

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOXORUBICIN YÜKLENMİŞ
MİKROKÖPÜKÇÜKLERİN IN-VIVO DENEY
HAYVANI MODELİNDE MEME KANSERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

EFE ÖZGÜR SERİNAN

**TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970183

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOXORUBICIN YÜKLENMİŞ
MİKROKÖPÜKÇÜKLERİN IN-VİVO DENEY
HAYVANI MODELİNDE MEME KANSERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

TEMEL ONKOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EFE ÖZGÜR SERİNAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

II. Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Ekrem ÖZDEMİR

(Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 213M668 No'lu proje kapsamında
desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970183

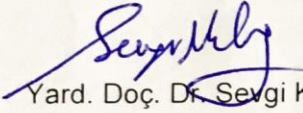
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı,
Temel Onkoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Efe Özgür Serinan
**‘DOXORUBICIN YÜKLENMİŞ MİKROKÖPÜKÇÜKLERİN IN-VIVO
DENEY HAYVANI MODELİNDE MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ’**
konulu Yüksek Lisans tezini 10.07.2017 tarihinde başarılı olarak
tamamlamıştır.


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Temel Onkoloji Anabilim Dalı


Yard. Doç. Dr. Sevgi KILIÇ ÖZDEMİR

ÜYE

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Bölümü


Prof. Dr. Nur ÇELGÜN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Pediyatrik Onkoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Gül den DİNİZ

YEDEK ÜYE

Tepecik Eğitim ve

Araştırma Hastanesi

Prof. Dr. Zekiye ALTUN

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Temel Onkoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR.....	x
ÖZET	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	4
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	4
1.2. Araştırmanın Amacı.....	6
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	7
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Memenin Tanımı Ve Anatomisi	8
2.2. Meme Kanserinin Tanımı	9
2.2.1. Yayılma Eğilimine Göre Meme Kanseri Tipleri	9
2.2.1.1. Lobüler Kanserler	10
2.2.1.1.1. Non-İnvaziv (İn-Situ) Lobüler Kanserler.....	10
2.2.1.1.2. İnvaziv (İnfiltratif) Lobüler Kanserler	11
2.2.1.2. Duktal Kanserler	11
2.2.1.2.1. Non-İnvaziv Duktal Kanserler (Duktal Karsinoma Insitu=DCIS)	11
2.2.1.2.2. İnvaziv (İnfiltratif) Duktal Kanserler	12
2.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	13
2.4. Meme Kanserinde Risk Faktörleri	14

2.4.1. Demografik Özellikler	14
2.4.2.Reprodüktif Etki	15
2.4.2.1. Menopoz Yaşı	15
2.4.2.2. Menarş Yaşı	15
2.4.2.3. İlk Doğum Yaşı	15
2.4.2.4. Emzirme	16
2.4.3. Ailesel/Genetik Faktörler	16
2.4.4. Çevresel Faktörler	16
2.4.4.1.Radyasyon	16
2.4.4.2. Alkol Kullanımı.....	16
2.4.4.3. Beslenme Alışkanlığı.....	17
2.4.4.4. Oral Kontraseptif Kullanımı.....	17
2.4.4.5. Hormon Replasman Tedavisi (HRT) Kullanımı.....	17
2.4.4.6. Sigara Kullanımı	18
2.4.5. Diğer Faktörler.....	18
2.4.5.1.Önceki Benign Meme Hikayesi.....	18
2.5. Tedavi.....	18
2.5.1.Doxorubicin Ve Sınırlayıcı Etkileri	18
2.5.2. Tedavide Yeni Arayışlar	19
2.5.2.1. Lipozomlar	19
2.5.2.2. Hedeflendirilmiş İlaç Taşıma Sistemleri.....	19
2.5.2.3. Mikroköpükçükler.....	20
2.5.2.4. Ultrason İlişkili Terapi	20

3. GEREÇ ve YÖNTEM.	21
3.1. Araştırmanın Tipi	21
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	21
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	21
3.4. Çalışma Materyali	21
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	21
3.6. Veri Toplama Araçları	21
3.6.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	21
3.6.1.1. Kullanılan Cihazlar	21
3.6.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	22
3.6.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	22
3.6.2. 4T1 Hücre Hattının Ekilmesi	23
3.6.2.1. Amaç	23
3.6.2.2. Uygulama Basamakları	23
3.6.2.3. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılıklarının Değerlendirilmesi	24
3.6.2.3.1. Genel İlke	24
3.6.2.3.2. Uygulama Basamakları	25
3.6.3. 4T1 Hücre Hattının Pasajlanması	25
3.6.3.1. Amaç	25
3.6.3.2. Uygulama Basamakları	25
3.6.4. 4T1 Hücre Hattının Kaldırılması ve Toplanması	27
3.6.4.1. Amaç	27
3.6.4.2. Uygulama Basamakları	27

3.6.5. Hayvan Modeli ve Deney Grupları.....	27
3.6.5.1. Farelerde Tümör Boyut Ölçümü	28
3.6.5.1.1. Manuel Tümör Boyut Ölçümü.....	28
3.6.5.1.2. Ultrasonografik Tümör Boyut Ölçümü.....	29
3.6.5.2. Ajan Enjeksiyonlarının Yapılması	31
3.6.5.2.1. Kontrol Grubu	31
3.6.5.2.2. Doxorubicin Grubu.....	32
3.6.5.2.3. Lipozomal Doxorubicin Grubu	32
3.6.5.2.4. Mikroköpükçük Grubu.....	34
3.6.5.2.5. Doxorubicin Yüklendi Mikroköpükçük Grubu	35
3.6.5.3. Hayvanların Sakrifikasyonu	35
3.6.6. Akım Sitometri ile Dokulardaki Apoptoz Yüzdelерinin Belirlenmesi	35
3.6.5.3. Amaç	35
3.6.5.3. Uygulama basamakları.....	38
3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi.....	40
3.8. Verilerin değerlendirilmesi	41
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	41
3.10. Etik Kurul Onayı	41
4. BULGULAR	42
4.1. 4T1 Meme Kanseri Hücre Hattının Çoğaltılması	42
4.2. Manuel Tümör Boyut Ölçümünün Yapılması	42
4.3. Mikroköpükçüklerin Ultrason Altında Görüntülemesinin İn-Vitro Olarak Yapılması	45
4.4. Akım Sitometri ile Apoptoz Tayininin Yapılması	47

4.5. Histopatolojik Değerlendirmenin Yapılması	52
4.6. Biyokimyasal Değerlendirme	61
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
7. KAYNAKLAR.....	74
8. EKLER	79
8.1. Laboratuvar Çalışma İzin Belgesi.....	79
8.2. Etik Kurul Onayı	80
8.3. Özgeçmiş	81
8.4. İngilizce Yayın	85

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Deney ve Kontrol Grupları	28
Tablo 2. Tüm gruptaki 35 hayvanın tümör boyut farkı, nekroz, apoptoz ve canlılık oranlarının ortalamaları	58
Tablo 3. Tüm Gruplara Kruskal Wallis H testi uygulanması sonucu apoptoz oranı, nekroz oranı, canlılık değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi	58
Tablo 4. Kruskal Wallis-H testi sonucu anlamlı çıkan grupların arasında Mann Whitney-U testi uygulanması sonucu tümör boyut farkı, nekroz, apoptoz ve canlılık değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	59
Tablo 5. Tüm Gruplara Kruskal Wallis H testi uygulanması sonucu idrardaki kreatinin, protein ve albümin değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi	62
Tablo 6. Kruskal Wallis-H testi ile anlamlı çıkan gruplara Mann Whitney-U testi uygulanması sonucu Kan-kreatinin, protein, albümin, şeker, Serum Glutamik Oksaloasetik Transaminaz (SGOT), Serum Glutamik Piruvik Transaminaz (SGPT), Laktat Dehidrogenaz (LDH) değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Meme anatomisi içten görünüm.....	8
Şekil 2. Meme anatomisi dıştan görünüm	9
Şekil 3. Noninvaziv lobüler kanser.....	10
Şekil 4. İnvazif lobüler kanser.....	11
Şekil.5. Noninvaziv duktal kanser.....	12
Şekil 6. İnvazif duktal kanser	12
Şekil 7. Hedeflendirilmiş DOX yüklü fosfolipid mikroköpükçüğün şematik görüntüsü	20
Şekil 8. Manuel olarak fare sırtındaki tümör boyutunun ölçülmesi.....	29
Şekil 9. Farenin stabilizasyon tablası üzerine konması ve ultrason probunun üç boyutlu transduser konumlandırma sistemi yardımı ile konumlandırılması	30
Şekil 10.Ultrason altında 3D tümör boyutu ölçümü görüntüsü.....	31
Şekil 11. Manuel ve ultrasonografik volüm ölçümü sonrası kontrol grubu hayvanlarına 0,5 ml hacimde intraperitoneal şekilde serum fizyolojik verilmesi.....	32
Şekil 12. Manuel ve ultrasonografik volüm ölçümü sonrası Lipo-DOX grubu hayvanlarına 0,3 Ml hacimde intravenöz şekilde Lipo-DOX verilmesi	33
Şekil 13. 27 G Kelebek iğne ile fare kuyruk veninin kataterizasyonu.....	34
Şekil 14. Akım sitometri çalışma prensibi	37
Şekil 15. Akım sitometride hücre deteksiyonunun şematik gösterimi	38
Şekil 16. 4T1 Meme kanseri hücrelerinin inverted mikroskop altında görüntüsü	42
Şekil 17. DOX Grubu hayvanlarının 1. ve 4. gün manuel tümör boyutu grafiği	43
Şekil 18. Lipo-DOX grubu hayvanlarının 1. ve 4. gün manuel tümör boyutu grafiği ..	43
Şekil 19. Kontrol grubu hayvanlarının 1. Ve 4. gün manuel tümör boyutu grafiği	44
Şekil 20. MB-DOX grubu hayvanlarının 1. ve 4. gün manuel tümör boyutu grafiği....	44
Şekil 21. MB grubu hayvanlarının 1. ve 4. gün manuel tümör boyutu grafiği.....	45

Şekil 22. 96 Kuyucuklu plate’de ultrasonografik işlemin uygulanması.....	46
Şekil 23. Kuyucuk içindeki mikroköpükçüklerin ultrason altında patlatılmadan önce ve patlatıldıktan sonraki görüntüleri.....	46
Şekil 24. Kontrol grubuna ait akım sitometrik apoptoz analizi görüntüleri.....	47
Şekil 25. MB grubuna ait akım sitometrik apoptoz analizi görüntüleri.....	48
Şekil 26. DOX grubuna ait akım sitometrik apoptoz analizi görüntüleri	49
Şekil 27. MB-DOX grubuna ait akım sitometrik apoptoz analizi görüntüleri.....	50
Şekil 28. Lipo-DOX grubuna ait akım sitometrik apoptoz analizi görüntüleri	51
Şekil 29. Kontrol grubu ile karşılaştırılan diğer grupların apoptoz yüzdeleri.	52
Şekil 30. Kontrol (A), DOX (B) , MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında akciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü.....	53
Şekil 31. Kontrol (A), DOX (B) , MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü.....	54
Şekil 32. Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında beyin dokusunun histopatolojik görüntüsü.....	55
Şekil 33. Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında karaciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü	56
Şekil 34. Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü.....	57

KISALTMALAR

WHI: Womens Health İtiative(Kadın Sağlığı Girişimi Çalışması)

BKİ: Beden Kitle İndeksi

DOX: Doxorubicin

Lipo-DOX: Lipozomal Doxorubicin

MB: Mikroköpükçük

MB-DOX: Doxorubicin Yüklendiş Mikroköpükçük

HRT: Hormon Replasman Tedavisi

FBS: Fetal Bovin Serum

PBS: Phosphate-Buffered Saline

RPM: Rotation Per Minute

3D: 3-Dimension

ml: Mililitre

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

cm: Santimetre

SGOT: Serum Glutamik Oksaloasetik Transaminaz

SGPT: Serum Glutamik Piruvik Transaminaz

LDH: Laktat Dehidrogenaz

TEŞEKKÜR

Bana, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapabilme şansını sunan; tanıdığım ilk doktorum, ikinci annem, Enstitü Müdürümüz Prof. Dr. Nur OLGUN'a;

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda zorunlu stajımı yaptığım ilk andan, bütün lisansüstü eğitim hayatım boyunca benden desteğini esirgemeyen; bana her zaman güven veren ve yüzünü kara çıkarmamak için elimden geleni yapacağım saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a;

Kendisinden bilgi ve çalışma disiplini adına çok şey öğrendiğim saygıdeğer hocam Doç. Dr. Zekiye ALTUN'a;

Saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Ekrem ÖZDEMİR ve Yard. Doç. Dr. Sevgi KILIÇ ÖZDEMİR'e;

Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda, bilgi ve tecrübesiyle bana yol göstermiş saygıdeğer tüm hocalarıma, Onkoloji Enstitüsü idari personeline;

Tüm desteklerinden ötürü sayın Halil ATEŞ'e;

Temel Onkoloji Yüksek Lisans ve Doktora programındaki tüm çalışma arkadaşlarıma;

Her türlü zorluğu aşmada birlikte üstesinden geldiğimiz laboratuvar çalışma arkadaşlarım Ayça PAMUKOĞLU, Pınar ERÇETİN ÖZDEMİR, Banu DEMİR ve Melek AYDIN, Cansu ÖNERCAN ve Gülşah KÜRKÇÜ'ye;

213M668 No'lu proje kapsamında yüksek lisans eğitimimde sağladığı burstan ötürü TÜBİTAK kurumuna;

En son ancak en önemli olarak; her ihtiyaç duyduğumda, sevgisi, bilgisi ve deneyimleri ile bana destek veren ilk idolüm; babam Nihat Faik SERİNAN ve hayattaki en önemli varlığım; annem Gülçin SERİNAN'a, bana sabır ve sevgiyle destek veren, huzur kaynağım; kız arkadaşım Safiye DEMİR'e;

Minnet duyuyor ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak bu tezi; beni her zaman izlediğine emin olduğum, dedem İsmet ÖZLÜ'ye ithaf ediyorum.

Efe Özgür SERİNAN

İzmir, Temmuz 2017

DOXORUBICIN YÜKLENMİŞ MİKROKÖPÜKÇÜKLERİN IN-VİVO DENEY HAYVANI MODELİNDE MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Efe Özgür SERİNAN

Yazışma Adresi: Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET

Meme kanserinde, beklenmedik yan etkilerle tedavi sürecini olumsuz etkileyen standart yöntemlerin aksine mikroköpükçükler (MB) kanser ile mücadelede yeni bir yaklaşım olabilir. Bu çalışmanın amacı, Doksorubisin (DOX) yüklenmiş ilk yerli üretim hedeflendirilebilir özellikte ultrason kontrast ajanı MB'lerin, in-vivo deney hayvanı modelinde, hedeflenen bölgeye ulaştırılması, ultrason altında görüntülenmesi, hedef bölgede MB'lerin patlatılması ve bu sayede ilacın hedef bölgede kontrollü salınımı, buna bağlı olarak özellikle kanser tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağının belirlenmesidir.

Doksorubisinin (DOX) ve lipozomlara hapsedilmiş DOX'un (Lipo-DOX) 4T1 meme kanseri hücrelerine in-vitro etkisi incelendi. MB'lerin ultrason altında görüntülenmesi ve ultrason altında kontrollü bir biçimde patlatılabildiğinin in-vitro olarak gösterilmesi sağlandı. Hayvan modeli için yaklaşık 6 haftalık dişi atimik nude fareler kullanıldı. Her bir grupta 7 hayvan olmak üzere 5 deney grubu oluşturuldu. GrupI; Kontrol Grubu, GrupII; DOX Verilen Grup, GrupIII; MB Uygulanan Grup, GrupIV; DOX Yüklü MB Uygulanan Grup, GrupV; Lipo-DOX uygulanan Grup. 4T1 hücreleri subkutan enjekte edilerek oluşturulmuş tümörlerin çapı 1cm'ye geldiğinde, nude farelere ultrason altında 3 boyutlu tümör volüm ölçümünü takiben ilaç uygulamaları yapıldı. İlaç uygulanan fareler çalışmanın 4. günü yine ultrason altında 3 boyutlu tümör volüm ölçümünü takiben sakrifiye edildi. Dokular (akciğer, karaciğer, böbrek, beyin, tümör) formol fiksasyonu ile takip sonrasında kesitlerde Hemotoksilen-Eosin ile boyanarak histopatolojik olarak değerlendirildi.

Hayvanlara, meme kanseri 4T1 hücrelerinde literatür bilgisi ile de konfirme edilmiş LD50 dozu olan 5 mg/kg DOX uygulandı. Atimik nude farelerden sakrifikasyon

sırasında alınan dokulardan yapılan histopatolojik değerlendirmede akciğer, karaciğer, böbrek, beyin ve tümör dokuları incelendi. Akciğer, böbrek ve beyinde, tüm gruplar için normal histoloji gözlendi. Karaciğerde ise, DOX ve Lipo-DOX gruplarında, her bir gruptaki 7'şer olgunun parenkiminde spotty nekroz tarzında hasar, hafif düzeyde gözlendi. Tümör boyut farkı, gruplar arasında istatistiksel anlam vermezken ($p=0,145$) nekroz oranı, apoptoz oranı, hücre canlılığı ve karaciğer hasarı istatistiksel anlamlı saptandı.

Çalışmamız sonucunda, ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin, in-vitro ve in-vivo koşullarda ultrason altındaki görüntülemede kontrast yarattığı ve kontrollü olarak patlatılabildiği gösterilmiştir. DOX ve Lipo-DOX'un LD₅₀ dozlarının nude farede oluşturmuş tümörde nekroza yol açtığı gösterilmiştir.

Gelecek çalışmalarda, mikroköpükçüklere birden fazla dozda DOX yükleme ile deneylerin yapılması, ultrason altında mikroköpükçüklerin patlatılma işleminin birden fazla kere yapılması ve tümör boyutunda istatistiksel anlamlı klmeyi grebilmek için sakrifikasyona kadar geen sürenin uzatılması nerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Lipozom, Doksorubisin, Mikroköpükçük, Ultrasonografi

THE EFFECT OF DOXORUBICINE LOADED MICROBUBBLES ON BREAST CANCER IN IN VIVO EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL

In-vitro effects of doxorubicin (DOX) and Doxorubicin confined to liposomes (Lipo-DOX) on 4T1 breast cancer cells were examined. MB images were displayed under ultrasound and demonstrated to be detonated under ultrasound in a controlled manner.

Approximately 6 weeks of female athymic nude mice were used for the animal model. 5 experimental groups were formed. The number of animals in each group was determined as 7.

When 4T1 cells were subcutaneously injected and the tumors reached 1cm in diameter, nude mice underwent 3-dimensional tumor volume measurement under ultrasound followed by drug administration. The drug-treated mice were sacrificed on the 4th day of the study, again following a 3-dimensional tumor volume measurement under ultrasonication. The tissues (lung, liver, kidney, brain, tumor) were stained with hematoxylin-eosin in sections after formalin fixation and histopathologically evaluated. The animals were also treated with 5 mg / kg DOX, which is a well-documented LD50 dose, in the breast cancer 4T1 cells. Lung, liver, kidney, brain and tumor tissues were examined histopathologically from tissues taken during sacrifice of athymic nude mice. Normal histology was observed in all groups in the lung, kidney and brain. In the liver, in the DOX and Lipo-DOX groups, the damage in the spotty necrosis style was observed mildly in the parenchyma of 7 cases in each group. Necrosis rate, apoptosis rate, cell viability and liver damage were statistically significant when the tumor size difference did not give statistical significance between the groups ($p = 0,145$).

As a result of our study, it has been shown that ultrasound contrast agent microbubbles can be contrasted and controlled in vitro under in vivo conditions under ultrasound imaging. Doses of LD50 of DOX and LIPODOX have been shown to induce tumor necrosis in nude mice.

In future studies, it is proposed to perform experiments with Doxorubicin loading at high doses of microbubbles, prolongation of microbubbles until sacrifice to see if the microbubbles are detonated more than once under ultrasound and statistically significant decrease in tumor size.

Keywords: Breast Cancer, Liposome, Doxorubicin, Microbubble, Ultrasonography

1.GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Meme kanseri kadın sağlığını olumsuz etkileyen ve günümüzde giderek artan görülme sıklığı ile yaygın bir sağlık sorunu haline gelmiş bir kanser çeşididir. Meme kanseri gelişmiş ülkelerin çoğunda yeni teşhisli malignitelerin 3'te 1'ini oluşturmaktadır ve bu oranıyla kadınlar arasında en sık görülen tümörlerden biridir. Avrupa'da yılda 180.000, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda 184.000 yeni olgu saptanmaktadır. 2015 yılında yayınlanan istatistik çerçevesinde dünya genelinde yaklaşık 1,7 milyon meme kanseri vakası ve 521,900 meme kanserine bağlı ölüm gözlenmiştir. Dünya geneline bakıldığında ise meme kanseri tüm kanser vakalarının %25'ini oluşturur ve kadınlar arasındaki kanser ölümlerinin %15'ini oluşturur (1). Farklı alt tipleri ve bu alt tiplerdeki belirli patolojik özellikler ve biyolojik davranışlara sahip olması nedeniyle oldukça heterojen bir hastalıktır (2). Alman Kimyacı Paul Ehrlich'in ilk defa çeşitli kimyasalları deney hayvanları üzerinde gözlemlemesi ve bu kimyasalların anti kanser potansiyellerini belgelemesi ile "kemoterapi" temini keşfetmesinden bu yana kemoterapi 20.yy'dan beri, kanser tedavisinde uygulanan en yaygın ve etkili yöntemdir (3). Ancak tedavi süresince veya tedavi sonrasında başarılı olabilmek için hastalara çoğu zaman birden fazla antikanser ilaç verilmekte; bununla birlikte ilaçların hedeflenmiş ve bölgesel salınım olmadan verilmesi ilaç direncine neden olabilmekte ve bu durum da kemoterapi etkinliğini ve dolayısıyla başarıyı büyük ölçüde engellemektedir (4). Bu duruma çoklu ilaç direnci [multiple drug resistance (MDR)] denilmektedir. MDR, kanser hücrelerinin çok çeşitli ilaç kullanımı sonucunda bu ilaçlara karşı bir direnç göstermesi ve nihayetinde yapısal ve fonksiyonel olarak çok çeşitli ilaçlara karşı bile hayatta kalması olarak tanımlanmış bir durumdur. MDR'nin üstesinden gelebilmek için ilaç dozları artırılmakta, bunun sonucunda ise kontrolü mümkün olmayan yan etkiler oluşmakta, dolayısıyla tedavi giderek zorlaşmaktadır.

Birçok antikanser ilacın etkinliği, ilacın ulaştığı bölgede yeterli konsantrasyona sahip olamaması ve sağlıklı doku ve hücrelere, geri dönüşümü olmayan farmakolojik etkiler oluşturması nedeniyle sınırlıdır (5).

Tümör dokusu arasındaki mikroköpükçüklerin, tümör kan damarlarına salınımından sonra kontrollü bir şekilde tetiklenerek ilaç salınımının yapılması, en yüksek lokal ilaç

konsantrasyonunu sağlayıp normal dokulara ilaç dağılımını daha düşük seviyede tutabilir (6). Kemoterapide ilaç taşınımı dizaynındaki en ana hedeflerden biri budur.

Diğer kanser çeşitlerinde olduğu gibi meme kanserinde de genel ilaç tedavisinde vücuda enjekte edilen ilaç yalnızca hastalıklı hücreleri değil, aynı zamanda vücudun tüm bölgelerine yayılarak sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. Bu nedenle meme kanseri tedavisinde, yan etkileri azaltmak için ilaçların bölgesel salınımı çok önemlidir.

Klasikleşmiş kemoterapinin tedavide yetersiz kalma nedenlerinden biri olarak tümörde görülen damarlanma da örnek gösterilebilir.

Tümörde görülen damarlanma; oldukça heterojen, geniş bölgelere yayılmış, lineer yapıdan uzak; özetle oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir.

Buna ek olarak tümör dokusunda görülen, dokular arası boşluktaki sıvı basıncının yüksek olması, hücrelerin ve damarların iç basıncı artırarak yüksek dış basıncı dengelemeye gitmesine yol açtığından, tümör dokusunda sıvı aktarımı azalmakta; dolayısıyla terapötik ajanların etkisinin istenilen seviyeye ulaşamamasına neden olmaktadır (7).

Kemoterapötiklerin mikroköpükçük gibi mikroköpükçüklerde kapsülasyonu; lipozomlar, polimerik miseller, oyuk yapıya sahip partiküller vb. şekilde yapılabilmekte olup, kapsülasyon ilaç konsantrasyonunu sulu faz içinde bariz bir şekilde arttırıp, önceki ilaçların sulu fazdaki düşük konsantrasyonları nedeniyle yaşadıkları başarısızlıkları ortadan kaldırmayı hedeflemektedir.

Nanoteknolojinin gelişimi, tıpta ilaç taşınımı başta olmak üzere kanser teşhisi ve tedavisinde çığır açıcı gelişmelerin oluşmasını sağlamıştır. Son 10 yılda nanotıp, kemoterapötik ilaçların geniş yan etkileri ve ilaç direnci gibi birçok problemin çözümü olmaya aday, tıbbın yeni bir alanı olarak gelişimini sürdürmektedir (7). Nanomateryaller spesifik bir dokuya ve bunun reseptörlerine yönelik hedeflendirilebilmekte ve ilaç yüklenecek şekilde dizayn edilebilmektedir. Bu da ilacın tümör dokusundaki spesifikliğinin artışına ve sağlıklı dokuda minimal yan etkinin görülmesini sağlayabilir.

Nano partiküller permeabiliteyi arttırması ve tümör mikroçevresinde ilaç tutulumunu arttırması gibi nedenlerden ötürü çok iyi birer tümör hedefleyici araçlar olarak kullanılabilirler ve bu sayede MDR mekanizmalarını yenmek üzere kullanılabilirler (8).

Buna ek olarak; artmış vasküler geçirgenlik, tümörde zayıf lenfatik drenaja yol açar. Bu pozitif etki, tümör dokusuna salgılanan parçacıkların daha uzun tutulmasını sağlar. Bu da, tümörde görülen damarlanma ve dokular arası basıncın yüksek olması nedeniyle ilaç etkinliğinin düşük olması sorunun çözümünde de nanomateryaller kullanılabileceğinin göstergesidir.

Ultrasonografi, tıpta çeşitli hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan tanısal bir görüntüleme yöntemidir.

Geleneksel kemoterapi tedavisinde ortaya çıkan ilaç konsantrasyonunun yeterli düzeyde olmayışı, tümör damarlanması sonucu tümör dokusuna istenilen miktarda kemoterapötik ajanın ulaştırılamaması, hedeflenmiş bir tedavi uygulanamaması sonucu sağlıklı dokuda hasarın büyük olması gibi sınırlandırmalar ultrason ilişkili kemoterapötik yüklü mikroköpükçüklerin tedavide kullanımıyla aşılabılır.

Ultrason ilişkili, yani ultrason altında izlenebilen ve gerektiğinde cihazın mekanik indeks değeri artırılarak sonikasyon altında patlatılabilen mikroköpükçükler, terapötik ajanların tümör dokularına ulaştırılmasındaki yeni potansiyel nanoparçacıklar olarak görülmektedir (7).

Tümör damarlanması içindeki ultrason-ilşkili mikroköpükçüklerin, ultrason dalgalarıyla etkileşimi sonucunda, mikroköpükçüklerin titreşimi sağlanabilir. Bu da damarların iç duvarlarında hasara, yırtıklara neden olabilir. Sonuçta tümörün damar geçirgenliğinde artışa yol açılabilir. Böylelikle ilaç taşınımındaki zorlukların üstesinden gelinebilir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ultrason altında patlatılabilecek ilaç yüklü mikroköpükçüklerin hayvan tümörlerinin tedavisinde umut vadettiği gösterilmiştir.

1.2.Araştırmanın Amacı

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

1.3.Araştırmanın Hipotezleri

Ultrason altında izlenebilen ve sonikasyon altında patlatılabilen doxorubicin yüklü mikroköpükçükler, in vitro deney hayvanı modelinde meme kanseri üzerine

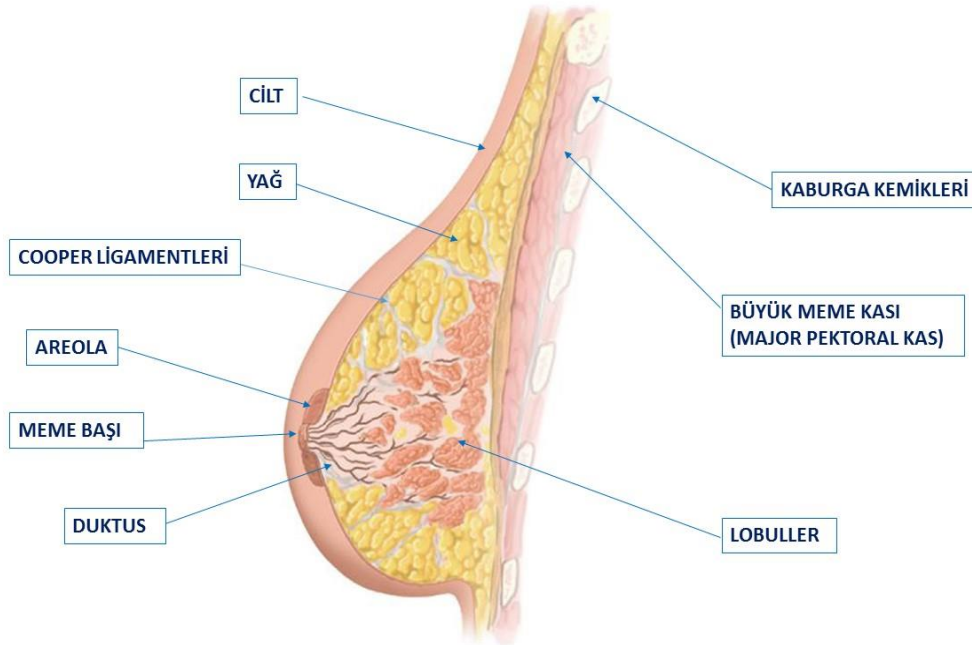
- 1) Hedeflenmiş tedavi ajanı olarak kullanılabilirler.
- 2) Tedavi edici etkiye sahiptir.
- 3) Sistemik dolaşıma enjekte edilen mikroköpükçükler ultrason ile görüntüleme de kontrast yaratarak, elde edilen görüntünün netliğini, kalitesini ve çözünürlüğünü artırır.



