleri kaydedildi. Referans genlik değerlerinin küvetin açısına bağlı olarak her üç

frekans için aynı olmasına dikkat edildi. Manyetik karıştırıcı çalıştırıldı. İlk olarak, stok süspansiyondan 1 µl hacim en düşük mikroköpükçük konsantrasyonu 1E+02 #/ml olacak şekilde küvete eklendi. Hemen sonra, arka duvar sinyali kaydedildi. Benzer şekilde, artan konsantrasyonlarda stok mikroköpükçük konsantrasyonu küvere ilave edilerek her ekleme sonrası pik sinyalin genlik değerleri kaydedildi. Mikroköpükçükleri ortama eklendikçe sinyalin düştüğü görüldü. Her bir konsantrasyon için elde edilen ultrason sinyaller ve kalibrasyon grafiği **Şekil 68**'de gösterilmektedir. **Şekil 68(a)**'da görüleceği üzere, bir küverin arka duvarında en yüksek sinyal ortamda hiç mikroköpükçük yokken elde edildi. Mikroköpükçük konsantrasyonu arttığında, arka duvarda görülen genlik değerinde bir azalma oldu. Denklem (23) kullanılarak, **Şekil 68(b)**'de görüleceği üzere, atenüasyonda değerleri ile mikroköpükçük konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki bulundu. Ancak, şekilden görüleceği üzere, mikroköpükçük konsantrasyonu 1E+03 ile 5E+06 #/ml arasında doğrusal bağıntı karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 68. (a) Küvette sadece FTÇ var iken küvetin ön ve arka yüzeyinden geri yansıyan ses dalgalarının görüldüğü sinyal pikleri, (b) mikroköpükçük atanüasyon kalibrasyon grafiği.

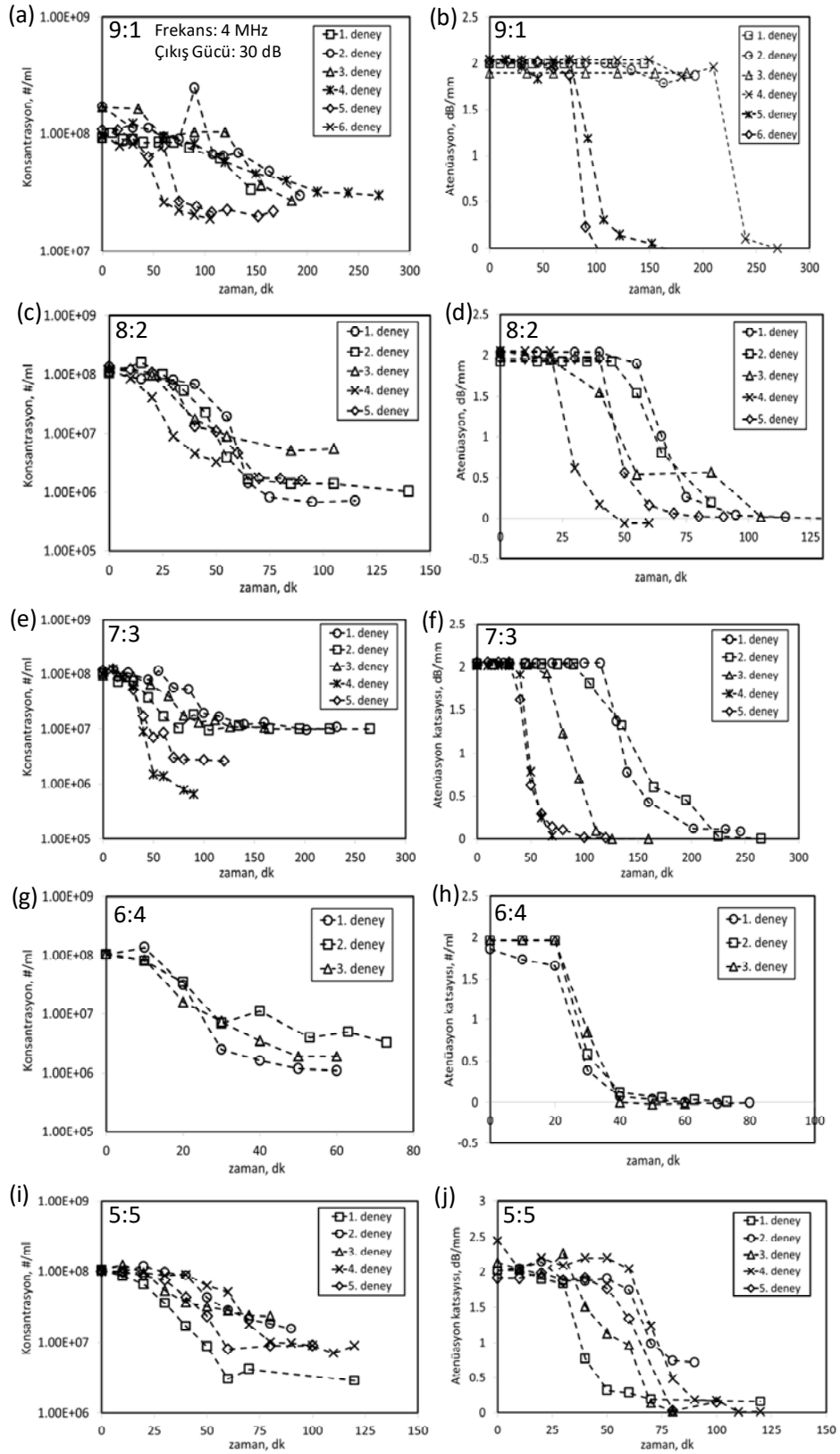
Benzer kalibrasyon grafiği diğer 1 MHz ve 2 MHz frekanslar için de ölçüldü. Farklı frekanslarda mikroköpükçük kalibrasyon grafikleri **Şekil 69**'de verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, konsantrasyona-genlik değerleri ile konsantrasyona-atenüasyon değerleri arasında ters bir orantı olduğu görülmektedir. **Şekil 69(a)**'da düşük konsantrasyonlarda ses dalgası herhangi bir yansımaya uğramadan ortamdaki geçtiğinde maksimum genlik değeri elde edilmektedir. Mikroköpükçük konsantrasyon ile bu değer azalmaktadır. Öte yandan, **Şekil 69(b)**'de görüleceği üzere konsantrasyon düşük seviyelerde iken atenüasyon değeri Denklem (23)'den sıfır olarak hesaplanmaktadır. Her bir frekans değerlerinde dar bir konsantrasyon aralığında mikroköpükçüklerin genlik ve atenüasyon kalibrasyonları elde edilmiş olup, farklı kompozisyonlarda mikroköpükçüklerin stabilite ölçülmesinde kullanılmıştır.



Şekil 69. Farklı frekanslarda mikroköpükçük kalibrasyon grafikleri, (a) konsantrasyona-genlik değerleri, (b) konsantrasyona-atenüasyon değerleri.

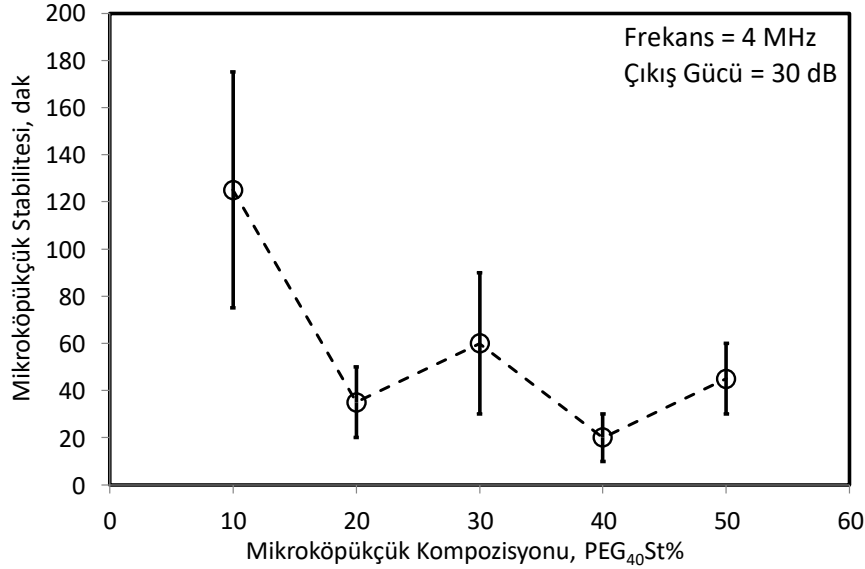
Farklı Kompozisyonda Mikroköpükçüklerin Ultrason Altında Stabilitesi: İçi perflorokarbon dolu mikroköpükçükler farklı DSPC:PEG₄₀St oranlarında (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 ve 5:5) üretildi ve ultrason altında stabiliteleri ölçüldü. Yüksek frekans (4 MHz) ve çıkış gücünde (30 dB) her bir mikroköpükçük türü aynı koşullar altında ultrasona tabi tutuldu.

Deneylerin tekrarlanabilir olduğunu görmek için deneylerin çok sayıda tekrarı yapıldı. Deney süresince mikroköpükçük konsantrasyonu ve arka duvara ait genlik değerleri ölçüldü ve kaydedildi. Buna göre konsantrasyon ve atenüasyondaki değişimleri gösteren grafikler çıkarıldı. **Şekil 70**'da farklı (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; ve 5:5) kompozisyonlarda mikroköpükçüklerin ultrason altında zamanla konsantrasyon ve atenüasyon katsayısındaki değişim gösterilmektedir. Her bir kompozisyon için hem ölçülen konsantrasyonlardaki değişim, hem de atenüasyon değerlerindeki değişim sıralı olarak verilmiştir. Aynı başlangıç konsantrasyonları ile her bir mikroköpükçük kompozisyonu için deneyler tekrarlandı. Şekilde, 9:1 kompozisyonunda mikroköpükçüklerde ölçülen konsantrasyonun ve atenüasyon değerlerinin düşmediği ve yüksekte kaldığı görülmektedir. Bunun nedeni, mikroköpükçüklerin parçalanması esnasında küçük yavru mikroköpükçüklerin oluşması, yada parçalanma sonucu ortamda misel, lipozom ya da lipid topakları olmasından dolayı olabileceği değerlendirildi. Mikroköpükçüklerin bozulmaya başlamasıyla ortamda oluşan hava baloncuklarının küvetin ön duvarına tutunmuş halde bulunduğu gözlemlendi. Dolayısıyla, probtan gelen ses dalgalarının bir kısmının hava baloncukları tarafından atenüe olması sonucu ses dalgası arka duvara yeteri kadar ulaşamadı ve sistemde arka duvardan yansıyan herhangi bir sinyal piki görülmedi. 9:1 mikroköpükçükleri için yaklaşık 80 ila 200 dakika sonra atenüasyon değişiminden konsantrasyon değerlerinin ölçülebilir limitlere geldiği görüldü. 8:2 mikroköpükçükleri için ilk 20 dakika konsantrasyon değişmezken, sonrasında ultrason etkisiyle mikroköpükçüklerin konsantrasyonda azalma gözlemlendi. Atenüasyon ölçümü ancak 40 dakika sonra ölçülebilir konsantrasyona ulaştı ve 80 dakika sonra mikroköpükçükler tamamen yok oldu. 7:3 kompozisyonunda mikroköpükçükler için ilk 25 dakika sonunda mikroköpükçükler konsantrasyonu düşmeye başladı ve azalarak devam etti. Atenüasyon ölçümü ancak ilk 50 dakika içerisinde ölçülebilir mikroköpükçük konsantrasyonu seviyesine düşmüş ve yaklaşık 200 dakika sonra mikroköpükçükler tamamen ortamdaki kaybolmuşlardır. 6:4 kompozisyonu en az stabil olan mikroköpükçük kompozisyonu olarak bulundu. İlk 40 dakika içerisinde bu mikroköpükçükler ortamdaki tamamen kayboldular. Son olarak 5:5 mikroköpükçükler için, ilk 20 dakika içerisinde konsantrasyonda hemen hemen bir değişiklik görülmezken, sonrasında hızlı bir düşüşle 75 dakika sonra ortamdaki hemen hemen bütün mikroköpükçükler bozundu. Atenüasyon ilk 30 dakika sonunda ölçülebilir konsantrasyonlara mikroköpükçüklerin düştüğünü göstermektedir ve yaklaşık 80 dakika sonunda ortamdaki bütün 5:5 mikroköpükçükler yok olmuştur.



Şekil 70. Farklı (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; ve 5:5) kompozisyonlarda mikroköpükçüklerin ultrason altında zamanla konsantrasyon ve atenuasyon katsayısındaki değişim.

Tüm bu deneylerden sonra, farklı kompozisyonda mikroköpükçüklerin stabilitelerinin karşılaştırılması **Şekil 71**'de verilmiştir. Her bir mikroköpükçük kompozisyonun için en az 3 defa konsantrasyon ve atenuasyon ölçümleri yapılmış, mikroköpükçükler stabiliteleri hesaplanmıştır. Şekilde mikroköpükçüklerin atenuasyon ile ölçülebilir konsantrasyonlara gelme sürelerinin ortalaması alınarak standart sapma değerleri ile birlikte şekilde verilmiştir. Şekilden görüleceği üzere, PEG40St% artmasıyla birlikte, mikroköpükçüklerin stabilitesinde bir azalma olduğu görülmektedir. Görünen o ki, mikroköpükçüklerin zar yapısında bulunan PEG40St miktarı arttıkça, monatabaka yapısı kalınlaşmakta ve belli bölgelerde farklı kütle birikimlerine sebep olmaktadır. Newton'nun $F=m.a$ prensibine göre, ultrason altında monatabakanın yüksek hızlarda atımı esnasında sözkonusu kütle üzerine aşırı kuvvet uygulanacağından, bu mikroköpükçüklerin daha kısa zamanda parçalanacağı değerlendirilmektedir.



Şekil 71. Farklı kompozisyonda mikroköpükçükler ultrason altında stabilitelerinin karşılaştırılması.

4.6 Farklı Kompozisyonda Mikroköpükçüklerin Ekojeniteleri

Farklı kompozisyonlarda mikroköpükçüklerin ekojenitelerini ölçmek amacıyla **Şekil 23**'de gösterilen deney düzeneği tasarlanmıştır. Deneylerde, hayvan deneylerine dedike yüksek çözünürlüklü Visual Sonics Vevo 2100 model ultrasonografi cihazı kullanılmıştır. Ölçümler, bu cihazın yüksek çözünürlüklü problelerinden biri olan 9-18 MHz MS 200 prob ile

gerçekleştirilmiştir. Ultrason kontrast maddelerin ekojenitelerini belirlemek üzere Şekil 23'de gösterilen akış fantomu deney düzeneği kullanılmıştır. Mikroköpükçüklerin değişik akış hızı, konsantrasyon, ve hacimlerde bolus enjeksiyon ile ölçümler yapılmıştır. Elde edilen intensite-zaman verileri Denklem-(19) ile değerlendirilmiş ve hesaplamalarda kullanılmak üzere AUC ve MTT değerleri bulunmuştur. Hesaplamalarda, literatüde Denklem-(10) ve Denklem-(11) ile önerilen bağıntıların tekrarlayan sonuçlar vermediği anlaşılmış ve yeniden değerlendirme ile gerekli eşitlikler türetilmiştir. Burada, ilk olarak bolus enjeksiyon yöntemi ile hesaplama metodu tanıtılacaktır.

4.6.1 Bolus Enjeksiyon Yöntemi için Hesaplama Metodu Geliştirme

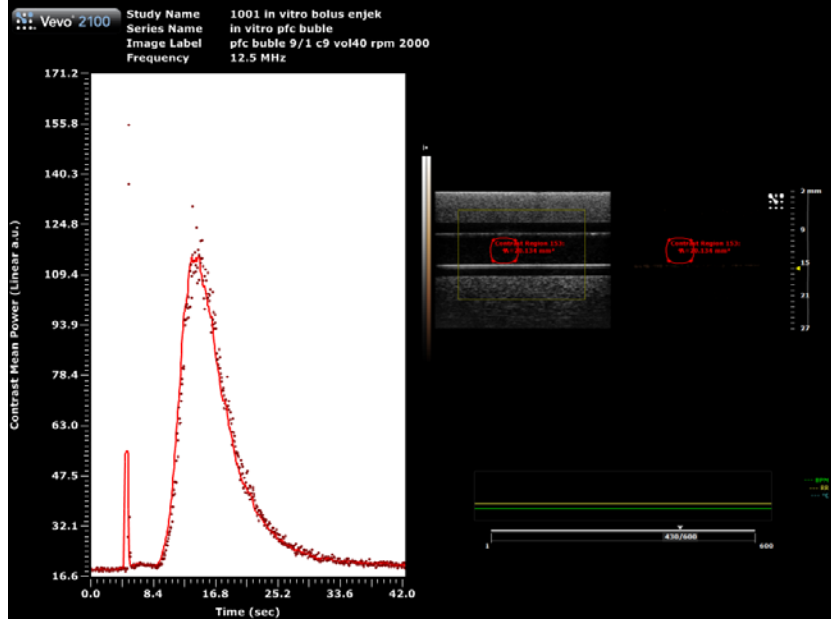
Bolus enjeksiyon ile 3 damar fantom içerisine enjekte edilmiş mikroköpükçüklerin akış görüntüsü **Video 2**'de gösterilmektedir. Video'da mikroköpükçüklerin enjeksiyon sonrası artan intensitede görüntü vermesi ve zamanla azlalarak intensitedeki azalmayı göstermektedir.

Video 2. Mikroköpükçüklerin 3 damar fantomda akış görüntüsü.

Ancak, mikroköpükçük konsantrasyonu çok yüksek değerlerde olduğunda, gelen ses dalgası borunun üst duvarından geri yansıtılacağından, **Video 3**'de görüleceği üzere, arka bölgelerde gölgelenmeler olmakta ve doğru intensite değerleri okunamamaktadır.

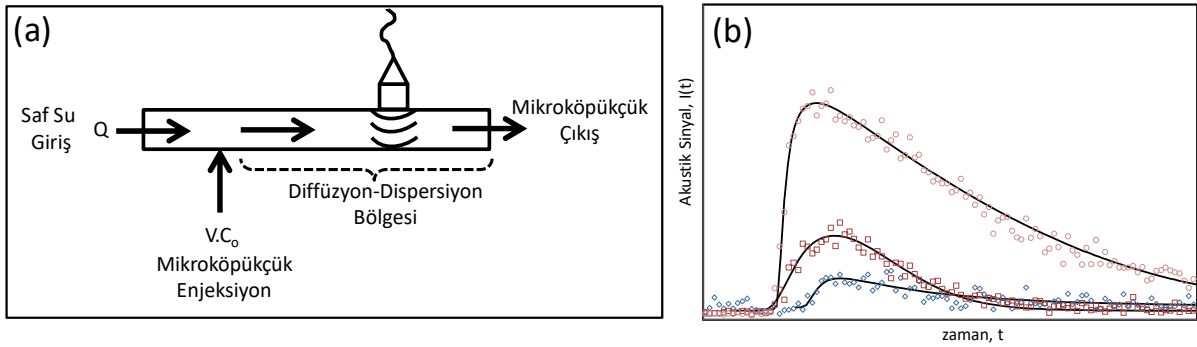
Video 3. Yüksek konsantrasyonlarda mikroköpükçük bolus enjeksiyonu için ses dalgası zayıflaması ve gölgelenme oluşması.