2.GENEL BİLGİLER

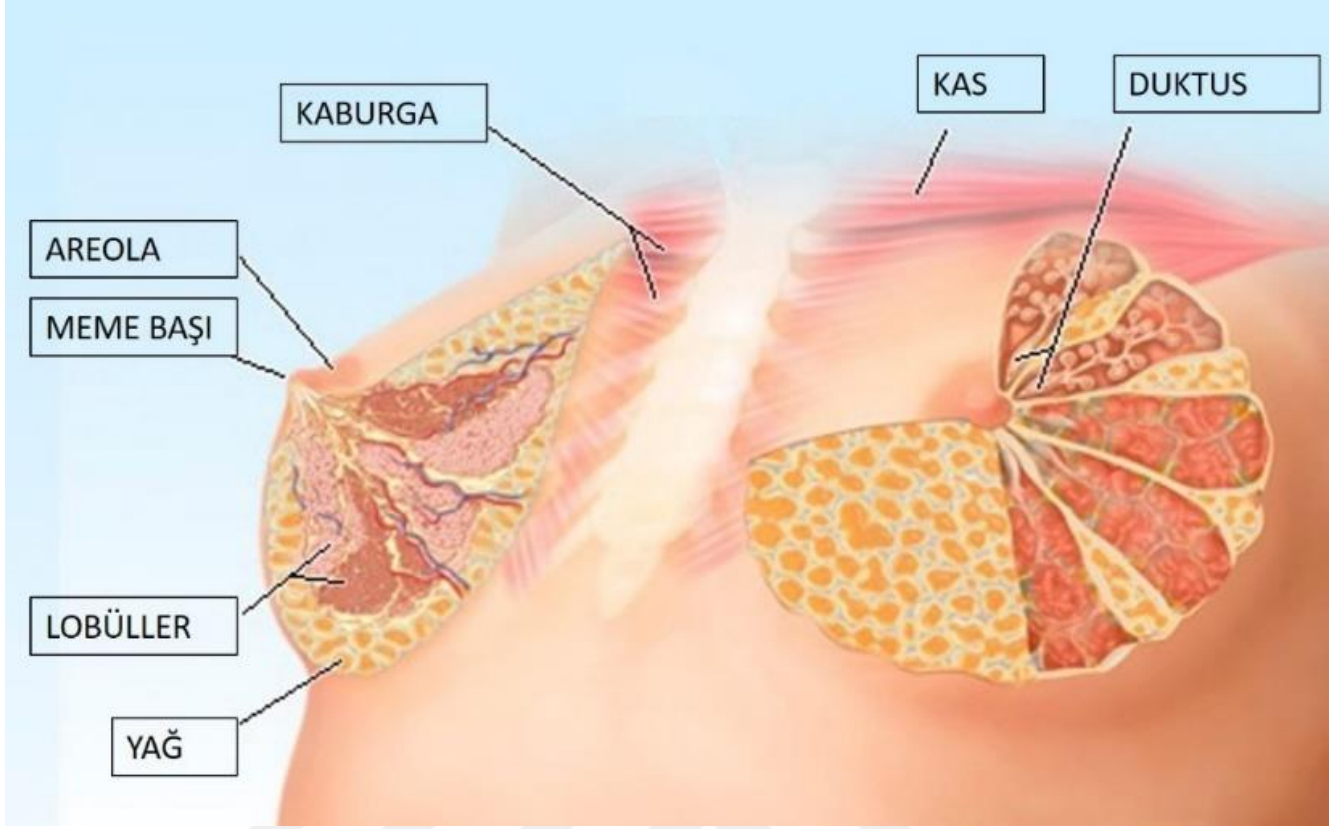
2.1. Memenin Tanımı ve Anatomisi

Meme, kadınlarda süt üretimi ve salgılanmasından sorumlu, ter bezinden farklılaşmış bir organdır. Süt yapımını sağlayan bezlerin oluşturduğu lobüller sistem, sütün meme başına aktarımını ve boşaltılmasını sağlayan duktus sistemi ve dokuların arasını oluşturan yağ ve bağ dokudan oluşur (9). Memenin kendisi kas dokusu içermez ancak göğüs duvarının en büyük kası olan pektoral adalelerin üzerine oturmuştur. Memelerin iç yapısında lobüllerin birleşmesiyle loblar oluşur. Her memede 15–20 lob, her lobda da süt üretimini yapan birimler olan 20–40 kadar lobüller bulunur. Lobüllerin sayısı; fizyolojik koşullara bağlı olarak değişmektedir (10). Lobların çevresini dolduran yağ dokusu memeye şeklini ve boyutunu verir. Lobüller hormonal uyarılara yanıt olarak süt üretirler. Her bir lobdan gelen süt kanalları (duktus), süt sinüsleri ile meme ucunda sonlanır. Meme başının çevresindeki koyu renkli yuvarlak bölgeye areola denir. Cooper bağları(adını göğüs anatomisinin anlaşılması adına yazdığı kitapla tanınan Sir Astley Cooper'dan almaktadır), meme dokusunu, üzerindeki cilde bağlar. Meme dokusunun dik duruşu, Cooper bağları ile sağlanmaktadır (9,10).



Jesinger RA, Breast Anatomy for the Interventionalist. Tech Vasc Interv Radiol. 2014;17(1);3-9'ten uyarlanmıştır.

Şekil 1. Meme Anatomisi İçten Görünüm



http://www.medicinenet.com/image-collection/breast_anatomy_picture/picture.htm'den uyarlanmıştır.

Şekil 2. Meme Anatomisi Dıştan Görünüm

2.2. Meme Kanserinin Tanımı

Meme kanseri, meme dokusunda bulunan epitelyal kökenli hücrelerden kaynaklanan kötü huylu tümörlerin genel adıdır. Meme, yapısal olarak lobüler ve duktal olmak üzere iki ana kısımdan oluştuğundan, memede gelişen tümörler de, süt salgılayan kısımdan gelişen tümörler olan lobüler kanser ve süt kanallarından gelişen duktal kanser olmak üzere ikiye ayrılır.

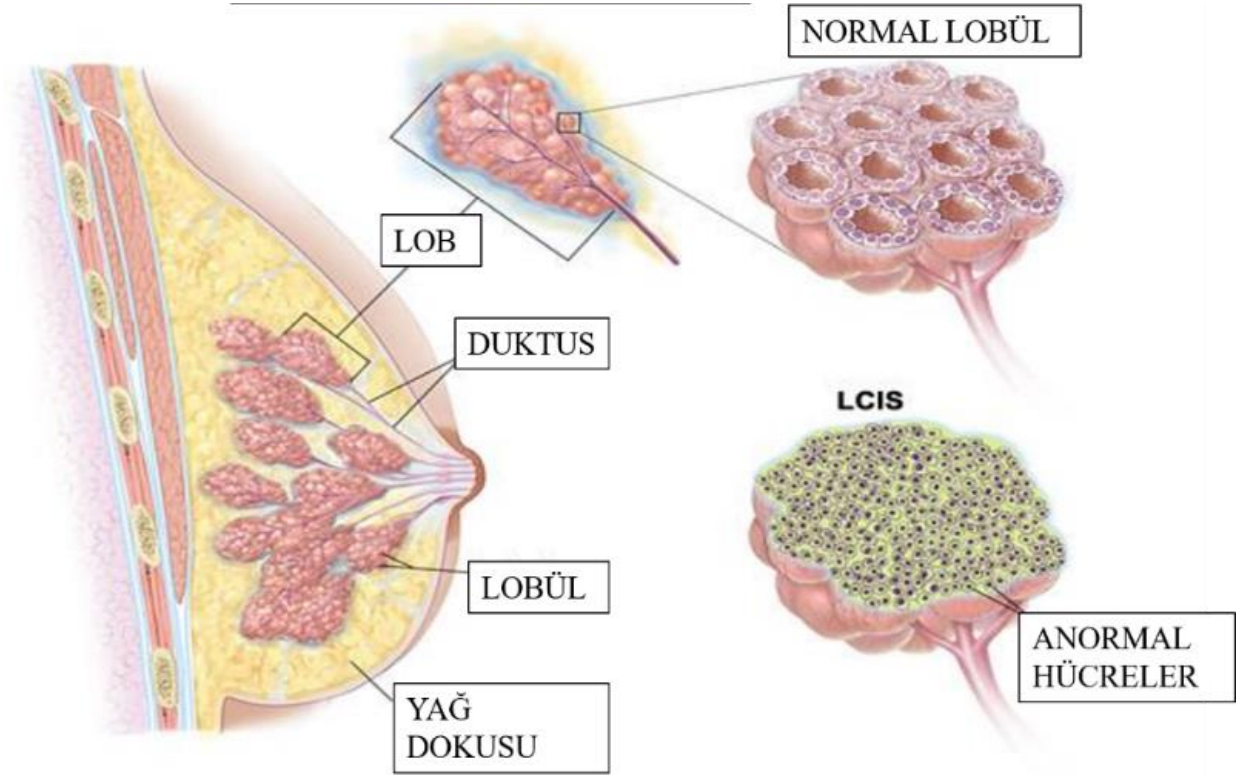
2.2.1. Yayılma Eğilimine Göre Meme Kanseri Tipleri

Yayılma eğiliminin olup olmasına göre ise meme kanseri, noninvaziv ve invaziv olmak üzere 2'ye ayrılır. Noninvaziv (in situ) meme kanserinde, malign hücreler çevre dokuya yayılmaksızın lobüller ya da duktuslar içinde çoğalırlar. İnvaziv meme kanserinde ise malign hücreler memenin duktuslarında meydana gelir ve lenf, kan damarları ve çevre meme dokusuna yayılım gösterir. Noninvaziv ve invaziv meme kanserleri duktusta veya lobülde oluşumuna göre de alt tiplere ayrılırlar.

Lobüler Kanserler

2.2.1.1.1. Noninvaziv (insitu) Lobüler Kanserler (Lobüler karsinoma insitu= LCIS)

Lobül içinde sınırlı kalan, çok yavaş gelişen ve genellikle belirgin bir kitle oluşturmeyen türdür. Bu nedenle de tanı konulmayabilir.

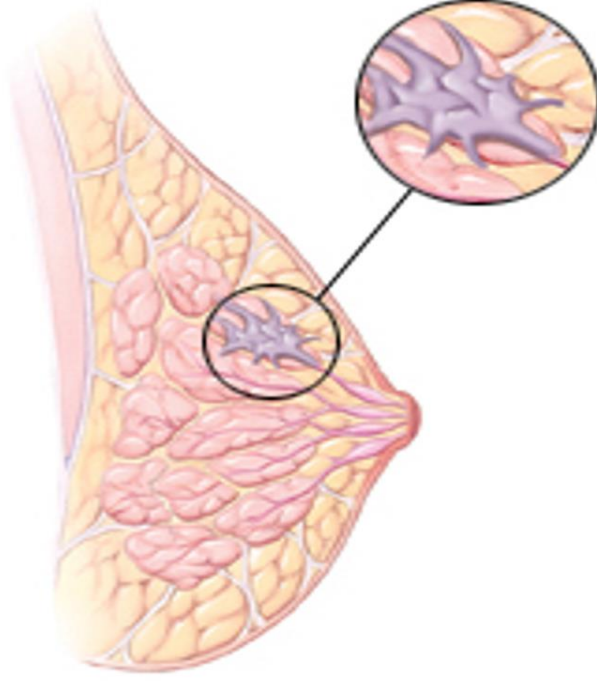


<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=44433>'den uyarlanmıştır.

Şekil 3. Noninvaziv Lobüler Kanser

2.2.1.1.2. İnvaziv (infiltratif) Lobüler Kanserler

Nadir olmakla birlikte süt bezlerinde başlayıp çevre dokulara yayılan türdür.



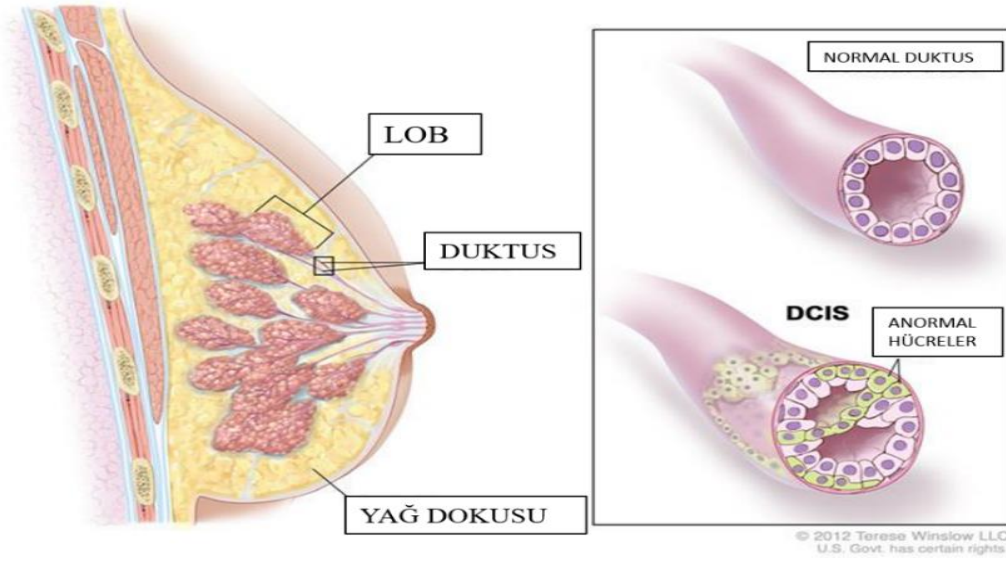
<http://www.health.harvard.edu/womens-health/breast-cancer>'den uyarlanmıştır.

Şekil 4. İnvaziv Lobüler Kanser

2.2.1.2. Duktal Kanserler

2.2.1.2.1. Noninvaziv (insitu) Duktal Kanserler (Duktal karsinoma insitu= DCIS)

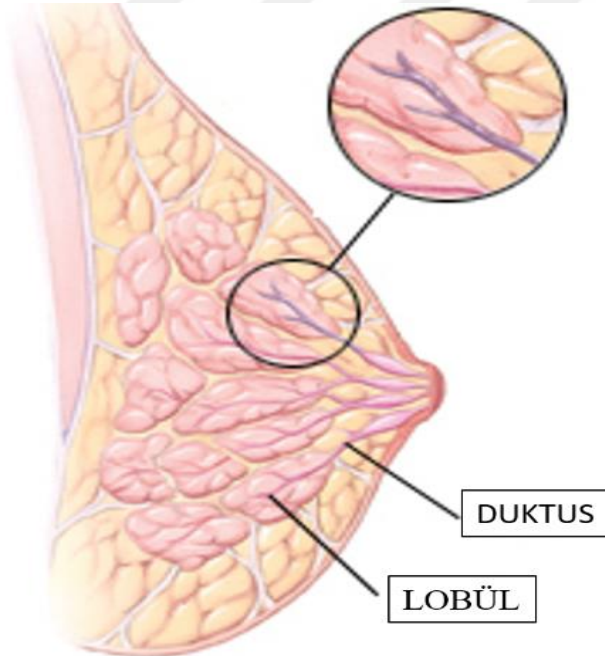
Süt kanalları içinde sınırlı, belirgin bir büyüklüğe ulaşabilen ve tedavi edilmediği takdirde invaziv duktal karsinoma dönüşebilen türdür.



<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancerterms?cdrid=45674>'den uyarlanmıştır.

Şekil.5. Non-invazif Duktal Kanser

2.2.1.2.2. İnvaziv (infiltratif) Duktal Kanserler: Süt kanallarında başlayıp tüm meme dokusuna yayılabilen ve en sık görülen türdür.



<http://www.health.harvard.edu/womens-health/breast-cancer>'den uyarlanmıştır.

Şekil 6. İnvazif Duktal Kanser

2.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri (MK) dünyada en sık görülen ikinci kanser ve kadınlar arasında, bugüne kadar en sık görülen kanser türüdür (11). Meme kanseri dünyadaki kadınlar arasındaki tüm kanserlerin %10'undan fazlasını oluşturur (12). Kadınlarda kanser nedenli ölümler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Her yıl dünyadaki yaklaşık 230.000 kadına invaziv meme kanseri tanısı konmakta ve bunun sonucunda yaklaşık 40.000 hasta ölmektedir (13)

Meme kanserinde Amerika; yılda 100.000'de 80-90 görülme sıklığı ile ilk sıralarda yer alırken, Japonya'da bu değer 100.000'de 12-15 arasındadır (14). Ancak 1970'ten bu yana Asya ülkelerindeki gelişimin ve doğurganlığın batı tarzı olması nedeniyle Japonya, Singapur ve Çin'de meme kanserinin görülme oranındaki fark giderek azalmaktadır. Meme kanserinin görülme sıklığındaki en büyük artış Kanada, ABD, İspanya ve İsveç'te ortaya çıkmıştır (14).

Yaş, kişisel ve aile öyküsü ve yüksek meme yoğunluğu gibi birçok bilinen meme kanseri risk faktörü vardır.

ABD'de meme kanserlerinin yaklaşık %19'unda 30-49 yaş kadınlarda teşhis konur ve %44'ü 65 yaş ve üzeri kadınlarda görülür.

Japonya'da, 35 yaşın altında meme kanseri tanısı alan kadınlar, Tüm meme kanseri hastalarının yaklaşık %3'ünü oluşturmaktadır (11). 2013 yılında yapılan bir çalışmada, ABD kadınları arasında yaklaşık 232.340 yeni invaziv meme kanseri vakası, 64.640 yeni in situ meme kanseri teşhisi ve 39.620 meme kanserine bağlı ölüm beklendiği belirtilmiştir (14)

Bu çalışmada in situ tanı alan 1.900 hasta 40 yaşından küçük, 15.650 hasta 40-50 yaş aralığında, 26.770 hasta 50-64 yaş aralığında ve 22.220 hasta 65 yaşından büyüktür.

İnvaziv vakaların 10.980'i 40 yaşından küçük, 48.910 hasta 40-50 yaş aralığında, 84.210 hasta 50-64 yaş aralığında ve 99.220 hasta 65 yaşından büyüktür.

Meme kanserine bağılı ölümlere bakıldığında ise; 1.020 hasta 40 yaşından küçük, 4.780 hasta 40-50 yaş aralığında, 11.970 hasta 50-64 yaş aralığında ve 22.870 hasta 65 yaşından büyüktür.

Aynı çalışma grubu tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışmada, 2015 yılında ABD'li kadınlarda yaklaşık 231.840 yeni invaziv meme kanseri vakası, 60.290 yeni in situ meme kanseri teşhisi ve 40.290 meme kanserine bağılı ölüm beklendiğı belirtilmiştir (15). İnvaziv vakaların 10.500'i 40 yaşından küçük, 35.850 hasta 40-50 yaş aralığında, 54.060 hasta 50-60 yaş aralığında ve 131.430 hasta 65 yaşından büyüktür. Meme kanserine bağılı ölümlere bakıldığında ise; 1.010 hasta 40 yaşından küçük, 3.690 hasta 40-50 yaş aralığında, 7.600 hasta 50-60 yaş aralığında ve 27.990 hasta 65 yaşından büyüktür.

Ülkemizde ise 1992-2003 yılları arasındaki 3897 meme kanserli hastanın yaş dağılımına bakıldığında, meme kanseri görölme oranlarının 45-49 yaş aralığında %16,99, 40-44 yaş aralığında %14,8 ve 50-54 yaş aralığında %13,6 olduğı belirtilmiştir (16).

2.4. Meme Kanserlerinde Risk Faktörleri

Meme kanseri gelişiminde rol oynayan etmenler olan risk faktörleri, 5 ana başlıkta sınıflandırılabilir.

2.4.1. Demografik Özellikler

Kadın cinsiyeti meme kanseri gelişimindeki risk faktörlerinin en büyüğü olarak görölmektedir ve risk artışı 100 kat olarak ifade edilir (17). Kadın cinsiyeti kadar yaşlanma, yeni meme kanseri oluşumu için en büyük faktörlerden biridir. Amerika'da, meme kanseri riski 60 ila 79 yaş arasındaki kadınlar için 13'te 1, 40 ile 59 yaşları arasında 24'te 1 ve 39 yaş ve altı kadınlarda 229'da 1'dir (18). Günümüz koşullarında, bir kadının in situ meme kanserine yakalanma riski 6'da 1 iken ve invazif meme kanserine yakalanma riski 8'de 1'dir. Yaşın ilerlemesi meme kanseri riski doğru orantılı olarak artış göstermektedir (17). Ancak akciğer kanseri ile karşılaştırıldığında meme kanseri insidansı daha gençken daha yüksektir (19).

Meme kanseri görölme sıklığı beyaz kadınlarla karşılaştırıldığında, siyah tenli kadınlarda %20 daha az olmasına karşın mortalite oranları siyah tenli kadınlarda daha

fazladır. Bu durumun açıklaması ise iki etnik grup arasındaki sosyo-ekonomik farklılıklar ve yaşam tarzı farklılıkları olarak belirtilmektedir (17).

2.4.2. Reprodüktif Öykü

2.4.2.1. Menopoz Yaşı

Over fonksiyonları; yani menarş, gebelik ve menopoz, östradiol, östriol ve östron gibi östrojen alttiplerinin modülasyonu ile sağlanır (17).

Östrojen hormonuna maruz kalınan sürede artışın olması, meme kanseri gelişme riskinde artışla ilişkili iken östrojene maruz kalınan sürenin azalmasının ise koruyucu olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle menstrüasyona erken başlayan veya geç menopoz geçiren kadınlarda, meme kanseri geliş riski yüksektir (19).

Menopoz başlangıcındaki her 1 yıllık gecikme, riskin % 3 oranında artması ile ilişkilidir (18).

55 yaşından sonra doğal bir menopoz olan kadınlar, 45 yaşından önce menopoz yaşayan kadınlarda meme kanseri gelişme olasılığının iki kat daha yüksektir (19).

2.4.2.2. Menarş Yaşı

Menarş başlangıcındaki 1 yıllık bir gecikme, sonraki hayatta meme kanseri gelişme riskinde % 5 azalma ile ilişkilidir. 11 yaş veya daha öncesinde menarş olunması meme kanseri için bir risk faktörü olarak kabul edilirken menarş başlangıcının 15 yaş veya daha büyük olması bir koruyucu faktör olarak kabul edilir (18).

2.4.2.3. İlk Doğum Yaşı

Kadınlarda doğum sonrası yaklaşık 5 yıl boyunca meme kanseri riskinde azalma meydana gelir. Her doğum meme kanseri görel riskini % 7 oranında azaltır. Bu koruyucu etki, çocuk sayısı ile birlikte artar (18).

Hiç doğum yapmamış olmak veya ilk doğumdaki geç yaş, ömür boyu meme kanseri insidansını arttırır. 30 yaşından sonra ilk çocuğu olan kadınlarda meme kanseri riski, 20 yaşından önce ilk çocuğu olan kadınların yaklaşık iki katı kadardır.

En yüksek risk grubunu ise 35 yaşından sonra ilk çocuğu olan kişiler oluşturur; bu kadınlar hiç doğum yapmamış kadınlara göre daha yüksek risk altında görünmektedir (19).

2.4.2.4. Emzirme

Emzirmenin meme kanseri riskini azaltmada rolü olduğu uzun zamandan beri düşünülmektedir. Epidemiyolojik kanıtların gözden geçirilmesinin sonuçları, Meme kanserine karşı koruyucu etkisi istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç ifade edemese de, emzirmenin premenopozal kadınlarda meme kanserini riskini daha belirgin bir şekilde azalttığı bilinmektedir (17,18).

2.4.3. Ailesel/Genetik Faktörler

Farklı kanserlerde yapılan aile çalışmaları; kanser olan hasta bireyin birinci ve ikinci derece yakınlarında kanser riskinin normal popülasyona göre artmış olduğunu göstermektedir (18). Ailede aynı tip kanserin görülmesi durumunda kalıtsal kanser, farklı tip kanserlerin görülmesi durumunda ise kanser ailesi olarak tanımlanmaktadır. Meme kanserinin aile hikayesinde var olması önemli bir risk faktörüdür. Bir adet birinci derece akrabada meme kanseri olması, meme kanseri riskini 1.80 kat artırırken, iki tane birinci derece akraba varlığında ise bu risk 2.9 kat artar. Meme kanserine yakalanmış olan akraba 30 yaşından önce tanı almış ise risk 2.9 kat, 60 yaşından sonra tanı konmuş ise risk 1.5 kat artar.

2.4.4. Çevresel Faktörler

2.4.4.1. Radyasyon

Özellikle 10-14 yaş arasında, memenin aktif olarak geliştiğı dönemde, radyasyona maruz kalma meme kanseri riskini artırmaktadır (17).

İkinci Dünya Savaşı sırasında radyasyona maruz kalan genç kızlarda meme kanseri riskinin iki katına çıktığı gözlemlenmiştir (19). Erken yaştaki maruziyetin aksine 45 yaşından sonra radyasyona maruz kalma veya radyoterapi meme kanseri riskini etkilememektedir (17).

2.4.4.2. Alkol Alımı

Alkol tüketiminin östradiol serum düzeylerini yükselttiğı bilinmektedir. Bazı çalışmalar alkol tüketimi ile meme kanseri insidansı arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir, ancak ilişki tutarsızdır ve ilişki alkolden ziyade diğer diyet faktörleri ile birlikte olabilir.

2.4.4.2. Beslenme Alışkanlığı

Yağ içeriği yüksek yiyeceklerin uzun süreli tüketiminin de serum östrojen düzeylerini yükselterek meme kanseri riskinde artışa katkıda bulunduğunu düşündüren bazı kanıtlar bulunmasına rağmen, yağ alımı ile meme kanseri arasındaki gerçek ilişki özellikle güçlü veya tutarlı görünmemektedir (19).

Prospektif çalışmaların sonuçları incelendiğinde, doymuş yağ ile zayıf şekilde pozitif bir ilişki dışında, meme kanseri riski ile belirli yağ türünün alımı arasında hiçbir ilişkiye rastlanmamıştır (18).

Obezite, postmenopozal kadınlarda meme kanseri riskinde artışa neden olmaktadır. Özellikle 18 yaşından sonra büyük kilo alımlarında, birim vücut kitle indeksi (BMI) artışı başına risk % 2 oranında artmaktadır (18,19).

Haftada 5 kez kırmızı et yenilmesi ile meme kanseri riskinde artış olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, D vitamininin meme kanserine karşı koruyucu bir etkisinin olabileceği gösterilirken, E ve C vitaminleri veya beta-karoten gibi antioksidanların alımının meme kanseri riskine etki ettiği yönünde güçlü bir kanıt yoktur (17).

2.4.4.4. Oral Kontraseptif Kullanımı

Oral kontraseptifler, uzun vadeli kullanıcılar arasında veya kullanımı bıraktıktan sonraki 10 yıl içerisinde meme kanseri riskinde hafif bir artış meydana getirebilir, ancak bu kısa süreli bir etki olarak görülmemektedir.

Oral kontraseptif kullanan kadınlarda teşhis edilen kanserlerin, bu ajanları hiç kullanmamış kadınlarda tanı konanlara kıyasla klinik olarak ilerlemesi daha düşüktür (göreceli risk 0.88'dir).

Kullanım süresi, ilk kullanımdaki yaş, kontraseptifler içindeki hormon dozu ve tipi, meme kanseri riski üzerinde anlamlı bir etkiye sahip görünmemektedir (18,19).

2.4.4.5. Hormon Replasman Tedavisi (HRT) Kullanımı

HRT meme kanseri literatüründe tartışmalı bir alan olmuştur. Hem 2002'de Randomize kontrollü Kadın Sağlığı Girişimi (WHI) çalışması, 1 Milyon Kadın Çalışması, HRT'nin mevcut ve son yıllarda kullanımının göğüs kanseri riskini arttırdığına dair daha önceki

bulguları doğrulamıştır ve yalnızca östrojen etkileri arasındaki önemli farklılıkların artmasıyla (1.30, $P < 0.0001$), mevcut kullanıcılardaki göğüs kanseri riskinin arttığını doğrulamıştır (18, 19). HRT kullanımı sonucu oluşan meme kanseri riski, alkol kullanımı, aşırı kilo ($BKİ > 30 \text{ kg/m}^2$), 30 yaşından sonra yapılan ilk doğum, geç menopoz gibi risk faktörlerinden daha farklı değildir, sonuç olarak meme kanseri riskini arttırdığı söylenebilir.

2.4.4.6. Sigara Kullanımı

Önemli araştırmalara rağmen, tütün ile göğüs kanseri arasındaki ilişki hala tartışmalıdır. En büyük problem alkol ve tütünün yakından ilişkilendirilmesi olmuştur. Bugüne kadar yayınlanmış tutarsız sonuçlar göz önüne alındığında, bu sonuçları değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu söylenebilir (18).

2.4.5. Diğer Faktörler

2.4.5.1. Önceki Benign Meme Hastalık Hikayesi

Ağır atipik epitel hiperplazisi olan kadınlar da, memelerinde proliferatif bir değişiklik olmayan kadınlara göre meme kanseri geliştirme riski dört ila beş kat daha yüksektir. Bu değişikliğin yanında ailenin göğüs kanseri öyküsü olan (birinci derece görelisi) kadınlarda, risk dokuz kat artmıştır. Elle tutulabilir kistler, kompleks fibroadenomlar, kanal papillomları, skleroz adenozisi ve orta veya florid epitel hiperplazisi olan kadınlar, bu değişiklikler olmadan kadınlara göre biraz daha yüksek meme kanseri riski taşır (1.53 kat). Ancak bu artış klinik olarak önemli değildir (19).

2.5. Tedavi

2.5.1. Doxorubicin ve Kullanımını Sınırlayıcı Etkileri

Antrasiklinler, özellikle doxorubicin, uzun zamandan beri kanser tedavisinin ana dayanağı olmuştur. Doxorubicin, mesane, meme, mide, akciğer, yumurtalık kanseri, tiroid, yumuşak doku sarkomu, multipl miyelom ve Hodgkin lenfoma kanserlerini tedavi etmek için en sık kullanılır. (20)

Özellikle erken evre meme kanserinde doxorubicin standart terapi olarak kullanılmaktadır (21).

Güçlü antineoplastik etkinliğine rağmen doxorubicin klinik kullanımı, bulantı, kusma, özellikle de hematolojik toksisite ve geri döndürülemez kardiyak hasar gibi yan etkileri nedeniyle sınırlı kalmıştır (21).

Doxorubicin kullanımındaki en büyük sorun tedavi sırasında doz sınırlamasının olmasıdır. Klasik olarak Doxorubicin'in kümülatif dozları 450 mg/m²'de kardiyak hasar gözlenmezken, 550 mg/m² ve 700 mg/m²'de kardiyak hasar artışı gözlenmiştir (20).

2.5.2. Tedavide Yeni Arayışlar

2.5.2.1. Lipozomlar

Geleneksel Doxorubicin tedavisinin yan etkileri nedeniyle, eşit etkinlik ve daha az yan etki ile lipozomal formülasyonun geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıktı (20). Lipozomlar, su dolu veziküllerin, fosfolipid moleküllerinden oluşan bir veya birkaç zar ile çevrelendiği yapılar olarak tanımlanabilir. Fosfolipidler, içine yüklenecek ilaçları sulu bölmelerinde ve/veya membranlar içerisinde hapsedecek şekilde modifiye edilebilir (22). Lipozomları kullanmanın başlıca avantajlarından biri, bu vezikülleri oluşturmada kullanılan fosfolipidlerin doğal kaynaklardan ekstrakte edilmesi ve vücut açısından güvenli olmalarıdır. Buna ek olarak, fosfolipid çift tabakanın doyumluk derecesi ilaç salınım oranını değiştirmek için modifiye edilebilir (20).

Lipozomlar, antikanser ilaçları için taşıyıcı araçlar olarak kullanıldığından, ilacın etki alanına hedeflenmesi, klinik etkilerinin geliştirilmesi ve sürdürülmesi, toksisitesinin azaltılması ve metabolizma ve bağışıklık yanıtlarından korunması daha iyidir (22).

2.5.2.2. Hedeflendirilmiş İlaç Taşıma Sistemleri

Geleneksel tedavideki sınırlamalardan birisi de doku seçiciliğinin olmamasıdır. Bu durum sağlıklı dokuda anlamlı yan etkilere yol açacağı gibi, tümör dokusunda düşük ilaç konsantrasyonlarına da yol açar (23).

Hedeflendirilmiş ilaç taşıma sistemlerinin kullanımı bu sorunları çözmeye yardımcı olabilir. Bu tür sistemlerde bir ilaç taşıyıcısı geçirgen tümör kaplarından geçer ve taşıyıcı içindeki gömülü ilaç tümör hücreleri arası boşluğa salınır (23).

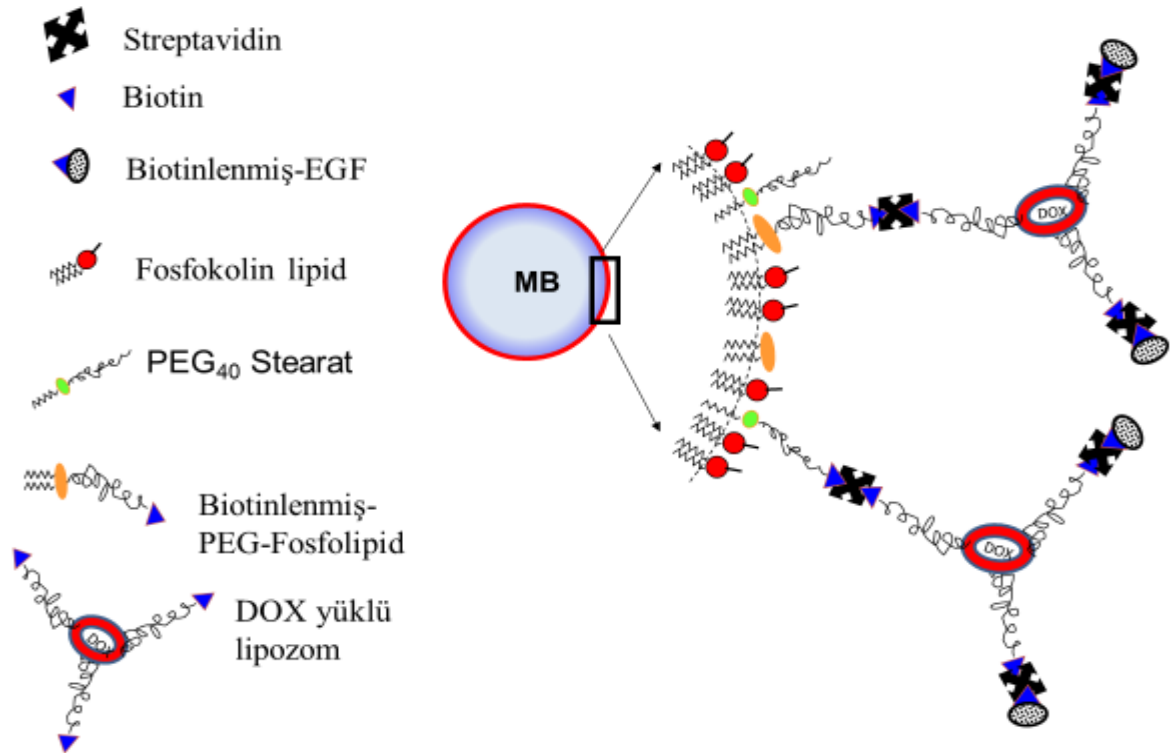
İlaç taşıma sistemlerinde, taşıyıcının tümör dokusunda hedeflendirilmiş olarak birikmesi de sağlanabilir. Gömülü ilaç daha sonra tümör dokusunda serbest bırakılırsa,

tedavinin etkinliği artırılabilir ve yan etkiler azaltılabilir, böylece hedeflenen ilaç dağıtım hedeflerine ulaşılabilir (23).

2.5.2.3. Mikroköpükçükler

Mikroköpükçüklerle ultrason aracılı ilaç sunumu, terapötik maddelerin hedeflenen tümörlere taşınmasını noninvaziv olarak artırabilir (24).

Hedeflendirilmiş DOX Yüklü Fosfolipid Mikroköpükçükler



Şekil 7. Hedeflendirilmiş DOX Yüklü Fosfolipid Mikroköpükçüğün Şematize Görüntüsü

2.5.2.4. Ultrason İlişkili Terapi

Son yıllarda ultrason ilişkili yöntemler hedefleme aracı olarak önerilmiştir (25). Mikroköpükçükler tümör damarlanmasında iken, ultrason dalgalarının mikroköpükçüklerle etkileşimi köpükçüklerin salınımına ve yıkımına neden olabilir. Bu da vasküler duvarların yırtılmasına neden olabilir. Bu açıklıklar, tümörün vasküler geçirgenliğini artırabilir (24,26). Ayrıca, ilaç yüklü mikroköpükçüklerin hedef bölgeye ulaştıktan sonra ultrason sonikasyonu ile yok edilmesi sonucunda hedef bölgeye yüklü bir madde sağlayabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu araştırma, deneysel olarak gerçekleştirilmiş bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu araştırma 01.05.2016 tarihinde literatür taraması ile başlamış olup, 10.07.2017 tarihinde tez savunması ile sonlandırılmıştır. Araştırma, çalışma için gerekli biyogüvenlik düzeylerine uygun donanıma sahip Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmada, farelerde meme kanseri oluşturmak amacıyla hayvan kökenli 4T1 meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada, incelenen 5 grupta, her bir grup için 7 hayvan olmak üzere toplam 35 adet atimik nude fare, kullanılmıştır..

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bu çalışmada, tedavi ajanı olarak kullanılacak olan Doxorubicin, ultrason altında görüntülemeye kontrastlanmayı artırma amacıyla kullanılan mikroköpükçükler ve hedeflenmiş tedavide kullanılıp kullanılamayacağının araştırıldığı Doxorubicin yüklü mikroköpükçükler araştırmanın bağımsız değişkenlerini oluştururken; bu ajanların kullanımıyla tümör oluşturulmuş atimik nude farelerden elde edilecek tümör yanıtları, araştırmanın bağımlı değişkenlerini oluşturur.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.6.1.1.Kullanılan Cihazlar

Laminar Akışlı Biyogüvenlik sınıf II Kabinet (Nüve)

Karbondioksitli inkübatör (Nüve)

Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Heraus)

Akım Sitometri Cihazı (BD Accuri C6)

+4 °C Buzdolabı (Arçelik 450 lux)

-20 °C derin dondurucu (Ariston)

-80 °C Buzdolabı (Thermo Science)

-196 °C sıvı azot tankı (Heraus)

Otomatik pipet 0.5-10 µl (Isolab)

Otomatik pipet 20-200 µl (Isolab)

Otomatik pipet 100-1000 µl (Isolab)

Inverted Mikroskop (Olympus CKX41)

Motorlu Pipet (Diamed)

Ultrason Görüntüleme cihazı (Visual Sonics Vevo 2100)

3.6.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Steril Pipetler-2 ml, 5 ml, 10ml, 20 ml (Greiner)

Pipet Uçları (Sarı ve Mavi)

15 ml vida kapaklı konik santrifüj tüpü (Falcon)

50 ml vida kapaklı konik santrifüj tüpü (Falcon)

Polistren Akım Sitometri Tüpü

Steril pastör pipeti (Greiner)

Steril tek kullanımlık bistüri ucu

3.6.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit

Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) ortamı (Gibco)

Tripan Mavisi

Trypsin/EDTA

PEG-MB-DOX

Doxorubicin

Fetal Bovin Serum (FBS) (Biochrom)

Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Gibco)

L-Glutamin (Biochrom)

Penisilin/ Streptomisin (Gibco)

Dimetil sülfoksit (DMSO)

Annexin-V Apoptosis Kit (BioVision, Inc.)

3.6.2. 4T1 Hücre Hattının Ekilmesi

3.6.2.1. Amaç

- Atimik nude farelerde meme kanseri tümör modeli oluşturmak amacıyla hayvan kökenli 4T1 meme kanseri hücre hattı çoğaltılmak üzere açılmıştır.

3.6.2.2. Uygulama Basamakları

- Laminar akışlı kabin; yapılacak işlemde en az 15 dk. öncesinden çalıştırılır.
- Kabinin içi %70'lik alkol ile silinir.
- Bu hücre hattında kullanılacak olan RPMI 1640 hücre besi ortamı; hücre hattı bilgilerinde idame bilgilerine uygun bir biçimde gereken komponentler konularak (50 ml'lik hazırlanmış ortam için: 44ml hazırlanmamış ortam+ 5ml fetal bovin serum (FBS)+ 0,5ml Penisilin-Streptomisin.+0,5 ml L-Glutamin.) hazırlanır ve kabinet içine konarak ortam sıcaklığına gelmesi sağlanır (27).
- Su banyosu çalışma başlamadan önce 37 °C'ye ısıtılır.
- Kullanılacak pipetler, otomatik pipetör gibi malzemeler kabinet içine yerleştirilir.

- Dondurulmuş hücre, azot sıvı azot tankından veya -80 °C buzdolabından çıkarılır ve çıkartılır çıkartılmaz hızlı bir şekilde önceden 37°C'ye ısıtılmış su banyosuna daldırılır ve sıvı çözölemeye başlayana kadar burada hafif çalkalanarak tutulur.
- Kriyoviyal içindeki, hücrelerin bulunduğu donmuş vaziyetteki ortam eridiğinde, dış kısmı %70'li etil alkol ile silinerek kabinet içine yerleştirilir.
- Çözönmüş kriyoviyal içeriği; 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır ve üzerine 10ml hszırlanmış ortam eklenir ve ardından pipetleme ile homojenizasyon sağlanır.
- Homojenizasyon sonrası 15 ml'lik santrifüj tüpü santrifüj cihazına yerleştirilir, tam karşısına aynı miktardaki denge tüpü yerleştirilir ve 10 dk 1300 rpm'de santrifüjlenir.
- Bu sırada hücrelerin ekileceği 25 cm²'lik flaklara 4ml hazırlanmış ortam eklenir.
- Santrifüj işlemi sonrası pellet altta, süpernatant üstte kalmış olur.
- Süpernatant kısım kısım atılır, ve kriyoviyal üzerine 1 ml hazırlanmış ortam eklenir; ardından pipetleme ile homojenizasyon işlemi sağlanır.
- 1ml hazırlanmış ortam içinde homojenize edilen hücreler içinde 4 ml ortam bulunan 25 cm²'lik flakların alt yüzeyine; yavaşça, yüzeyin tamamına yayılacak şekilde ve köpük oluşturmada eklenir.
- Flakların ağzı kapatılır.
- Flask üzerine gerekli bilgiler(hücre hattının adı+ hücre hattı için kullanılan ortamın adı+ekimi yapan kişinin adı+ekim tarihi+pasaj no'su) yazılır.
- Ekilen hücrelere inverted mikroskop altında bakılarak durumları incelenir.
- Flaskın her tarafı, bilgi yazıları silinmeyecek şekilde %70'lik alkol ile silinir ve inkübatöre kaldırılır 37 °C sıcaklık %5 CO₂'li inkübatöre kaldırılır (28).

3.6.2.3. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılıklarının Değerlendirilmesi

3.6.2.3.1. Genel İlke

Yeni açılan bir hücrenin canlılık durumunu hızlıca tayin etmek adına tripan mavisi adı verilen bir boya kullanılmaktadır. Bu boya negatif yüklüdür. Eğer hücre membranı zarar görmemiş ve canlı bir hücre ise, boya hücre içine girmez. Ancak canlı olmayan hücreler boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi görünürler.

3.6.2.3.2.Uygulama Basamakları

- Kriyoviyalde kalan 10 µl hücre, 10 µl tripan mavi ile birlikte karıştırılır.
- Karışımdan alınan 10 ml örnek, otomatik hücre sayım cihazına özel hücre sayım lamına aktarılır ve okutma işlemi yapılır.

3.6.3. 4T1 Hücre Hattının Pasajlanması

3.6.3.1. Amaç

Kültürlerde çoğalan tümör hücreleri; içinde bulundukları besi ortamındaki nütrientleri tüketerek; üreme yüzeyine yayılma özelliği gösterirler. Çoğalan tümör hücrelerinde, normal hücrelerden farklı olarak kontakt inhibisyon olmadığından, çoğalma nedeniyle hücreler yüzeyden kalkabilir veya besinsiz kaldıklarından bu hücrelerde ölüm görülebilir. Bu nedenle bu tür bir durumda kültürün bölünmesi, yapılacak en doğru hareket işlemdir. Bu işleme pasajlama adı verilir.

3.6.3.2. Uygulama Basamakları

- Laminar akışlı kabin; yapılacak işlemde en az 15 dk. öncesinden çalıştırılır.
- Kabinin içi %70'lik alkol ile silinir.
- Kullanılacak hazırlanmış ortam ve PBS kabin içine konarak ortam sıcaklığına gelmesi sağlanır.
- Tripsin/EDTA solüsyonu -20 °C'den çıkarılarak erimesi ve ortam sıcaklığına gelmesi sağlanır.
- Hücrelerin bulunduğu flastaki ortam; hücreleri yapıştığı yüzeyden kaldırmayacak şekilde çekilir ve kabin içinde bulunan içine %70'lik alkol sıkılmış sıvı atık kabına dökülür.
- Kültür yüzeyi PBS ile 1 (veya kirlilik durumuna göre 2) kez yıkanır.
- PBS, hücreler üzerinde 2-3 kez hafif çalkalama yolu ile dolaştırılır ve bir pipet vasıtası ile hücrelere zarar vermeden çekilir.
- Yıkama işleminden sonra, erimiş ve ortam sıcaklığına gelmiş olan Tripsin/EDTA solüsyonu 25 cm²'lik kültür flastı üzerine için 1 ml, 75 cm²'lik kültür flastı üzerine için 3 ml eklenir.
- Eklenen Tripsin/EDTA'nın hücre yüzeyinin tamamına yayılması sağlanır.

- Tripsin/EDTA eklenmiş olan kültür flaskı 1-3 dakika arasında 37 °C %5 CO₂'li inkübatörde tutulur. Tripsin/EDTA proteolitik bir enzim olduğundan, inkübasyon süresi aşılmamalıdır.
- Inkübasyon sonrası kültür flaskı inkübatörden çıkarılır.
- Gerek makroskopik gerekse mikroskopik olarak hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı kontrol edilir.
- Hücrelerin kalkması sağlandıktan sonra flask, %70'lik alkolle silinir ve kabinet içine konur.
- Flaskın içine Tripsin/EDTA'yı inaktive etmesi amacıyla, Tripsin/EDTA miktarının 2 katı kadar hazırlanmış ortam konur.
- Tripsin/EDTA inaktive edildikten sonra flask içindeki ortam bir pipet ile al-ver yapılarak homojenize edilir ve bir pipet ile çekilir santrifüj tüpüne aktarılır.
- 1300 rpm de 10 dk. santrifüjlenir.
- Santrifüj sonunda süpernatant pipet ile pellete zarar vermeyecek şekilde çekilir ve sıvı atık kabına dökülür.
- Kalan pellet üzerine taze besi ortamı eklenir.
- 25cm²'lik flaska pasaj yapılacaksa; flaska 4 ml complete ortam; pellet üzerine 1 ml complete ortam; 75 cm²'lik flaska pasaj yapılacaksa; flaska 8 ml complete ortam; pellet üzerine 2 ml hazırlanmış ortam eklenir.
- Pellet üzerine ortam eklendikten sonra önce santrifüj tüpüne dışarıdan vurularak, ardından bir pipet ile al-ver yapılarak hücrelerin süspanse olması sağlanır. Bu aşamada hücrelerin uygun şekilde homojenize olması önemlidir. Aksi takdirde hücreler öbek halinde kalacağından yeterli beslenememeleri, çoğalamamaları ve buna bağlı olarak ölümleri gerçekleşebilir.
- Pasajlama işleminden sonra flaskın kapağı kapatılır.
- Flask üzerine gerekli bilgiler (hücre hattının adı+ hücre hattı için kullanılan ortamın adı+ekimi yapan kişinin adı+ekim tarihi+pasaj no'su=bir önceki no'dan bir arttırılır) yazılır.
- Pasajlanan hücrelere, inverted mikroskop altında bakılarak durumları incelenir.
- Flaskın her tarafı, bilgi yazıları silinmeyecek şekilde %70'lik alkol ile silinir ve inkübatöre kaldırılır.

3.6.4. 4T1 Hücre Hattının Kaldırılması ve Toplanması

3.6.4.1. Amaç

Atimik nude farelerde tümör oluşturmak üzere çoğaltılan 4T1 meme kanseri hücre hattı, çoğalma kabından kaldırılmalı ve uygun biçimde toplanmalıdır.

3.6.4.2. Uygulama Basamakları

- Laminar akışlı kabin; yapılacak işlemde en az 15 dk. öncesinden çalıştırılır.
- Kabinin içi %70'lik alkol ile silinir.
- Flask içindeki besi yeri uzaklaştırılır.
- Flasklardaki hücreler, hücre kazıyıcı cell scraper ile kaldırılır
- Kaldırılan hücreler; enjeksiyon sayısına göre istenilen miktarda hazırlanmış ortam ile resüspanse edilir ve insülin enjektörlerine aktarılır.

3.6.5. Hayvan Modeli ve Deney Grupları

Hayvan modeli için yaklaşık 6 haftalık dişi atimik nude fareler kullanılmıştır. 4T1 hücreleri atimik nude farelere, 0.5 ml hacimde 4×10^5 olacak şekilde subkutan olarak enjekte edilmiştir (29). Her bir grupta 7 hayvan olmak üzere 5 deney grubu oluşturulmuştur. Gruplar Tablo 1'de gösterilen şekildedir.

Tablo 1. Deney ve Kontrol Grupları

Deney ve kontrol grupları	Grup başına Hayvan adedi
1.Sadece Tümör Dokusu Oluşturulan Grup (Kontrol)	7
2.Tümör Oluşturulup, Sadece Doxorubicin Verilen Grup	7
3.Tümör Oluşturulup, Sadece Mikroköpükçük Uygulanan Grup	7
4.Tümör Oluşturulup, Doxorubicin Yüklü Mikroköpükçük Uygulanan Grup	7
5. Tümör Oluşturulup, Lipozomal Doxorubicin Verilen Grup	7
Kullanılan toplam Hayvan Sayısı	35

Tümör enjeksiyonundan itibaren hayvanlar her gün kontrol edilmiştir. Tümör çapı 1 cm'ye ulaşan farelerde manuel ve ultrason altında tümör boyut ölçümü yapıldıktan sonra Tablo 1'de belirtilen deney gruplarına uygun olacak şekilde ajan uygulaması yapılmıştır.

3.6.5.1. Farelerde Tümör Boyut Ölçümü

Tümör boyut ölçümü manuel ve ultrason altında yapılmıştır.

3.6.5.1.1. Manuel Tümör Boyut Ölçümü

Tümör boyutunun manuel olarak ölçülmesi Şekil 7'de gösterildiği şekilde manuel kumpas kullanılarak yapılmıştır.

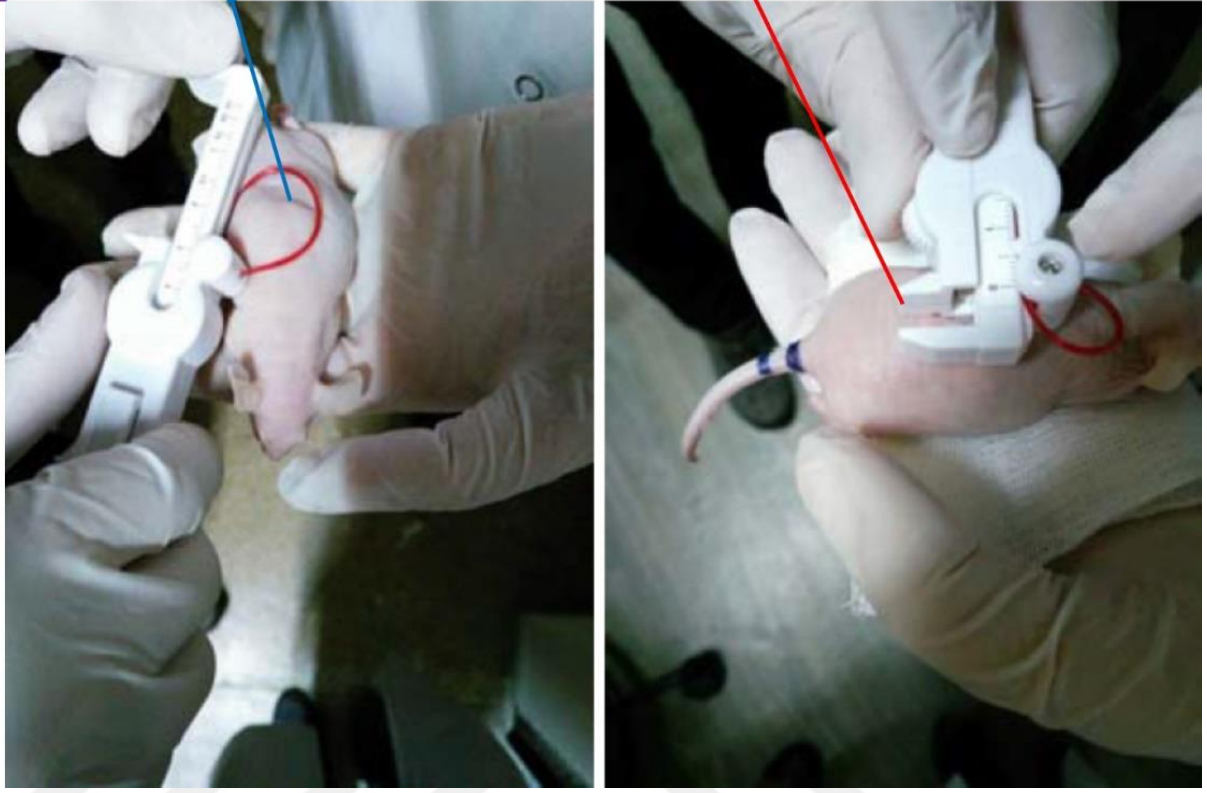
TÜMÖR MANUEL ÖLÇÜM YÖNTEMİ

1

Tümör Alanı (cm²
cinsinden)

2

Tümör Uzunluğu(cm
cinsinden)

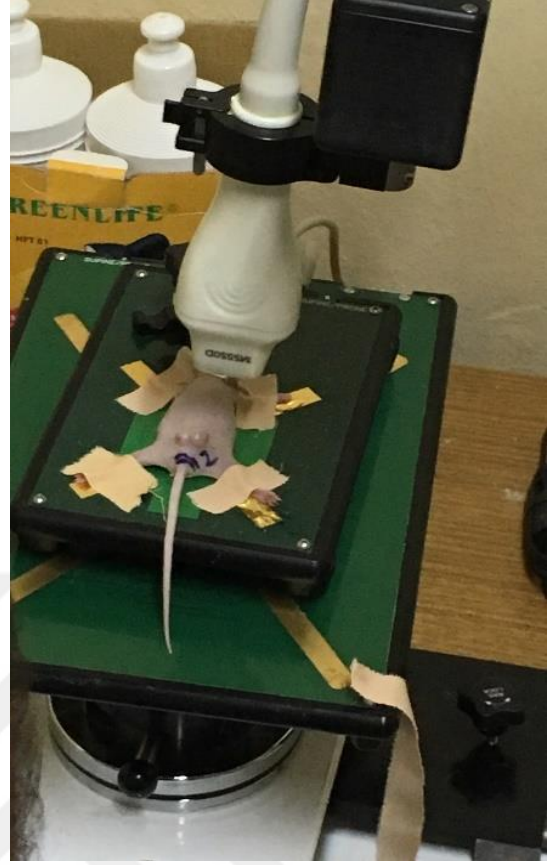


Şekil 8. Manuel olarak fare fırtındaki tümör boyutunun ölçülmesi.

3.6.5.1.2. Ultrasonografik Tümör Boyut Ölçümü

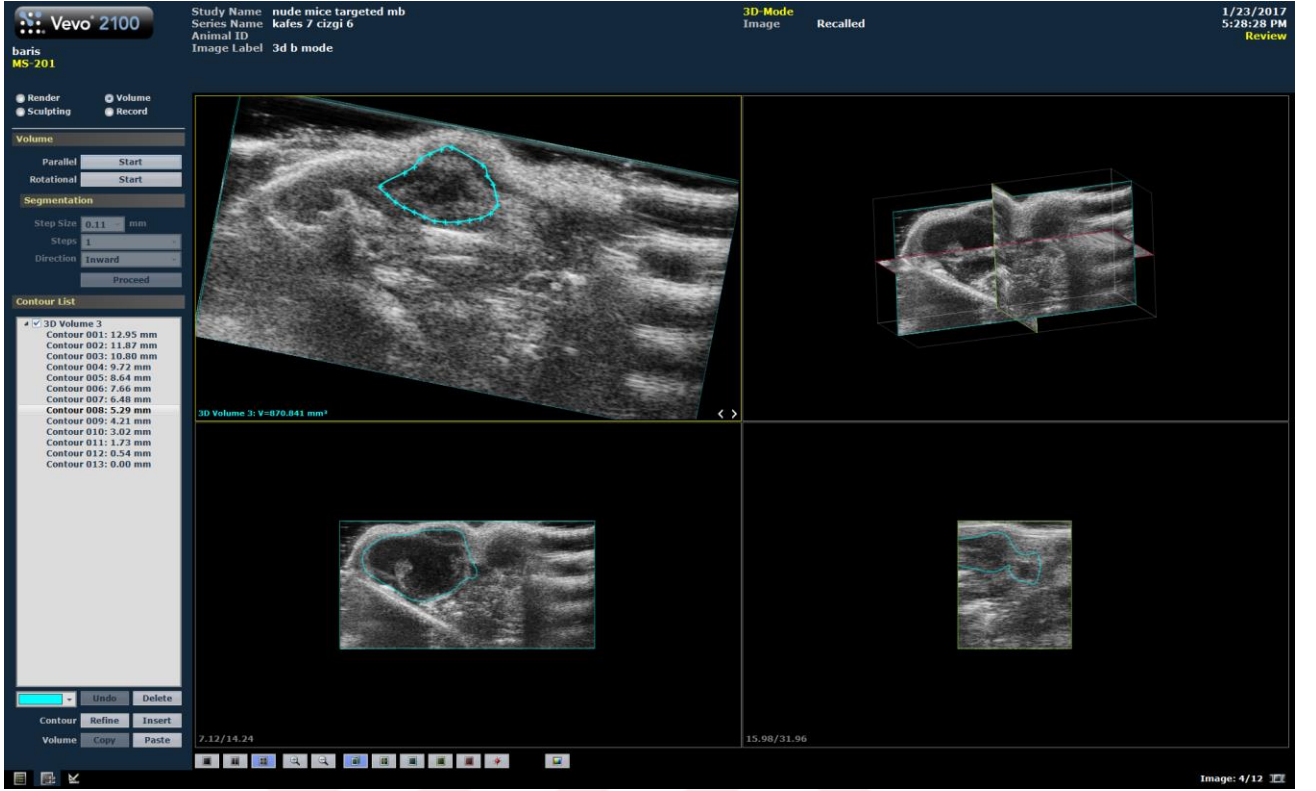
Ultrasonografik ölçüm ise Visual Sonics Vevo 2100 model hayvan deneylerine dedike yüksek çözünürlüklü ultrasonografi cihazının özelliklerinden biri olan 3D görüntüleme ile gerçekleştirilmiştir.