Bu durum, **Şekil 72**'de görüleceği üzere, ölçümde de yüksek ekojenite yerine daha düşük bir pik ekojenite, ardından gölgeye ait ekojenitenin düştüğü bir alan olarak izlenmektedir. Videodan ve şekilden açıkça görüleceği üzere konsantrasyon ile intensite ancak düşük konsantrasyonlarda doğrusallık göstermektedir.



Şekil 72. Ekojenite-zaman grafiğinde ilk pik, akışta önde gelen ve yüzeydeki mikroköpükçükleri temsil etmektedir. Ardından oluşan düşük ekojenitedeki kısa plato yoğun mikroköpükçüklere ait gölge ve atenüasyonu temsil etmektedir. Daha sonrasında konsantrasyonun düşmesi ile atenuasyon oluşturmayan ancak yüksek konsantrasyondaki mikroköpükçüklerden veri alınabilmekte ve ikinci bir pik izlenmektedir.

Bolus enjeksiyon yöntemi için hesaplama metodu geliştirilmesinde kullanılan model düzenek **Şekil 73(a)**'da gösterilmektedir. Böyle bir düzenekte elde edilebilecek intensite-zaman eğrileri **Şekil 73(b)**'de görüldüğü gibi, önce artan sonra azalan bir trend izlemektedir. İndikatör dilüsyon modeli de denen bu yöntemde, bolus olarak enjeksiyon sonrasında akış boyunca sözkonusu indikatör akış düzlemi boyunca dilüsyona uğramakta ve konsantrasyonunda önce bir artma ve sonra da bir azalma görülmektedir.



Şekil 73. Bolus enjeksiyon yöntemi için hesaplama metodu geliştirilmesi, (a) model düzenek, (b) elde edilen deneysel intensite-zaman eğrileri.

Bolus enjeksiyonda konsantrasyondaki seyrelme Denklem (28) ile verilebilir.

$$D \frac{\partial^2 C(x, t)}{\partial x^2} - \vartheta \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} = \frac{\partial C(x, t)}{\partial t} \quad (28)$$

Bu, kimya mühendisliğinde iyi bilinen difüzyon-dispersiyon denklemlerinden biridir. Akustik intensite ile konsantrasyon arsında doğru orantı olduğu varsayılmaktadır. Bu durumun düşük konsantrasyonlarda doğru olduğu bu çalışmada **Şekil 68**'de gösterilmiştir. Bu durumda, mikroköpükçük konsantrasyonu için elde edilecek konsantrasyon-zaman eğrisi, akustik sinyal-zaman eğrisine benzer olacağından, akustik sinyal için çözüm, Denklem-(29) ile verilmektedir.

$$I(t) = AUC \cdot \left(\frac{e^\lambda}{\mu}\right) \cdot \sqrt{\frac{\lambda}{2\pi}} \cdot \left(\frac{\mu}{(t-t_0)}\right)^{3/2} \cdot \exp\left[-\frac{1}{2}\lambda\left(\frac{\mu}{(t-t_0)}\right) + \left(\frac{(t-t_0)}{\mu}\right)\right] + I_0 \quad (29)$$

Burada, $\mu=x_0/v$, $\lambda=\mu v^2/2D$, x_0 ROI olarak bilinen seçilen bölgenin giriş ve çıkış arasındaki uzaklığı göstermektedir. Intensite-zaman eğrisinin dar mı ya da geniş mi olacağı λ^{-1} 'e bağlı olarak değişmektedir. $\tau_D=x_0^2/D$ difüzyon zamanı ve $\tau_C=D/\mu$ konveksiyon zamanı olarak tanımlarsak, kimya mühendisliği kütle ve enerji aktarımında sıklıkla kullanılan Peclet sayısı (Pe), $Pe= \tau_D/\tau_C =2.\lambda$ olur ki, bu da λ değerinin fizyolojik olarak önemli bir öneme sahip olduğunu gösterir. Örneğin, akış hızı çok yüksek ise difüzyon yanında dağılım ihmal edileceğinden, daha dar bir intensite-zaman eğrisi gözlenecek; akış hızı düşük durumlarda ise, intensite-zaman eğrisi daha geniş bir profil gösterecektir.

Sabit bir akışta konsantrasyonu βC_0 olan mikroköpükçüklerden V bolus hacim sisteme enjekte edildiğinde, bu miktarın sensör tarafından okunacak konsantrasyon-zaman eğrisi toplamı Denklem (30)'daki gibi verilebilir. Burada β konsantrasyonu kesin olarak bilinmeyen mikroköpükçük miktarı için çarpan faktör olarak kullanılmıştır.

$$V \cdot \beta C_0 = \int_0^\infty Q \cdot C(t) dt \quad (30)$$

Intensite ile konsantrasyon arasında doğrusal bir ilişki var olduğu bilindiğinden, kalibrasyon eğrisi denklemi Denklem (31) ile verilebilir.

$$I(t) = \alpha \cdot C(t)|_x + \varphi \quad (31)$$

Burada α kalibrasyon eğrisinin eğimi, ve φ y-ekseni kesim noktasıdır. Bu durumda, Denklem (30) Denklem (32)'deki gibi yazılabilir.

$$V \cdot \beta C_0 = Q \cdot \int_0^\infty \frac{I(t) - \varphi}{\alpha} dt \quad (32)$$

Denklem sadeleştirildiğinde, Denklem (33) elde edilir ki, rahatça integral alınabilir.

$$\frac{V \cdot \alpha \cdot \beta C_0}{Q} = \int_0^\infty I(t) dt - \int_0^\infty \varphi dt \quad (33)$$

İlk integral, AUC olarak bilinen intensite-zaman eğrisi altında kalan alandır. İkinci integral ise bir sabittir. Böylece, Denklem (34) elde edilmiş olur.

$$\frac{V \cdot \alpha \cdot \beta C_o}{Q} = AUC - \varphi_o \quad (34)$$

Denklemin yeniden organize edilmesinden Denklem (35) elde edilir.

$$AUC = (\alpha \cdot \beta \cdot C_o) \left(\frac{V}{Q} \right) + \varphi_o \quad (35)$$

Burada, AUC Denklem (10)'da gösterildiğinden farklıdır. Bir sabit kendisine eşlik etmektedir ve elde edilen verilerin değerlendirilmesinde önemli bir fonksiyonu yerine getirmektedir. Ortalama geçiş zamanı (MTT) değerini hesaplama için Denklem (36) kullanılır.

$$MTT = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad (36)$$

MTT için elde edilen sonuç Denklem (37) ile verilmektedir.

$$MTT = \mu = \frac{x_o}{\vartheta} \quad (37)$$

Ortalama akış hızı $v=Q/A$ olduğundan, $MTT = x_o \cdot A/Q$, ve ROI hacmi $x_o \cdot A$ olduğundan, MTT ile ROI hacmi arasında Denklem (38) ile verilen bağıntı vardır.

$$MTT = ROI \cdot \left(\frac{1}{Q} \right) + \psi_o \quad (38)$$

Böylece, intensite-zaman eğrileri ile elde edilen curve-fit değerlerinden gerekli hesaplamalar yapılabilecektir.

4.6.2 Bolus Enjeksiyon Yöntemi ile Mikroköpükçük Konsantrasyonunun Belirlenmesi

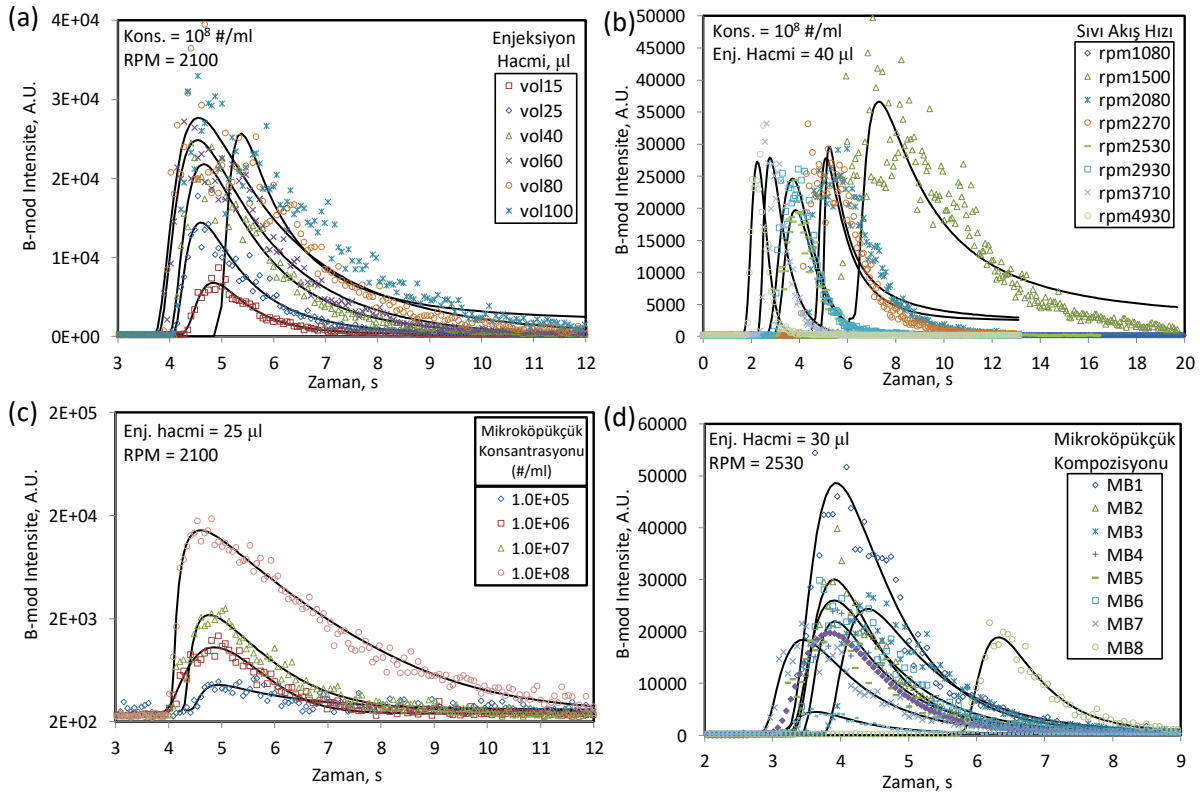
Farklı bolus hacimlerinde, farklı akış hızında, farklı konsantrasyonlarda ve farklı mikroköpükçük formülasyonlarında bolus enjeksiyon yöntemi ile ölçülen intensite-zaman değerleri ve model denklem ile uyumlulukları **Şekil 74**'da gösterilmektedir. **Şekil 74(a)**'da görüleceği üzere, aynı türde ve aynı konsantrasyonda mikroköpükçük serum seti boru içerisinden akan sabit akışta sıvı içerisine farklı bolus hacimlerinde enjekte edilmiştir. Elde edilen zaman-intensite eğrileri şekilde görülmektedir. Vevo2100 model ultrason cihazı ile yapılan deneylerin çok daha kontrollü yapıldığı ve elde edilen verilerin çokluğu nedeniyle daha güvenilir sonuçlar alınabildiği tecrübe edilmiştir. Vevo2100 cihazının paket programının Log-normal model denklemi kullanarak verileri analiz ettiğini öğrendik. Ancak, cihaz daha çok *in-vivo* deneylere göre programlandığından, çok kısa sürelerde geçiş sonucu elde edilen verilerin Vevo2100 cihazı ile değerlendirilmesinde sorunlar yaşadık. Bu soruna çözüm olarak, elde edilen verilerin analizlerini PFT modeline göre manuel olarak gerçekleştirdik. Şekilde PFT modeline göre curve-fit eğrilerinin uyum içinde olduğu görülmektedir.

Başka bir çalışmada, farklı sıvı akış hızlarında elde edilen zaman-intensite eğrileri çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada, aynı tür mikroköpükçük ve stok çözeltisinden alınan

aynı hacimde bolus enjeksiyonlar, farklı akış hızlarında sıvı akışına verilmiştir. Elde edilen zaman-intensite eğrileri ve FPT modeline göre fit eğrileri **Şekil 74(b)**'de gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, verilerin model ile uyumu oldukça iyidir.

Farklı konsantrasyonlarda aynı tür mikroköpükçükler için elde edilen zaman-intensite eğrileri **Şekil 74(c)**'de gösterilmektedir. Elde edilen deneysel veriler ile FTP modeli oldukça iyi uyum içerisindedirler.

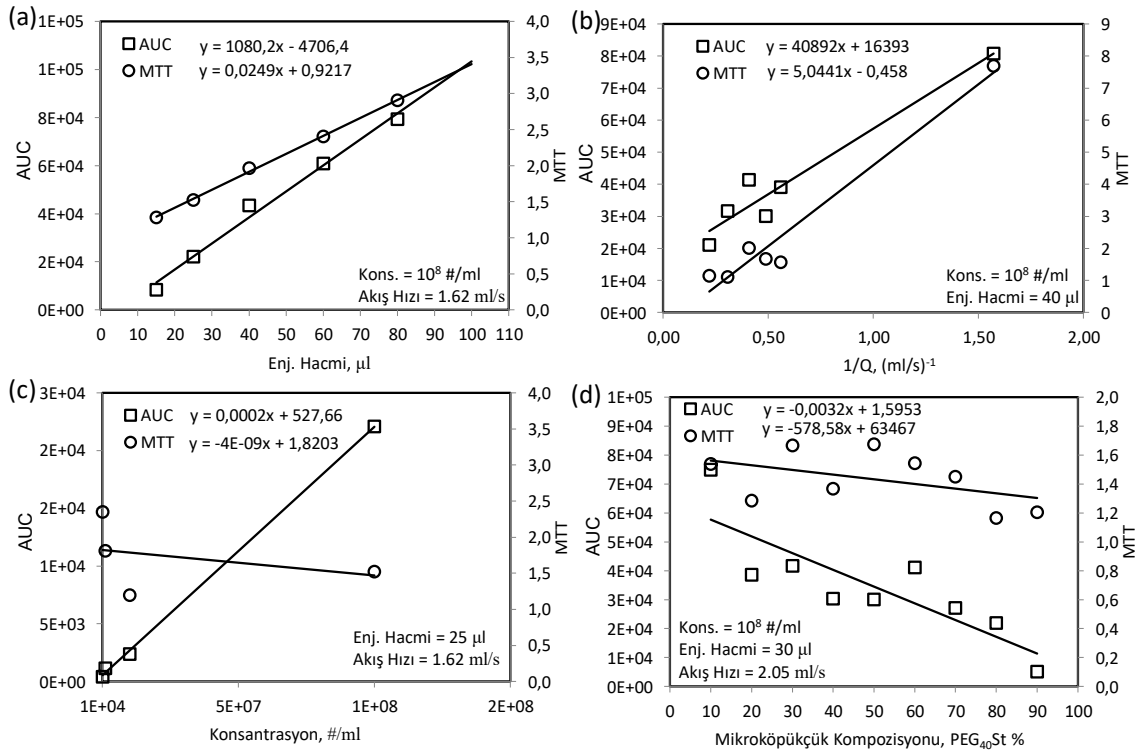
Başka bir çalışmada, farklı formülasyonlarda hazırlanmış ultrason kontrast maddesi mikroköpükçükler için aynı hacim bolus enjeksiyonlarında ve aynı sıvı akış hızlarında Vevo2100 ile elde edilen zaman-intensite verileri elde edilmiştir. Elde edilen verilerin FTP modeline göre değerlendirilmeleri **Şekil 74(d)**'de gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, deneysel veriler ile model oldukça uyumlu bir benzerlik göstermektedir.



Şekil 74. (a) Farklı bolus enjeksiyon hacimlerinde Vevo2100 ile elde edilen zaman-intensite eğrileri, (b) farklı akış hızlarında bolus enjeksiyon için elde edilen zaman-intensite eğrileri, (c) farklı konsantrasyonlarda bolus enjeksiyon için elde edilen zaman-intensite eğrileri, (d) farklı mikroköpükçük kompozisyonlarında bolus enjeksiyon için elde edilen zaman-intensite eğrileri. Düz çizgi ile gösterilen eğriler model denklem eğrileridir.