Ultrasonografik ölçümde, küçük deney hayvanı stabilizasyon tablası üzerine yerleştirilen ve anestezi altında bulunan nude farenin sırtındaki tümör üzerine cihaz probu, üç boyutlu transduser konumlandırma sistemi yardımı ile konumlandırılmıştır.



Şekil 9. Farenin stabilizasyon tablası üzerine konması ve ultrason probunun üç boyutlu transduser konumlandırma sistemi yardımı ile konumlandırılması

Probu hareket ettirilen 3D görüntüleme motoru ve üç boyutlu konumlandırma sistemi ile tümörün 3 boyutlu olarak boyut ölçümü alınmıştır.



Şekil 10.Ultrason altında 3D tümör boyutu ölçümü görüntüsü.

Cihazın 3D görüntüleme yazılımı ve 3D görüntüleme motoru yardımı ile nude farelerden otomatik olarak ultrasonografik kesitler alınarak görüntülenmiştir.

Ultrasonografik kesit görüntüleme işlemi tamamlandığında, tamamlandığında yazılım tüm tümörün sınırlarını otomatik olarak belirleyerek tümör hacmini hesaplamıştır.

3.6.5.2. Ajan Enjeksiyonlarının Yapılması

3.6.5.2.1.Kontrol Grubu

Kontrol Grubu hayvanlarına, manuel ve ultrasonografik tümör boyut ölçünlerini takiben 0,5 ml hacimde serum fizyolojik intraperitoneal sekilde enjekte edilmiştir.



Şekil 11. Manuel ve ultrasonografik volüm ölçümü sonrası kontrol grubu hayvanlarına 0,5 ml hacimde intraperitoneal şekilde serum fizyolojik verilmesi

3.6.5.2.2. Doxorubicin Grubu

Doxorubicin (DOX) Grubu hayvanlarına, manuel ve ultrasonografik tümör boyut ölçünlerini takiben 0,5 ml hacimde, literatür bilgisi ile de konfirme edilmiş olan 5 mg/Kg DOX intraperitoneal şekilde enjekte edilmiştir. DOX, kuyruktan enjekte edildiğinde damarlarda nekroza yol açtığından ve bu nedenden ötürü farelerde acıya yol açmasından dolayı uygulama intraperitoneal yapılmıştır.

3.6.5.2.3. Lipozomal Doxorubicin Grubu

Lipozomal Doxorubicin (Lipo-DOX) Grubu hayvanlarına, manuel ve ultrasonografik tümör boyut ölçünlerini takiben 0,3 ml hacimde 5 mg/ Kg olacak şekilde Lipo-DOX kuyruk veninden intravenöz olarak enjekte edilmiştir.



Şekil 12. Manuel ve ultrasonografik volüm ölçümü sonrası Lipo-DOX grubu hayvanlarına 0,3 ml hacimde intravenöz şekilde Lipo-DOX verilmesi



Şekil 13. 27 G kelebek iğne ile fare kuyruk veninin kataterizasyonu.

3.6.5.2.4.Mikroköpükçük Grubu

Mikroköpükçük (MB) Grubu hayvanlarına, manuel ve ultrasonografik tümör boyut ölçünlerini takiben 0,3 ml hacimde 3×10^8 konsantrasyonda MB kuyruk veninden intravenöz olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sırasında aynı zamanda tümör

dokusundan ultrasonografi eşliğinde ekojenite ölçümleri yapılmış ve kontrast maddenin tümör dokusuna ulaşımı gözlenmiştir.

3.6.5.2.5 Doxorubicin Yüklenmiş Mikroköpükçük Grubu

Doxorubicin Yüklenmiş Mikroköpükçük (MB-DOX) Grubu hayvanlarına, manuel ve ultrasonografik tümör boyut ölçünlerini takiben 0,3 ml hacimde 22,7 µg/ml DOX olacak şekilde 3×10^8 konsantrasyonda mikroköpükçük kuyruk veninden intravenöz olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sırasında aynı zamanda tümör dokusundan ultrasonografi eşliğinde ekojenite ölçümleri yapılmış ve Doxorubicin kontrast maddenin tümör dokusuna ulaşımı gözlenmiştir. Enjeksiyonun gözlenmesini takiben, ultrason cihazındaki “Burst” tuşu kullanılarak mikroköpükçüklerin patlatılması ve DOX’un lokal olarak salınımı sağlanmıştır. Bu tuşa basıldığında cihazın mekanik indeksi arttığından dolayı mikroköpükçüklerin patlatılması sağlanmıştır.

3.6.5.3. Hayvanların Sakrifikasyonu

Ajan uygulanan fareler çalışmanın dördüncü günü yine manuel ve ultrason altında 3 boyutlu tümör boyut ölçümünü takiben sakrifiye edilmiştir. Dokular (Akciğer, karaciğer, böbrek, beyin ve tümör) olağan formol ile fiksasyon ile takip sonrasında kesitlerde Hemotoksilen-Eosin ile boyanarak histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

3.6.6. Akım Sitometri Yöntemi ile Dokulardaki Apoptoz Oranlarının Belirlenmesi

3.6.6.1. Amaç

Akış sitometrisi, hücre yüzeyinin ve hücre içi moleküllerin ekspresyonunu analiz etmek, heterojen hücre popülasyonlarında farklı hücre tiplerini tanımlamak, izole edilmiş alt popülasyonların saflığını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (30).

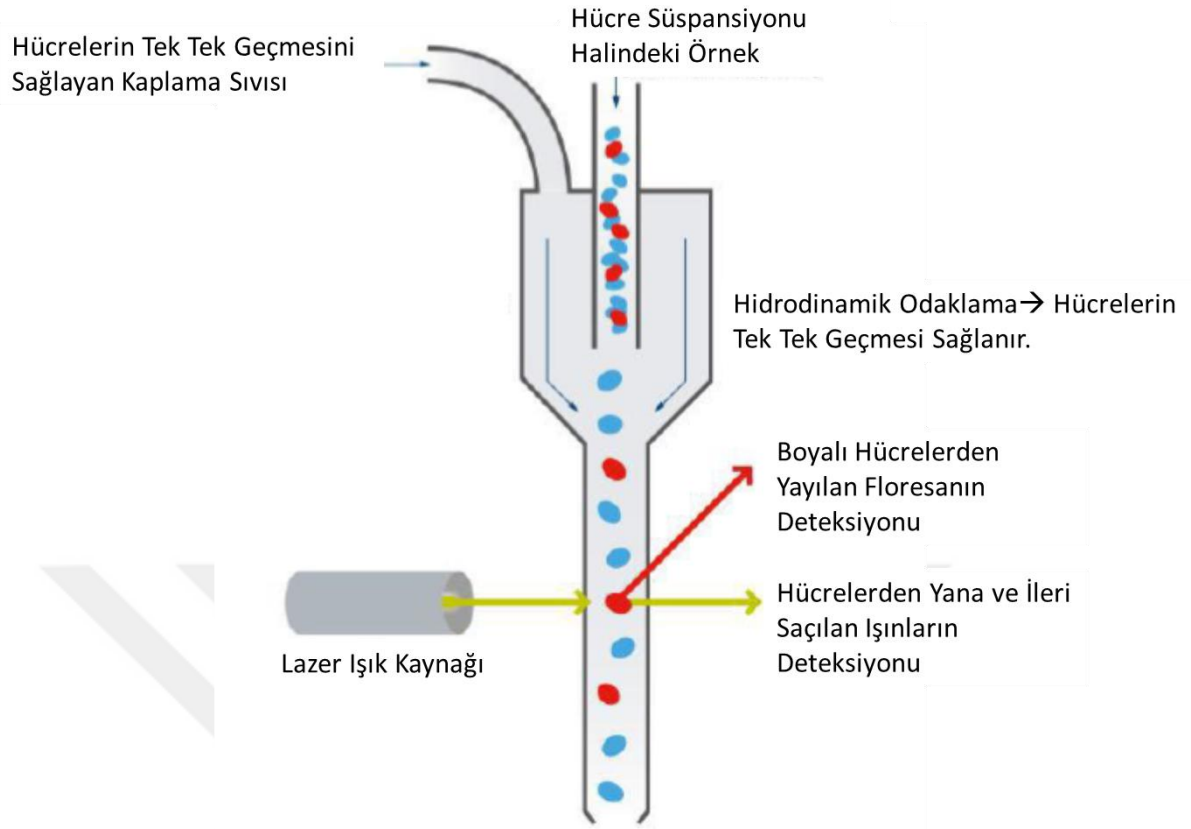
Akış sitometrisi ile hücrelerin birden fazla özelliği hızlı ve eş zamanlı olarak analiz edilebilir (31). Akış sitometrisi son yıllarda hızla gelişmiştir ve uygulamaları hem temel hem de klinik araştırma laboratuvarlarında yaygınlaşmaktadır (32).

Bunun nedeni olarak Tek hücrelerin (veya çekirdek, mikroorganizmalar, kromozom preparatları ve diğer tüm parçacıklar) optik ve floresans özelliklerinin ölçülmesi ve bu

sayede hücre büyüklüğü, sitoplazmik içerik, DNA veya RNA içeriği gibi bilgilerin elde edilebilmesi gösterilebilir (31).

Bir akım sitometri cihazı, hücre topluluğunun hidrodinamik odaklama ile tek hücre şeklinde lazer önünden geçmesini sağlayan akış sistemi olan “hidrolik kısım”dan, lazer önünden geçen hücrelerden açığa çıkan floresan saçılımlarının çeşitli filtreler (çapraz, silindirik filtreler) yardımıyla toplanarak detektöre aktarılmasını sağlayan “optik kısım”dan ve elde edilen optik sinyalin arttırılarak elektrik sinyaline çevrilmesini ve devamında bilgisayarda analiz edilmesini sağlayan “elektronik kısım”dan oluşur (31, 33).

Akım Sitometri cihazına Cihaz dışında süspansiyon halinde bulunan hücreler, cihaz içine tek hücre süspaniyonu olacak şekilde alınır. Cihaz içindeki akış kabini hücrelerin lazer önünden tek tek olacak şekilde geçmesini sağlar. Hücreler lazer önünden geçerken lazerden gelen monokromatik bir ışın demeti hücreleri keser. Saçılan ışınlardan ileri olanların (Forward Scatter) tespiti ile hücrenin büyüklüğü ile ilgili, yana olanların (Side Scatter) tespiti ile de hücrenin içindeki granül yapısı ile ilgili yaklaşık olarak bilgiler elde edilir. Akım sitometri ile floresan işaretlenmiş hücrelerin tespiti de yapılabilir.



<http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry/> den Türkçe'ye uyarlanmıştır.

Şekil.14. Akım Sitometri Çalışma Prensibi

Floresan boyalar, DNA veya RNA gibi farklı hücresel bileşenlere bağlanabilir veya interkalasyon yapabilir (33).

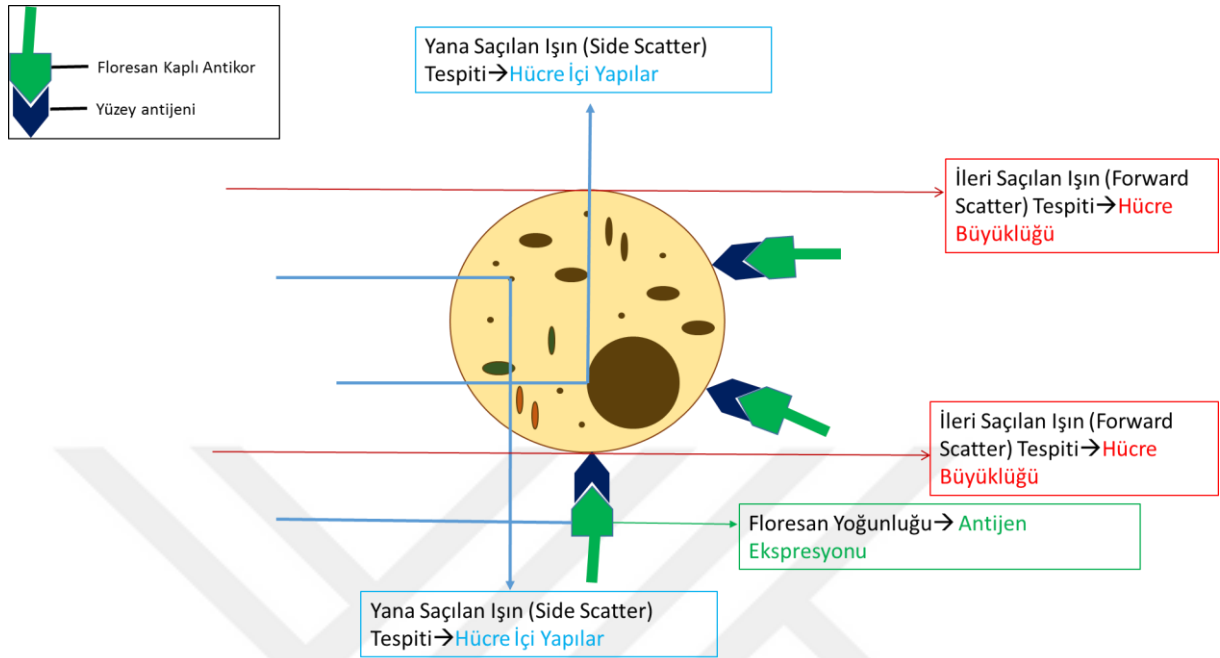
Ayrıca, flüoresan boyalara konjuge edilmiş antikorlar hücre zarlarındaki veya hücre içindeki spesifik proteinleri bağlayabilir.

İşaretli hücreler lazer önünden geçirildiğinde, flüoresan molekülleri daha yüksek bir enerji durumuna geçerler.

Yüksek enerjileri nedeniyle kararsız durumda olan floresan molekülleri daha düşük enerji seviyesine dönmek için daha yüksek dalga boylarında ışık enerjisi yayarlar.

Her biri benzer uyarılma dalga boylarına ve farklı emisyon dalga boylarına (dolayısıyla "renklere") sahip olan birden fazla florokrom kullanılması, birkaç hücre özelliğinin aynı anda ölçülmesini sağlar (31).

Yaygın olarak kullanılan boyalar, propidyum iyodür, fitoeritrin ve floresein içerir, ancak birçok başka boyalar mevcuttur.



Şekil.15. Akım sitometride hücre deteksiyonunun şematik gösterimi.

3.6.6.6.2. Uygulama Basamakları

- Farelerden elde edilen tümör dokuları laminar akışlı kabinde steril koşullarda homojenize edilir, filtreden geçirilerek tek hücre süspansiyonu elde edilir.
- Tek hücre süspansiyonu olarak elde edilen hücreler 1200 rpm de 5 dk santrifüjlenir.
- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılır.
- Pellet biçimindeki hücreler, kit ile birlikte verilen bağlama solüsyonunda 500 µl hacimde resüspanse edilir ve 5ml'lik akım sitometri tüpüne aktarılır.
- Bu basamakta belirtilen miktarlar $1-5 \times 10^5$ hücre için geçerlidir. Bu nedenle öncesinde hücre sayımı yapılarak eklenecek miktarlar optimize edilecektir.
- Akım sitometri tüpüne aktarılan örnekler üzerine 5 µl FITC-Annexin V, 5 µl PI (Propidyum İyodür) eklenir ve oda sıcaklığında ve karanlıkta 5 dakika inkübe edilir.

- Analizde doğru kapılama ayarını yapabilmek için her bir örnek için ayrı bir tüpe hiç boya konmadan sadece bağlama solüsyonunda resüspanse edilmiş örnek konur ve aynı koşullarda inkübe edilir.
- İnkübasyon sonunda örneklerin akım sitometri cihazında ölçümü yapılır.
- Ölçüm sonunda Annexin V boyananlar erken apoptotik, Annexin V ve PI boyananlar geç apoptotik veya nekrotik, İki boyayla boyanmayanlarda canlı olarak tanımlanacaktır.
- Elde edilen bu yüzde verileri ile en başta yapılan hücre sayımına göre hesaplamalar yapılacaktır.



3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi

Araştırmanın ön literatür taraması (Ocak 2015- Mayıs 2015)



Araştırmanın etik kurul onayının Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 29/2015 protokol no'lu olmak üzere alınması (Haziran 2015)



Sarf malzemelerin temini (Nisan 2016)



4T1 Hücre hattının açılması, pasajlanması ve çoğaltılması (Ağustos 2016-Eylül 2016)



Atimik Nude farelerin temini (Eylül 2016)



Atimik Nude farelerde tümör oluşturulması (Eylül 2016-Ekim 2016)



Hayvanlara deney gruplarında uygun görüldüğü üzere ajanların uygulanması, ultrason altında görüntüleme ile tümör boyutlarının ölçümleri ve sakrifikasyonları (Ekim 2016-Aralık 2016)



Hayvanların sakrifikasyonları sırasında alınan dokularından histopatolojik değerlendirmeleri (Aralık 2016-Ocak 2017)



Hayvanların sakrifikasyonları sırasında alınan tümör dokularından, akım sitometri yöntemi ile apoptoz oranlarının bakılması (Ocak 2017)



Verilerin düzenlenmesi istatistiksel analizlerin yapılması (Ocak 2017)



Tez Savunması (Temmuz 2017)

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Gruplar arasındaki histopatolojik ve biyokimyasal farklar, SPSS.15 programında, “Kruskal Wallis H” ve “Mann Whitney-U” testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm analizlerde, P değerinin 0.05’ten düşük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmanın sınırlılıkları arasında; hayvan kullanımını minimum sayıda tutmak amacıyla, tek doz MB-DOX’un denenmiş olması, hayvanlara ultrason altında görüntüleme işleminin hayvan refahı açısından her gün yapılamıyor oluşu örnek olarak gösterilebilir.

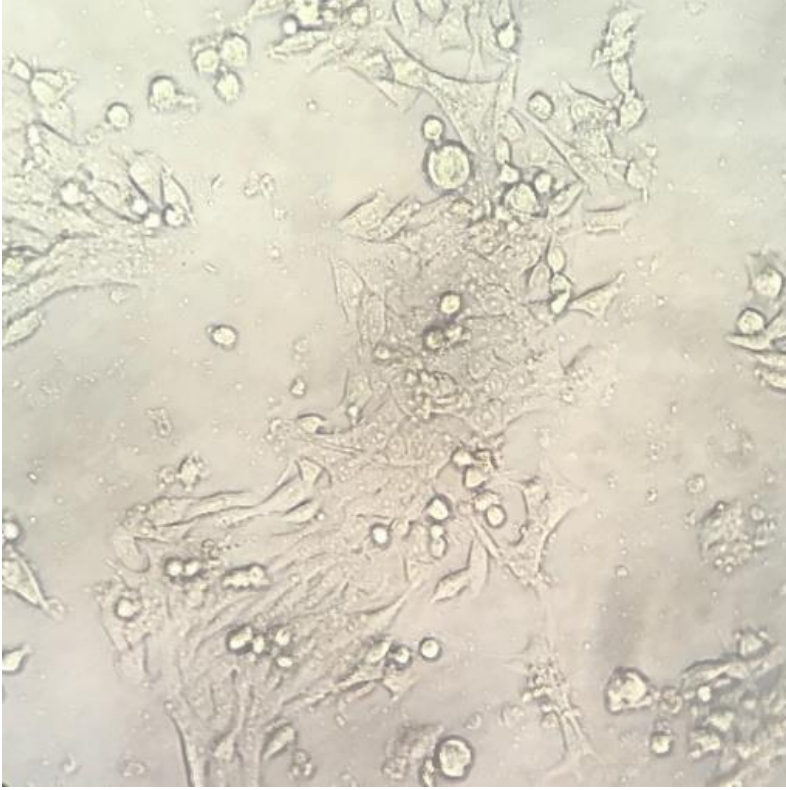
3.10. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 09.06.2015 tarihinde verilen 29/2015 protokol no’lu etik kurul onayı kapsamında gerçekleştirilmiştir (Ek 1).

4.BULGULAR

4.1. 4T1 Meme Kanseri Hücre Hattının Çoğaltılması

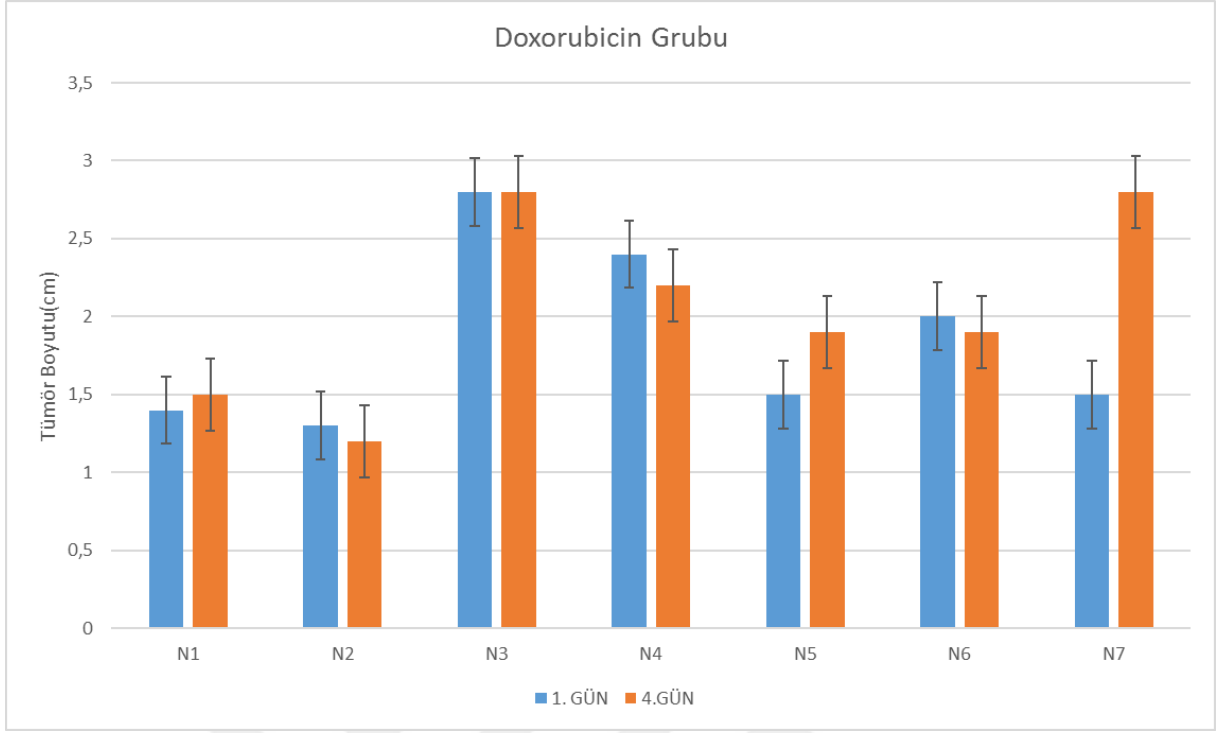
Deneylerin yapılması için seçilen 4T1 Hücre Hattı, deneylerde kullanılmak üzere uygun kültür ortamı içinde çoğaltıldı.



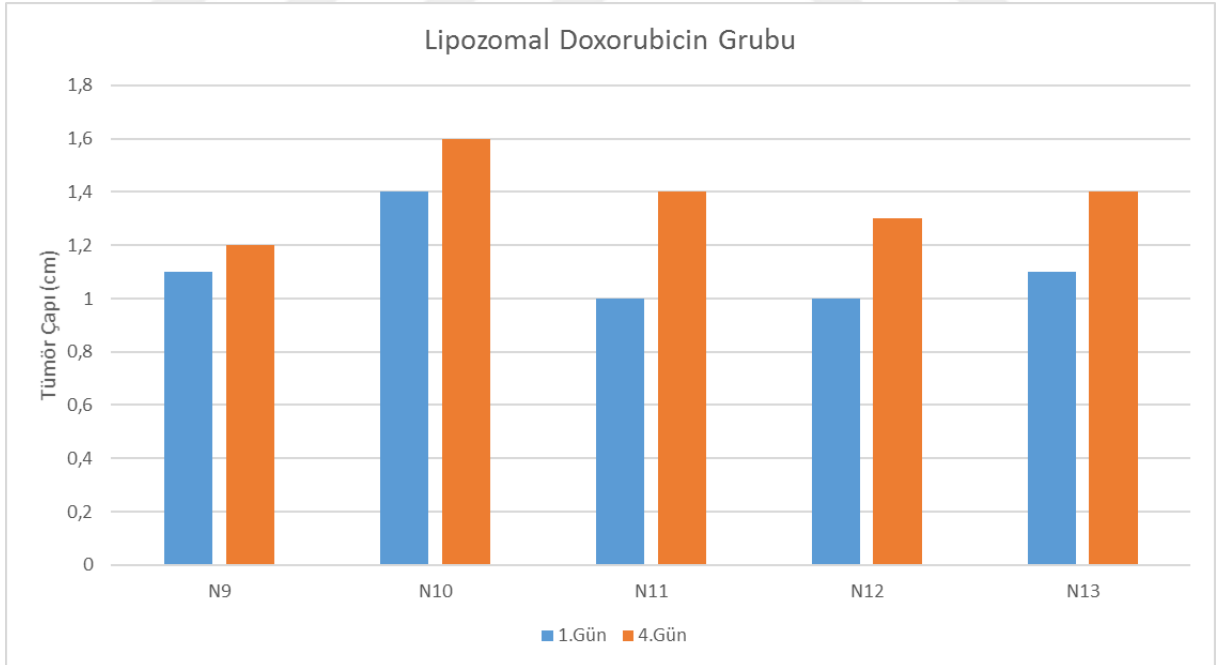
Şekil 16. 4T1 meme kanseri hücrelerinin inverted mikroskop altında görüntüsü.

4.2. Manuel Tümör Boyut Ölçümünün Yapılması

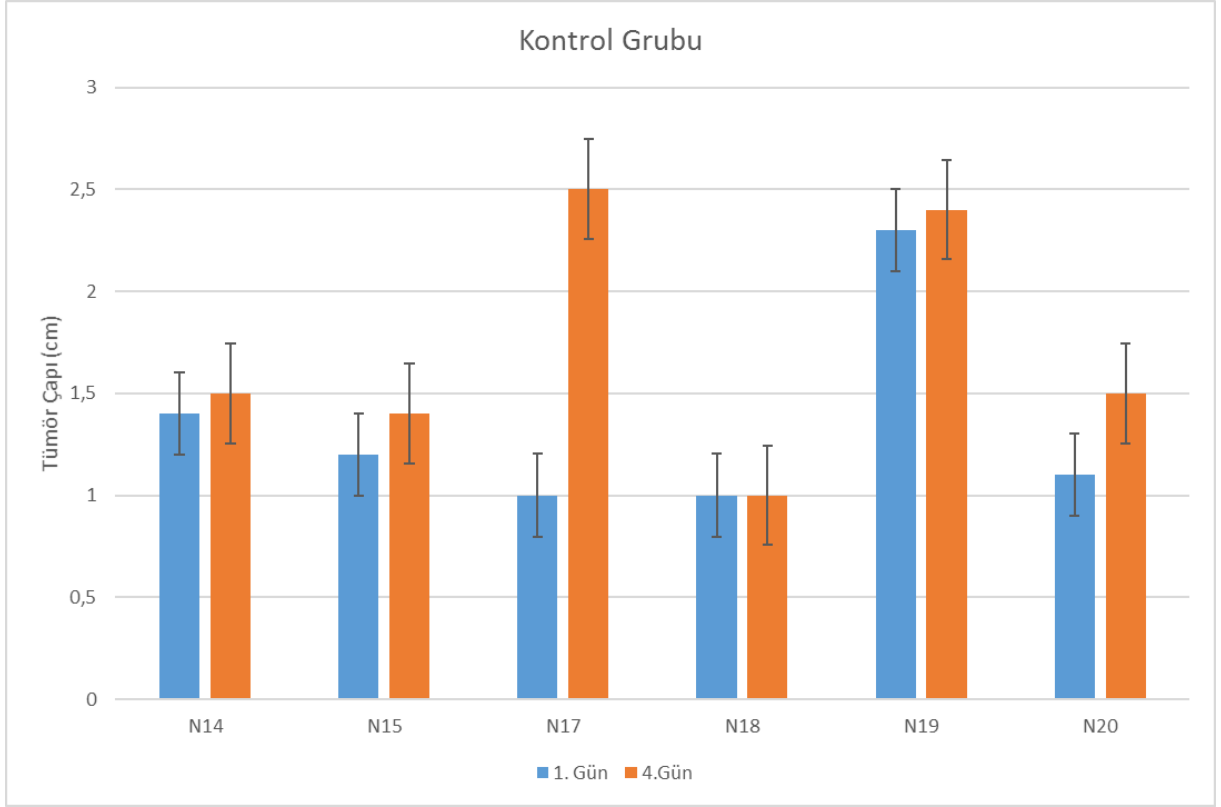
4T1 meme kanseri hücre hattı çoğaltıldıktan sonra farelere 5 ml hacimde subkutan olarak enjekte edildi ve hayvanların tümör oluşana kadar her gün izlemleri gerçekleştirildi. Tümör çapı 1 cm'ye ulaşan farelerde ise enjeksiyonun yapıldığı 1. günden, sakrifikasyonun yapıldığı 4. güne kadar her gün manuel tümör boyutu ölçümü yapıldı.



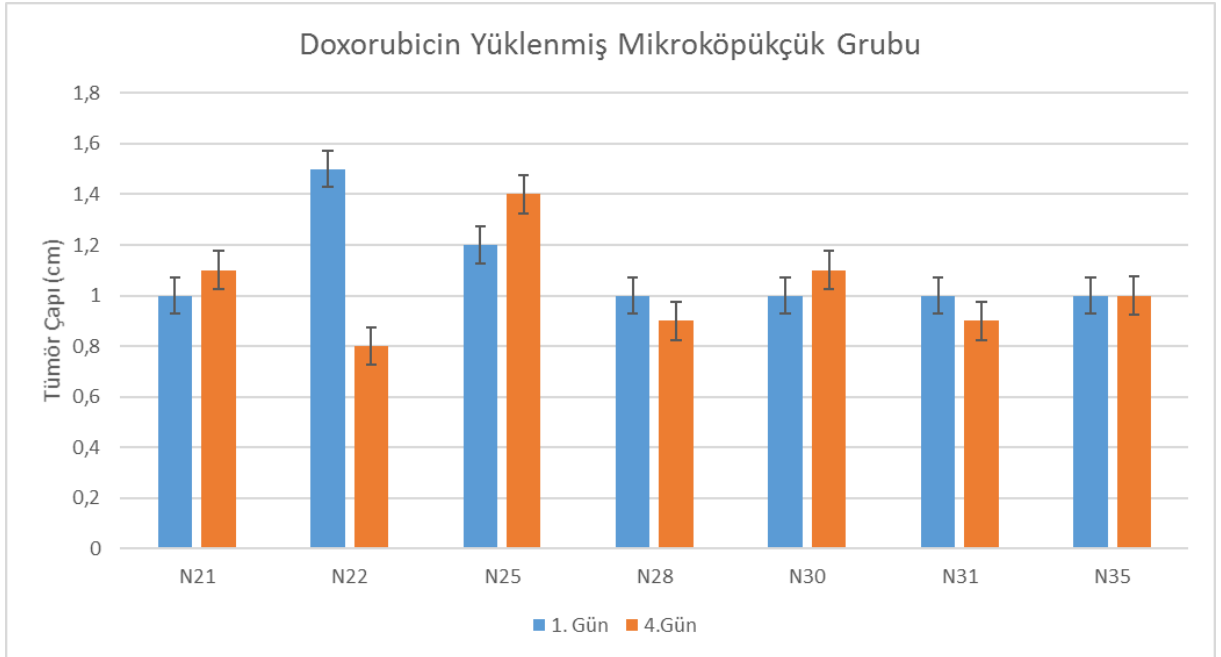
Şekil 17. DOX grubu hayvanlarının 1. ve 4. Gün manuel tümör boyutu grafiği



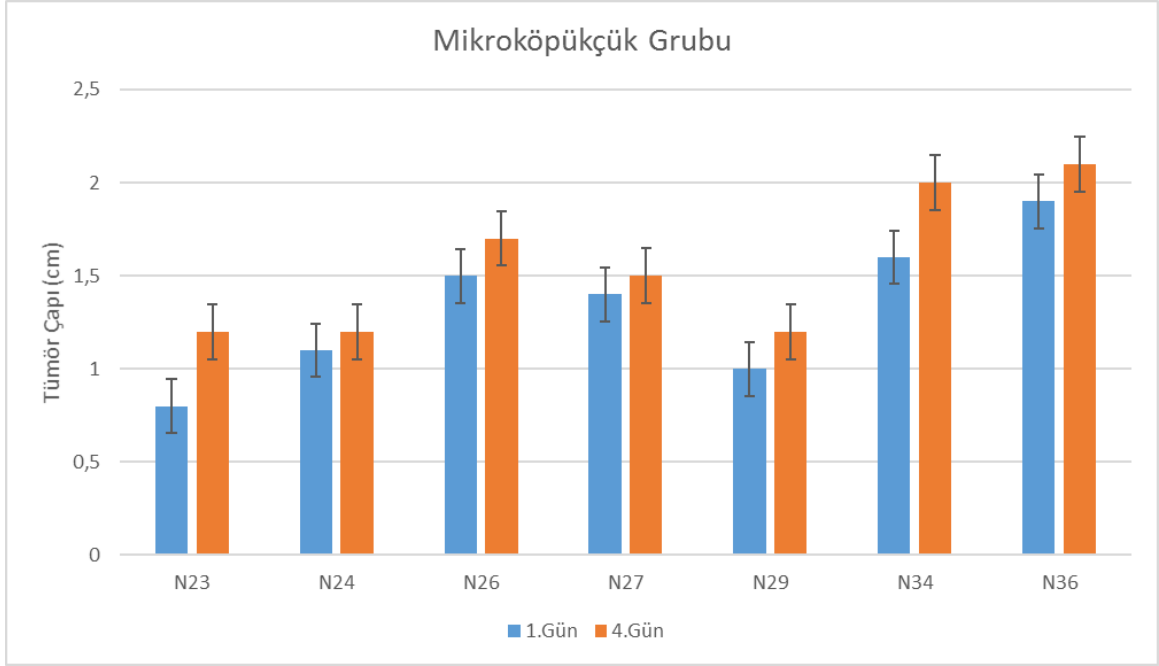
Şekil 18. Lipo-DOX grubu hayvanlarının 1. ve 4. Gün manuel tümör boyutu grafiği



Şekil 19. Kontrol grubu hayvanlarının 1. ve 4. Gün manuel tümör boyutu grafiği



Şekil 20. MB-DOX grubu hayvanlarının 1. ve 4. Gün manuel tümör boyutu grafiği

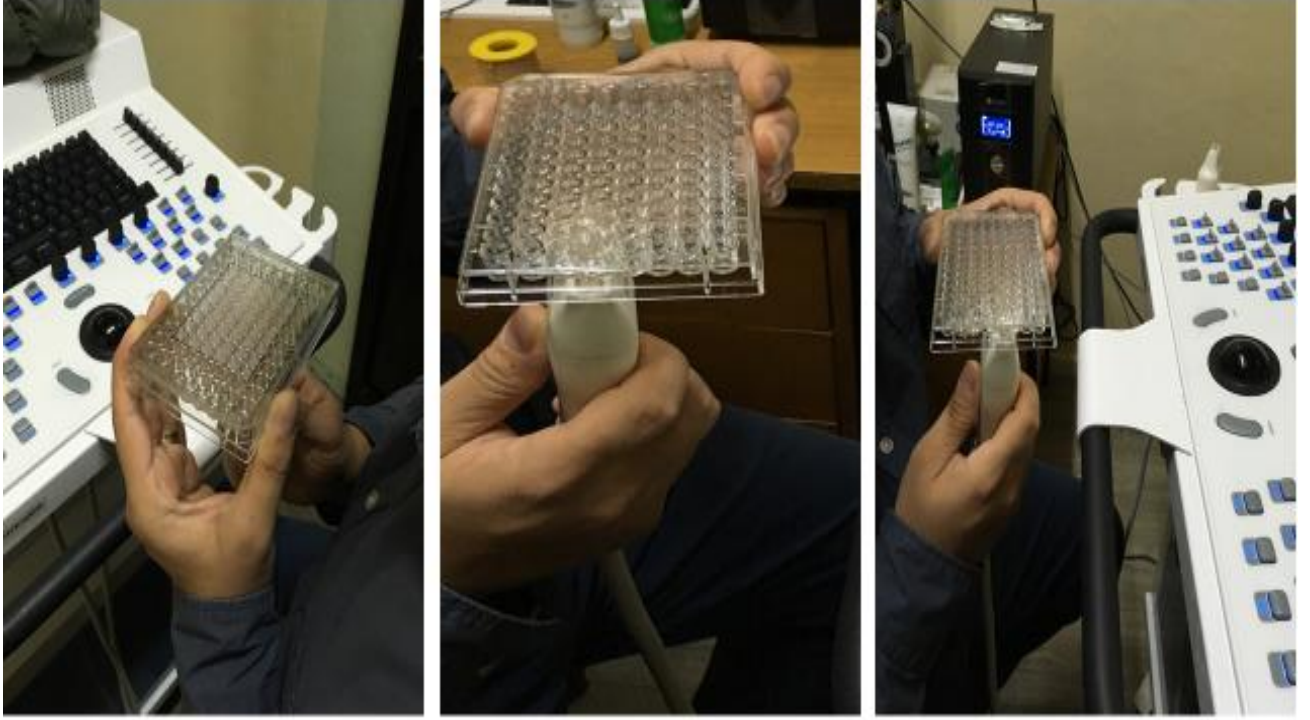


Şekil 21. MB grubu hayvanlarının 1. ve 4. Gün manuel tümör boyutu grafiği

Tüm grupların tümör boyut farkı, gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p=0,145$).

4.3. Mikroköpükçüklerin Ultrason Altında Görüntülemesinin İn-Vitro Olarak Yapılması

Mikroköpükçüklerin farelere verilmeden önce, ultrason altında patlatılabildiğinin gösterilmesi amacıyla ultrason altında 96 kuyucuk well platelere hücre ekimi yapılarak in-vitro bir çalışma yapılmıştır.



Şekil 22. 96 kuyucuklu plate'de ultrasonografik işlemin uygulanması

Ultrason Altında Patlatılmadan
Önce Mikroköpükçüklerin
Kuyucuk İçindeki Görünümü



Ultrason Altında Patlatıldıktan
Sonra Mikroköpükçüklerin
Kuyucuk İçindeki Görünümü

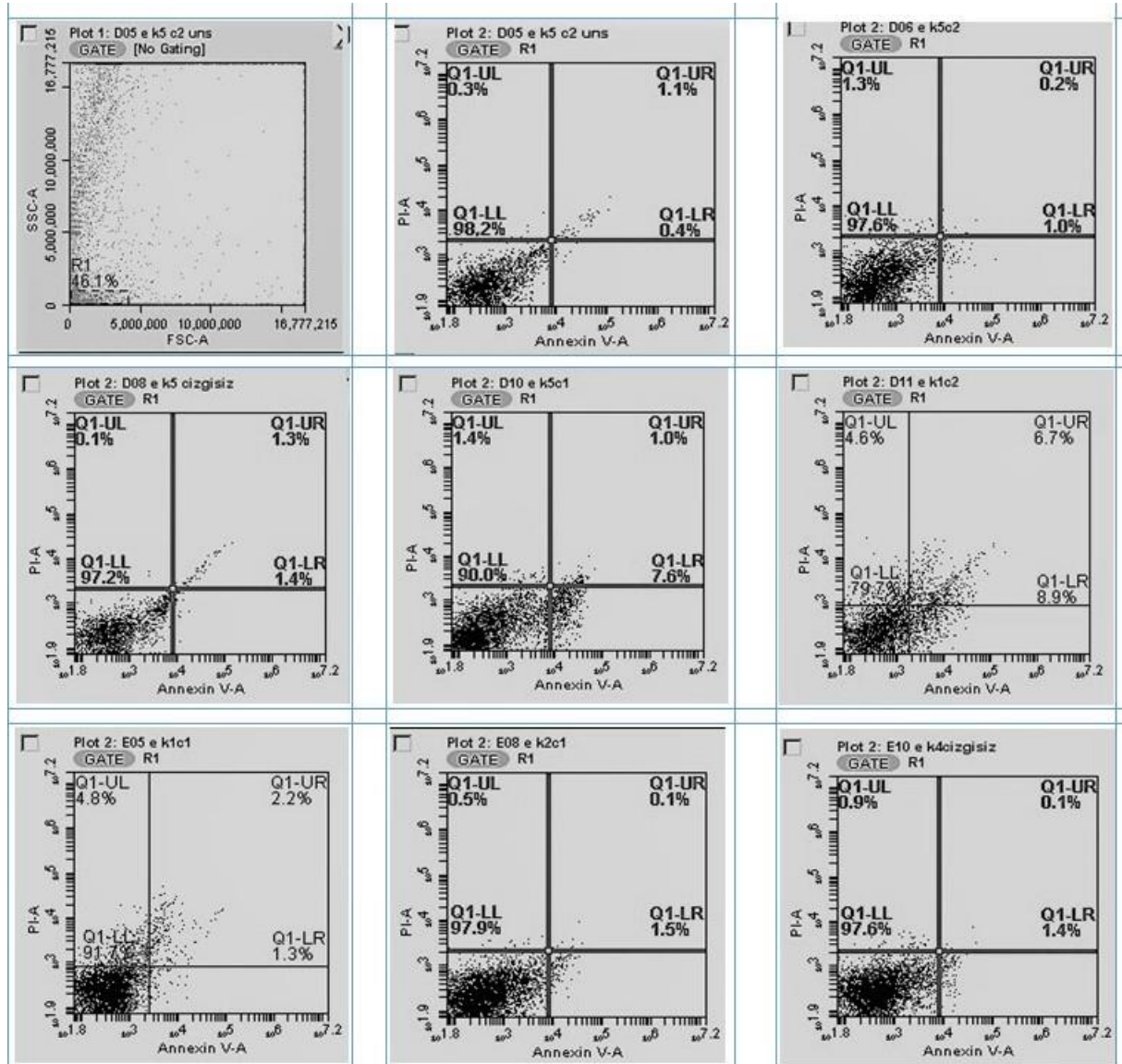


Şekil 23. Kuyucuk içindeki mikroköpükçüklerin ultrason altında patlatılmadan önce ve patlatıldıktan sonraki görüntüleri

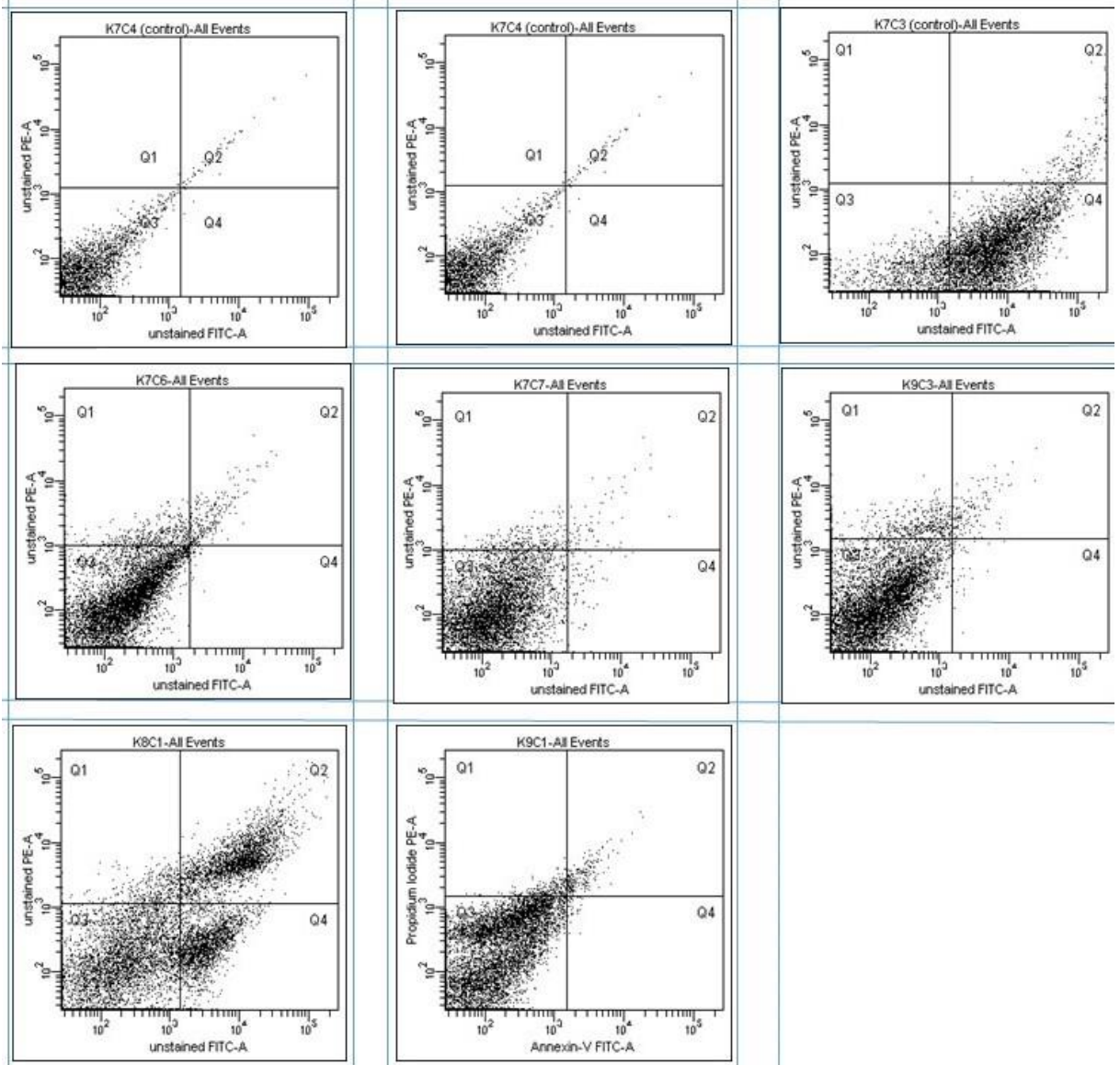
Yapılan bu çalışma sonucunda mikroköpükçüklerin ultrason altında, cihazın mekanik indeksi artırılarak kontrollü bir biçimde patlatılabildiği söylenebilir.

4.4. Akım Sitometri ile Apoptoz Tayininin Yapılması

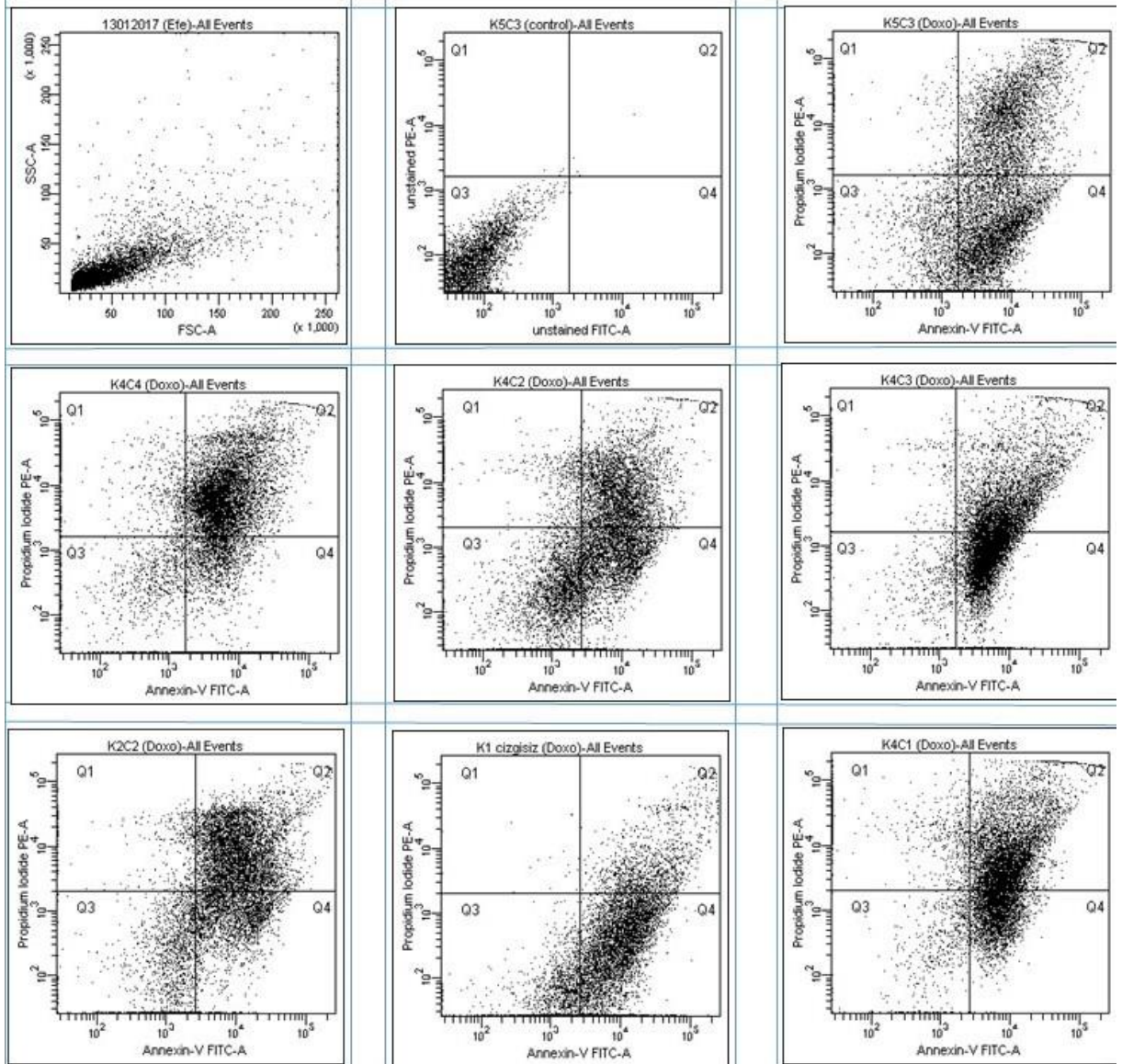
Atimik nude farelerden sakrifikasyon sırasında alınan tümör dokusu örneklerinden, akım sitometri ile apoptoz tayini yapılmıştır. Apoptoz oranı grupla arasında istatistiksel anlamlı saptanmıştır ($p=0,001$).



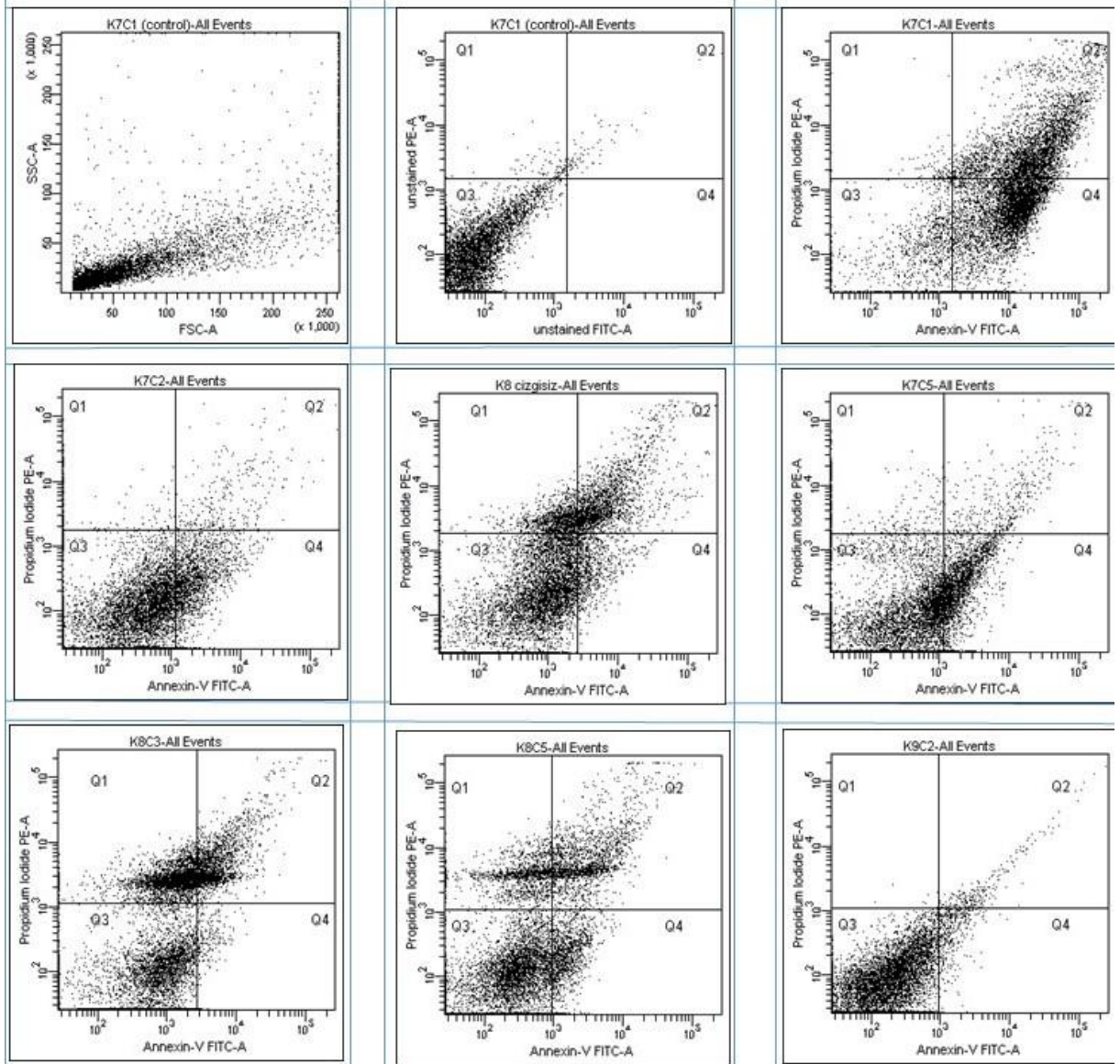
Şekil 24. Kontrol grubuna ait akım sitometrik apoptoz analizi görüntüleri



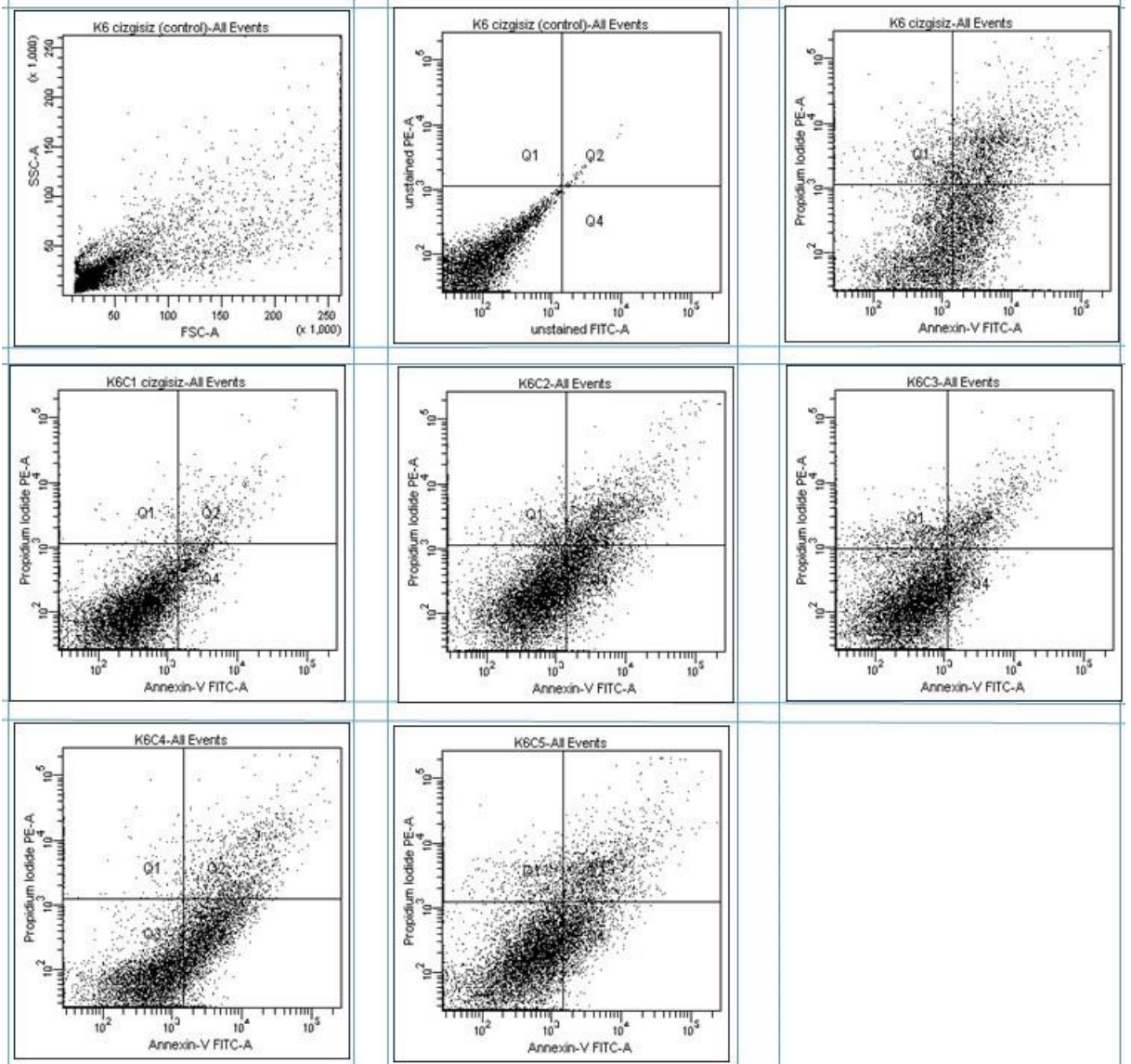
Şekil 25. MB grubuna ait akım sitometrik apoptoz analizi görüntüleri