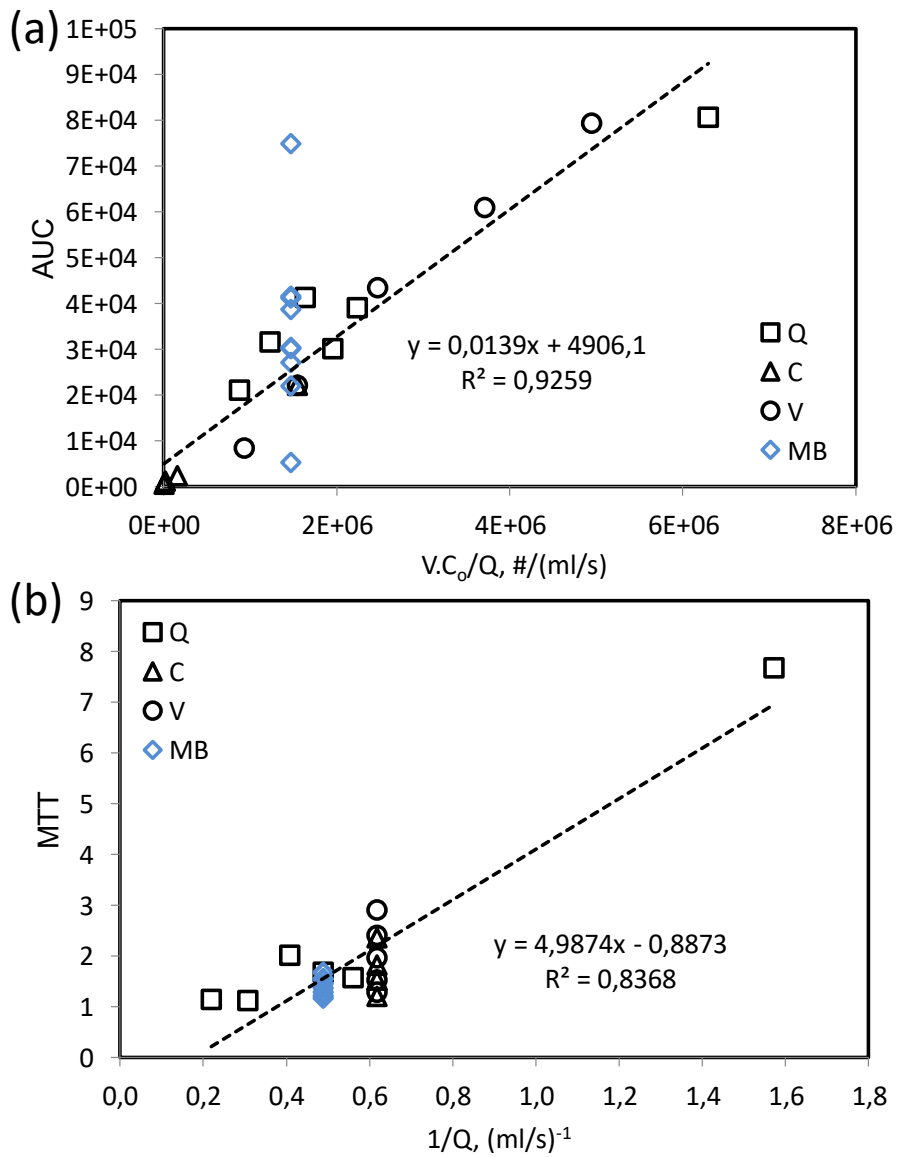
Farklı koşullarda bolus enjeksiyonu için elde edilen eğri altındaki kalan alan (AUC) ve ortalama geçiş zamanı (MTT) değerleri **Şekil 75**'de gösterilmektedir. Eğri altında kalan alan

(AUC), Denklem (35)'de görüldüğü üzere, bolus hacmi ve konsantrasyon ile doğru orantılı, akış hızı ile ters orantılıdır. MTT ise Denklem (38)'da görüleceği üzere, akış hızı ile ters orantılıdır. **Şekil 75(a)**'da görüleceği üzere, farklı bolus hacimlerde AUC ve MTT değerleri doğrusal olarak değişmektedir. Doğru için y-ekseni kesim noktasının olması, bu değerlerin ihmal edilemeyeceği anlamına gelmektedir. **Şekil 75(b)**'da görüleceği üzere, akış hızının tersi ile AUC ve MTT karşılaştırıldığında, yine doğrusal bir trendin olduğu görülmektedir. Ancak burada bazı sapmaların olması, deney esnasında pompanın denge değerine gelmesi için geçen sürede oluşan sapmalardan dolayı olabileceği değerlendirilmektedir. **Şekil 75(c)**'da görüleceği üzere, AUC değerleri ile konsantrasyon arasında doğrusal bir ilişki varken, MTT değerleri ile konsantrasyon arasında doğrudan bir ilişki olduğu görülmemektedir. Son olarak, aynı koşullarda ve göreceli aynı konsantrasyonda aynı hacimde bolus enjeksiyon yapılan farklı kompozisyonda mikroköpükçükler için elde edilen AUC ve MTT değerleri **Şekil 75(d)**'de görülmektedir. Şekilden görüleceği üzere MTT değerleri her bir mikroköpükçük için önemli ölçüde değişmez iken, AUC değerleri farklılık göstermektedir. Bu mikroköpükçüklerin konsantrasyonlarının kabul edilen değerden farklı olduğu anlamına gelebilir.



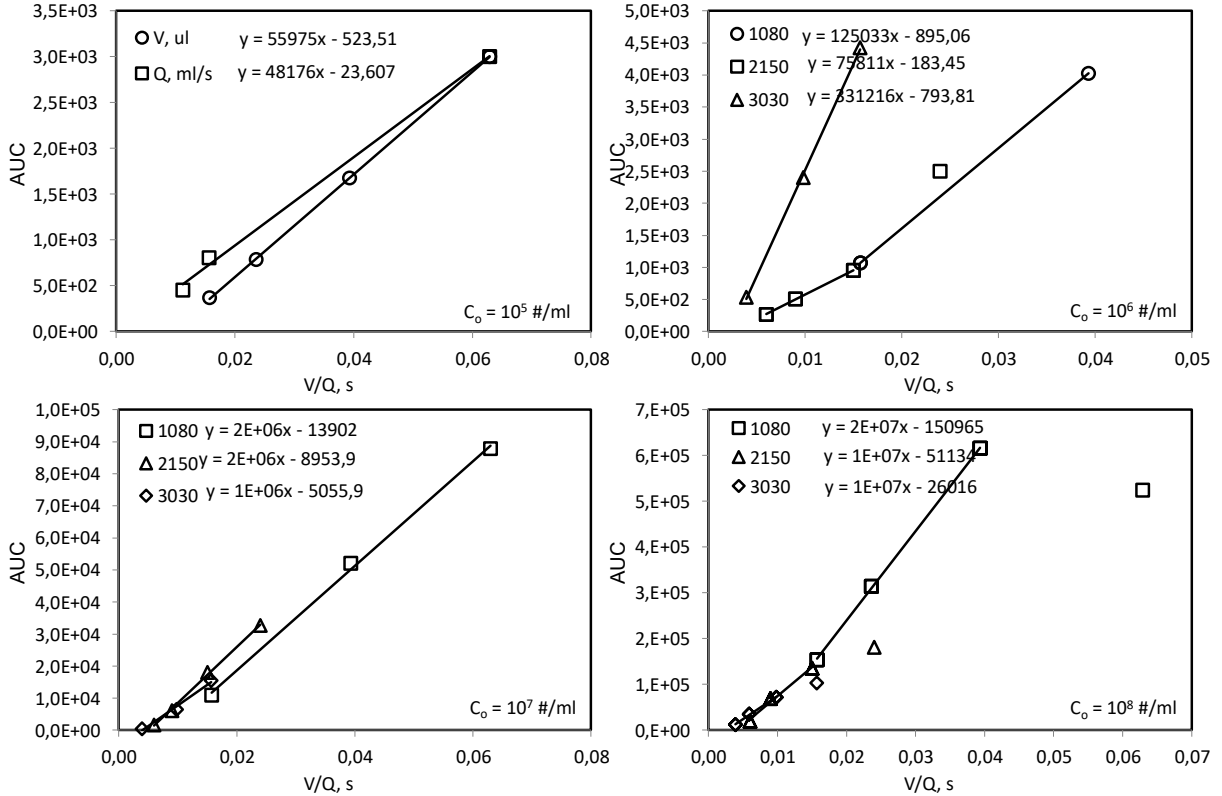
Şekil 75. Farklı koşullarda bolus enjeksiyon sonucu elde edilen AUC ve MTT parametrelerinin (a) farklı bolus enjeksiyon hacimlerinde (b) farklı akış hızlarında, (c) farklı konsantrasyonlarda, ve (d) farklı mikroköpükçük kompozisyonlarında bolus enjeksiyon için değerlendirilmesi.

AUC ve MTT değerleri, **Şekil 76**'de görüleceği üzere, ölçülen tüm parametreler için birlikte değerlendirilmiştir. **Şekil 76(a)**'da görüleceği üzere, AUC değerinin VC_0/Q çarpım değerleri ile doğrusal bir ilişki içinde olduğu görülmektedir. Ancak, farklı kompozisyonlarda mikroköpükçüklerden 2-3 tanesinin önemli sapma gösterdikleri anlaşılmaktadır. Bu durumda, sözkonusu mikroköpükçükler için gerçek değerleri bulmak üzere β parametresi Denklem (35)'da ifade edilmiştir. Öte yandan, **Şekil 76(b)**'de görüleceği üzere, MTT değerleri $1/Q$ değerleri ile değerlendirildiğinde doğrusal bir ilişki bulunmuş; burada farklı kompozisyonda mikroköpükçüklerin konsantrasyonda olması MTT değerlerini beklendiği gibi etkilememiştir.



Şekil 76. (a) AUC ve (b) MTT değerlerinin ölçülen tüm parametreler için birlikte değerlendirilmesi.

Mikroköpükçüklerin konsantrasyonlarını belirlemek üzere yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde aynı tür mikroköpükçükler için farklı konsantrasyonlarda, farklı bolus hacmi ve farklı akış hızları için AUC değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değerler V/Q değerine karşı grafiğe geçirilerek, her bir konsantrasyon için eğim değerleri elde edilmiştir. **Şekil 77'**de DSPC:PEG₄₀St 9:1 mikroköpükçükleri için farklı konsantrasyonlarda, farklı bolus hacmi ve farklı akış hızları için AUC değerleri verilmiştir.

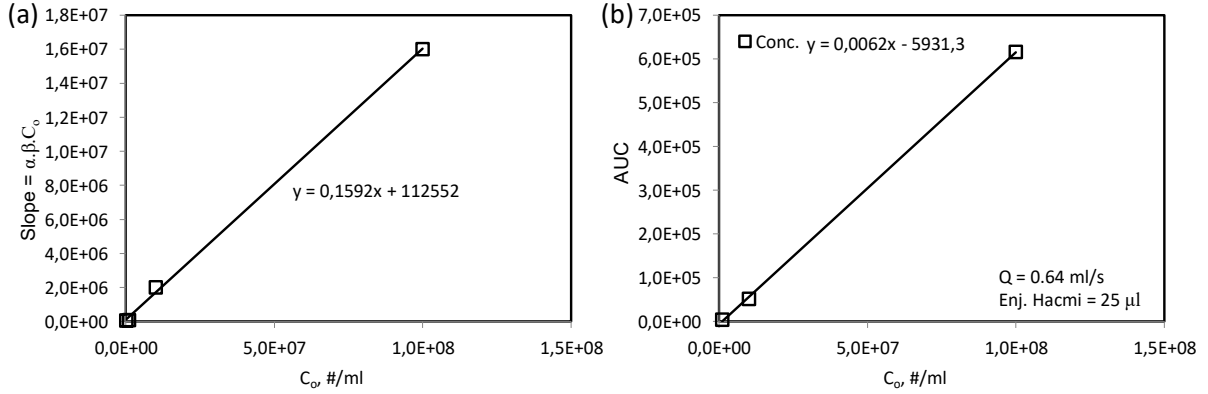


Şekil 77. DSPC:PEG₄₀St 9:1 mikroköpükçükleri için farklı konsantrasyonlarda farklı bolus hacmi ve farklı akış hızları için AUC değerleri.

Farklı konsantrasyonlarda DSPC:PEG₄₀St 9:1 mikroköpükçükleri için **Şekil 77'**de elde edilen eğim değerleri **Şekil 78(a)**'da gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, mikroköpükçük konsantrasyonu ile akustik intensite arasındaki ilişkiyi gösteren α değeri ile konsantrasyonu bilinmeyen mikroköpükçüklerin çarpım katsayısı β bu eğrinin eğiminden bulunabilmektedir. Bu değer DSPC:PEG₄₀St 9:1 mikroköpükçükleri için 0.159 olarak bulunmuştur.

Şekil 78(b)'de farklı konsantrasyonlarda aynı mikroköpükçük için $Q=0.64$ ml/s ve bolus hacmi=25 μ l olan koşullarda eğim değeri 0.062 olarak elde edilmiştir. Burada, Denklem (35) kullanılarak hesaplanacak $\alpha.\beta$ değeri 0.159 olarak bulunur. Görüleceği üzere, yöntem işlemektedir.

Bilinen bir mikroköpükçük konsantrasyonu için $\alpha=0.0135$ olarak hesaplanmıştır. Buna göre farklı kompozisyonda mikroköpükçüklerin konsantrasyonları ultrason ile hesaplanabilecektir.

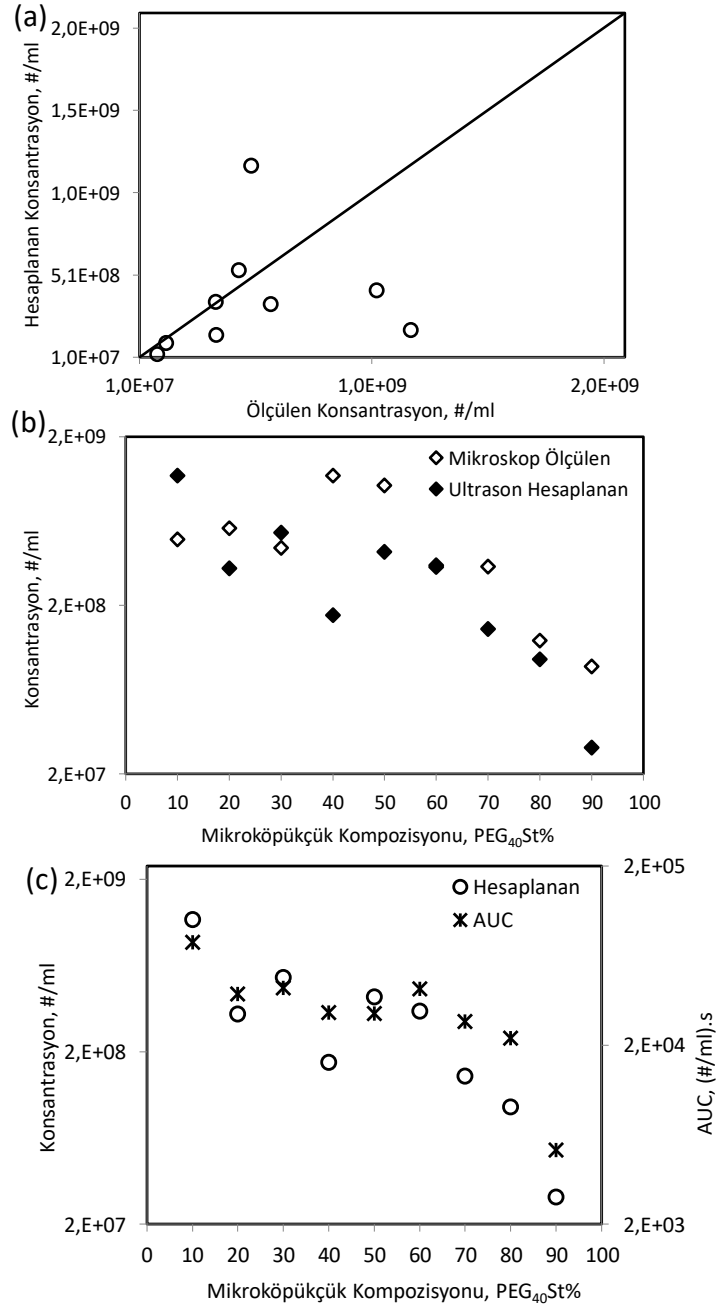


Şekil 78. Farklı konsantrasyonlarda DSPC:PEG₄₀St 9:1 mikroköpükçükleri için (a) elde edilen eğim değerleri (b) aynı mikroköpükçük için ölçülen eğim değeri.

Ölçülen mikroköpükçük konsantrasyonuna ile hesaplanan mikroköpükçük konsantrasyonu **Şekil 79(a)**'da gösterilmektedir. Şekilden görüleceği üzere, ölçülen mikroköpükçük konsantrasyonu ile burada geliştirilen ultrason yöntemiyle hesaplanan konsantrasyonların 2-3 mikroköpükçük türü haricinde uyumlu oldukları anlaşılmaktadır. **Şekil 79(b)**'de her bir mikroköpükçük kompozisyonu için ölçülen ve ultrason yöntemi ile hesaplanan mikroköpükçük konsantrasyonları karşılaştırılmaktadır. Hangi mikroköpükçük için konsantrasyonlarda farklılık olduğu şekilden görülmektedir. Genelde, mikroköpükçüklerin konsantrasyonları ya mikroskop görüntülerinden doğrudan hesaplanmakta, ya da tane sayıcı cihazlar vasıtasıyla ölçülmektedir. Ancak, her bir yöntemin kendisine göre artı ve eksi yanları vardır. Bu cihazların hassasiyetleri de tartışılmaktadır. Ölçülen intensite değerleri mikroköpükçüklerin konsantrasyonu ile doğrudan orantılıdır. **Şekil 79(c)**'de farklı formulasyonlarda hazırlanmış ultrason kontrast maddesi mikroköpükçükler için elde edilen Eğri Altındaki Alan (AUC) ile yeni geliştirilen yöntem ile hesaplanan mikroköpükçük konsantrasyonları görülmektedir. Şekilden görüleceği üzere, ölçülen AUC değerleri ile hesaplanan mikroköpükçük konsantrasyonlarının genelde birbiri ile uyumlu oldukları anlaşılmaktadır. Mikroköpükçüklerin konsantrasyonlarının tayin edilmesindeki hassasiyet göz önüne alındığında, ve ultrason ile ölçümlerin konsantrasyon ile doğrusal olduğu değerlendirildiğinde, mikroköpükçüklerin konsantrasyonlarının ultrason ile belirlenmesi mümkün olabilecektir. Ultrason ile yapılan ölçümlerde, farklı formulasyonlarda üretilen mikroköpükçüklerin benzer ekojenite değerler verdiği anlaşılmaktadır. Farklı



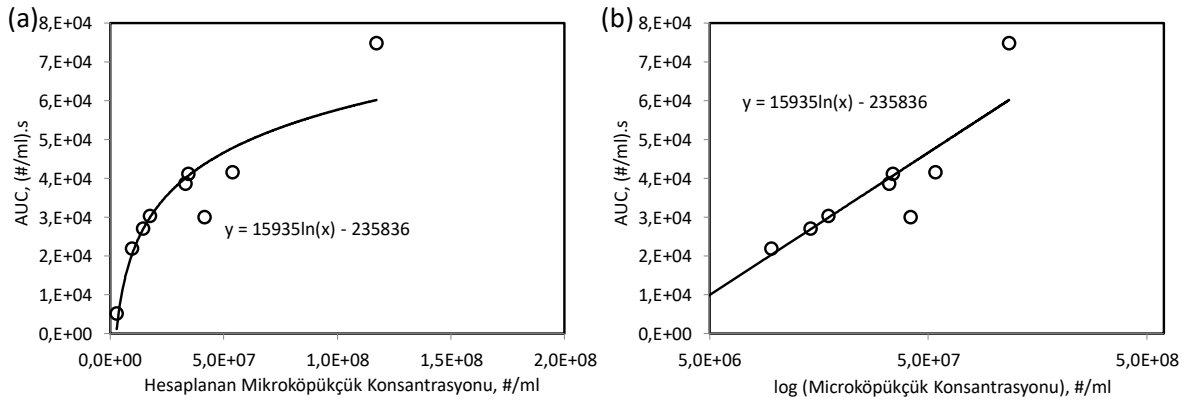
mikroköpükçüklerin farklı ölçülerde intensite vermesi, mikroköpükçüklerin farklı konsantrasyonlarda olduğu ile alakalı olduğu anlaşılmıştır. Bu durumda, farklı mikroköpükçüklerin ekojenitelerini tespit edebilmek için konsantrasyon faktörünü gözardı etmemek gerektiği şekilden anlaşılmaktadır.



Şekil 79. (a) Ölçülen mikroköpükçük konsantrasyonuna ile hesaplanan mikroköpükçük konsantrasyonunun arasındaki sapmalar, (b) Ölçülen mikroköpükçük konsantrasyonuna ile ultrason yöntemi ile hesaplanan mikroköpükçük konsantrasyonunun karşılaştırılması, (c) farklı formülasyonlarda hazırlanmış ultrason kontrast maddesi mikroköpükçükler için elde edilen Eğri Altındaki Alan (AUC) ile hesaplanan mikroköpükçük konsantrasyonları.