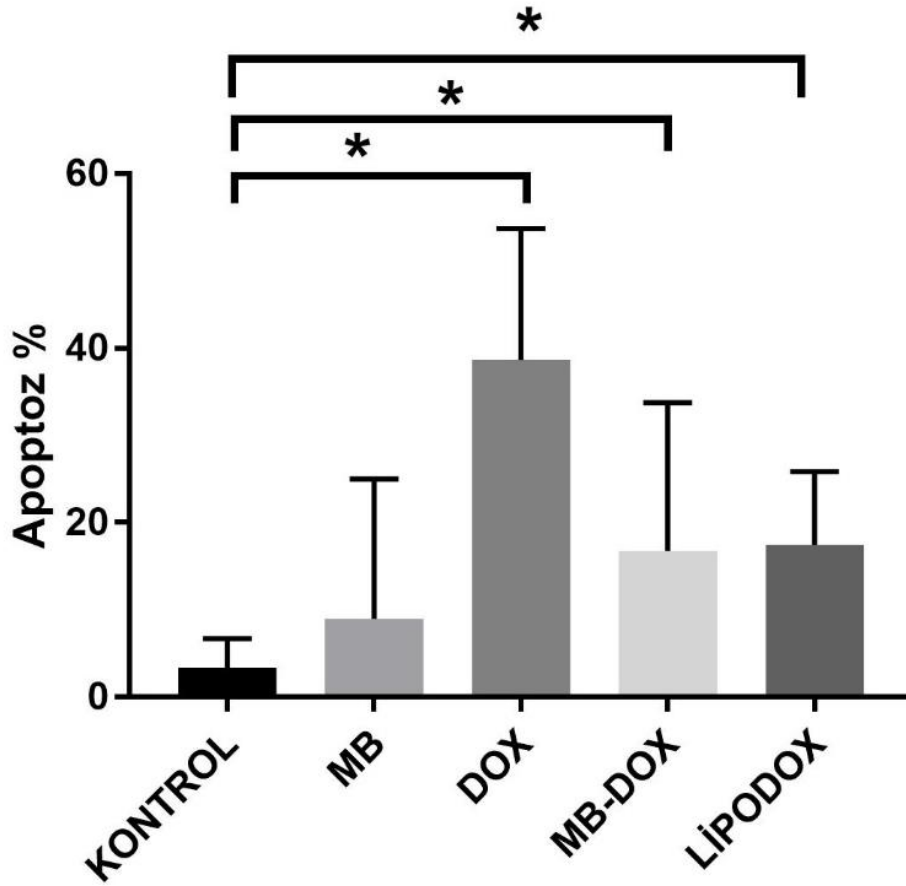
Şekil 26. DOX grubuna ait akım sitometrik apoptoz analizi görüntüleri



Şekil 27. MB-DOX grubuna ait akım sitometrik apoptoz analizi görüntüleri



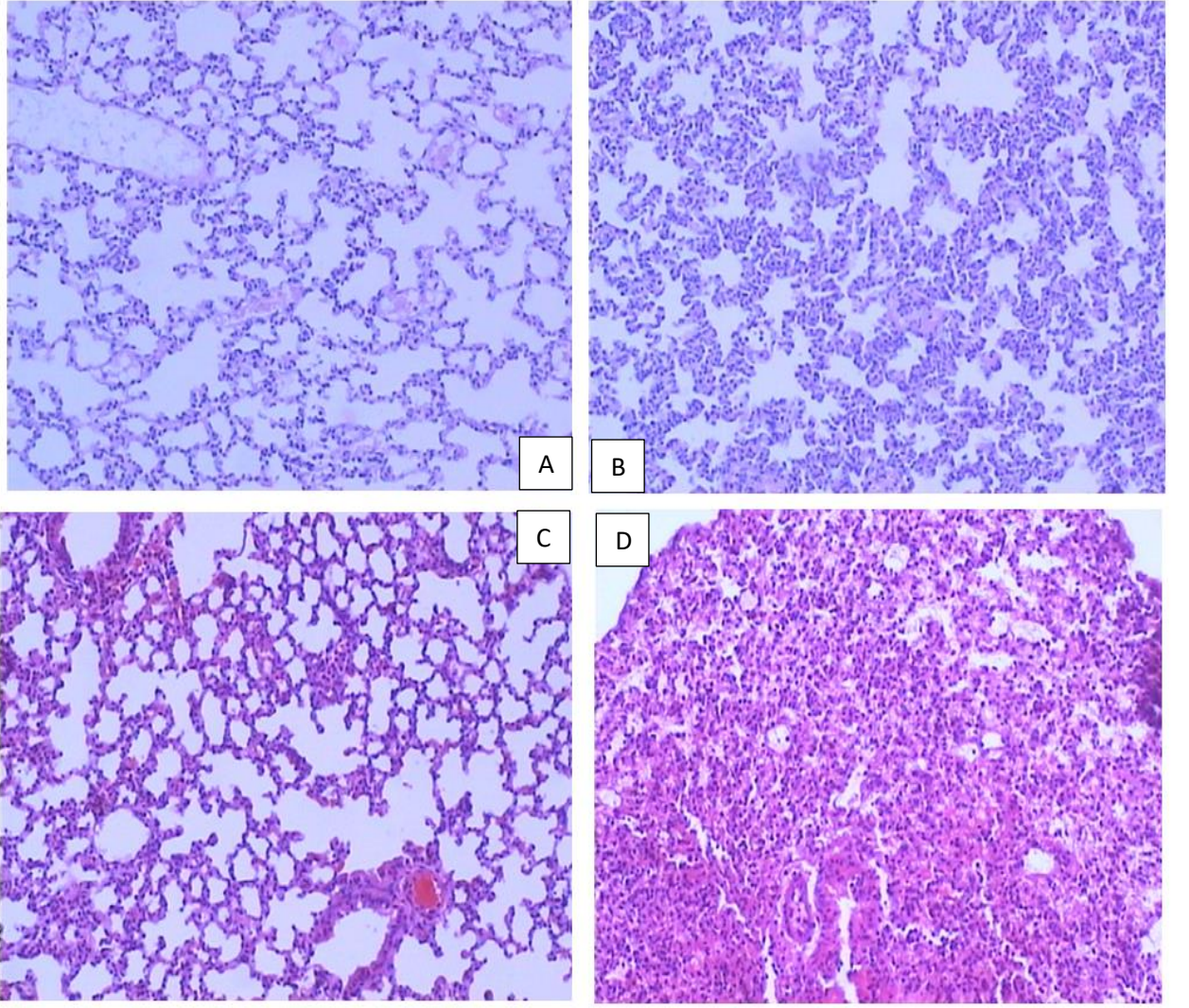
Şekil 28. Lipo-DOX grubuna ait akım sitometrik apoptoz analizi görüntüleri



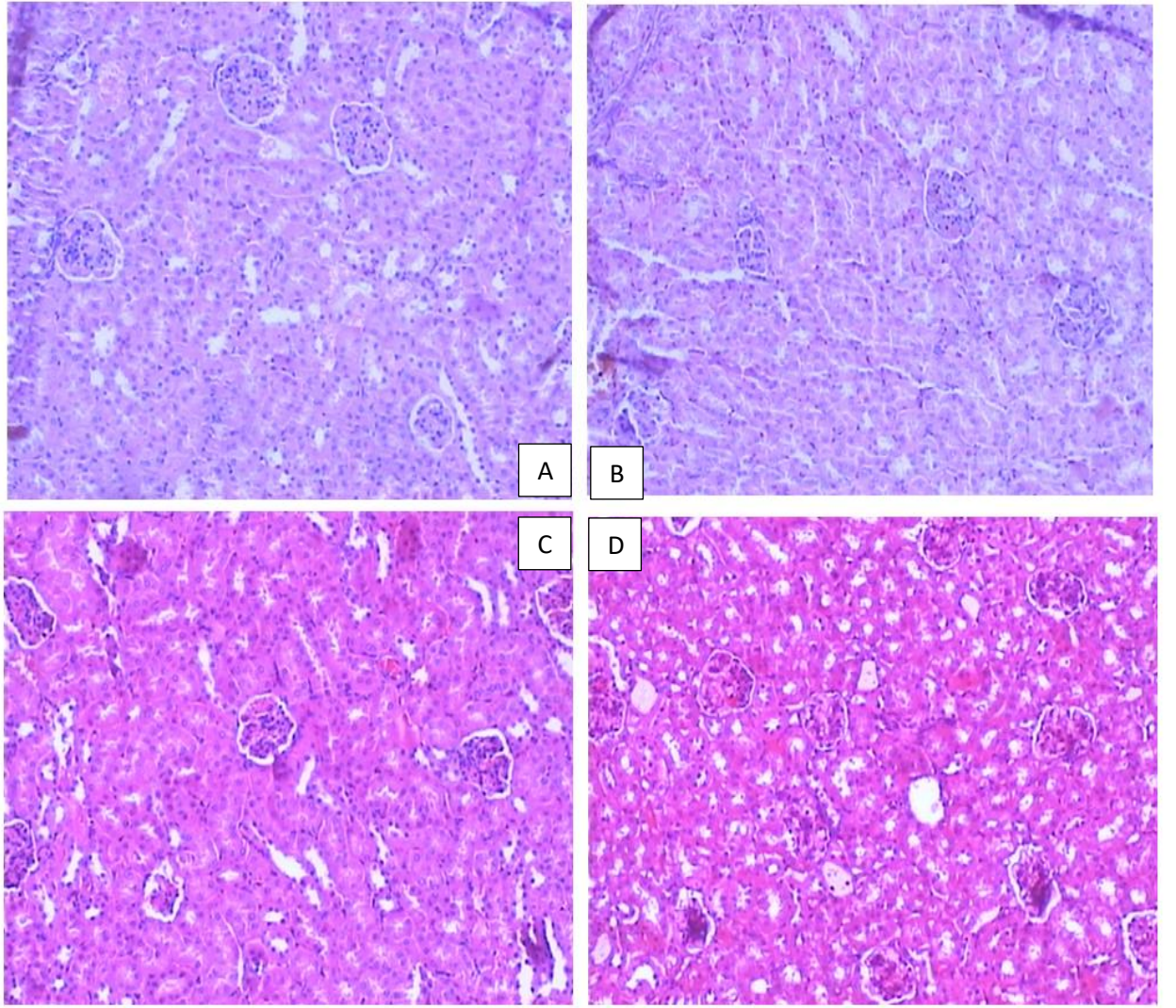
Şekil 29. kontrol grubu ile karşılaştırılan diğer grupların apoptoz yüzdeleri. (* $p<0,05$)

4.5. Histopatolojik Değerlendirmenin Yapılması

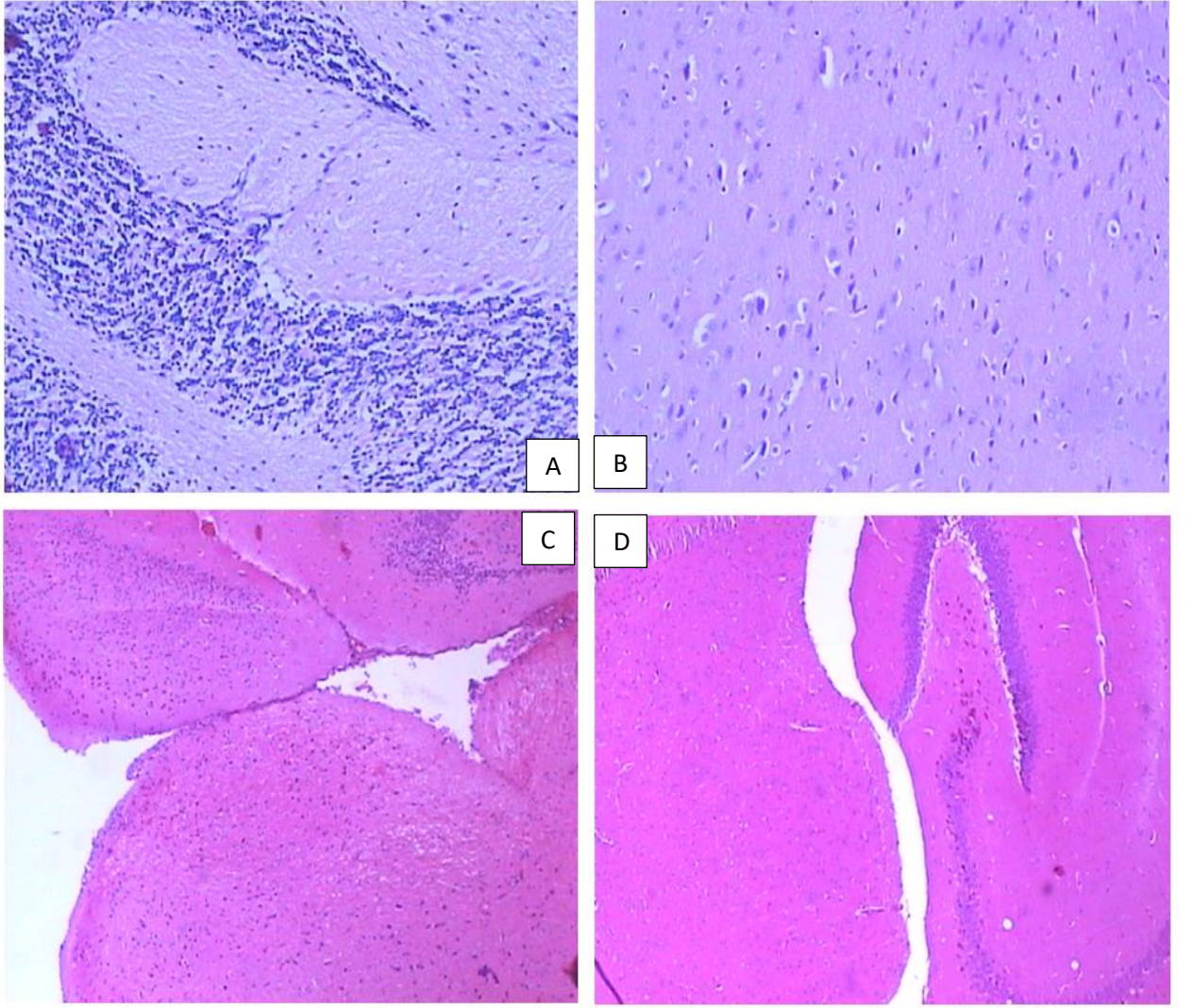
Atimik nude farelerden sakrifikasyon sırasında alınan dokulardan yapılan histopatolojik değerlendirmede akciğer, karaciğer, böbrek, beyin ve tümör dokuları incelendi. Akciğer, böbrek ve beyinde, tüm gruplar için normal histoloji gözlemlendi.



Şekil 30. Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında akciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü. Akciğer dokusundan alınan kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde tüm gruplar için normal histopatoloji gözlemlendi.

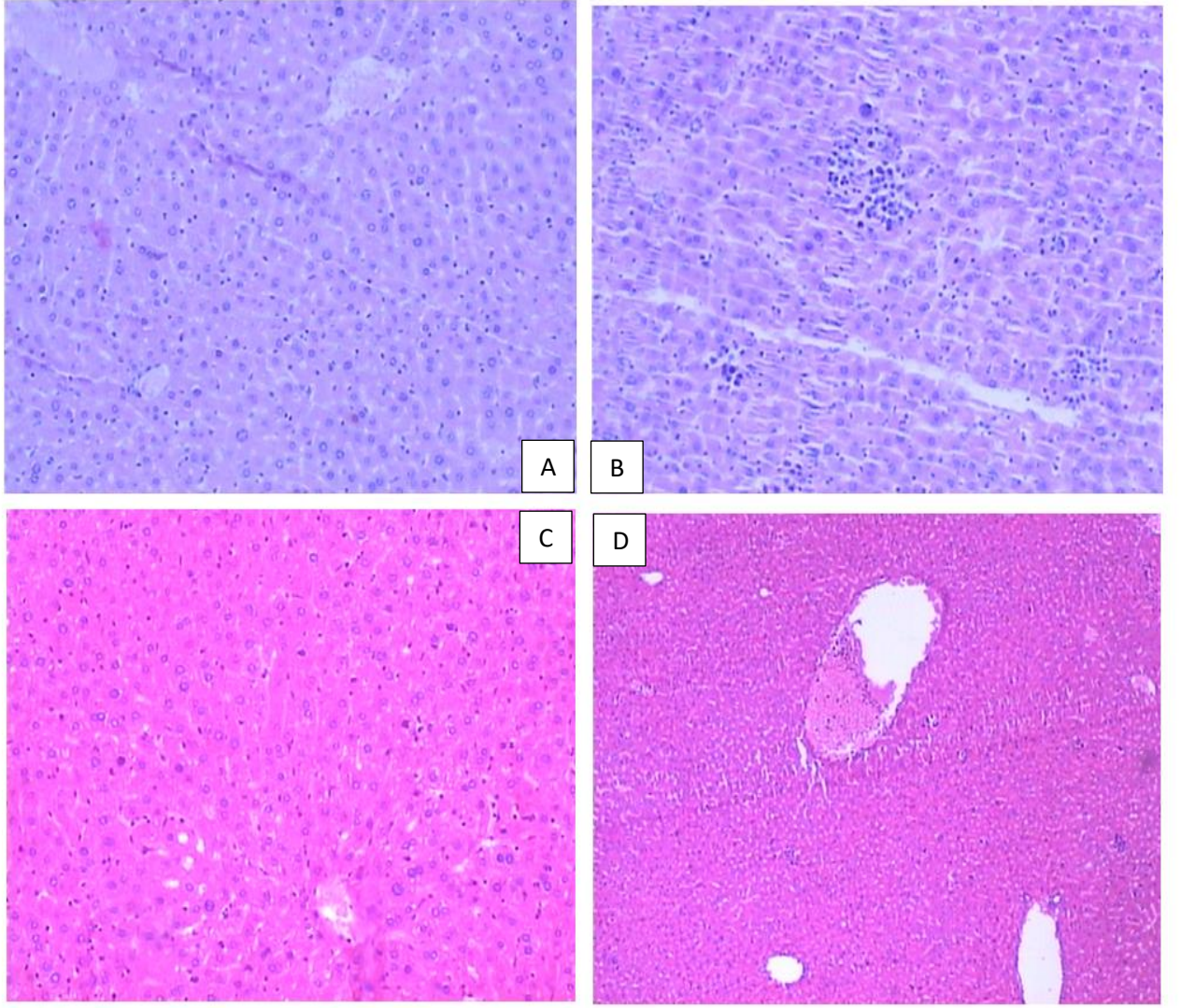


Şekil 31. Kontrol (A), DOX (B) , MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü. Böbrek dokusundan alınan kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde tüm gruplar için normal histopatoloji gözlemlendi.

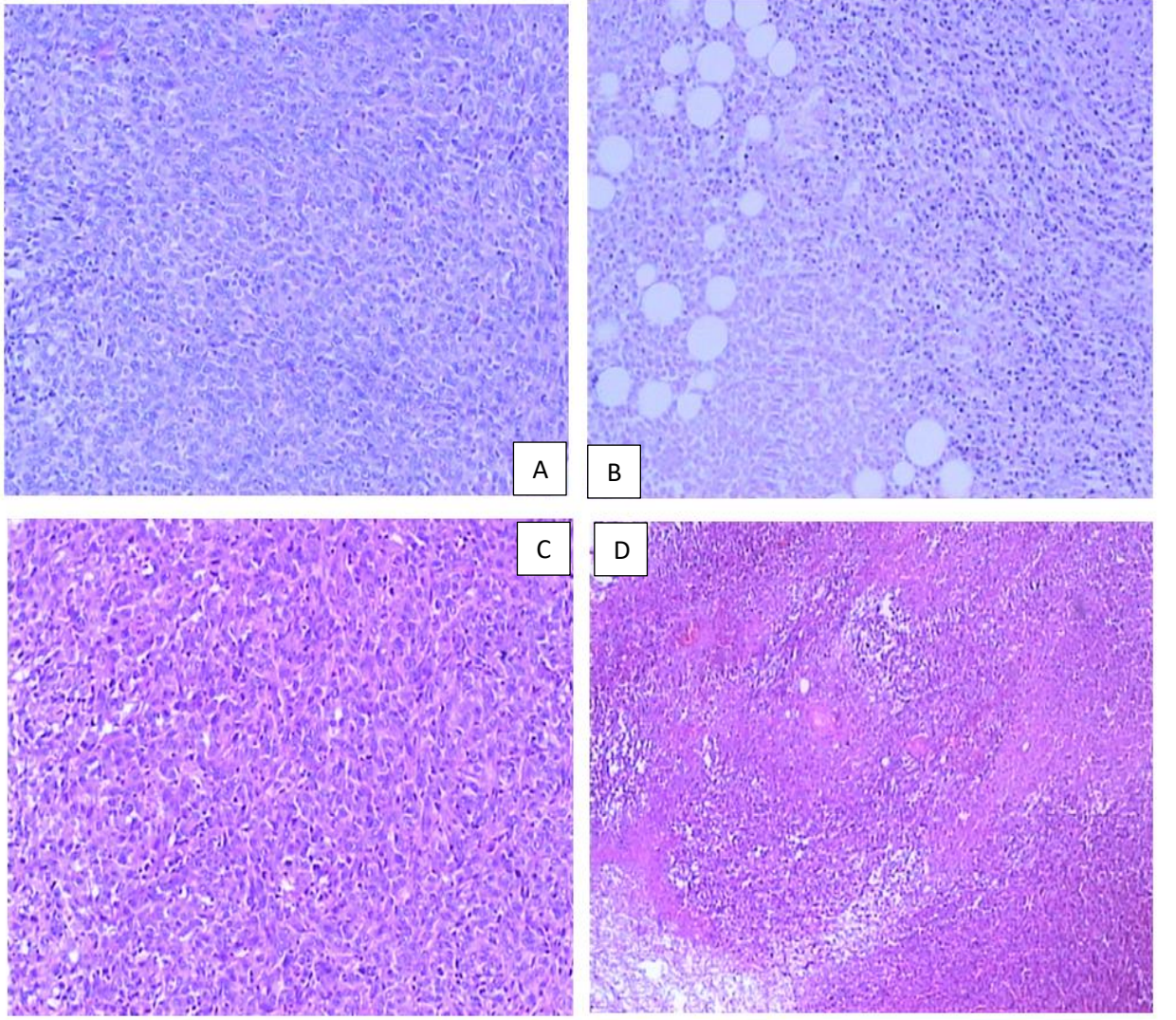


Şekil 32. Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında beyin dokusunun histopatolojik görüntüsü. Beyin dokusundan alınan kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde tüm gruplar için normal histopatoloji gözlemlendi.

Karaciğerde ise, DOX ve Lipo-DOX gruplarında, her bir gruptaki 7'şer olgunun parenkiminde spotty nekroz tarzında hasar, hafif düzeyde dikkati çekmiştir.



Şekil 33. Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında karaciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü. Karaciğer dokusundan alınan kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde, Doxorubicin ve Lipozomal Doxorubicin gruplarında karaciğer parenkiminde spotty nekroz tarzında hasar, hafif düzeyde dikkati çekmiştir.



Şekil 34. Kontrol (A), DOX (B), MB (C) ve MB-DOX (D) gruplarında tümör dokusunun histopatolojik görüntüsü.

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

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

Tablo 2. Tüm gruplardaki 35 hayvanın tümör boyut farkı, nekroz, apoptoz ve canlılık oranlarının ortalamaları (istatistiksel analiz sonucunda p değeri 0,05'ten küçük olan veriler istatistiksel anlamlı değişiklik göstermiş olarak değerlendirilecektir.)

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

Tablo 3. Tüm Gruplara Kruskal Wallis H testi uygulanması sonucu apoptoz oranı, nekroz oranı, canlılık değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Grup	% Canlılık	% Apoptoz	% Nekroz
Kontrol	92%	3%	2,3
Doxorubicin	16%	38%	60%
Mikroköpükçük	80%	9%	6%
Lipozomal Doxorubicin	66%	18%	63%
Doxorubicin Yüklendi	58%	16%	44%
Mikroköpükçük			

Tümör boyut farkı, gruplar arasında istatistiksel anlam vermezken ($p=0,145$) nekroz oranı, apoptoz oranı, hücre canlılığı ve karaciğer hasarı istatistiksel anlamlı saptanmıştır. Bu bulgunun üzerinde her bir grup kendi arasında Mann Whitney-U testi ile değerlendirilmiştir.

Tablo 4. Kruskal Wallis-H testi sonucu anlamlı çıkan grupların arasında Mann Whitney-U testi uygulanması sonucu tümör boyut farkı, nekroz, apoptoz ve canlılık değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (istatistiksel analiz sonucunda p değeri 0,05'ten küçük olan veriler istatistiksel anlamlı değişiklik göstermiş olarak değerlendirilecektir.)

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

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

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

MB ve MB-DOX grupları karşılaştırıldığında, tümör boyut farkı ($p=0,011$) ve Nekroz ($p=0,017$) açısından istatistiksel anlamlı bir fark gözlenirken, apoptoz ($p=0,097$), canlılık ($p=0,128$) ve karaciğer hasarı ($p=1,000$) açısından istatistiksel anlamlı bir gözlenmemiştir. MB grubu için tüm hayvanların ortalamaları alındığında, %2,28 tümör boyut farkı, %80 hücre canlılığı, %9 apoptoz, %6 ise nekroz gözlenmiş olup; MB-DOX grubunda %7,143 tümör boyut farkı, %58 canlılık, %16 apoptoz ve %44 nekroz gözlenmiştir. MB-DOX, MB grubuna göre tümör boyutunda istatistiksel anlamlı bir azalış gözlenmiş, nekroz oranında ise istatistiksel anlamlı bir artış gözlenmiştir. Karaciğer hasarına bakıldığında ise, her iki grupta da karaciğer hasarı anlamlı düzeyde olmadığından, 2 grup arasında karaciğer hasarı bakımından anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

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

Kontrol ve MB-DOX grupları karşılaştırıldığında, tümör boyutu farkı ($p=0,097$) ve karaciğer hasarı ($p=1,000$) için istatistiksel anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Nekroz ($p=0,007$), apoptoz ($p=0,017$) ve canlılık ($p=0,004$) açısından ise istatistiksel anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. Kontrol grubu için tüm %92 hücre canlılığı, %3 apoptoz, %2,3 ise nekroz gözlenmiş olup; Doxorubicin yüklenmiş mikroköpükçük grubunda kontrol grubuna göre %58 canlılık, %16 apoptoz ve %44 nekroz gözlenmiştir. MB-DOX grubunda, apoptoz ve nekroz oranlarında istatistiksel anlamlı bir artış gözlenirken, canlılık değerinde istatistiksel anlamlı bir azalış gözlenmiştir.

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

açısından istatistiksel anlamlı bir artış gözlenirken, canlılık oranında istatistiksel anlamlı bir azalış gözlenmiştir.

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

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

4.6. Biyokimyasal Değerlendirme

Hayvanların sakrifikasyonları sırasında alınan kan ve idrar örneklerinden biyokimyasal analizler yapılmış ve istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. MB verilen grupta örnek sayısı yetersiz olduğundan ($n=1$) değerlendirmeye alınmamıştır. İdrar değerleri açısından kontrol, DOX, Lipo-DOX ve MB-DOX gruplarına Kruskal Wallis H testi yapılmıştır ve kreatinin, protein, albümin değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bu dört grup arasında protein ($p=0,036$), kreatinin ($0,023$) değerlerinde istatistiksel anlamlı fark bulunduğu saptanmıştır.

Tablo 5. Tüm Gruplara Kruskal Wallis H testi uygulanması sonucu idrardaki kreatinin, protein ve albümin değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi (istatistiksel analiz sonucunda p değeri 0,05'ten küçük olan veriler istatistiksel anlamlı değişiklik göstermiş olarak değerlendirilecektir.)

Parametreler	p Değerleri
İdrar-Kreatinin	0,023
İdrar-Protein	0,036
İdrar-Albumin	0,134

Bulunan bu bulgu üzerinde gruplar arasında Mann Whitney-U testi yapılarak değerlerin gruplar arasındaki değişimi istatistiksel olarak incelenmiştir.

Kontrol ve MB-DOX grupları Mann Whitney-U testi yapılarak karşılaştırıldığında, albümin (p=0,032), sgot (p=0,057) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır.

Tablo 6. Kruskal Wallis-H testi ile anlamlı çıkan gruplara Mann Whitney-U testi uygulanması sonucu Kan-kreatinin, protein, albümin, şeker, Serum Glutamik Oksaloasetik Transaminaz (SGOT), Serum Glutamik Piruvik Transaminaz (SGPT), Laktat Dehidrogenaz (LDH) değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (istatistiksel analiz sonucunda p değeri 0,05'ten küçük olan veriler istatistiksel anlamlı değişiklik göstermiş olarak değerlendirilecektir.)

Grup	İdrar-Kreatin p Değeri	İdrar-Albumin p Değeri	İdrar-Protein p Değeri	Kan Şekeri p Değeri	Kan-Kreatin p Değeri	SGOT p Değeri	SGPT p Değeri	LDH p Değeri
Kontrol x MB-DOX	0,730	0,032	0,730	0,057	0,343	0,047	1,000	0,057
Kontrol x DOX	0,413	0,286	0,556	0,610	0,914	0,914	0,257	0,762
Kontrol x Lipo-DOX	0,05	0,548	0,016	-	-	-	-	-
DOX x MB-DOX	0,343	0,486	0,486	0,010	0,476	0,114	0,476	0,038

Kontrol ve DOX gupları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanamamıştır.

Kontrol ve Lipo-DOX grupları karşılaştırıldığında, kan örnekleri elde edilemediği için istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. İdrarda ise, iki grup arasında protein değeri ($p=0,016$) istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu saptanmıştır.

Buna göre protein değeri, Lipo-DOX grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir.

DOX MB-DOX grupları karşılaştırıldığında, kan şekeri ($p=0,010$) ve LDH ($p=0,010$) değerlerinde anlamlı istatistiksel fark saptanmıştır.



5. TARTIŞMA

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

Bu hedef doğrultusunda 4T1 meme kanseri hücresi, *in vitro* olarak üretilmiş ve atimik nude farelere enjekte edilmiştir. Tümör oluşumlarını takiben, sadece serum fizyolojik(SF) verilecek olan kontrol grubu, tümör oluşumunu takiben ultrasonografik görüntülerde kontrastlanmayı sağlayacak olan MK'lerin verileceği grup, tümör oluşumunu takiben DOX verilecek olan grup, DOX yan etkilerini azaltmak amacıyla, tümör oluşumunu takiben LİPO-DOX verilecek olan grup, ve hedeflendirilmiş tedavi denemesinin yapılacağı DOX yüklü MB (MB-DOX) verilecek olan grup oluşturulmuştur.

Ultrason altında tümör boyut ölçümü yapılan hayvanlar; ilaç enjeksiyonları sonrası 4. günde yine ultrason altında boyut ölçümünü takiben sakrifiye edilmişlerdir. Sakrifikasyon sırasında uygun koşullarda alınan karaciğer, akciğer, beyin, böbrek ve tümör dokularında akım sitometri ile apoptoz tayini, histopatolojik olarak incelemeleri ve yapılmış, aynı zamanda yine hayvanların sakrifikasyonu sırasında hayvanlardan alınan kan ve idrar örneklerinden biyokimyasal analizler yapılmış ve tüm bu sonuçlar çerçevesinde istatistiksel olarak grupların birbirleriyle değerlendirilmesi yapılmıştır.

İstatistiksel analizler incelendiğinde Tümör boyut farkı, gruplar arasında istatistiksel anlam vermemiştir ($p=0,145$). Anlamlı fark olmamasının nedeni olarak sakrifikasyonların 4.günde yapılması gösterilebilir. Doxorubicin grubundaki tümörlerde nekrotik ve apoptotik etki, kontrol grubuna göre anlamlı artışta iken, Doxorubicin grubundaki tümörlerde resorbsiyon olmayışı, tümör boyutunda fark olmamasının nedeni olarak gösterilebilir.

Hayvan kullanımını minimum sayıda tutmak amacıyla, tek doz MB-DOX denenmiş olması, hayvanlara ultrason altında görüntüleme işleminin hayvan refahı açısından her

gün yapılamıyor oluşu, tümör boyutunda istatistiksel anlamlı azalma olmamasının nedenleri arasında gösterilebilir.

Doxorubicin, çok geniş bir etki yelpazesine sahip, kendi başına veya diğer ajanlarla kombinasyon halinde reçete edilebilen, antrasiklin sınıfının en güçlü üyelerinden bir antikanser ilaçtır (34,35).

Geniş aktivite yelpazesi nedeniyle göğüs, prostat, rahim, yumurtalık, karın ve karaciğer tümörleri, çocukluk çağı solid tümörleri, osterosarkomlar ve yumuşak doku sarkomları ve Kaposi sarkomu gibi katı tümörlerin ve akut miyeloblastik ve Lenfoblastik lösemi gibi hematolojik malignitelerin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (34, 36,37)

Yapılan çeşitli çalışmalarda, Doxorubicin'in özellikle erken evre meme kanserinde standart terapi olarak kullanıldığı bilinmektedir (20).

Klinik uygulamada serbest DOX kullanımı, oluşturduğu birçok ciddi sistemik yan etkiler nedeniyle halen oldukça sınırlıdır (35). Nitekim, tümörde hasar oluşturmalarının yanı sıra kardiyotoksisiteye ve nefrotoksisiteye neden olur (38)

Doxorubicin ile ilgili bilinen en önemli yan etkinin kardiyak problemler olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (20,39). Rivankar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Doxorubicin'in kümülatif dozunun 450 mg/m²'de kardiyak hasara yol açmazken, 550 mg/m² ve 700 mg/m²'de kardiyak hasara yol açtığını göstermiştir (20). Bu durum, yüksek doz Doxorubicin kullanılması gereken hastalarda önemli oranda risk teşkil etmektedir.

Ek olarak, serbest DOX'ın etkinliği, P-glikoproteinden ve topoizomeraz II direncinden kaynaklanan çoklu ilaç direnci nedeniyle de engellenmektedir (40).

Doxorubicin'in kullanımını sınırlayıcı etkilerinin, lipozomların terapötik olarak kullanımıyla aşılabileceğine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır

Lipozomları kullanmanın başlıca avantajlarından biri, bu vezikülleri oluşturan fosfolipidlerin doğal kaynaklardan çıkarılması ve vücut için güvenli olmasıdır. Buna ek olarak, fosfolipid çift tabakanın doyma seviyesi, ilaç salınım oranını değiştirmek üzere modifiye edilebilir (20,22). Buna ek olarak lipozomlar, retiküloendotelial sistem tarafından tanınmayı önlemek için yüzeylerinde PEG (polietilen glikol) zincirleri içerir (38).

Lipozomların kullanılmasıyla yan etkilerin azalmasının görülmesi üzerine, birçok çalışma lipozomları insan kullanımı için denemeye başlamıştır (41). Lu ve arkadaşları, Lipozomal Doxorubicin'in, tedavi ile ilişkili yan etkiler yönetilebilir olduğu için evre 1-3 invaziv meme kanserlerinde kullanılabileceğini göstermiştir. Ghannam ve arkadaşları, Doxorubicin yüklü lipozomların, bazı katı tümörlerde, serbest Doxorubicin ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğunu göstermişlerdir (22).

Bu çalışmada ilaç enjeksiyonları tümör hacim gelişmesine bakılmaksızın 7.günde yapılmıştır. Bizim çalışmamızda ise tümör enjeksiyonunu takiben tümör hacim kontrolü yapılmış ve ilaç enjeksiyonu, tümör hacmi 1cm³'e ulaştığında yapılmıştır. Çalışmadaki kontrol ve serbest DOX (2µg Dox/ Hayvan Ağırlığı g) grubu hayvanları 30. güne kadar yaşatılırken, Lipo-DOX grubu hayvanları 60.güne kadar yaşatılmışlardır. Bizim çalışmamızda ise tüm gruplarda ilaç enjeksiyonundan sonraki 4. güne kadar yaşatılmışlar, 4. günde tümör boyut ölçümünü takiben kurban edilmislerdir. Kontrol grubunda hayvanların kurban edildiği 30.gündeki tümör büyüklüğü 0,93 cm³ iken serbest DOX grubunda tümör büyüklüğü 0,85 cm³'tür. Lipo-DOX grubunda tümör büyüklüğü, ancak 40.günde kontrol ve serbest DOX içeren grubun tümör büyüklüğüne yaklaşabilmiştir. Ancak 40. günden sonra tümör büyümesi devam etmiştir ve kurbanın yapıldığı 60. günde tümör büyüklüğü 1,5 cm³ olarak ölçülmüştür. Çalışmada ilaç yüklü lipozomların, ilacın metabolizma ve bağışıklık tepkilerinden koruyarak daha uzun süre etkili tuttuğunu, bu nedenle kurbanın kontrol e ve serbest DOX'a göre daha ileri bir zamanda yapıldığına dikkat çekilmiştir (22).

DOX'un lipozomal formu olan ve FDA onayı alan ilk formülasyonlardan biri olan Doxil'in, klinik çalışmalarda Serbest Dox'un yarattığı kardiyotoksikiteyi önemli oranda azalttığı gösterilmiş olsa da, Doxil kullanımına bağlı da çeşitli yan etkiler ortaya çıkmıştır. Özellikle tümör damar yapısı dışında deri kılcal damarlarında lipozomların pasif bir şekilde birikmesi durumu birçok hastada gözlenmiştir (35,38).

Bu nedenle, birçok araştırma grubu, DOX'in yüklü araçlara ligandlar veya antikorlar eklenmesi yoluyla DOX'in tümörlere hedeflenmesini arttırmaya çalışmaktadır (38).

Bununla birlikte 1980'lerden beri yapılan çalışmalarda, ilaç taşınımını arttırmak için akustik dalgalar gibi ultrason ilişkili yöntemlerin kullanılması gerektiği ortaya konmuştur (42).

Geçmişte ultrason, ilaç yüklü taşıyıcılardan ilaç salınımını başlatmak için harici bir tetikleyici olarak kullanılmıştır. İlk çalışmalarda, düşük frekans (<1 MHz) ultrason kullanılarak deneyler gerçekleştirilirken, daha yakın zamanlarda, yüksek frekanslı ultrasonun (1-10 MHz), mikroköpükçüklerle kombine edildiğinde, ilaçların hücre içi iletimi ve salınımını artırabileceği gösterilmiştir (43). Mikroköpükçükler bir ultrasonik alanın etkisi altında iken büyüyüp daralabilir yani kavitasyona uğrayabilir. Ultrason yoğunluğu yeterince yüksek olduğunda ise, mikroköpükçükler kavitasyona dayanamayarak parçalanabilir. Sonuçta mikroköpükçüklerin patladığı yerin yakındaki hücrelerin zarlarında geçici olarak delikler açılabilir ve dolayısıyla ilaçların hücre içi alımı kolaylaşabilir. Bu olguya sonoporasyon denir (38).

Bununla birlikte, DOX-lipozomları ve mikroköpükçüklerin birlikte enjekte edilmesinin önemli bir dezavantajı, DOX-lipozomların hâlâ ekstrevasyona uğraması ve cilt kılcal damarları gibi istenmeyen dokularda (ultrasona maruz bırakılmayan bölgelerde) birikmesidir. Lipozomlar ve mikroköpükçüklerin birbirine bağlanması ise bu durumu önleyebilir. Lipozomların mikroköpükçük duvarına tutturulması ile lipozom içindeki DOX'un dışarı salınımını durdurulabilir. Bu nedenle, DOX içeren lipozomların, mikroköpükçüklerin lipid kabuğuna avidin-biotin bağlanması yoluyla "DOX-yüklü mikroköpükçükler" tasarlanmıştır.

Doxorubicin kullanımında ultrasonun sinerjik etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (44). Ancak bu çalışmalar genellikle ultrasonun tek başına kullanılması ve devamında Doxorubicin'in hücre içine iletimi üzerine yoğunlaşmıştır (34,45,46).

Daha önceki çalışmalarda Ultrason ve Doxorubicin iletimi iki ayrı mekanizma olarak çalışılırken, Gao ve meslektaşları, ultrasonla muamele edildiğinde DOX'u serbest bırakabilen bir DOX-yüklemeli mikroköpükçük tasarımını ilk yayımlayan kişiler olmuştur (47). Gao ve meslektaşları yaptıkları çalışmada perfluoropentan gazı ve onu stabilize etmek için kullanılan biyolojik olarak parçalanabilir blok kopolimerlerden yapılmış nanoköpükçükler oluşturmuşlardır. Oluşturulan nanoköpükçüklerin, tümör kan damarlarının normal doku vaskülatürden daha geçirgen olması nedeniyle pasif bir hedefleme yoluyla tümör dokusunda birikmesi sağlanmıştır. Nanoköpükçüklerin hücre içine salınımı sonrası sisteminin 5 dakika boyunca 42 ° C'ye ısıtılması üzerine 29 ° C'lik bir kaynama noktasına sahip olan perfluoropentan buharlaştırılmış ve

nanoköpükçüklerin (691 nm) birleşerek mikroköpükçüklere (1.24 μ m) dönüşümü ve devamında güçlü ultrason kontrastı sağlanmıştır. Son olarak ise mikroköpükçükler ultrason altında kontrollü olarak patlatılarak lokal ilaç salınımı sağlanmıştır (47).

Gao ve arkadaşlarının atimik nude farelerle yaptıkları çalışmada hayvanlarda tümör oluşumu gözlemlendikten sonra tedavi 2 ay boyunca, haftada 1 gün ilaç verimi olacak şekilde sürerken; bizim çalışmamızda tümör çapı 1 cm³'e ulaştığı andan itibaren ilaç uygulaması yapılmış ve ilaç uygulamasını takiben 4 günde hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

Çalışmada hayvanların sağ ve sol arka kısımlarında tümör oluşturulmuştur. Tümörlerin ikisine de 0,75 mg/ml dozda liposozomal kaplı DOX yüklü mikroköpükçük verilmiştir. Bizim çalışmamızda ise hayvanlara 0,125 mg/ml olacak şekilde DOX verilmiştir. bu çalışmada, hayvanlardaki tümörlerin bir tanesine ilaç verilmesine rağmen ultrason uygulanmazken diğer tümöre ilaç enjeksiyonundan 4 saat sonra ultrason uygulanmıştır. Bizim çalışmamızda ise ilaç uygulaması ile aynı anda ultrason uygulaması da yapılmış, mikroköpükçükler ultrason altında patlatılmıştır. Çalışmada 2 aylık tedavi süresince ultrason almış tümörün büyümesinin, ultrason almamış olan tümör büyümesine göre anlamlı farklılık gösterdiği belirtilmişse de, her iki uygulamada da tümör boyut küçülmesi gözlenmemiştir (47).

Lentacker ve çalışma arkadaşlarının melanom hücrelerinde DOX yüklü mikroköpükçüklerin ultrason ile etkileşiminin incelendiği bir çalışmada, DOX yüklü mikroköpükçüklerin, ultrasona maruz bırakıldığında, serbest liposozomal Doxorubicin'lerden çok daha fazla tümör hücresi öldürüldüğü gösterilmiştir (38).

Bu çalışmada BLM melanom hücre hattı kullanılmış ve Lipo-DOX, ultrason ile indüklenmiş Lipo-DOX ve Ultrason ile indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin hücre canlılığına etkisi, hücre kültürü düzeyinde incelenmiştir. 30 μ g/ml DOX konsantrasyonunda, ultrason ile indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçük %40 canlılık gösterirken, Lipo-DOX ve ultrason ile indüklenmiş Lipo-DOX gruplarında yaklaşık %80 hücre canlılığı göstermiştir. Doz artışı ile beraber ultrason ile indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir. Ultrason ile indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçükler 50 μ g/ml'lik DOX dozunda %70 canlılık, 100 μ g/ml'lik DOX dozunda ise %60 canlılık göstermiştir.

Çalışmanın devamında ise, antikanser ilaçların biyolojik aktivitesi üzerindeki sinerjistik etkisi, çalışmacılar tarafından açıklanmaya çalışılmıştır. Buna göre; lipozomal kaplı DOX'un ultrasonla muamelesi sonucu, DOX'un hücrelere pasif difüzyon ve pinositoz yoluyla giren lipozomlardan salındığı düşünülmektedir. Bu hipotezi doğrulamak için; mikroköpükçüklerin yarattığı kavitasyon etkisinin, hücre zarındaki doğrudan etkisinden kaçınılmalıdır, böylelikle sadece DOX'tan gelen sitotoksik etki hesaba katılabilir. Bu nedenle öncelikle mikroköpükçükler, melanom hücreleri olmadan ultrasona maruz bırakılmıştır. Daha sonra, mikroköpükçüklerin patlatılması sonucu yayılan Lipo-DOX'un bulunduğu ortam, melanom hücrelerinin bulunduğu kaba aktarılmıştır. Böylelikle mikroköpükçüklerin, melanom hücreleri üzerine kavitasyonu ve melanom hücrelerinin sonoporasyonu önlenmiştir. 4 saatlik inkübasyondan sonra ortam uzaklaştırılmış ve 48 saat sonra hücre canlılığı ölçülmüştür. 30 µg/ml DOX dozunda bu grup için %45, 50 µg/ml DOX dozunda %38 canlılık ve 100 µg/ml DOX dozunda %30 canlılık gözlenmiştir. Bu grup ultrason ile indüklenmiş Lipo-DOX yüklü mikroköpükçük grubundan daha az hücre ölümü yapmış olmasına rağmen, sadece lipo-DOX uygulanan gruba göre daha fazla hücre ölümüne neden olmuştur (38).

Bunun yanı sıra DOX-yüklü mikroköpükçüklerin Lipo-DOX'a göre daha az yan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Çünkü Ultrasona maruz kalmayan dokularda mikron boyutlu DOX yüklü mikroköpükçükler bozulmadan durmakta ve bu nedenle Lipo-DOX'u serbest bırakmamaktadır.

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

Bu çalışma ile, ultrason ve mikroköpükçüklerin kullanımı sonucu kanser hücrelerinin ölümünde artış olduğu gösterilmiştir (34).

Bizim de çalışmamızda ultrason görüntüleme cihazını kullandığımız Vevo marka mikroköpükçük ile DOX'un ultrason altındaki uygulamasının hem glioblastoma hem de meme kanseri hücreleri ölümünde sinerjistik bir gelişmeye neden olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, serbest DOX ve 400 kPa, 600 kPa, 800 kPa ultrason değerlerinde indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçüklerin, U87-MG glioblastom ve MDAMB-231 meme kanseri hücre hatlarında, hücre canlılığı üzerine 48. saatteki etkileri incelenmiştir. Buna göre U87-MG glioblastom hücrelerinde serbest DOX ve ultrason ile indüklenmiş DOX %60 canlılık gösterirken, 400 kPa, 600 kPa ve 800 kPa ultrason değerlerinde indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçük gruplarında sırasıyla %20 ve %25'er canlılık gözlenmiştir. MDAMB-231 hücre hattında ise serbest DOX ve ultrason ile (400 kPa) indüklenmiş serbest DOX %90 canlılık gösterirken, 400 kPa, 600 kPa ve 800 kPa ultrason değerlerinde indüklenmiş DOX yüklü mikroköpükçük grupları sırasıyla %70, %60 ve %45 canlılık göstermişlerdir.

Literatürde mevcut verilerle uyumlu olarak, bu sonuçlar, dolaylı olarak, hücre ölümünün artmasının, ultrasonla indüklenen hidrofilik gözenekler yoluyla artmış DOX alımına bağlı olduğunu göstermiştir.

Daha sonra, ultrason altında mikroköpükçük etkinliğinin mikroköpükçüklerin türüne bağlı olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, U-87 MG glioblastom ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde; bizim çalışmamızda kullandığımız mikroköpükçüklerimize benzer bir şekilde PEG kaplı mikroköpükçüklerin en etkili mikroköpükçükler olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte yine bizim çalışmamızdaki "sadece mikroköpükçük verilen" ve "DOX yüklü mikroköpükçük verilen" gruplardan elde ettiğimiz sonuçlara benzer bir şekilde Escoffre ve arkadaşları da, mikroköpükçük destekli ultrasonun kendi başına apoptozu uyarmadığını ve dolayısıyla, apoptozun mikroköpükçük ile birlikte verilen ultrason uygulaması sırasında DOX alımıyla indüklendiğini doğrulamıştır.

Escoffre ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise, insan glioblastoma hücrelerinde DOX lipozom yüklü mikroköpükçüklerin terapötik etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda DOX yüklü mikroköpükçüklerin iyi görüntüleme özelliklerine ve yüksek bir terapötik potansiyele sahip olduğunu gösterilmiştir (35).

Yang ve arkadaşlarının kronik miyeloid lösemi hücre hattı üzerinde yaptığı çalışmada ise, ultrason ilişkili DOX yüklü mikro köpükçüklerin antitümöral etkisi incelenmiş ve

ultrason ilişkili bu methodun, tedavi etkinliğini arttırdığı ve bu nedenle potansiyel klinik method olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (49).

Tinkov ve arkadaşları tarafından yürütülen bir hayvan araştırmasında, serum fizyolojik verilen kontrol grubu, DOX yüklü mikroköpükçük verilen grup ve ultrason altında DOX verilen grup olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. Her bir gruptaki hayvanlara 1. Ve 7. Günde ilaç uygulamaları yapılmış ve 14. Günde tümör hacim büyümesi yüzdeleri karşılaştırılmıştır. 0. ve 7. günde sadece serum fizyolojik alan kontrol grubunda 961 ± 743 'lük bir artış gözlenmiştir. 0. ve 7. günde DOX yüklü mikroköpükçük alan grupta 700 ± 608 'lik bir artış gözlenmiştir. 0. Ve 7. Günde ultrason altında DOX yüklü mikroköpükçük alan grupta 284 ± 166 'lık bir artış gözlenmiştir. Ultrason altında DOX yüklü mikroköpükçük alan gruptaki tümör hacim değişimi, DOX yüklü mikroköpükçük alan gruba ($p < 0,05$) ve kontrol grubuna ($p < 0,01$) göre istatistiksel anlamlı farklı olarak gözlenmiştir (25).

Bu çalışma ile Tinkov ve arkadaşları; Doxorubicin yüklü hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin hedef tümör de büyümeyi önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (25).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

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

Kontrolle karşılaştırıldığında, literatür bilgisi ile konfirme edilen DOX dozu olan 5mg/Kg DOX'un antitümöral olarak etkili olduğu gözlenmiştir. Gözlenen bu etki tümör boyutundan ziyade, tümördeki nekroz, apoptoz ve canlılık oranlarının karşılaştırılması ile elde edilmiştir. DOX grubunda, kontrolle karşılaştırıldığında yan etki olarak anlamlı düzeyde karaciğer parenkim hasarı gözlenmiştir.

DOX yüklü MB'lerin, DOX'a göre daha az etkili olduğu gözlenmiştir. MB-DOX antitümöral etkili olarak bulunmuştur, ancak, doz ayarlama çalışmaları (aynı konsantrasyondaki mikroköpükçük üzerine daha fazla DOX yüklenmesi) yapılmalıdır. Antitümöral etki gösteren MB-DOX'un karaciğerde nekroz yan etkisi yapmadığı saptanmıştır. MB-DOX'ların nekroz oranı, DOX'un nekroz oranına yakın çıkmıştır. MB-DOX'ların apoptoz yerine nekrozu indüklediği gözlenmiştir. Sadece DOX ise hem apoptozu hem nekrozu indüklemektedir. Kontrol grubu ile MB grubu karşılaştırıldığında, hiçbir parametrede istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmemiştir. Bu durum, tek başına mikroköpükçüklerin kontrole eşdeğer olduğunu ve mikroköpükçüklerin uygun bir sham grubu olduğunu göstermektedir.

Kontrol ile MB-DOX grubu karşılaştırıldığında, karaciğer hasarında fark görülmemesi MB-DOX'ların karaciğer hasarından koruduğunu göstermektedir. Nekroz, apoptoz ve canlılıktaki istatistiksel anlamlı farklar ise MB-DOX'un etkili olduğunu göstermektedir. Lipo-DOX'un antitümöral etki gösterdiği, ancak buna karşılık karaciğer hasarı yaptığı söylenebilir. Lipo-DOX, aynı dozda DOX'a kıyasla benzer oranda nekroz oluştururken, apoptoz daha az oluşturduğu söylenebilir. MB-DOX'lar, Lipo-DOX ile aynı tümöral etkiyi gösterirken, karaciğer hasarı oluşturmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle tümör üzerinde yoğunlaştırılmış kemoterapötik ajanların özellikle karaciğerdeki yan etkilerden koruyucu olabileceği söylenebilir.

Çalışmamız sonucunda, Ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin, in-vitro ve in-vivo koşullarda ultrason altındaki görüntülemeye kontrast yarattığı ve kontrollü olarak patlatılabildiği gösterilmiştir. DOX ve Lipo-DOX'un LD50 dozlarının nude farede oluşturmuş tümörde nekroza yol açtığı gösterilmiştir.

Gelecek çalışmalarda, mikroköpükçüklere birden fazla dozda Doxorubicin yüklemesi ile deneylerin yapılması, ultrason altında mikroköpükçüklerin patlatılma işleminin birden fazla kere yapılması ve tümör boyutunda istatistiksel anlamlı küçülmeyi görebilmek için sakrifikasyona kadar geçen sürenin uzatılması planlanmaktadır.



7.KAYNAKLAR

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, ve ark. Global Cancer Statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015;65: 87–108
2. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. J. Cancer. 2016;7(10):1281-1294
3. Lawrence J, Cameron D, Argyle D. Species differences in tumour responses to cancer chemotherapy. Phil Trans R Soc. 2015; 370:1-12
4. Aksoy Y. Kanserde İlaç Direncinin Üstesinden Gelmenin Yolları: Yeni İlaçların Tasarımı. J Med Sci 2010;30(6):2011-2016
5. Conde J, Doria G, Baptista P. Noble Metal Nanoparticles Applications in Cancer. J Drug Deliv. 2011;2012:1-12
6. Jin Z, Jin M, Jiang C, Yin X, ve ark. Evaluation of doxorubicin-loaded pH-sensitive polymeric micelle release from tumor blood vessels and anticancer efficacy using a dorsal skin-fold window chamber model. Acta Pharmacol Sin. 2014;35(6):839-845
7. Lin CY, Li JR, Tseng HC, Wu MF, ve ark. Enhancement of focused ultrasound with microbubbles on the treatments of anticancer nanodrug in mouse tumors. Nanomedicine. 2012;8(6):900-907
8. Condea J, Oliva N, Artzia N. Implantable hydrogel embedded dark-gold nanoswitch as a theranostic probe to sense and overcome cancer multidrug resistance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(11):1278-1287
9. Jesinger RA, Breast Anatomy for the Interventionalist. Tech Vasc Interv Radiol. 2014;17(1);3-9
10. Zucca-Matthes G, Urban C, Vallejo A. Anatomy of the nipple and breast ducts. Gland Surg. 2016;5(1):32-36
11. Darwish AD, Helal AM, El-din NH, Solaiman LL. Breast cancer in women aging 35 years old and younger: The Egyptian National Cancer Institute (NCI) experience. The Breast 2017;31:1-8

12. Jansen LA, Backstein RM, Brown MH. Breast size and breast cancer: A systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*; 2014; 67:1615-1623
13. Tang Y, Wang Y, Kiani MF, Wan B. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*; 2016; 16(5):335-343
14. DeSanctis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast Cancer Statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2014 ;64(1): 52–62
15. DeSanctis C, Fedawa AS, Sauer AG, Kramer JL ve ark. Breast Cancer Statistics, 2015: Convergence of Incidence Rates Between Black and White Women. *CaA Cancer J Clin* 2016; 66(1):31–42
16. Haydaroğlu A, Dubova S, Özşaran Z, Bölükbaşı Y, ve ark. Ege üniversitesinde meme kanserleri: 3897 olgunun değerlendirilmesi. *J Breast Health*. 2005; 1(1):6-11
17. Koçak S, Çelik L, Özbaş L, Sak SD,ve ark. Meme kanserinde risk faktörleri, riskin değerlendirilmesi ve prevansiyon: istanbul 2010 konsensus raporu. . *J Breast Health*. 2011; 7(2):47-67
18. Washbrook E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *J Womens Health*. 2006;3(1):8–14
19. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of Breast Diseases Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000; 321(7261):624-628
20. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy *J Cancer Res Ther* 2014; 10: 853-858
21. Lu YC, Yang FO, Hsieh CM, Chang KJ, ve ark. Pegylated Liposomal Doxorubicin as Adjuvant Therapy for Stage I-III Operable Breast Cancer. *in vivo* 2016; 30: 159-164
22. Ghannam MM, Gebaly RE, Fadel M. Targeting doxorubicin encapsulated in stealth liposomes to solid tumors by non thermal diode laser. *Lipids Health Dis* 2016; 15: 68
23. Ping X, Angang D Xia G, Yin Zhu Z, ve ark. Improved Efficacy of Liposomal Doxorubicin Treatment of Superficial Tumors by Thermotherapy. *Technol Cancer Res Treat* 2016; 15: 314-321

24. Lin CY, Li JR, Tseng HC, Enhancement of focused ultrasound with microbubbles on the treatments of anticancer nanodrug in mouse tumors. *Nanomedicine* 2012; 8: 900-907
25. Tinkov S, Coester C, Serba S, Geis NA, ve ark. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: In-vivo characterization. *J Control Release* 2010; 148: 368-372
26. Tinkov S, Winter G, Coester C, Bekeredjian R. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: Part I — Formulation development and in-vitro characterization. *J Control Release* 2010; 143: 143-150
27. Gelder M, Vancle' A, Elssen C, Hupperets P, ve ark. Bone marrow produces sufficient alloreactive natural killer (NK) cells in vivo to cure mice from subcutaneously and intravascularly injected 4T1 breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 161: 421-433
28. Li D, Qin Q, Wang X, Shi H, ve ark. Intratumoral expression of mature human neutrophil peptide-1 potentiates the therapeutic effect of doxorubicin in a mouse 4T1 breast cancer model. *Oncol Rep* 2014; 31: 1287-1295
29. Przybyla B, Shafirstein G, Vishal S, Dennis RA, ve ark. Molecular changes in bone marrow, tumor and serum after conductive ablation of murine 4T1 breast carcinoma. *Int J Oncol* 2014; 44: 600-608
30. Lareum OD, Farsund T. Clinical Application of Flow Cytometry: a Review. *Cytometry* 1981; 2(1): 1-13
31. Brown M, Wittwer C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clin Chem* 2000; 46(8B):1221-1229
32. Orfao A, Ruiz-Arguelles A, Lacombe F, Ault K ve ark. Flow Cytometry: Its Applications in Hematology. *Haematologica*. 1995; 80:69-81
33. Kanevi MO, Muranlı FDG. Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *SAÜ Fen Bil Der.* 216; 1:33-36

34. Escoffre JM, Piron J, Novell A, Bouakaz A. Doxorubicin Delivery into Tumor Cells with Ultrasound and Microbubbles. *Mol Pharm* 2011; 8: 799-806
35. Escoffre JM, Mannaris C, Novell A, Lentacker I ve ark. Doxorubicin Liposome-Loaded Microbubbles for Contrast Imaging and Ultrasound- Triggered Drug Delivery. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2013; 60: 78-87
36. Carvalho, C, Santos, RX, Cardoso, S, Correia, S ve ark. Doxorubicin: The good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 2009; 16: 3267–3285.
37. Cutts S, Parsons P, Sturm R, Philips D. Adriamycin-induced DNA adducts inhibits the DNA intercalations of transcription factors and RNA polymerase. *J Biol Chem* 1996; 271: 5422–5429
38. Lentacker I, Bart Geers B, Demeester J, Smedt SCD, ve ark. Design and Evaluation of Doxorubicin-containing Microbubbles for Ultrasound-triggered Doxorubicin Delivery: Cytotoxicity and Mechanisms Involved. *Mol Ther* 2010; 18: 101-108
39. Octavia Y, Tocchetti C, Gabrielson KL, Janssens S, ve ark. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52: 1213-1225
40. Swift L, Rephaeli A, Nudelman A, Philips D ve ark. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res* 2006; 66: 4863–4871
41. Torchilin VP, Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. *AAPS J* 2007; 9: 128-147
42. Marano F, Argenziano M, Frairia R, Adamini A, ve ark. Doxorubicin-Loaded Nanobubbles Combined with Extracorporeal Shock Waves: Basis for a New Drug Delivery Tool in Anaplastic Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016; 26: 705-716
43. Ferrara KW. Driving delivery vehicles with ultrasound. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 1097-1102
44. Loverock P, terHaar G, Ormerod MG, Imrie PR. The effect of ultrasound on the cytotoxicity of adriamycin. *Br J Radiol* 1990; 63; 543–546
45. Siu T, Jackson J, Burt H, Chiao, M Drug uptake enhancement using sonodynamic effects at 4 MHz—a potential application for micro-ultrasonic transducers. *IEEE Trans Biomed Eng* 2007; 54: 1153–1156.
46. Yu T, Huang X, Hu K, Bai J ve ark. Treatment of transplanted adriamycin resistant ovarian cancers in mice by combination of adriamycin and ultrasound exposure. *Ultrason Sonochem* 2004; 11: 287–291

47. Gao Z, Kennedy AM, Christensen DA, Rapoport NY. Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy. *Ultrasonics* 2008; 48: 260-270

48. Yang S, Wang P, Wang X, Su X ve ark. Activation of microbubbles by low-level therapeutic ultrasound enhances the antitumor effects of doxorubicin. *Eur Radiol* 2014; 24: 2739-2753



8. EKLER

8.1. Laboratuvar Çalışma İzin Belgesi



TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
Onkoloji Enstitüsü Müdürlüğü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanlığı



01.05.2016

İLGİLİ MAKAMA;

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'ın Proje yöneticisi olduğu Efe SERİNAN isimli Yüksek lisans öğrencisinin tez projesi olan "Doxorubicin Yüklendiği mikro köprücüklerin İn-Vivo Deney Hayvanı Modelinde Meme Kanseri Üzerine Etkisi " başlıklı çalışmanın, Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmesi uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Temel Onkoloji AD. Bşk.