Mikroköpükçüklerin konsantrasyonlarının logaritması AUC ile doğru orantılı olduğu **Şekil 80**'de görülmektedir. Ultrason ile B-mod görüntüler gerçekte görüntü intensitesinin logaritmik değeri olarak raporlanmaktadır. Vevo2100 model ultrason cihazı ile alınan B-mod görüntülerden elde edilen intensite değerleri kullanıldığından bu sonuç sürpriz olmamıştır. Şekilden görüleceği üzere ancak 3 noktanın sapma gösterdiği diğer noktaların ise doğrusal bağıntı ile uyum içinde olduğu görülmektedir.

Mikroköpükçüklerin sayısını belirlemede başlıca üç yöntem bulunmaktadır. Bunlar, ışık (optik) mikroskop, Coulter multisizer, ve ışık saçılması (DLS) yöntemidir(Sennoga vd. 2012). Her bir yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Mikroköpükçüklerin boyutlarını ölçmede optik mikroskop yöntemi daha uygun olduğu; sayılarını belirlemede ise Coulter multisizer yönteminin daha iyi sonuç verdiği rapor edilmektedir(Sennoga vd. 2012). Bu çalışmada geliştirilen ve ilk defa kullandığımız, 4.ncü bir yöntem olarak, ultrason yöntemi ile mikroköpükçük konsantrasyonu ölçülebilecektir.



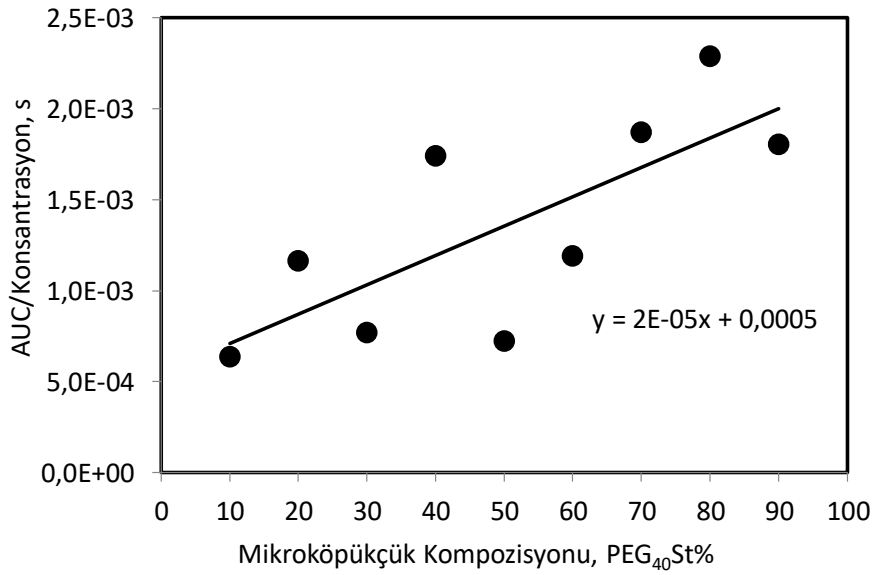
Şekil 80. Mikroköpükçüklerin konsantrasyonlarının logaritması AUC ile doğru orantılıdır.

4.6.3 Farklı Mikroköpükçüklerin Ekojeniteleri

Mikroköpükçüklerin ekojenitelerini belirlemede Pik artışı (Peak Enhancement) değerlerine ya da bununla ilintili olan eğri altında kalan alan (AUC) değerlerine bakılarak karar verilebilir. Ancak, Denklem (35) ile verilen bağıntıda AUC değerlerinin konsantrasyon ile doğru orantılı olduğu görülmektedir. Yine, aynı denklemden, her bir mikroköpükçük türü için bolus enjeksiyon hacmi ve sıvı akış hızı gibi deneysel parametrelerin aynı olması beklenir. Kendi mikroköpükçüklerimiz için bu tür parametrelerin aynı olması sağlanabilmiştir. Mikroköpükçüklerin ultrason ekojenitelerinin belirlenmesinde mikroköpükçüklerin boyut dağılımları da önemlidir. Mikroköpükçüklerin rezonans frekansları uygulanan frekans değerinden farklıdır ve boyutlarına bağlıdır. Rezonans frekanslarının altında boyutlara sahip

mikroköpükçükler osilasyon yapmazken, mikroköpükçüklerin osilasyonları için kritik boyutun üzerinde olmaları gerekir. Bu durumda, farklı kompozisyonda mikroköpükçüklerin ekojenitelerine **Şekil 81**'da görüldüğü üzere mikroköpükçük konsantrasyonu başına eğri altında kalan alan olarak bakılmıştır.

Şekilden görüleceği üzere, farklı kompozisyonda mikroköpükçük ekojenitesi mikroköpükçüklere yüklenen PEG₄₀St yüzdesi ile artmaktadır. Mikroköpükçük yüzeyinde PEG₄₀St miktarı arttığında damping etkisiyle mikroköpükçüklerin osilasyonlarının azalacağı dolayısıyla ekojenite değerlerinin düşeceği beklenirdi. Öte yandan, ultrason altında boyutlarının 4 katına kadar büyüeyebilen mikroköpükçüklerin parçalanmasıyla yavru mikroköpükçükler oluştuğu bilinmektedir. Bu durumda, mikroköpükçüklerin yüzeylerinde PEG₄₀St miktarı arttıkça, boyutlarında damping etkisiyle bir düşme yaşanırken, mikroköpükçüklerin bütüncül yapılarının korunduğu ve böylece ekonejenite değerlerinin böylece yüksek olabileceği değerlendirilmektedir.



Şekil 81. Farklı kompozisyonda mikroköpükçüklerin ekojenitesi.

Yapılan çalışmalarda, bu deneylere ek olarak içeriği hava olan ve PFC olan mikroköpükçüklerden aynı konsantrasyon ve aynı PEG₄₀St oranına ait suşları aynı volüm (40 µl) ve aynı akış hızında (2000 rpm) 3 damar fantomunda karşılaştırılmıştır. Bu deney sonunda, PFC içeren mikroköpükçüklerin hava içeren mikroköpükçüklere göre daha yüksek ekojenite oluşturdukları saptanmıştır. Yine bu deney ile %50 ve %10 PEG₄₀St oranına sahip mikroköpükçükler birkez daha karşılaştırılmış olup %50 PEG₄₀St oranındaki mikroköpükçükler 10⁸ konsantrasyondaki enjeksiyonu eşdeğer %10 PEG₄₀St oranındaki

mikroköpükçükler göre daha yüksek ekojenite oluşturmuştur. 10^8 konsantrasyondaki %50 PEG₄₀St oranına sahip mikroköpükçükler bu serideki en yüksek ekojeniteyi vermektedirler.

4.7 Mikroköpükçüklerin Darlık Fantomunda Ekojenitelerinin Belirlenmesi

In-vitro deneylerden biri olan darlık fantomu ile gerçekleştirilen çalışmalarda, darlık bulunan lüminal yapı içerisinde ultrason kontrast maddesi mikroköpükçük (MB)'lerin akım paterninin ve davranış özelliklerinin aydınlatılması planlanmıştır. Değişik hızlarda ve konsantrasyonlarda MB'lar şekilde verilen deney düzeneğine uygulanarak tam darlık düzeyine yerleştirilen ultrasonografi probu ile akım profilleri değerlendirilmiştir. %25, %50, %75 derece darlık olan üç ayrı hat üzerinde ayrı ayrı enjeksiyonlar ile deney gerçekleştirilmiştir. Darlık öncesi ve sonrası bölgelerde aynı alan değerlerinde (Region of Interest (ROI)) ölçümler ve değerlendirmeler yapılmıştır. Darlık öncesi segment ROI'si "ROI 1", darlık sonrası ROI'si "ROI 2 " olarak adlandırılmıştır. Bu modelde, **Video 4** ile gösterilen darlık sonrası alanda merkez akış profilinde hız artışı ile akıp giden MB'lar izlenmekte iken periferde darlığın hemen sonrasında akımın türbülanslı olduğu alanda kaotik bir şekilde dönen ve sirkülasyon oluşturan MB'lar izlenmiştir. Bu durum darlık modelindeki laminer akım paternini desteklemektedir.

Video 4. Pantom darlık modelinde darlık öncesi ve darlık sonrası mikroköpükçüklerin akış profillerini gösteren video kaydı

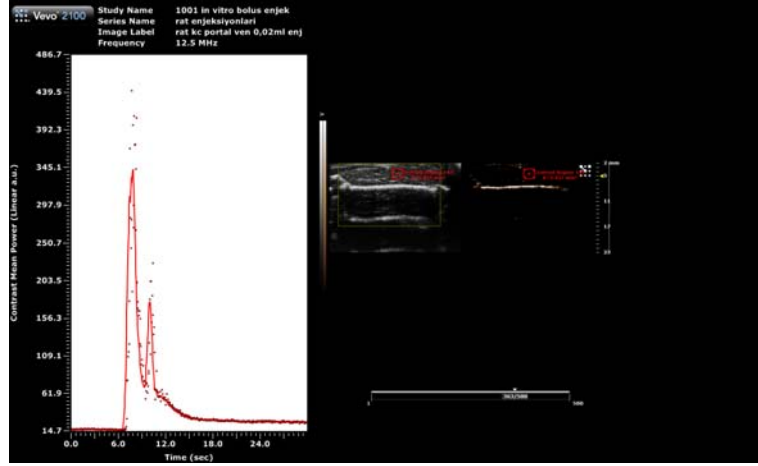
Gerçekleştirilen bu deney ile MB'ların da eritrosit, trombosit vb. şekilli kan elemanları gibi laminer akım profiline uygun bir davranış paterni gösterdikleri ortaya konmuştur. Bu durum canlı hayvan enjeksiyonunda fizyolojik akıma uygun davranış göstereceklerinin tanımlanması sebebiyle büyük önem taşımaktadır. Video'da görüleceği üzere, MB'lar damar lümeni yüzeyinde akümüle olmamakta ya da lümen tabanında çökmemektedirler. Darlık düzeyinde agregatlar oluşturmamaktadırlar. Laminer akım modelinde homojen dağılım göstermekte ve santralde hızlı, periferde yavaş olacak şekilde akılmaktadırlar. Periferde yavaş akan MB'lar birleşmemekte, agregat olmamakta, ve staz oluşturmamaktadırlar. Bu deney sonucunda MB'ların fizyolojik akıma uygun olarak güvenli bir şekilde canlı deney hayvanına uygulanabileceği ve canlıdaki sirkülasyon sistemine uygun olduğu gösterilmiştir.

4.8 Mikroköpükçüklerin *Ex-Vivo* Görüntüleri

Uygulayıcının deneyimini arttırmak ve mikroköpükçüğün *ex-vivo* dokudaki davranış şeklini değerlendirmek amacıyla *ex-vivo* deneyler planlanmış ve gerçekleştirilmiştir. *Ex-vivo* deney modelleri olarak tavuk göğsü, kuzu karaciğeri, rat karaciğeri, rat gluteal kası, rat dalağı seçilmiştir. *Ex-vivo* deneyler Vevo2100 yüksek çözünürlüklü ultrasonografi cihazı altında 9 - 18 MHz prob ile gerçekleştirilmiştir. Başka bir çalışma sonucu sakrifiye edilen bir ratın karaciğeri eksize edilerek çıkartılmış ve portal venden branül yerleştirilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan girişten yaklaşık 3.10^7 MB/ml konsantrasyonda 0.02 ml volümde uygulanarak eş zamanlı olarak ultrasonografi altında değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Bu enjeksiyon ile portal ağaç vasküler yatağı mikroköpükçükler ile doldurulmuş ve dokunun vaskülerizasyonu ve perfüzyonu ultrasonografik olarak görüntülenebilir hale gelmiştir. Bu çalışmanın kaydedildiği Video görüntüsü **Video 5**'de verilmiştir.

Video 5. *Ex-vivo* olarak hazırlanan sıçan karaciğer deney modeline uygulanan mikroköpükçüklerin vasküler yatağı doldurarak tüm dokuda ekojenite artışına neden olduğu izlenmektedir.

Bu karaciğer dokusundan 5.4 mm^2 alana sahip ROI ile ölçüm yapıldığında, dokudaki ekojenite artışı **Şekil 82**'de gösterilebilmiştir. *Ex-vivo* olarak hazırlanan sıçan karaciğer deney modeline uygulanan mikroköpükçüklerin vasküler yatağı doldurarak tüm dokuda ekojenite artışına neden olduğu izlenmektedir. Enjeksiyon hızına bağlı hızlı bir ekojenite artışı ve sonrasında azalarak plato çizen eğri mevcuttur. Zamana bağlı ekojenite değişikliğini gösteren grafikte pik ekojenite değeri sonrasında ekojenitenin plato çizdiği düzeye dek izlenen ekojenite azalması; programın yazılım özelliklerine ve *ex-vivo* dokuda enjeksiyon bölgesi dışına sızarak alandan temizlenen mikroköpükçüklere sekonder olarak değerlendirilmiştir. Sonrasında plato çizen eğrinin plato fazı ise görüntü düzleminde sebat eden ve ve akım olmadığı için temizlenmeyen mikroköpükçükleri göstermektedir.



Şekil 82. Karaciğer dokusuna ex-vivo enjekte edilen ultrason kontrast maddesi ile ölçülen ekojenite artışı.

Sıçan gluteal kas enjeksiyonunda, **Video 6**'da görüleceği üzere, enjeksiyon sonrasında anterior reflaktif bir yüzey ve posteriorunda akustik gölge oluşmuş olup mikroköpükçüklerin dağılımı değerlendirilememiştir.

Video 6. Sıçanın gluteal kasına enjeksiyon gerçekleştirilmiş ve anterior reflaktif bir yüzey ile bu yüzey posteriorunda akustik gölge oluşmu izlenmiştir.

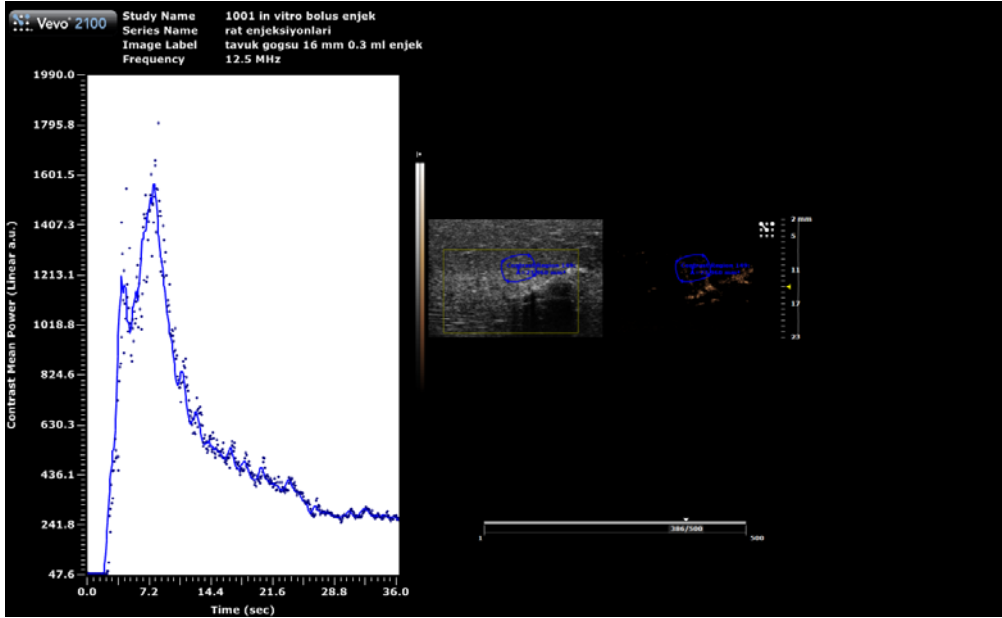
Benzer görünüm, **Video 7**'de görüleceği üzere, tavuk göğsünde 8 mm derinliğe uygulanan 0.3 ml'lik ilk enjeksiyonunda da gerçekleşmiştir.

Video 7. Tavuk göğsünde 8 mm derinliğe uygulanan ilk enjeksiyonunda da sıçan gluteal kası enjeksiyonuna benzer şekilde anterior reflaktif bir yüzey ile bu yüzey posteriorunda akustik gölge oluşmu izlenmiştir.

Ancak, **Video 8**'de görüldüğü üzere, tavuk göğsünde 16 mm derinliğe uygulanan 0.3 ml'lik 2.nci enjeksiyonda ise MB'lar kas planları arasında ve iğne trasesinde dağılmıştır.

Video 8. Tavuk göğsünde 16 mm derinliğe uygulanan enjeksiyonda ise mikroköpükçüklerin kas planları arasında ve iğne trasesinde dağılımı izlenmektedir.

Bu dağılım alanından yapılan ölçümde, **Şekil 83**'de görüleceği üzere, ekojenite artışı grafiksel olarak saptanabilmektedir.



Şekil 83. Tavuk göğsü 16 mm derinliğe uygulanan enjeksiyonda yapılan ölçümde enjeksiyon hızına bağlı hızlı bir ekojenite artışı ve sonrasında azalarak plato çizen eğri izlenmektedir. Zamana bağlı ekojenite değişikliğini gösteren grafikte pik ekojenite değeri sonrasında ekojenitenin plato çizdiği düzeye dek ekojenite azalması; programın yazılım özelliklerine ve ex vivo dokuda enjeksiyon bölgesi dışına sızarak alandan temizlenen mikroköpükçüklere sekonder olarak değerlendirilmiştir. Sonrasında plato çizen eğrinin plato fazı ise görüntü düzleminde sebat eden ve ve akım olmadığı için temizlenmeyen mikroköpükçükleri göstermektedir.

Video 9'da, kuzu karaciğerine ultrasonografi altında ex-vivo enjeksiyon yapılarak iğnenin katettiği yol boyunca uzanan vasküler yapılar, enjeksiyon ardından MB ile dolmuş göstermektedir.

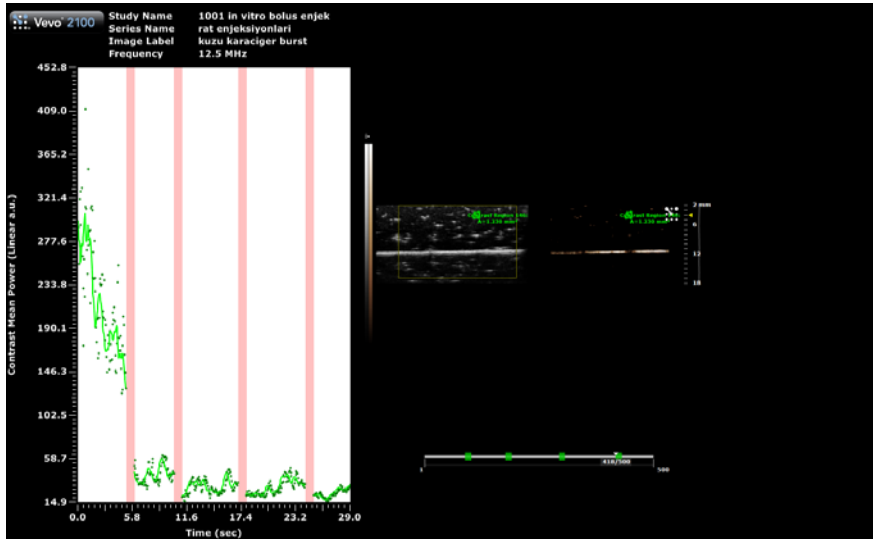
Video 9. Kuzu karaciğerine yapılan enjeksiyon ile iğnenin kat ettiği yol boyunca uzanan vasküler yapılar mikroköpükçükler ile dolmuş ekojen hal almaktadır.