Mithatpaşa Caddesi No:1606 İnciraltı 35340 İzmir
Tel: 0(232) 412 8201 Fax: 0(232) 278 9495
e-posta: temelonkoloji@deu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için
Gülperi ÇANKAYA
Tel.: 412 8201



8.2. Etik Kurul Onayı



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, İnciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 04/13/2015
Toplantı Tarihi : 09 Haziran 2015

Sayın, Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Temel Onkoloji AD

29/2015 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Doxorubicin yüklenmiş mikroköpükçüklerin İn-Vivo Deney Hayvanı modelinde meme kanseri üzerine etkisi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı
(Araştırmacı)

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye(Araştırmacı)

Prof.Dr.Hüsnü Alper BAĞRIYANIK
Üye (Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.M.Ensari GÜNELİ
Üye (Topl.Katılmadı)

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Doç.Dr.Meral KARAMAN
Üye

Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

Doç.Dr.Günay KIRKIM
Üye

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye
(topl.katılmadı)

Doç.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye (Araştırmacı-Topl.katılmadı)

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCİ
Üye

Z. Kınar
Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

8.3.Özgeçmiş

Efe Özgür SERİNAN

TC Kimlik No / Pasaport No:	44539452220
Doğum Yılı:	1990
Yazışma Adresi :	Narlı Mah. An Sitesi Sk. Körfez Apt No:8 Da:10 Narlidere/İZMİR
Telefon :	0506 928 21 23
Faks :	
e-posta :	efeserinan@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Temel Onkoloji		
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen fakültesi	Kimya		2013

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

				.	
--	--	--	--	---	--

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

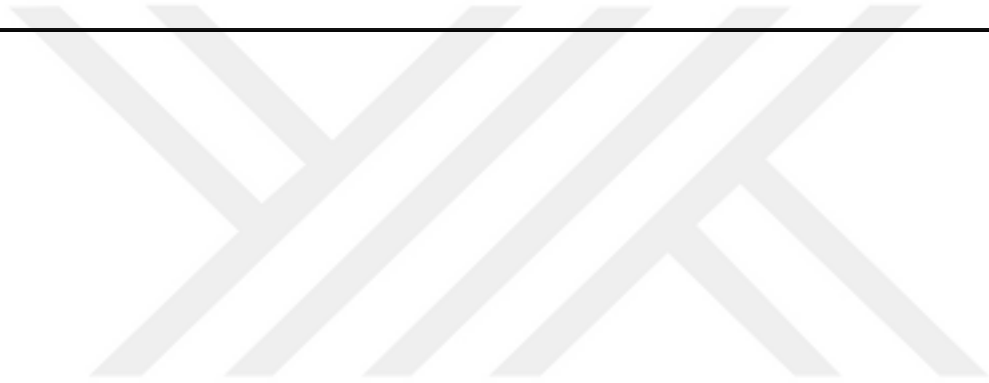
SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

**Ercetin AP, Pamukoglu A, Ayla M, Serinan E, Cecen E, Altun Z, Aktas S, Olgun N.
Silmarinin**

**Sisplatin Kombinasyonu İle Nöroblastom Hücrelerine Etkisi. 2nd Anticancer Agents
Congress&5th Multidisciplinary Cancer Research Congress. 2014**



Type of Article: Research Article

Short Title: In Vivo Effects of Doxorubicine Loaded Microbubbles

THE EFFECT OF DOXORUBICINE LOADED MICROBUBBLES ON BREAST CANCER IN IN VIVO EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL

Efe Özgür Serinan^{1*}, Mustafa Barış², Gülşah Kürkçü³, Meryem Çalışır⁴, Melek Aydın¹, Cansu Önercan³, Safiye Aktaş¹, Zekiye Altun¹, Sevgi Kılıç Özdemir³, Osman Yılmaz⁴, Ekrem Özdemir³

¹Department of Basic Oncology, Dokuz Eylül University School Of Medicine, Izmir, Turkey

²Department of Radiology, Dokuz Eylül University School Of Medicine, Izmir, Turkey

³Department of Chemical Engineering, Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey

⁴Department of Laboratory of Animal Science, Dokuz Eylül University School of Medicine, Izmir, Turkey

***Corresponding Author**

Efe Serinan

Department of Basic Oncology, Institute of Oncology,

Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey

Phone (or Mobile) No.: +90-(506) 928-2123

Email: efeserinan@gmail.com

DECLARATIONS

The manuscript is new and is not being considered elsewhere. Authors have no any commercial association and conflict of interest. All the experiments were done following the principles of Dokuz Eylül University Animal Ethical Committee's approval .

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank TUBITAK for the project 213M668 for the financial support of this work.

ABSTRACT

Breast cancer is a type of cancer that affects women's health negatively and has become a widespread health problem with increasing frequency. Although Doxorubicin is a frequently used chemotherapeutic agent in breast cancer, it limits the use of many side effects, especially irreversible cardiac damage. Unlike standard methods that negatively affect the treatment process with unexpected side effects in breast cancer, ultrasound-associated microbubbles may be a new approach in the treatment of cancer. Drug-loaded microbubbles that can be detonated under controlled ultrasound are seen as new potential nanoparticles for delivering therapeutic agents to tumor tissues

The aim of this study is to demonstrate that the first localized production of Doxorubicin loaded with the ultrasound contrast agent microspheres in the in-vivo experimental animal model, delivery to the target site, imaging under ultrasound, detonation of the microspheres in the target area and thus controlled release of the drug in the target area.

In summary, it has been shown that ultrasound contrast agent microbubbles can be contrast-enhanced and detonated under in-vitro and in-vivo conditions under ultrasound imaging.

Key Words: Breast Cancer, Ultrasound, Microbubbles, Liposomes, Drug Delivery

INTRODUCTION

Breast cancer is one of the most commonly diagnosed cancer types in women and accounts for more than 10% of all cancers among women (1). Throughout their lives, one in every eight women is diagnosed with breast cancer (2). Breast cancer is the second most common cancer-related death in women after lung cancer. Each year, approximately 230,000 women in the world are diagnosed with invasive breast cancer, resulting in about 40,000 deaths (3). Approximately 19% of breast cancers in the United States are diagnosed in women aged 30-49 and 44% are seen in women over 65 years of age. In Japan, women who have breast cancer diagnoses below 35 years old make up about 3% of all breast cancer patients (1). In a study conducted in 2013, approximately 232,340 new invasive breast cancer cases, 64,640 new in situ breast cancer diagnoses and 39,620 breast cancer-related deaths were expected among US women (4). In a study conducted by the same study group in 2015, approximately 231,840 new invasive breast cancer cases, 60,290 new in situ breast cancer diagnoses and 40,290 breast cancer-related deaths were expected in US women in 2015 (5). Anthracyclines, especially Doxorubicin, have long been the mainstay of cancer treatment. Doxorubicin was first used in cancer types such as multiple myeloma and Hodgkin's lymphoma, but has long been used in the treatment of breast cancer. (6). Doxorubicin is used as standard therapy especially in early stage breast cancer (7). Despite strong antineoplastic efficacy, the clinical use of doxorubicin has been limited due to nausea, vomiting, especially side effects such as hematological toxicity and irreversible cardiac damage (7). The major problem with the use of doxorubicin is the dose limitation during treatment. In general, the cumulative doses of doxorubicin did not show cardiac damage at $450 \text{ mg} / \text{m}^2$, whereas cardiac damage was observed at $550 \text{ mg} / \text{m}^2$ and $700 \text{ mg} / \text{m}^2$ (6). Due to the side effects of traditional doxorubicin treatment, the need for the development of a liposomal formulation with equal efficacy and fewer side effects emerged (6). Liposomes can be described as structures in which water filled vesicles are surrounded by single or multiple membranes of phospholipid structure. Phospholipids can be modified to trap drugs to be loaded into aqueous compartments and /

or membranes (8). One of the main advantages of using liposomes is that the phospholipids used to form these vesicles are extracted from natural sources and are safe for the body. In addition, the saturation level of the phospholipid bilayer can be modified to change the drug release rate (6).

Another limitation of conventional treatment is the lack of tissue selection. This may lead to significant side effects in healthy tissue, as well as lower drug concentrations in the tumor (9). Targeted drug delivery systems can be used to derive from these limitations. In targeted drug delivery systems, a drug carrier structure passes through the spaces in the tumor vasculature and the buried drug in the carrier is released into the tumor cell space. In drug delivery systems, the carrier may be targeted to the tumor tissue and accumulation in a particular area may be provided. If the drug is released when the targeted drug carrier reaches the tumor tissue, the efficacy of the treatment can be increased and side effects can be reduced. (9).

Ultrasound-mediated drug delivery with microbubbles may noninvasively increase the transport of therapeutic agents to targeted tumors (10) In recent years, ultrason-mediated methods have been proposed as a targeting tool (11). While microbubbles are in tumor vasculature, the interaction of ultrasound waves with microtubules may cause release and destruction of foam cells. This can cause the vascular walls to tear. These openings may increase the vascular permeability of the tumor (10,12). In addition, drug loaded microspheres may provide a lumen to the target site as a result of ultrasound sonication after reaching the target site (12). Since liposomes are used as carrier vehicles for anticancer drugs, targeting of the drug to the area of action, development and maintenance of clinical effects, reduction of toxicity and protection from metabolism and immune responses are better (8).

The aim of this study is to demonstrate that the first localized production of Doxorubicin loaded with the ultrasound contrast agent microspheres in the in-vivo experimental animal model, delivery to the target site, imaging under ultrasound, detonation of the microspheres in the target area and thus controlled release of the drug in the target area,

MATERIAL&METHODS

Cell Lines

Mammary carcinoma cell line 4T1 was used in the experiments. 4T1 cell line was grown in RPMI-1640 (Gibco™) containing 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine (13). The incubation of the cells was adjusted to 37 ° C with an incubator containing 5% CO₂ (14). The effect of anticancer drug Doxorubicin (DOX) and Doxorubicin (Lipo-DOX) loaded to liposomes on in vitro 4T1 breast cancer cells was examined. Cell viability of DOX and Lipo-DOX at different concentrations was determined by measuring dead and viable cell numbers in 96-well plated breast cancer cells. Microbubbles were imaged under ultrasound and shown to be detonated under in-vitro conditions under ultrasound.

Experimental Design

6-7 week old athymic female nude mice were taken from the Dokuz Eylül University Department of Laboratory of Animal Science. All experiments were conducted with the approval of Dokuz Eylül University Animal Experiments Local Ethics Committee. All animals were fed ad libitum feed and water in sterile cages with HEPA filter. The 4T1 cancer cells (4×10^5) were injected subcutaneously into the left rear leg of each Mouse (15) (Figure 1).

The description of the experimental groups is given below:

Group I: Experimental group in which 0.5 ml of serum was injected intraperitoneally into nude mice and considered as control group.

Group II; Experimental group in which 0.5 ml, 5 mg/kg single injection of DOX was injected intraperitoneally into nude mice.

Group III; Experimental group in which 0.5 ml, 5 mg/kg single injection of microbubble was injected intravenously into nude mice.

Group IV; Experimental group in which 0.5 ml, 5 mg/kg single injection of DOX-loaded microbubble was injected intravenously into nude mice.

Group V; Experimental group in which 0.5 ml, 5 mg/kg single injection of Lipo-DOX was injected intravenously into nude mice.

When the tumor reached 1 cm size, the mice underwent 3-dimensional volume measurement under ultrasound (Figure 2). Animals were administered 5 mg / kg DOX (LD50) in 4T1 cells of breast cancer. On the fourth day of study, under ketamine/xylazine anaesthesia (50 and 5 mg/kg, respectively), the 3-dimensional volume measurement of each mice has been re-performed and mice were sacrificed (Figure 3). Lung, liver, kidney, brain and tumor samples were obtained with dissection. Then, they were fixed in 10% neutral buffered formalin solution and staining with haematoxylin–eosin dye (16).

RESULTS

The 4T1 Cell Line selected for the experiments and the cells cultured in the appropriate culture medium for use in experiments (Figure 4).

Manual Tumor Size Measurement

Cultured 4T1 breast cancer cells were injected subcutaneously into the mice in a volume of 5 ml and the mice were followed up daily until the tumors were formed.

When the tumors reached a diameter of 1 cm in the mice, manual tumor size measurement was performed every day for 4 days from injection to sacrifice.

The tumor size difference before injection (Day 1) and before sacrifice (Day 4) was examined for each animal in each group.

When the tumor size difference was compared among all groups, no statistically significant results were found ($p=0,145$) (Figure 5.a-e)

Ultrasonic Imaging of Microbubbles in In-Vitro Conditions

Before an animal study was initiated, an in-vitro study demonstrated that microbubbles could be exploded under ultrasound (Figure 6).

As a result of this study, it can be said that the microbubbles can be detonated in a controlled manner by increasing the mechanical index of the device under ultrasound.

Determination of apoptosis by flow cytometry

Atomic nude mice were subjected to apoptosis determination by flow cytometry from tumor tissues taken during sacrifice. Apoptosis rate was statistically significant among all groups ($p=0,001$) (Figure 7).

Histopathological examination of nude mice

Lung, liver, kidney, brain, tumor tissues were taken from atypical nude mice during sacrifice and these tissues were examined histopathologically. Normal histology was observed in all groups in the lung, kidney and brain. Spotty necrosis-like damage was

observed in the liver parenchyma of animals in groups DOX and Lipo-DOX at a mild level (Figure 8-12).

Non-parametric tests were performed because of 7 cases in each group. Kruskal Wallis H test was applied because there were more than 2 groups and the groups were independent from each other. Tumor size difference, apoptosis, necrosis and viability rates, liver damage were examined among the groups. When all groups were evaluated together, mean tumor size difference ratio was found as 1,6%, mean necrosis rate was found as 35,4%, mean apoptosis rate was found as 17,2% and mean viability rate was found as 63% (Table 1)

Tumor size difference was not statistically significant between groups ($p=0,145$). In contrast, necrosis rate, apoptosis rate, cell viability and liver damage were statistically significant. Thus, each group was assessed by the Mann Whitney-U test (Table 2).

When the groups DOX and Control were compared, there was no statistically significant change in the tumor size difference ($p=0,259$). However, statistically significant changes were observed in necrosis ($p=0,001$), apoptosis($=0,001$), viability($p=0,001$) and liver damage($p=0,026$) values. For the control group, 92% cell viability, 3% apoptosis and 2.3% necrosis were observed; 16% viability, 38% apoptosis and 60% necrosis were observed in the DOX group. While cell viability in the DOX group showed a significant decrease compared to the control group, the rates of apoptosis and necrosis increased significantly in comparison with the control group (Table 3).

When the groups DOX and MB-DOX were compared, there was no statistically significant change in the tumor size difference ($p=0,209$) and necrosis ($p=0,209$). However, statistically significant changes were observed in, apoptosis($=0,017$), viability($p=0,007$) and liver damage($p=0,026$) values. For the DOX group, 16% cell viability, 38% apoptosis and 60% necrosis were observed; 58% viability, 16% apoptosis and 44% necrosis were observed in the MBDOX group. While cell viability in the DOX group showed a significant decrease compared to the MB-DOX group, the rates of apoptosis increased significantly in comparison with the MB-DOX group (Table 3).

When the groups MB and MB-DOX were compared, there was no statistically significant change in apoptosis($=0,097$), viability($p=0,128$) and liver damage($p=1,000$). However,

statistically significant changes were observed in the tumor size difference ($p=0,011$) and necrosis ($p=0,017$) values. For the MB group, 2,28% tumor size difference, 80% cell viability, 9% apoptosis and 6% necrosis were observed; 7,143% tumor size difference, 58% viability, 16% apoptosis and 44% necrosis were observed in the MB-DOX group. While tumor size difference in the MB-DOX group showed a significant decrease compared to the MB group, the rates of necrosis increased significantly in comparison with the MB group. Liver damage was not significant in both groups, so liver damage was not compared between the groups (Table 3). When the groups Control and MB were compared, there was no statistically significant change in the tumor size difference ($p=0,456$), apoptosis ($p=0,456$), necrosis ($p=0,53$). For the Control group, 92% cell viability, 3% apoptosis and 2,3% necrosis were observed; 80% viability, 9% apoptosis and 6% necrosis were observed in the MB group. When the groups Control and MB were compared, there was no statistically significant value (Table 3).

When the groups Control and MB-DOX were compared, there was no statistically significant change in the liver damage ($p=1,000$). However, statistically significant changes were observed in, apoptosis($=0,017$), necrosis ($p=0,007$) and viability($p=0,004$) values. For the Control group, 92% cell viability, 3% apoptosis and 2,3% necrosis were observed; 58% viability, 16% apoptosis and 44% necrosis were observed in the MB-DOX group. While apoptosis and necrosis values in the MB-DOX group showed a significant increases compared to the Control , the rates of cell viability decreased significantly in comparison with the control group (Table 3).

When the groups Control and Lipo-DOX were compared, statistically significant changes were observed in, apoptosis($=0,004$), necrosis ($p=0,001$) and viability($p=0,001$) values. For the Control group, 92% cell viability, 3% apoptosis and 2,3% necrosis were observed; 66% viability, 18% apoptosis and 63% necrosis were observed in the MB-DOX group. While apoptosis and necrosis values in the Lipo-DOX group showed a significant increases compared to the Control, the rates of cell viability decreased significantly in comparison with the control group (Table 3).

When the groups DOX and Lipo-DOX were compared, there was no statistically significant change in the liver damage ($p=1,000$) and necrosis($p=0,902$). However, statistically significant changes were observed in, apoptosis($p=0,011$) and viability($p=0,001$) values. For the DOX group, 16% cell viability, 38% apoptosis and 60% necrosis were observed; 66% viability, 18% apoptosis and 44% necrosis were observed in the Lipo-DOX group. While apoptosis value in the DOX group showed a significant increases compared to the Lipo-DOX , the rates of cell viability decreased significantly in comparison with the Lipo-DOX group (Table 3).

When the groups MB-DOX and Lipo-DOX were compared, there was no statistically significant change in the apoptosis ($p=0,383$), necrosis($p=0,073$) and cell viability ($p=0,620$). However, statistically significant change was observed in, liver damage($p=0,026$) values. For the MB-DOX group, 58% cell viability, 16% apoptosis and 44% necrosis were observed; 66% viability, 18% apoptosis and 44% necrosis were observed in the Lipo-DOX group (Table 3).

Biochemical examination of nude mice

Biochemical analyzes were performed on the blood and urine specimens taken during the sacrifice of animals and the findings were compared statistically.

In group A, statistical evaluation was not possible as the number of samples was insufficient ($n=1$).

Kruskal Wallis H test was performed on DOX, Lipo-DOX and MB-DOX groups and creatinine, protein and albumin values in urine were statistically compared. Protein($p=0,036$) and creatinin($p=0,023$) values were statistically significant.

When groups Control and MB were assessed using the Mann-Whitney U test, $p = 0.730$ for urine-creatine and $p = 0.730$ for urine-protein were found. As a result, no nephrotoxic effect was observed when the control and Mb-DOX groups were compared (Table 4).

When groups Control and DOX were assessed using the Mann-Whitney U test, $p = 0,413$ for urine-creatine and $p = 0,556$ for urine-protein were found. Accordingly, no nephrotoxic effect was observed when the control and DOX groups were compared (Table 4).

Control and Lipo-DOX groups were found to be $p = 0.05$ for Urine-Creatine and $p = 0.016$ for Urine-Protein when compared with Mann Whitney-U test. As a result, statistically significant nephrotoxic effect was observed when the control and Lipo-DOX groups were compared (Table 4).

Also a significant statistical difference was found in blood glucose ($p=0,010$), LDH ($p=0,010$) values when DOX and MB-DOX groups were compared.

DISCUSSION

The aim of this study is to demonstrate that the first localized production of Doxorubicin loaded with the ultrasound contrast agent microbubbles in the in-vivo experimental animal model, delivery to the target site, imaging under ultrasound, detonation of the microbubbles in the target area and thus controlled release of the drug in the target area, The use of ultrasonic related methods such as acoustic waves to increase drug transport has been known since 1980 (17). Several studies have shown that doxorubicin is an effective chemotherapeutic agent for cancer treatment, but it has many major side effects. It is known that Doxorubicin is used as standard therapy especially in early stage breast cancer (6). Several studies have shown that the most important side effect of doxorubicin is cardiac problems (6,18). Therapeutic use of liposomes can be used to overcome emerging problems. One of the main advantages of using liposomes is that the phospholipids used to form these vesicles are extracted from natural sources and are safe for the body. In addition, the saturation level of the phospholipid bilayer can be modified to change the drug release rate(6). Several studies have shown that side effects, especially cardiotoxicity, are diminishing while the efficacy of drugs in liposomal formulations increases in human use.(19). In another study, Lu et al. Showed that liposomal Doxorubicin could be used in the stage 1-3 invasive breast cancers that can be treated because the side effects associated with the treatment are manageable (7). Ghannam et al. Have shown that Doxorubicin-loaded liposomes are more effective in some solid tumors when compared to free Doxorubicin (8). Tinkov et al. showed that doxorubicin-loaded microbubbles under ultrasound sonication increased the amount of drug accumulating in tumor tissues compared to free Doxorubicin (12). In an animal study conducted by Tinkov et al., they showed that Doxorubicin significantly reduced tumor growth with microbubbles loaded with the target tumor.

CONCLUSION

In this study, it has been observed that 5mg / Kg DOX, which is confirmed by literature information, is effective as an antitumoral agent. This observed effect was obtained by comparing the rates of tumor necrosis, apoptosis and viability. In the DOX group, significant liver parenchyma damage was observed as a side effect when compared to the control.

As a result of this study, it was observed that DOX-loaded MBs were less effective than DOX, so dose-setting studies should be performed on MBs loaded with DOX. It was determined that MB-DOX, which had antitumor effect, did not have side effects of necrosis in the liver. The necrosis rate of MB-DOX was close to the necrosis rate of DOX. While Dox induces both apoptosis and necrosis, MB-Dox induces necrosis instead of apoptosis. When the control group and the MB group were compared, no statistically significant results were observed for any parameters. This indicates that the microbubbles alone are equivalent to the control and the microbubbles are a suitable sham group.

When the control and MB-DOX groups are compared, there is no difference in liver damage. This suggests that MB-DOX protects against liver damage. In addition, statistically significant differences in necrosis, apoptosis and viability indicate that MB-DOX is effective. In this study, it can be said that Lipo-DOX has antitumor effect but liver damage. While MB-DOX showed the same tumor effect as Lipo-DOX, it did not cause liver damage. Therefore, it can be said that the chemotherapeutic agents intensified on the tumor may be protective against the side effects, especially in the liver.

As a result of our study, it has been shown that the ultrasound contrast agent microbubbles can be contrasted in vitro and in-vivo under ultrasound imaging and can be detonated in a controlled manner. It has also been shown that doses of LD50 of DOX and LIPODOX lead to tumor necrosis in nude mice.

In future studies, we propose that experiments with multiple doses of Doxorubicin loading on microsomes, prolongation of microsomal puncture under ultrasound, and prolongation of survival to sacrifice to see statistically significant decrease in tumor size.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank TUBITAK for the project 213M668 for the financial support of this work.

REFERENCES

1. Darwish AD, Helal AM, El-din NH, et al. Breast cancer in women aging 35 years old and younger: The Egyptian National Cancer Institute (NCI) experience. *The Breast* 2017;31:1-8
2. Jansen LA, Backstein RM, Brown MH. Breast size and breast cancer: A systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*; 2014; 67:1615-1623
3. Tang Y, Wang Y, Kiani MF, et al. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*; 16:335-343
4. DeSanctis C, Ma J, Bryan L, et al. Breast Cancer Statistics, 2013. *CA CANCER J CLIN* 2014 ;64: 52–62
5. DeSanctis C, Fedawa AS, Sauer AG, et al. Breast Cancer Statistics, 2015: Convergence of Incidence Rates Between Black and White Women. *CA CANCER J CLIN* 2016; 66: 31–42
6. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy *J Cancer Res Ther* 2014; 10: 853-858
7. Lu YC, Yang FO, HSIEH CM, et al. Pegylated Liposomal Doxorubicin as Adjuvant Therapy for Stage I-III Operable Breast Cancer. *in vivo* 2016; 30: 159-164
8. Ghannam MM, Gebaly RE, Fadel M. Targeting doxorubicin encapsulated in stealth liposomes to solid tumors by non thermal diode laser. *Lipids Health Dis* 2016; 15: 68
9. Ping X, Angang D Xia G, et al. Improved Efficacy of Liposomal Doxorubicin Treatment of Superficial Tumors by Thermotherapy. *Technol Cancer Res Treat* 2016; 15: 314-321
10. Lin CY, Li JR, Tseng HC, Enhancement of focused ultrasound with microbubbles on the treatments of anticancer nanodrug in mouse tumors. *Nanomedicine* 2012; 8: 900-907
11. Tinkov S, Coester C, Serba S, et al. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: In-vivo characterization. *J Control Release* 2010; 148: 368-372

12. Tinkov S, Winter G, Coester C, et al. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: Part I — Formulation development and in-vitro characterization. *J Control Release* 2010; 143: 143-150
13. Gelder M, Vancle' A, Elssen C, et al. Bone marrow produces sufficient alloreactive natural killer (NK) cells in vivo to cure mice from subcutaneously and intravascularly injected 4T1 breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2107; 161: 421-433
14. Li D, Qin Q, Wang X, et al. Intratumoral expression of mature human neutrophil peptide-1 potentiates the therapeutic effect of doxorubicin in a mouse 4T1 breast cancer model. *Oncol Rep* 2014; 31: 1287-1295
15. Przybyla B, Shafirstein G, Vishal S, et al. Molecular changes in bone marrow, tumor and serum after conductive ablation of murine 4T1 breast carcinoma. *Int J Oncol* 2014; 44: 600-608
16. Eryilmaz, Eliyatkin N, Demirci B, et al. Protective effect of Pycnogenol on cisplatininduced ototoxicity in rats. *Pharm Biol* 2016; 54: 2777-2781
17. Marano F, Argenziano M, Frairia R, et al. Doxorubicin-Loaded Nanobubbles Combined with Extracorporeal Shock Waves: Basis for a New Drug Delivery Tool in Anaplastic Thyroid Cancer. *THYROID* 2016; 26: 705-716
18. Octavia Y, Tocchetti C, Gabrielson K, et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52: 1213