Video 10'da dolmuş göstermiş geniş bir vasküler yapı görüntülenerek bu kesite ilki ardından 5 sn, 6 sn ve 7 sn aralıklar ile cihazın "burst " tuşu kullanılarak toplam 4 kez yüksek

mekanik index'li ses dalgası pulsarı uygulanmıştır. Bu sayede görüntüdeki vasküler yapı içerisindeki MB'lar patlatılmıştır.

Video 10. Dolum göstermiş geniş bir vasküler yapı görüntülenerek, bu kesite ard arda uygulanan yüksek mekanik indexli ses dalgası pulsarı ile mikroköpükçükler patlatılmıştır.

Bu vasküler yapı düzeyinde ROI ile ölçüm yapıldığında, **Şekil 84'**de görüleceği üzere, her "burst" uygulaması ardından ekojenitede azalma saptanmıştır. Bu azalma grafikte izlendiği gibi en fazla ilk uygulama sonrasında saptanmaktadır. Diğer patlatma uygulamaları arasındaki fark ise güçlkle seçilebilecek düzeydedir. Bu deney bize göstermiştir ki ex-vivo doku içerisine enjekte edilen MB'lar vasküler yatak içerisinde dağılabilmekte ve vasküler yatak içerisinde akümüle şekilde kalabilmektedirler. Yine bu deney ile MB'ların patlatılabildiği ve patlayan MB'lar ardından ekojenitenin azaldığı gösterilmiştir.



Şekil 84. Patlayan mikroköpükçüklere ait zaman intensite eğrisi çizdirildiğinde yukarıdaki rafikte izlendiği gibi en fazla ilk uygulama sonrasında ekojenite azalması saptanmaktadır. Diğer patlatma uygulamaları arasındaki fark ise güçlkle seçilebilecek düzeydedir.

Ex-vivo deneyler uygulayıcının deneyimini arttırdığı gibi doku içerisinde MB'ların görünüm özelliklerini deneyimlemelerini sağlamıştır. Bu sayede araştırmacılar canlı hayvan deneyi öncesinde dokuda MB'ların oluşturacağı görünüm hakkında fikir sahibi olmuşlardır. Bu deneyim canlı hayvan uygulamalarına geçildiğinde uygulayıcıların görüntüleri ve bulguları yorumlama yeteneğine katkıda bulunacaktır. Gerekli görüldüğü durumda uygulayıcıların bu yeteneklerini arttırmak için yeni *ex-vivo* deneylerin planlanması amaçlanabilir. *Ex-vivo*

deneyler sonraki aşama olan canlı deney hayvanı uygulaması öncesinde büyük bir yarar sağlamıştır.

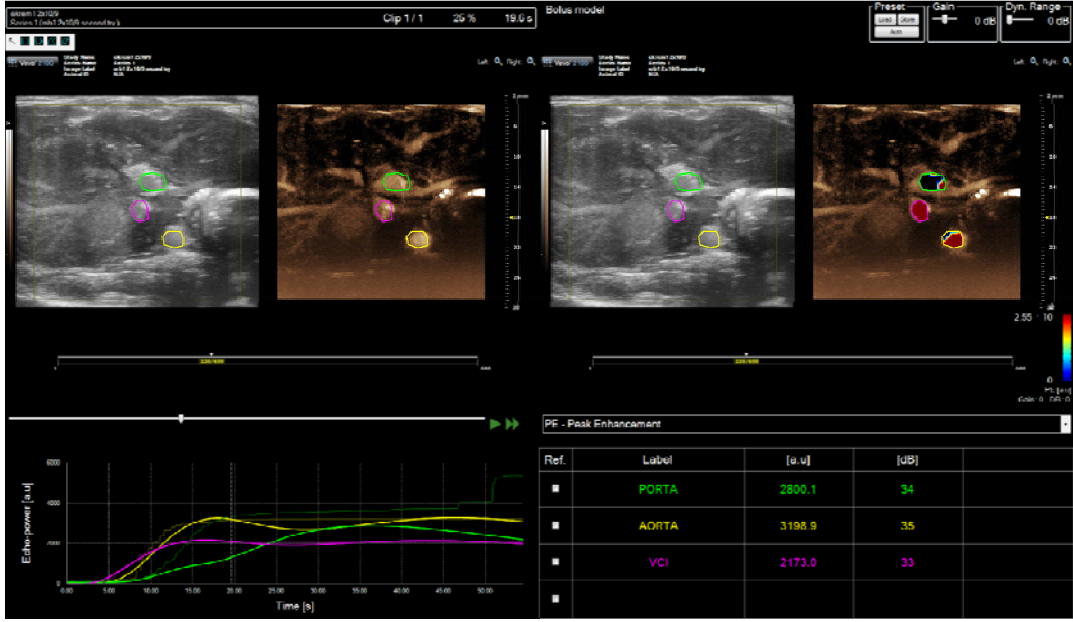
4.9 Mikroköpükçüklerin In-Vivo Toksisiteleri

Mikroköpükçüklerin *in-vivo* deneyleri için canlı organizmada davranışlarını değerlendirmek üzere sıçan deneyleri ve toksik değerlendirmeye yönelik sıçan ve tavşan deneyleri planlanmıştır. Biyodavranış açısından sıçan deneyleri ile uygulanma yöntemi uygunluğu, uygulanma alanında karşılaşılabilecek sorunlar, pulmoner kapiller bariyerin aşılıp aşılamayacağı, hedef dokuya ulaşım düzeyi gibi sorulara cevap aranması amaçlanmıştır. Bunlara ek olarak bu proje ile üretilen ilk yerli mikroköpükçüklerin, mevcut ticari mikroköpükçük referansı ile karşılaştırılması ve etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Mikroköpükçüklerin olası toksik etkilerinin varlığı ve toksik doz değerlendirmesine yönelik deneyler için iki ayrı hayvan modeli çalışılmıştır. Küçük hayvan modeli olarak sıçan, daha büyük hayvan modeli olarak tavşanlarda toksisite deneyi gerçekleştirilmiştir.

Sıçanın kuyruk veninden verilen mikroköpükçükler ile elde edilen ultrasonografi görüntüleri, **Video 11**'de görüleceği üzere, kaydedilmiştir. Görüntüler bu veri değerlendirmesi için dedike olarak hazırlanmış VevoCQ yazılım programı ile işlenerek değerlendirilmiştir. VCI, aorta ve portaya yerleştirilen ROI (region of interest)ler ile ve VevoCQ yazılımı kullanılarak damarlardaki mikroköpükçük dağılımı zaman-ekojenite eğrisi **Şekil 85**'de görüleceği üzere grafiğe dökülmüştür.

Video 11. Kuyruk veni enjeksiyonu ile sıçanda VCI , aorta ve portal ven ile karaciğer parankiminin ekojenite artışı izlenmektedir.

Vena kava (VCI)'ya, abdominal aorta düzeyine ve vena portaya yerleştirilen 3 adet ROI lokalizasyonunda belirgin ekojenite artışı izlenmiştir. Bu alanlarda izlenen ekojenite artışı fizyolojik dağılım modeline uygun olarak ilk önce uygulanan venin döküldüğü VCI'da saptanmıştır (grafikteki mor çizgi). Ardından kalp ve akciğerlerden dönen mikroköpükçüklerin aortayı doldurmasına bağlı ekojenite artışı abdominal aorta da belirginlik kazanmıştır(grafikteki sarı çizgi). Aorta aracılığı ile tüm vücuda dağılan mikroköpükçükler dalak ve intestinal sistemin toplayıcısı olan portal vene ulaşarak porta da ekojenite artışı oluşturmaktadırlar (grafikteki yeşil çizgi). Portal ven aracılığı ile porta dallarında ve karaciğer parankiminde dağılan mikroköpükçükler genel bir ekojenite artışına neden olmaktadır. Ayrıca **Video 11**'de de izlendiği gibi portanın en uç ve ince dallarına dek ekojenite artışı saptandığı seçilebilmektedir.



Şekil 85. Zaman ekojenite ağrisinde mikroköpükçük uygulaması sonrasında ROI çizilen hedef alanlarda belirgin ekojenite artışı saptanmıştır.

Bu deney bize göstermiştir ki; mikroköpükçüklerimiz sıçanın dolaşım sisteminde parçalanmadan kalabilmekte, akciğer kapiller bariyerinden geçebilmekte, fizyolojik akım parametrelerinde akümüle olmadan ya da obstrüksiyon yaratmadan dağılabilmektedir. Buna ek olarak mikroköpükçüklerimiz görüntüleme için yeterli ekojeniteyi sağlayabilmektedirler. Bu bulgular ışığında bir sonraki basamak olan in vivo denek gruplarına enjeksiyon uygulanması için uygun zemin bulunmuştur.

4.9.1 Sıçanda Optimum Mikroköpükçük Dozu Belirleme

Sıçanlarda optimum doz, deneysel yöntemlerde anlatılan prosedür ile belirlenmiştir. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan mikroköpükçükler sıçanın kuyruk veninden 0,05 ml hacimde uygulanmıştır. Eş zamanlı olarak, ultrasonografi görüntüleri kaydedilmiştir (Video 1.5.1). Her bir enjeksiyonda 20 dakika boyunca görüntü kaydı alınarak mikroköpükçüklerin ölçülebilen anlamlı ekojenite oluşturmadığı zamana dek beklenmiştir.

Video 12. Kuyruk veninden uygulanan kontrast madde sırası ile vena kava inferior, aorta ve vena portada ekojenite artışı oluşturuyor. Ardından karaciğer parankiminde diffüz bir ekojenite artışı izleniyor.

Görüntüler bu tür verilerin değerlendirmesi için hazırlanmış VevoCQ yazılım programı ile işlenerek değerlendirilmiştir. VCI, aorta ve vena portaya yerleştirilen ROI (region of interest) ile VevoCQ yazılımı kullanılarak damarlardaki mikroköpükçük dağılımı zaman-ekojenite eğrisi şeklinde grafiğe dökülmüştür.

Vena kava, abdominal aorta düzeyine ve vena portaya yerleştirilen 3 adet ROI alanında belirgin ekojenite artışı izlenmiştir. Bu alanlarda izlenen ekojenite artışı fizyolojik dağılım modeline uygun olarak ilk önce uygulanan venin (kuyruk veni) döküldüğü VCI'da saptanmıştır. Ardından kalp ve akciğerlerden dönen mikroköpükçüklerin aortayı doldurmasına bağlı ekojenite artışı abdominal aortada belirginlik kazanmıştır. Aorta aracılığı ile tüm vücuda dağılan mikroköpükçükler dalak ve intestinal sistemin toplayıcısı olan portal vene ulaşarak vena portada ekojenite artışı oluşturmuştur. Portal ven aracılığı ile porta dallarında ve karaciğer parankiminde dağılan mikroköpükçükler genel bir ekojenite artışına neden olmaktadır. Bu dolaşım modeli 6 sıçanın hepsinde benzer olarak izlenmiştir. 1 sıçan damar yolu açılmadığı için deney dışı bırakılmıştır.

Bu deney bize göstermiştir ki; mikroköpükçükler sıçanın dolaşım sisteminde parçalanmadan kalabilmekte, akciğer kapiller bariyerinden geçebilmekte, fizyolojik akım parametrelerinde akümüle olmadan ya da obstrüksiyon yaratmadan dağılabilmektedir. Buna ek olarak mikroköpükçükler görüntüleme için yeterli ekojeniteyi sağlayabilmektedir. Bunlarla birlikte bu deneyin asıl amacı tanısal dozun belirlenmesidir. Pik ekojenite (PE) ölçümlerinde $2,5 \times 10^8$ dozda mikroköpükçük konsantrasyonu, artefakt oluşturmayan en yüksek ekojeniteyi veren konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Bu dozdan yüksek dozlarda atenüasyon nedeniyle damar yüzeyinde yoğun olarak bulunan mikroköpükçükler derinden veri alımını engellemekte ve gölgelenme oluşturarak görüntüyü bozmaktadır. Bu konsantrasyondan düşük değerlerde ise PE değerleri istenen seviyeye ulaşmamaktadır.

4.9.2 Referans Ticari Form ile Karşılaştırma

Referans ticari mikroköpükçük olarak Visualsonics Vevomarker® seçilmiştir. Dünyada bulunan diğer marka mikroköpükçükler getirilememiştir. Deneylerde, denenen mikroköpükçüğün uygulandığı 2 sıçanın ölçülen ekojenite değerleri vevomarker uygulanan sıçanlar ile karşılaştırılabilir düzeyde iken 2 sıçanda beklenen düzeyde ekojenite oluşmamıştır. Ekojenite oluşmayan bu 2 sıçandan bir tanesinde ekojenite 40 sn sonra ve

zayıf bir artış şeklinde izlenmiş olup anatomik bir probleme (ven anomalisi) ya da uygulama yeri sorununa ait olabileceği düşünülmüştür. Ek bir deney olarak 4 sıçan üzerinde 1×10^8 , 5×10^8 , ve $2,5 \times 10^8$ (2 sıçanda) dozları tekrar değerlendirilmiş olup $2,5 \times 10^8$ enjeksiyonlarından birinde beklenen ekojenite düzeyine ulaşılammış iken **Video 13**'de görüleceği üzere 5×10^8 enjeksiyon ekojenitesi daha yüksek değer vermiştir. Diagnostik dozun görüntülenmek istenen organa göre değişebilmekle birlikte $2,5 \times 10^8$ veya 5×10^8 olabileceği, iki düzeyinde kabul edilebileceği düşünülmüştür. Bu gruba ek 2 sıçan pilot olarak seçilmiş ve bu sıçanlardan birinde konsantrasyonun sabit enjeksiyon volümünün değiştiği multiple enjeksiyonlar diğesinde ise volümün sabit, konsantrasyonun değiştiği multip enjeksiyonlar yapılmıştır. Bu pilot çalışma ile enjeksiyonların linearitesi değerlendirilmiştir.

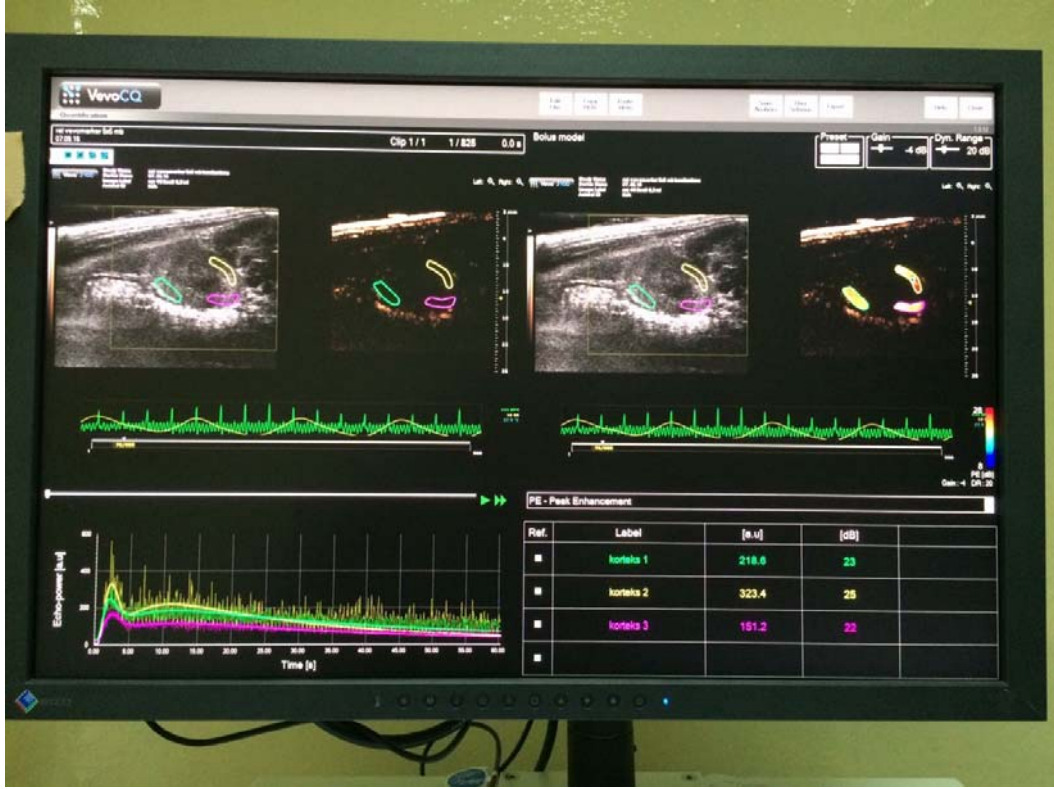
Video 13. 5×10^8 konsantrasyonda mb ile rat hepatik sistem-sirkülasyon modelinde ekojenite artışı izlenmektedir.

Bu deneylerde tanısal dozun bazı enjeksiyonlarında istenen ekojenite oluşmamıştır. Karşılaşılan bu sorun üzerine *in-vitro* basamağa geri dönülerek $2,5 \times 10^8$ dozu 3 damar fantomunda test edilmiştir. Bu doz aynı akış hızında ve hacimde ardarda enjeksiyonlar ile fantom akış sistemine uygulanmıştır. Bu veri ultrasonografik olarak kaydedilmiş olup PE ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu PE ölçümlerinde değerler 32-44 (a.u.) düzeylerinde ve benzer olup dozun tutarlı ve uygun ekojenite oluşturduğu konfirme edilmiştir.

In-vitro basamakta tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesine rağmen sıçan enjeksiyonlarının bazılarında ekojenite oluşmaması ve hayvanların vena porta, vena kava, aorta çaplarının farklılıklar göstermesi ölçümleri karşılaştırmayı güçleştirmektedir. Ayrıca, kuyruk veninde tromboz, darlık ya da anatomik varyasyonlar sebebiyle kontrast maddenin VCI'a geç ya da azalmış olarak ulaşması gibi olası yanıltıcı durumlar bu modelde tamamen dışlanamamaktadır. Bu bilgiler de göz önüne alınarak deney sonucunda referans ile denenen mikroköpükçükleri karşılaştırmak için sirkülasyon ve hepatik sistem modelinin uygun olmadığına ve deney modelinin değiştirilmesine karar verilmiştir. Daha tutarlı ölçümler yapılması ve 2 farklı mikroköpükçük tipinin daha benzer hemodinamik ortamda değerlendirilebilmesi için böbrek modeli seçilerek böbrek modelinde deney planlanmıştır.

Böbrek modeli deney düzeneği bize kapiller düzeyde parankimal dağılım göstererek parankimal ekojenite artışı oluşturan mikroköpükçükleri daha homojen bir ortamda değerlendirme olanağı sağlamaktadır. Önceki modelde ölçüm homojenizasyonunu etkileyebilecek damar çap farklılıkları ortadan kaldırılmış olup ek olarak mikroköpükçüklerin parankimal düzeydeki ekojenite artışı oluşturma özelliği de test edilmiştir. Bu modelde, **Şekil 86**'da görüleceği üzere, böbreğin anterior ve posterior korteks alanlarına benzer boyutlu ROI'ler yerleştirilerek kuyruk veninden verilen mikroköpükçükler renal arter aracılığı ile

böbrek perfüzyonu sağlamaları ve parankimal ekojenite artışı oluşturmaları ölçümlenmiştir. Deney esnasında alınan video, **Video 14**'de verilmektedir. Bu sayede daha standardize ölçümler ile mikroköpükçüklerin oluşturdukları parankimal ekojenite artış değerleri birbiri ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 86. Böbrek parankimi korteks düzeyine yerleştirilen ROI'ler izlenmektedir.

Video 14. Kontrast maddenin parankimde belirgin ekojenite artışına neden olduğu izlenmektedir.

Böbrek modeli deney grubunda tanısız doz ve ticari ürün ile karşılaştırma gerçekleştirilmiştir. Tüm enjeksiyonlar VevoCQ ve manuel yöntem olmak üzere iki yöntemle ölçülmüştür. İki yöntemle ölçüm sonuçlarında her grubun kendi içerisinde PE değerlerinin değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Ekojenite izlenen sıçanlar içerisinde en yüksek ekojenite 17,19 a.u ile 5×10^8 enjeksiyonuna, sonraki ise 15,02 a.u ile $2,5 \times 10^8$ konsantrasyonda Vevomarker enjeksiyonuna aittir. Diğer enjeksiyon değerleri ise bu değerlerin altında azalan düzeydedirler. Bu deney sonucunda bizim üretimimiz mikroköpükçükler ile ticari form Vevomarkerların eşdeğer PE değerlerine ulaşabildiği gösterilmiştir. Ancak ticari form grubu

da dahil deney grupları içerisinde PE değerlerinin farklılıklar göstermesi önceki deney modeline göre daha az olmakla birlikte geçerliliğini korumaktadır.

4.9.3 Sıçanda Toksik Doz Çalışması

Toksik doz çalışmasına alınan sıçanlar önceki deneylerdeki gibi hazırlanarak aynı veri kayıt basamakları ile görüntülemeye tabi tutulmuştur. **Video 15'**de toksik dozda elde edilen video görüntüler görülmektedir. Bu görüntülemeye verilen yüksek doz ile benzer şekilde atenüasyon olduğu izlenmiş olup yüksek dozda mikroköpükçük uygulandığının ultrasonografi ile sağlanması yapılmıştır. Enjeksiyon sonrasında sıçanlar akut toksik etkiler için metabolizma kafesine alınmıştır. Geç toksik etkiler için 14 gün boyunca takip edilen sıçanlar bu süreç sonunda kurban edilerek organ örnekleri patolojik değerlendirmeye gönderilmiştir.

Video 15. Yüksek dozda mb enjeksiyonu ardından VCI, aorta ve porta opasifiye olmakta ancak belli bir süre sonra atenüasyon etkisiyle özellikle aorta ekojenitesi olmak üzere derin dokulardan ekojenite/sinyal alınamaz hale gelmektedir.

4.9.4 Tavşanda Toksik Doz Çalışması

Toksik dozun sıçana göre daha büyük bir modelde değerlendirilmesi amacı ile tavşana yüksek doz mikroköpükçük enjeksiyonu planlanmıştır. Doz uygulaması esnasında, **Video 16'**da görüleceği üzere, ultrasonografik değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde ultrasonografik değerlendirmenin amacı kontrast maddenin sisteme ulaştığından ve beklenen şekilde yüksek dozda olduğunu düşündürecek şekilde atenüasyon oluşturduğundan emin olmaktır. Bu deney sonucunda 24 saat takip edilen tavşanlar kurban edilerek dokuları patolojiye gönderilmiştir.

Video 16. Tavşanda uygulanan yüksek miktarda kontrast madde atenüasyon oluşturarak aort ekojenitesinin ve büyük oranda görüntünün silinmesine neden oluyor.



4.9.5 Mikroköpükçüklerin Toksisitelerinde Biyokimya ve Hemogram Sonuçları

Sıçanlar için çalışmaya alınan tüm sıçanlardan örneklenebilen ve sağlıklı olarak yorumlanabilecek tüm veriler kontrol grubu ve farklı doz ya da konsantrasyonda mikroköpükçükler olarak gruplandırıldı. Sıçan biyokimya değerleri



Tablo 4'de ve hemogram değerleri **Tablo 5**'de verilmektedir. Tablolardan görüleceği üzere, sıçanların idrar kreatinin ve üre değerleri gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık göstermemiştir. Kan değerleri arasında da kreatinin, üre, ALT, AST, ALP, albumin, direkt, indirekt ve total bilirubin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlenmemiştir (



Tablo 4). Hemogram değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur (**Tablo 5).**

Tanımlanan bulgular kullanılmış olan mikroköpükçüklerin sıçanlarda biyokimyasal ya da hemogram değerleri ile gösterilebilen toksisiteye neden olmadıklarını ortaya koymaktadır.

Tablo 4. Sıçan Biyokimya Değerleri.

	Mikroköpükçük Kullanılan Sıçanlar (Tüm Gruplar) (n=37)		Kontrol (n=4)		<i>p</i>
	Ortalama	Std Sapma	Ortalama	Std Sapma	
İdrar Kreatinin (Önce)¶¶	81,12	19,14	83,25	12,29	0,82
İdrar Kreatinin (Sonra)¶¶	81,17	20,55	86,99	8,58	0,25
İdrar Üre (Önce)¶¶	6880,72	1173,67	6418,09	833,93	0,35
İdrar Üre (Sonra)¶¶	5962,46	1015,23	6312,99	482,08	0,29
Kan Kreatinin (Önce)¶¶	0,23	0,04	0,26	0,01	0,19
Kan Kreatinin (Sonra)¶¶	0,32	0,07	0,36	0,04	0,29
Kan Üre (Önce)	21,05	2,40	21,55	0,95	0,56
Kan Üre (Sonra)	18,84	2,24	18,67	3,59	0,91
AST (Önce)	130,37	22,83	143,50	24,24	0,34
AST (Sonra)	108,18	20,09	105,75	10,14	0,99
ALT (Önce)	51,58	12,87	46,75	12,26	0,89
ALT (Sonra)	45,21	10,86	47,25	12,21	0,32
ALP (Önce)	262,66	77,55	262,25	131,67	0,75
ALP (Sonra)	189,08	73,86	178,25	109,45	0,79
Albumin¶¶ (Önce)	2,96	0,17	3,10	0,15	0,14
Albumin (Sonra)	2,87	0,20	2,95	0,06	0,40
Total Bilirubin (Önce)	0,31	0,23	0,47	0,04	0,62
Total Bilirubin (Sonra)	0,20	0,04	0,18	0,02	0,27
İndirekt Bilirubin (Önce)	0,28	0,23	0,44	0,04	0,72
İndirekt Bilirubin (Sonra)	0,17	0,04	0,12	0,05	0,06
Direkt Bilirubin (Önce)	0,02	0,01	0,02	0,009	0,98
Diirekt Bilirubin (Sonra)	0,02	0,01	0,05	0,06	0,83

Tablo 5. Sıçan Hemogram Değerleri

	Mikroköpükçük Kullanılan Sıçanlar (Tüm Gruplar) (n=37)		Kontrol (n=4)		p
	Ortalama	Std Sapma	Ortalama	Std Sapma	
RBC	7,62	0,56	7,72	0,60	0,78
Hemoglobin	13,87	0,92	14,33	0,79	0,38
Hematokrit	41,92	3,09	43,28	3,10	0,43
MCV	55,31	2,72	56,28	2,42	0,40
MCHC	33,12	0,83	33,15	0,62	0,98
RDW	16,22	1,85	15,13	2,86	0,19
Trombosit	963,61	143,19	886,25	99,85	0,27
MPV	5,88	0,52	5,73	0,72	0,59
PCT	0,56	0,08	0,51	0,08	0,67
Lökosit	7,09	3,66	8,28	7,10	0,98
Nötrofil (%)	11,92	10,27	6,40	4,75	0,27
Lenfosit (%)	83,68	9,86	91,50	9,73	0,08
Monosit (%)	0,56	0,85	0,88	0,69	0,14
Bazofil (%)	3,20	6,06	0,80	0,70	0,78
Eozinofil (%)	0,64	0,50	0,43	0,26	0,46

Tavşanlarda toksisitenin sınanması için kontrol grubu ve asıl olmak üzere tavşanlar kullanılmıştır. Tavşanlarda mikroköpükçük uygulaması öncesi ve sonrasında kan biyokimya değerlerinde deney grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel farklılıklar saptanmıştır. Değerlerin kontrol grubundan farklı çıkması nedeniyle deney grubunda mikroköpükçük öncesi ve sonrası değerler için Wilcoxon testi uygulanmış ve işlem öncesi ve sonrası farklılıklar gösteren parametreler araştırılmıştır. Sonuçlar **Tablo 6**'da özetlenmiştir.

Tavşanlarda kontrol grubu ile deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren biyokimya parametreleri ele alındığında kan üre, ALP, total bilirubin ve indirekt bilirubin değerlerinin mikroköpükçük sonrası düşüş gösterdiği, AST ve ALT değerlerinin arttığı belirlenmektedir. Kan üre miktarı yükselmesi beklenen bir değerken düşüyor olması, düşüşün kontrol grubunda da bulunması ve değerlerin kreatinin ile paralellik göstermemesi, üre artışının klinik olarak değerinin olmadığını ortaya koymaktadır. İlaç kullanımı ile yükselmesi beklenen total ve indirekt bilirubin ile ALP değerindeki düşüş de

klirik olarak anlamlı değildir. Karaciğer fonksiyon testleri olan AST ve ALT'nin yükselmesi anlamlı bir bulgudur. Ancak deney grubundaki değerlerin standart sapmasının yüksek olması deney grubunun dar olması nedeniyle olarak örneklemenin güvenilirliğini gündeme getirmektedir. AST ve ALT değerlerinin geniş gruplar ile yinelenmesi çözüm olabilir. Enzimdeki bu oynamalara rağmen, aşağıda patoloji bölümünde anlatıldığı üzere, otopsi ile elde edilen histopatolojik incelemelerde tavşanların hiçbirisinde belirgin bir karaciğer hasarı saptanmaması mikroköpükçüklerin belirgin karaciğer toksisitesine yol açmadığını göstermektedir.

Tablo 6. Tavşan Biyokimya Değerleri

	Mikroköpükçük Kullanılan Tavşanlar (n=6)		Kontrol (n=3)		Deney kontrol grubu farklılık <i>p</i>	Deney grubu önce sonra farklılık <i>p</i>
	Ortalama	Std Sapma	Ortalama	Std Sapma		
Kan Kreatinin (Önce)¶¶	0,90	0,12	0,81	0,05	0,25	0,05
Kan Kreatinin (Sonra)¶¶	1,03	0,13	0,70	0,10	0,02	
Kan Üre (Önce)	16,86	2,67	15,06	2,00	0,43	0,07
Kan Üre (Sonra)	15,30	1,38	12,43	1,09	0,02	
AST (Önce)	25,83	7,05	28,66	4,72	0,60	0,02
AST (Sonra)	56,83	16,82	30,66	4,50	0,02	
ALT (Önce)	62,33	18,57	54,00	20,80	0,43	0,02
ALT (Sonra)	82,00	22,30	54,66	21,54	0,12	
ALP (Önce)	75,00	21,54	204,33	37,20	0,02	0,04
ALP (Sonra)	61,83	22,58	187,00	42,32	0,02	
Albumin¶¶ (Önce)	3,99	0,23	3,92	0,35	0,89	0,34
Albumin (Sonra)	4,11	0,37	3,97	0,25	0,12	
Total Bilirubin (Önce)	0,32	0,10	0,28	0,02	0,59	0,02
Total Bilirubin (Sonra)	0,18	0,008	0,27	0,04	0,01	
İndirekt Bilirubin (Önce)	0,30	0,10	0,27	0,02	0,79	0,02
İndirekt Bilirubin (Sonra)	0,16	0,05	0,26	0,05	0,01	
Direkt Bilirubin (Önce)	0,02	0,008	0,01	0,006	0,05	0,31
Direkt Bilirubin (Sonra)	0,02	0,004	0,01	0,005	0,15	

Tavşan hemogram değerleri **Tablo 7**'da listelenmiştir. Tabloda görüldüğü üzere, mikroköpükçükler tavşan hemogram değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik



oluşturmamaktadır. Mikroköpükçük enjeksiyonu sonrasında eozinofil değerlerinin artış gösterdiği belirlenmektedir, artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ancak birlikte geniş gruplarda yinelenen deneylerde alerji göstergesi olan bu parametreye öncelikle dikkat edilmesi uygun olacaktır.

Tablo 7. Tavşan Hemogram Değerleri

	Mikroköpükçük Kullanılan Tavşanlar (n=6)		Kontrol (n=3)		Deney kontrol grubu farklılık p	Deney grubu önce sonra farklılık p
	Ortalama	Std Sapma	Ortalama	Std Sapma		
RBC (Önce)¶¶	5,19	2,55	6,76	,061	0,12	0,91
RBC (Sonra)	5,30	2,62	6,65	0,72	0,31	
Hemoglobin (Önce)¶¶	10,91	5,35	13,80	0,43	0,07	0,67
Hemoglobin (Sonra)	11,15	5,48	13,20	0,98	0,86	
Hematokrit (Önce)¶¶	32,68	16,04	41,56	1,36	0,06	0,46
Hematokrit (Sonra)	34,31	16,92	40,00	2,96	0,73	
MCV (Önce)¶¶	52,48	25,79	61,76	3,76	0,79	0,34
MCV (Sonra)	54,05	26,63	60,25	2,19	0,31	
MCHC (Önce)¶¶	27,85	13,64	33,20	0,10	0,79	0,24
MCHC (Sonra)	27,11	13,28	33,00	0,00	0,31	
RDW (Önce)¶¶	11,56	5,71	14,96	1,02	0,07	0,35
RDW (Sonra)	12,20	6,02	14,85	1,06	0,73	
Trombosit (Önce)¶¶	268,66	136,63	375,33	123,24	0,12	0,46
Trombosit (Sonra)	304,83	196,73	362,50	68,58	0,99	
MPV (Önce)¶¶	5,10	2,58	6,23	0,15	0,15	0,49
MPV (Sonra)	5,68	3,03	5,95	0,07	0,61	
PCT (Önce)¶¶	0,16	0,08	0,23	0,03	0,12	0,46
PCT (Sonra)	0,19	0,12	0,21	0,10	0,99	
Lökosit (Önce)¶¶	7,55	4,96	6,66	0,80	0,43	0,24
Lökosit (Sonra)	5,53	3,01	8,10	0,00	0,18	
Nötrofil % (Önce)¶¶	10,81	8,56	11,70	9,54	0,79	0,60
Nötrofil % (Sonra)	13,08	10,55	12,85	10,96	0,99	
Lenfosit % (Önce)¶¶	65,80	32,42	75,30	27,04	0,79	0,24
Lenfosit % (Sonra)	52,13	27,11	83,25	10,39	0,09	
Monosit % (Önce)¶¶	1,76	0,98	2,73	0,64	0,12	0,75
Monosit% (Sonra)	1,81	1,76	2,40	1,41	0,73	
Bazofil % (Önce)¶¶	1,46	1,98	3,86	5,37	0,69	0,89
Bazofil % (Sonra)	1,78	2,88	0,20	2,55	0,39	
Eozinofil % (Önce)¶¶	3,48	7,31	6,40	8,05	0,36	0,08
Eozinofil % (Sonra)	14,51	15,80	1,30	,056	0,73	

4.9.6 Patoloji Sonuçları

Patoloji değerlendirmesi akciğer, karaciğer, böbrek ve beyin dokularını kapsamaktadır.

MB-1 (SIÇAN – 5×10⁸ MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Akciğerde alveolar çatı havalandırması olağan gözlemlenmiştir. **Ana bronşiyollerden birinde kronik inflamasyon gözlenmiştir.**

Bronşiolit gözlenmiştir. Plevra kalınlaşması yoktur. Aerasyon olağan görünümde dir.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlemlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerüleri olağan şekil ve boyutta gözlemlenmiştir. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümde dir. **Glomerüler kapiller yatakta hafif konjesyon gözlenmiştir.** Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlemlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menenjit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır.

Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-2 (SIÇAN – 5×10⁸ MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda, Akciğerde alveolar çatı havalandırması olağan gözlemlenmiştir. Plevra kalınlaşması yoktur. Aerasyon olağan görünümde dir.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağandır. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur.

Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda ; böbrek glomerüleri olağan şekil ve boyutta gözlemlenmiştir. Bazal tabaka kalınlaşması

gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümde. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlemlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menenjit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır.

Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-3 (SIÇAN – 2.5×10⁸ MICROBUBBLE)

Akciğere ait Patolojik değerlendirme yapılacak uygun doku görülememiştir.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlemlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerülleri olağan şekil ve boyuttadır. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümde. **Hafif tübüler konjesyon gözlenmiştir.** Akut tübüler nekroz saptanmamıştır.

Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlemlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menenjit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır.

Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-4 (SIÇAN – 5×10⁸ MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Akciğerde alveolar çatı havalandırması olağandır. Plevra kalınlaşması yoktur. Aerasyon olağan görünümde.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlemlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerülleri olağan şekil ve boyuttadır. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümde. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlemlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menenjit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-5 (SIÇAN – 5×10⁸ MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Akciğerde alveolar çatı havalandırması olağan gözlemlenmiştir. Plevra kalınlaşması yoktur. Aerasyon olağan görünümde dir.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağandır. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur.

Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerülerinde hafif konjesyon gözlenmiştir. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümde dir. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlemlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menenjit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır.

Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-6 (SIÇAN – 2.5×10⁸ MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Bronşiolit gözlenmiştir. Bronş duvarlarında mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenmiştir. Fokal konjesyon gözlenmiştir. Fokal bronkopnomöni gözlenmiştir.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda ; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlemlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerüleri olağan şekil ve boyuttadır. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümde dir. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlemlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menenjit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-7 (SIÇAN – 2.5×10⁸ MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Akciğerde alveolar çatı havalandırması olağan gözlemlenmiştir. Plevra kalınlaşması yoktur. Aerasyon olağan görünümde dir.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlemlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir.

Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünümüne sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerüleri olağan şekil ve boyutta gözlemlenmiştir. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümündedir. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlemlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menenjit gözlenmemiştir. Beyin zarlari olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-8 (SIÇAN – 2.5×10^8 MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Akciğerde alveolar çatı havalandırması olağan gözlemlenmiştir. **Fokal bronkopnomöni gözlenmiştir.**

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlemlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünümüne sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerüleri olağan şekil ve boyutta gözlemlenmiştir. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümündedir. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan olarak gözlemlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menenjit gözlenmemiştir. Beyin zarlari olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-9 (TAVŞAN – 3.2×10^9 MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Akciğerde alveolar çatı havalandırması olağan gözlemlenmiştir. Plevra kalınlaşması yoktur. Aerasyon olağan görünümündedir.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlemlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünümüne sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerüleri olağan şekil ve boyutta gözlemlenmiştir. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümündedir. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir. **Hafif konjesyon gözlenmiştir.**

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlemlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menenjit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-10 (TAVŞAN – 3.2×10⁹ MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Fokal amfizem gözlenmiştir. Fokal kanama ve konjesyon gözlenmiştir. Hemosiderin yüklü makrofaj varlığı saptanmıştır.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlemlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Santral venlerde konjesyon gözlenmiştir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerüleri olağan şekil ve boyuttadır. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümde. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlemlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menenjit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-11 (TAVŞAN – 3.2×10⁹ MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Hafif konjesyon gözlenmiştir.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Hafif konjesyon gözlenmiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Hafif konjesyon gözlenmiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; serebellum olağan gözlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menenjit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-12 (TAVŞAN – 3.2×10⁹ MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Akciğerde alveolar çatı havalandırması olağan gözlenmiştir. Plevra kalınlaşması yoktur. Aerasyon olağan görünümde.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Belirgin konjesyon gözlenmiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağandır. Ventriküler olağandır. Menejit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir.

Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-13 (TAVŞAN – 3.2×10⁹MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Fokal amfizem gözlenmiştir.

Akciğerde alveolar çatı havalandırması olağandır. Plevra kalınlaşması yoktur.

Aerasyon olağan görünümde dir.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerülleri olağan şekil ve boyutta gözlenmiştir. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümde dir. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menejit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-14(TAVŞAN – 3.2×10⁹MICROBUBBLE)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Akciğerde alveolar çatı havalandırması olağan gözlenmiştir. Plevra kalınlaşması yoktur. Aerasyon olağan görünümde dir.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerülleri olağan şekil ve boyutta gözlenmiştir. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümde dir. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağandır. Ventriküler olağandır. Menejit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-15 (SIÇAN – 5×10⁸ Vevo marker)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Akciğerde alveolar çatı havalandırması olağandır. Plevra kalınlaşması yoktur. Aerasyon olağan görünümdeydir.

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağan gözlenmiştir. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerülleri olağan şekil ve boyutta gözlenmiştir. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümdeydir. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menejit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

MB-16 (SIÇAN – 5×10⁸ Vevo marker)

Akciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; **Fokal pnömöni gözlenmiştir.**

Karaciğere ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Karaciğere ait kesitlerde portal alanlar olağandır. Retiküler çatı olağan gözlemlenmiştir. Parankim içinde kanama yoktur. Yağlanma gözlenmemiştir. Kapsül olağan görünüme sahiptir. Portal alanda inflamasyon ve kanama gözlenmemiştir.

Böbreğe ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Böbrek glomerülleri olağan şekil ve boyuttadır. Bazal tabaka kalınlaşması gözlenmemiştir. Afferent arterioller olağan görünümdeydir. Akut tübüler nekroz saptanmamıştır. Tübüler içi madde birikimi izlenmemiştir.

Beyine ait patolojik örnek kesitlerinden yapılan inceleme sonucunda; Serebellum olağan gözlenmiştir. Ventriküler olağandır. Menejit gözlenmemiştir. Beyin zarları olağandır. Normal dizilim gözlenmiştir. Kanama, nekroz gözlenmemiştir.

5. SONUÇLAR

Ultrason kontrast ajanı mikroköpükçükler hava, N₂, ve PFC gibi farklı gaz ve farklı PEG₄₀St kompozisyonlarında üretilmişlerdir. PFC gazı ile üretilen mikroköpükçükler diğer gazlar ile üretilen mikroköpükçükler ile kıyaslandığında, PFC gazı ile üretilen mikroköpükçüklerin verimlerinin en yüksek düzeyde ve ortalama boyutlarının en düşük

sevide olduğu bulunmuştur. Farklı PEG₄₀St oranlarında üretilen mikroköpükçüklerde, DSPC:PEG₄₀St oranı 5:5'e doğru gittikçe ortalama boyutların küçüldüğü, en dar boyut dağılımına gittikleri ve konsantrasyonlarının arttığı görülmüştür. DSPC:PEG₄₀St 5:5 formülasyonu ile ortalama boyutları 3.5 µm, maksimum mikroköpükçük boyutu 8 µm olan stabiliteyi yüksek mikroköpükçükler üretilmiştir.

Mikroköpükçüklerin yüzey morfolojileri floresan mikroskop görüntülerinden incelenmiştir. Mikroköpükçüklerin üretim aşamasından görüntüleme anına kadar geçen sürede yüzey morfolojilerinin oluştuğu kanaatine varılmıştır. Bu süre içerisinde mikroköpükçüklerin boyutlarında meydana gelen değişmelerde, mikroköpükçüklerin boyutlarında genleşme-sıkışma hareketleri neticesinde lipid, emülsifiyer, ve boya moleküllerin faz ayrımına gittikleri değerlendirilmiştir. Mikroköpükçüklerin yüzeyinde beklendiği gibi monotabaka yapısı yanında kümeleşmiş moleküllerden oluşan bölgelerin oluştuğu görülmüştür. Yüzeyde bölgesel kütle farklılıkları bulunması, mikroköpükçüklerin ultrason altında yaklaşık 700 m/s hızda ve $1.2 \cdot 10^{12}$ m/s² ivme ile osilasyonları esnasında mikroköpükçüğün boyutlarında küresel ve elastik büyüme-küçülme olması yerine her bir açıda yüzeyden dağılan odak noktaları belirmesine neden olmaktadır. Bu durum, mikroköpükçüğün ekojenite değerlerinde artışa neden olurken, mikroköpükçüğün ultrason altında stabilite kaybına neden olmaktadır.

Mikroköpükçüklerin basınç altında stabiliteyi incelenmiştir. İlk olarak, yalın hava kabarcıklarının basınç altında su içerisinde boyutlarının değişimi gözlenmiştir. Gaz çözünürlüğü bakımından doymuş bir sıvıda gaz kabarcıklarının çözünmeden kalabileceği; ancak, basıncın artmasıyla, kabarcığın hacminde meydana gelen küçülme yanında, sıvının doymuşluk seviyesi düşmesiyle kabarcık içerisindeki gaz çözünmeye başlamış, deney süresi boyunca kabarcıkların ortamdaki kayboluncaya kadar küçüldükleri görülmüştür. Basınç tekrar başlangıç değerine düşürüldüğünde, küçülmüş olan kabarcık tekrar eski haline dönmüş; hatta boyutu daha da artmıştır. Bu, mikroköpükçüklerin ortamda buldukları sıvının doymuşluk derecesinin önemini göstermektedir. Mikroköpükçüklerin içinde buldukları ortamları, sıcaklık, başka molekül ve iyonların varlığı gibi durumlarda gaz taşıma kapasiteleri değiştiğinde, mikroköpükçüklerden gaz çıkışı ya da gaz girişi mikroköpükçüklerin yüzey morfolojilerini, dolayısı ile stabiliteyi etkilemektedir.

Mikroköpükçüklerin ultrason ile konsantrasyonlarının tespit edilebilmesi için yöntem geliştirilmiştir. Bolus enjeksiyon yöntemi ile elde edilen zaman-intensite değerlerinin analiz edilmesinden eğri altında kalan alan (AUC) değerlerin akış hızı, bolus hacmi gibi deney koşullarına ve mikroköpükçük konsantrasyonuna bağlı olduğu ve ölçüm esnasında oluşan arkaplan intensite değerlerinin hesaplamalarda gözardı edilemeyeceği bulunmuştur.

Floresan mikroskopu ile yapılan çalışmalar, her bir mikroköpükçüğün kendine özgü yüzey kompozisyonlarına ve yüzey morfolojilerine sahip olduklarını göstermektedir.

Mikroköpükçük formülasyonlarına eklenen PEG₄₀St miktarı ile mikroköpükçüklerin ekojenitelerinde artış olduğu saptanmış; ancak, mikroköpükçüklerin yüzeylerinde PEG₄₀St miktarı arttıkça mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteilerinin azaldığı bulunmuştur.

İn-vivo deneylerimizde dolaşım sisteminin ve parankim düzeyinde perfüzyonun değerlendirildiği iki farklı modelde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu modeller mikroköpükçüklerin tüm seyri boyunca hayvan modelinde değerlendirilebileceği duraklar için uygundur. Dolaşımda venöz uygulama ardından stabil olarak akciğer bariyerini geçebildiği kalp tarafından arterial sistemik dolaşıma pompalanarak aortada ekojenite oluşturabildiği ve vasküler yatağın tüm alanlarını doldurabildiği gösterilmiştir. Böbrek modeli ile en organ değerlendirmesi, perfüzyon değerlendirmesi ve parankimal boyanma özelliklerinin tetkiki için uygun bir örnektir. Tüm bu enjeksiyonlarda optimum ekojenitenin olduğu örnekler olduğu gibi hedef ekojenite düzeylerine ulaşamayan enjeksiyon sonuçları da mevcuttur. Bu değişkenlik gösteren sonuçlar kontrol grubu olan Vevomarker® enjeksiyonlarında da izlenmektedir. Doz ile ekojenite pik artışı (PE) değerleri arasında lineer bir bağlantının tüm enjeksiyonlarda gösterilememesi in-vivo deneyin bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Hayvanların damar çaplarındaki, organ boyutlarında farklılıklar ROI boyutlarını da etkilemektedir. Eşdeğer ROI boyutları seçilerek ölçümler tekrarlanmış olmakla birlikte her hayvanın küçük de olsa görüntüleme aşamasından artefakt oluşumu açısından farklılıklar gösterebilmesi, hayvanların anatomik varyasyonel farklılıkları in-vivo deneyin doğası gereği ölçüm farklılıklarına neden olmuş olabilir. Tüm bu etkenler sonucunda doz PE yanıt eğrileri in-vivo deneylerde, in-vitro deneylerdeki kadar optimum bir lineerite gösteremeyebilir.

Sonuç olarak, laboratuvarımızda ürettiğimiz ilk yerli kontrast maddesi olan mikroköpükçükler ile ulaşılabilen PE değerleri, kontrol grubu ticari mikroköpükçük olan Vevomarker® ile karşılaştırılabilir düzeydedir.



KAYNAKLAR

Abou-Saleh, R. H., Swain, M., Evans, S. D. ve Thomson, N. H. 2014. "Poly(ethylene glycol) Lipid-Shelled Microbubbles: Abundance, Stability, and Mechanical Properties." *Langmuir* 30(19): 5557-5563.

Algül A., B. P., Seçil M., Canda T. 2003. "Meme kitlelerinde kontrastlı power Doppler ve renkli Doppler US: tanısal etkinlikleri ve ayırıcı tanıya katkıları." *Türk Tanısal ve Girişimsel Radyoloji Dergisi_9(2)*: 199-206.

Alzaraa, A., Gravante, G., Chung, W. Y., Al-Leswas, D., Bruno, M., Dennison, A. R. ve Lloyd, D. M. 2012. "Targeted microbubbles in the experimental and clinical setting." *American Journal of Surgery_204(3)*: 355-366.

Asch, F. M. ve Weissman, N. J. 2009. "Overview of the 2008 Food and Drug Administration Advisory Committee on Safety Considerations in the Development of Ultrasound Contrast Agents." *Circulation_119(14)*: 1956-1961.

Benchimol, M. J., Hsu, M. J., Schutt, C. E., Hall, D. J., Mattrey, R. F. ve Esener, S. C. 2013. "Phospholipid/carbocyanine dye-shelled microbubbles as ultrasound-modulated fluorescent contrast agents." *Soft Matter_9(8)*: 2384-2388.

Bettinger, T., Bussat, P., Tardy, I., Pochon, S., Hyvelin, J. M., Emmel, P., Henrioud, S., Biolluz, N., Willmann, J. K., Schneider, M. ve Tranquart, F. 2012. "Ultrasound Molecular Imaging Contrast Agent Binding to Both E- and P-Selectin in Different Species." *Investigative Radiology_47(9)*: 516-523.

Bloch, S. H., Wan, M., Dayton, P. A. ve Ferrara, K. W. 2004. "Optical observation of lipid- and polymer-shelled ultrasound microbubble contrast agents." *Applied Physics Letters_84(4)*: 631-633.

Borden, M. 2009. "Nanostructural features on stable microbubbles." *Soft Matter_5(4)*: 716-720.

Borden, M. A., Caskey, C. F., Little, E., Gillies, R. J. ve Ferrara, K. W. 2007. "DNA and polylysine adsorption and multilayer construction onto cationic lipid-coated microbubbles." *Langmuir_23(18)*: 9401-9408.



Borden, M. A., Dayton, P., Zhao, S. K. ve Ferrara, K. W. 2004. "Physico-chemical properties of the microbubble lipid shell - Composition, microstructure & properties of targeted ultrasound contrast agents." 2004 IEEE Ultrasonics Symposium, Vols 1-3: 20-23.

Borden, M. A., Kruse, D. E., Caskey, C. F., Zhao, S. K., Dayton, P. A. ve Ferrara, K. W. 2005. "Influence of lipid shell physicochemical properties on ultrasound-induced microbubble destruction." IEEE Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control_52(11): 1992-2002.

Borden, M. A. ve Longo, M. L. 2001. "Effect of lipid type on stability of air-filled microbubbles." Abstracts of Papers of the American Chemical Society_221: U339-U339.

Borden, M. A. ve Longo, M. L. 2002. "The dependence of lipid-coated microbubble dissolution behavior on acyl chain length." Biophysical Journal_82(1): 35a-35a.

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. ve Longo, M. L. 2004. "Oxygen permeability of fully condensed lipid monolayers." Journal of Physical Chemistry B_108(19): 6009-6016.

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. ve Longo, M. L. 2003. "Transport properties and surface morphology of the microbubble lipid shell." Biophysical Journal_84(2): 294a-294a.

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.

Borden, M. A., Sarantos, M. R., Stieger, S. M., Simon, S. I., Ferrara, K. W. ve Dayton, P. A. 2006. "Ultrasound radiation force modulates ligand availability on targeted contrast agents." Molecular Imaging_5(3): 139-147.

Chaline, J., Jimenez, N., Mehrem, A., Bouakaz, A., Dos Santos, S. ve Sanchez-Morcillo, V. J. 2015. "Macroscopic acousto-mechanical analogy of a microbubble." *Journal of the Acoustical Society of America*_138(6): 3600-3606.

Chen, C. C., Wu, S. Y., Finan, J. D., Morrison, B. ve Konofagou, E. E. 2013. "An Experimental Study on the Stiffness of Size-Isolated Microbubbles Using Atomic Force Microscopy." *Ieee Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control*_60(3): 524-534.

Chomas, J. E., Dayton, P., Allen, J., Morgan, K. ve Ferrara, K. W. 2001. "Mechanisms of contrast agent destruction." *Ieee Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control*_48(1): 232-248.

Chomas, J. E., Dayton, P. A., May, D., Allen, J., Klibanov, A. ve Ferrara, K. 2000. "Optical observation of contrast agent destruction." *Applied Physics Letters*_77(7): 1056-1058.

Cox, D. J. ve Thomas, J. L. 2010. "Ultrasound-Induced Dissolution of Lipid-Coated and Uncoated Gas Bubbles." *Langmuir*_26(18): 14774-14781.

Davidson, B., Chadderdon, S. M., Belcik, T., Gupta, S., Bettinger, T., Schneider, M. ve Lindner, J. R. 2010. "Ischemic Memory Imaging with a Selectin-targeted Microbubble Contrast Agent: Efficacy and Safety Testing in a Non-human Primate Model of Myocardial Ischemia." *Circulation*_122(21).

Dayton, P. A. ve Ferrara, K. W. 2002. "Targeted imaging using ultrasound." *Journal of Magnetic Resonance Imaging*_16(4): 362-377.

de Jong, N., Emmer, M., van Wamel, A. ve Versluis, M. 2009. "Ultrasonic characterization of ultrasound contrast agents." *Medical & Biological Engineering & Computing*_47(8): 861-873.

Dejong, N., Hoff, L., Skotland, T. ve Bom, N. 1992. "Absorption and Scatter of Encapsulated Gas Filled Microspheres - Theoretical Considerations and Some Measurements." *Ultrasonics* 30(2): 95-103.

Dicker, S., Mleczko, M., Siepmann, M., Wallace, N., Sunny, Y., Bawiec, C. R., Schmitz, G., Lewin, P. ve Wrenn, S. P. 2013. "Influence of Shell Composition on the Resonance Frequency of Microbubble Contrast Agents." *Ultrasound in Medicine and Biology*_39(7): 1292-1302.

Doinikov, A. A., Haac, J. F. ve Dayton, P. A. 2009. "Resonance frequencies of lipid-shelled microbubbles in the regime of nonlinear oscillations." *Ultrasonics*_49(2): 263-268.

Elmas, B.,Tuncel, M.,Yalcin, G.,Senel, S. ve Tuncel, A. 2005. "Synthesis of uniform, fluorescent poly(glycidyl methacrylate) based particles and their characterization by confocal laser scanning microscopy." *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*_269(1-3): 125-134.

Epstein, P. S. ve Plesset, M. S. 1950. "On the Stability of Gas Bubbles in Liquid-Gas Solutions." *J. Chem. Phys.* 18(11): 1505-1509.

Epstein PS, P. M., 1505 1950. "On the Stability of Gas Bubbles in Liquid-Gas Solutions." *J. Chem. Phys.*_18.

Ferrara, K.,Pollard, R. ve Borden, M. 2007. "Ultrasound microbubble contrast agents: Fundamentals and application to gene and drug delivery." *Annual Review of Biomedical Engineering*_9: 415-447.

Frinking, P. J. A. ve de Jong, N. 1998. "Acoustic modeling of shell-encapsulated gas bubbles." *Ultrasound in Medicine and Biology*_24(4): 523-533.

Fu, H. L.,Wang, J. J.,Chen, X. C.,Leng, X. P.,Thorne, S. ve Villanueva, F. 2011. "Long Term in vivo Stem Cell Tracking Using Contrast Ultrasound." *Circulation*_124(21).

Garg, S.,Thomas, A. A. ve Borden, M. A. 2013. "The effect of lipid monolayer in-plane rigidity on in vivo microbubble circulation persistence." *Biomaterials*_34(28): 6862-6870.

Gerber, F.,Krafft, M. P.,Waton, G. ve Vandamme, T. F. 2006. "Microbubbles with exceptionally long life - synergy between shell and internal phase components." *New Journal of Chemistry*_30(4): 524-527.

Greene, E. a. R. T. O. 2013. "Shapes displayed with durations in the microsecond range do not obey Bloch's law of temporal summation." *i-Perception* 4(6): 429.

Harabis, V.,Kolar, R.,Mezl, M. ve Jirik, R. 2013. "Comparison and evaluation of indicator dilution models for bolus of ultrasound contrast agents." *Physiological Measurement*_34(2): 151-162.

Helfield, B.,Chen, X. C.,Qin, B. ve Villanueva, F. S. 2016. "Individual lipid encapsulated microbubble radial oscillations: Effects of fluid viscosity." *Journal of the Acoustical Society of America*_139(1): 204-214.

Hettiarachchi, K., Talu, E., Longo, M. L., Dayton, P. A. ve Lee, A. P. 2007. "On-chip generation of microbubbles as a practical technology for manufacturing contrast agents for ultrasonic imaging." *Lab on a Chip*_7(4): 463-468.

Hosny, N. A., Mohamedi, G., Rademeyer, P., Owen, J., Wu, Y. L., Tang, M. X., Eckersley, R. J., Stride, E. ve Kuimova, M. K. 2013. "Mapping microbubble viscosity using fluorescence lifetime imaging of molecular rotors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*_110(23): 9225-9230.

Inaba, Y. ve Lindner, J. R. 2012. "Molecular imaging of disease with targeted contrast ultrasound imaging." *Translational Research*_159(3): 140-148.

Kabalnov, A., Bradley, J., Flaim, S., Klein, D., Pelura, T., Peters, B., Otto, S., Reynolds, J., Schutt, E. ve Weers, J. 1998. "Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream: 2. Experiment." *Ultrasound in Medicine and Biology*_24(5): 751-760.

Kabalnov, A., Klein, D., Pelura, T., Schutt, E. ve Weers, J. 1998. "Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream: 1. Theory." *Ultrasound in Medicine and Biology*_24(5): 739-749.

Khanicheh, E., Mitterhuber, M., Kinslechner, K., Xu, L. F., Lindner, J. R. ve Kaufmann, B. A. 2012. "Factors Affecting the Endothelial Retention of Targeted Microbubbles: Influence of Microbubble Shell Design and Cell Surface Projection of the Endothelial Target Molecule." *Journal of the American Society of Echocardiography*_25(4): 460-466.

Kilic, S., Lu, E. D., Tom, E., Gretton, J., Wagner, W. R. ve Villanueva, F. S. 2005. "Modifications of lipid microbubble shell composition affect intravascular kinetics." *Journal of the American College of Cardiology*_45(3): 271a-272a.

Kim, D. H., Costello, M. J., Duncan, P. B. ve Needham, D. 2003. "Mechanical properties and microstructure of polycrystalline phospholipid monolayer shells: Novel solid microparticles." *Langmuir*_19(20): 8455-8466.

Klibanov, A. L. 2002. "Ultrasound contrast agents: Development of the field and current status." *Contrast Agents* li_222: 73-106.

Kooiman, K., Kokhuis, T. J. A., van Rooij, T., Skachkov, I., Nigg, A., Bosch, J. G., van der Steen, A. F. W., van Cappellen, W. A. ve de Jong, N. 2014. "DSPC or DPPC as main shell component influences ligand distribution and binding area of lipid-coated targeted microbubbles." *European Journal of Lipid Science and Technology*_116(9): 1217-1227.

Kovalenko, A., Polavarapu, P., Pourroy, G., Waton, G. ve Krafft, M. P. 2014. "pH-Controlled Microbubble Shell Formation and Stabilization." *Langmuir*_30(22): 6339-6347.

Kozlov, M. M., Lichtenberg, D. ve Andelman, D. 1997. "Shape of phospholipid/surfactant mixed micelles: Cylinders or disks? Theoretical analysis." *Journal of Physical Chemistry B* 101(33): 6600-6606.

Kudo, N., Okada, K. ve Yamamoto, K. 2009. "Sonoporation by Single-Shot Pulsed Ultrasound with Microbubbles Adjacent to Cells." *Biophysical Journal*_96(12): 4866-4876.

Kwan, J. J. ve Borden, M. A. 2010. "Microbubble Dissolution in a Multigas Environment." *Langmuir*_26(9): 6542-6548.

Kwan, J. J. ve Borden, M. A. 2012. "Lipid monolayer collapse and microbubble stability." *Advances in Colloid and Interface Science*_183: 82-99.

Leong-Poi, H., Song, J., Rim, S. J., Christiansen, J., Kaul, S. ve Lindner, J. R. 2002. "Influence of microbubble shell properties on ultrasound signal: Implications for low-power perfusion imaging." *Journal of the American Society of Echocardiography*_15(10): 1269-1276.

Lozano, M. M. ve Longo, M. L. 2009. "Microbubbles Coated with Disaturated Lipids and DSPE-PEG2000: Phase Behavior, Collapse Transitions, and Permeability." *Langmuir*_25(6): 3705-3712.

Martin, J. W., Chin, J. W. ve Nguyen, T. 2003. "Reciprocity law experiments in polymeric photodegradation: a critical review." *Progress in Organic Coatings*_47(3-4): 292-311.

May, D. J., Allen, J. S. ve Ferrara, K. W. 2002. "Dynamics and fragmentation of thick-shelled microbubbles." *IEEE Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control* 49(10): 1400-1410.

Mayer, S. ve Grayburn, P. A. 2001. "Myocardial contrast agents: Recent advances and future directions." *Progress in Cardiovascular Diseases*_44(1): 33-44.

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.

Moriyasu, F. ve Itoh, K. 2009. "Efficacy of Perflubutane Microbubble-Enhanced Ultrasound in the Characterization and Detection of Focal Liver Lesions: Phase 3 Multicenter Clinical Trial." *American Journal of Roentgenology*_193(1): 86-95.

Mulvana, H., Stride, E., Tang, M. X., Hajnal, J. V. ve Eckersley, R. 2011. "Temperature-Dependent Differences in the Nonlinear Acoustic Behavior of Ultrasound Contrast Agents Revealed by High-Speed Imaging and Bulk Acoustics." *Ultrasound in Medicine and Biology* 37(9): 1509-1517.

Nanda, N. C., Shah, P. M. ve Gramiak, R. 1976. "Echocardiographic Evaluation of Tricuspid-Valve Incompetence by Contrast Injections." *Clinical Research*_24(3): A233-A233.

Pang, Z., Laplante, N. E. ve Filkins, R. J. 2012. "Dark pixel intensity determination and its applications in normalizing different exposure time and autofluorescence removal." *Journal of Microscopy*_246(1): 1-10.

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.

Parrales, M. A., Fernandez, J. M., Perez-Saborid, M., Kopechek, J. A. ve Porter, T. M. 2014. "Acoustic characterization of monodisperse lipid-coated microbubbles: Relationship between size and shell viscoelastic properties." *Journal of the Acoustical Society of America*_136(3): 1077-1084.

Postema, M., Bouakaz, A., ten Cate, F. J., Schmitz, G., De Jong, N. ve van Wamel, A. 2006. "Nitric oxide delivery by ultrasonic cracking: Some limitations." *Ultrasonics*_44: E109-E113.

Pu, G., Borden, M. A. ve Longo, M. L. 2006. "Collapse and shedding transitions in binary lipid monolayers coating microbubbles." *Langmuir*_22(7): 2993-2999.

Pu, G., Longo, M. L. ve Borden, M. A. 2005. "Effect of microstructure on molecular oxygen permeation through condensed phospholipid monolayers." *Journal of the American Chemical Society*_127(18): 6524-6525.

Qin, S. P., Caskey, C. F. ve Ferrara, K. W. 2009. "Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering." *Physics in Medicine and Biology* 54(6): R27-R57.

Roeckelein, J. E. 1998. *Dictionary of theories, laws, and concepts in psychology*, Greenwood Publishing Group.



Schutt, C. E., Ibsen, S. D., Benchimol, M. J., Hsu, M. J. ve Esener, S. C. 2014. "Manipulating Nanoscale Features on the Surface of Dye-Loaded Microbubbles to Increase Their Ultrasound-Modulated Fluorescence Output." *Small*_10(16): 3316-3324.

Schutt, E. G., Klein, D. H., Mattrey, R. M. ve Riess, J. G. 2003. "Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: The key role of perfluorochemicals." *Angewandte Chemie-International Edition*_42(28): 3218-3235.

Segers, T., de Rond, L., de Jong, N., Borden, M. ve Versluis, M. 2016. "Stability of Monodisperse Phospholipid-Coated Microbubbles Formed by Flow-Focusing at High Production Rates." *Langmuir*_32(16): 3937-3944.

Sennoga, C. A., Yeh, J. S. M., Alter, J., Stride, E., Nihoyannopoulos, P., Seddon, J. M., Haskard, D. O., Hajnal, J. V., Tang, M. X. ve Eckersley, R. J. 2012. "Evaluation of Methods for Sizing and Counting of Ultrasound Contrast Agents." *Ultrasound in Medicine and Biology*_38(5): 834-845.

Shen, Y. Y., Powell, R. L. ve Longo, M. L. 2008. "Influence of the dissolution rate on the collapse and shedding behavior of monostearin/monopalmitin-rich coated microbubbles." *Langmuir*_24(18): 10035-10040.

Sijl, J., Overvelde, M., Dollet, B., Garbin, V., de Jong, N., Lohse, D. ve Versluis, M. 2011. "'Compression-only' behavior: A second-order nonlinear response of ultrasound contrast agent microbubbles." *Journal of the Acoustical Society of America*_129(4): 1729-1739.

Skaug, M. J., Longo, M. L. ve Faller, R. 2011. "The Impact of Texas Red on Lipid Bilayer Properties." *Journal of Physical Chemistry B*_115(26): 8500-8505.

Sorace, A. G., Saini, R., Mahoney, M. ve Hoyt, K. 2012. "Molecular Ultrasound Imaging Using a Targeted Contrast Agent for Assessing Early Tumor Response to Antiangiogenic Therapy." *Journal of Ultrasound in Medicine*_31(10): 1543-1550.

Soucaille P, P. M., Tocanne JF, Teissié J. 1988. "Use of a fluorescein derivative of phosphatidylethanolamine as a pH probe at water/lipid interfaces." *Biochim Biophys Acta*. 939(2): 289-294.

Stefan S. Bordovsky, C. S. W., George D. Bachand, Jeanne C. Stachowiak, and Darryl Y. Sasaki "Engineering Lipid Structure for Recognition of the Liquid Ordered Membrane Phase." *Langmuir*.

Stride, E. ve Edirisinghe, M. 2009. "Novel preparation techniques for controlling microbubble uniformity: a comparison." *Medical & Biological Engineering & Computing*_47(8): 883-892.

Stride, E. ve Saffari, N. 2003. "Microbubble ultrasound contrast agents: a review." *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H-Journal of Engineering in Medicine*_217(H6): 429-447.

Strouthos, C.,Iampaskis, 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 Agent." *iee transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*_57(6): 1296-1310.

Sun, C.,Sboros, V.,Butler, M. B. ve Moran, C. M. 2014. "In Vitro Acoustic Characterization of Three Phospholipid Ultrasound Contrast Agents from 12 to 43 Mhz." *Ultrasound in Medicine and Biology*_40(3): 541-550.

Suzuki, R.,Oda, Y.,Utoguchi, N. ve Maruyama, K. 2011. "Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles." *Journal of Controlled Release*_149(1): 36-41.

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.

Szjjarto, C.,Rossi, S.,Waton, G. ve Krafft, M. P. 2012. "Effects of Perfluorocarbon Gases on the Size and Stability Characteristics of Phospholipid-Coated Microbubbles: Osmotic Effect versus Interfacial Film Stabilization." *Langmuir*_28(2): 1182-1189.

Talu, E.,Lozano, M. M.,Powell, R. L.,Dayton, P. A. ve Longo, M. L. 2006. "Long-term stability by lipid coating monodisperse microbubbles formed by a flow-focusing device." *Langmuir* 22(23): 9487-9490.

Tang, M. X.,Mulvana, H.,Gauthier, T.,Lim, A. K. P.,Cosgrove, D. O.,Eckersley, R. J. ve Stride, E. 2011. "Quantitative contrast-enhanced ultrasound imaging: a review of sources of variability." *Interface Focus*_1(4): 520-539.

Tinkov, S.,Bekeredjian, R.,Winter, G. ve Coester, C. 2009. "Characterization of ultrasound-mediated destruction of drug-loaded microbubbles using an improved in vitro model." *Applied Acoustics*_70(10): 1323-1329.

Tinkov, S.,Bekeredjian, R.,Winter, G. ve Coester, C. 2009. "Microbubbles as Ultrasound Triggered Drug Carriers." *Journal of Pharmaceutical Sciences*_98(6): 1935-1961.

Tu, J., Guan, J. F., Qiu, Y. Y. ve Matula, T. J. 2009. "Estimating the shell parameters of SonoVue (R) microbubbles using light scattering." *Journal of the Acoustical Society of America*_126(6): 2954-2962.

van Wamel, A., Kooiman, K., Harteveld, M., Emmer, M., ten Cate, F. J., Versluis, M. ve de Jong, N. 2006. "Vibrating microbubbles poking individual cells: Drug transfer into cells via sonoporation." *Journal of Controlled Release*_112(2): 149-155.

Veatch, S. L. ve Keller, S. L. 2005. "Seeing spots: Complex phase behavior in simple membranes." *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*_1746(3): 172-185.

Villanueva, F. S. 2010. "Myocardial Perfusion Imaging Using Ultrasound Contrast Agents Now or Never?" *Jacc-Cardiovascular Imaging*_3(9): 944-946.

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.

Wallace, W., Schaefer, L. H. ve Swedlow, J. R. 2001. "A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy." *Biotechniques*_31(5): 1076-+.

Wang, J. F., Wu, C. J., Zhang, C. M., Qiu, Q. Y. ve Zheng, M. A. 2009. "Ultrasound-mediated microbubble destruction facilitates gene transfection in rat C6 glioma cells." *Molecular Biology Reports*_36(6): 1263-1267.

Wang, J. J., Kilic, S., Tom, E., Lu, E. X., Schellenberger, U., Schreiner, G. F., Wagner, W. R. ve Villanueva, F. S. 2005. "Vascular endothelial growth factor-conjugated ultrasound microbubbles adhere to angiogenic receptors." *Circulation*_112(17): U562-U562.

Wang, T. Y., Wilson, K. E., Machtaler, S. ve Willmann, J. K. 2013. "Ultrasound and Microbubble Guided Drug Delivery: Mechanistic Understanding and Clinical Implications." *Current Pharmaceutical Biotechnology*_14(8): 743-752.

Waters, J. C. 2009. "Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy." *Journal of Cell Biology*_185(7): 1135-1148.

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.



Wrenn, S. P.,Dicker, S. M.,Small, E. F.,Dan, N. R.,Mleczko, M.,Schmitz, G. ve Lewin, P. A. 2012. "Bursting Bubbles and Bilayers." *Theranostics*_2(12): 1140-1159.

Yeh, C. K. ve Su, S. Y. 2008. "Effects of acoustic insonation parameters on ultrasound contrast agent destruction." *Ultrasound in Medicine and Biology*_34(8): 1281-1291.

Yu, H.,Lin, Z. S.,Xu, L.,Liu, D. L. ve Shen, Y. Y. 2015. "Theoretical study of microbubble dynamics in sonoporation." *Ultrasonics*_61: 136-144.

Zell, K.,Sperl, J. I.,Vogel, M. W.,Niessner, R. ve Haisch, C. 2007. "Acoustical properties of selected tissue phantom materials for ultrasound imaging." *Physics in Medicine and Biology* 52(20): N475-N484.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. SEVGİ KILIÇ ÖZDEMİR
Proje No:	113M270
Proje Başlığı:	İlk Yerli Üretim Ultrason Kontrast Maddesi Olan Mikroköpükçüklerin In-Vitro Ve In-Vivo Karakterizasyonlarının Yapılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	MUSTAFA MAHMUT BARIŞ, EKREM ÖZDEMİR, OSMAN YILMAZ
Danışmanlar:	MUSTAFA SEÇİL
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. KİMYA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/10/2013 - 15/10/2016
Onaylanan Bütçe:	481920.0
Harcanan Bütçe:	408251.83
Öz:	<p>Ultrasonografi tıpta yaygın olarak kullanılan tanı yöntemlerinden biridir. Ancak, ultrasonografide bazı durumlarda görüntü kalitesi istenen düzeyde değildir. Görüntünün daha net ve açıklayıcı olabilmesi için ultrason kontrast maddesi mikroköpükçüklerin kullanılması gerekmektedir. Bu çalışmada, 2010-2012 yılları arasında TÜBİTAK tarafından desteklenen 109M494 nolu proje kapsamında geliştirilen farklı kompozisyonda ilk yerli üretim mikroköpükçüklerin morfoloji ve ultrason altında in-vitro ve in-vivo stabiliteyi araştırılmıştır. Floresan mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, her bir mikroköpükçüğün kendine özgü yüzey kompozisyonuna ve yüzey morfolojisine sahip olduklarını gösterilmiştir. Gözlenen yüzey morfolojilerinin mikroköpükçüklerin üretim aşamasından görüntüleme anına kadar geçen sürede oluştuğu kanaatine varılmıştır. Mikroköpükçüklerin yüzeyinde monotabaka yapısı yanında kümelenmiş moleküllerin de oluştuğu bölgeler tespit edilmiştir. Mikroköpükçük formülasyonlarına eklenen PEG40St miktarı ile mikroköpükçüklerin ekojenitelerinde artış olduğu saptanmıştır; ancak, mikroköpükçüklerin yüzeylerinde PEG40St miktarı arttıkça mikroköpükçüklerin ultrason altında stabiliteyi azaldığı bulunmuştur. Mikroköpükçüklerin ultrason ile konsantrasyonlarının tespit edilebilmesi için yöntem geliştirilmiştir.</p> <p>Mikroköpükçüklerin, sıçan ve tavşan modellerinde in-vivo uygulamalarında, dolaşıma verilen mikroköpükçüklerin stabil olarak akciğer bariyerini geçebildiği, kalp tarafından arterial sistemik dolaşıma pompalanarak aortada ekojenite oluşturabildiği, ve vasküler yatağın tüm alanlarını doldurabildiği gösterilmiştir. Ticari mikroköpükçük olan Vevomarker® ile karşılaştırmalarda, araştırma kapsamında geliştirilen mikroköpükçüklerin mukayese edilebilir düzeyde oldukları gösterilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Ultrason, kontrast madde, mikroköpükçük, floresan, morfoloji, akustik,
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır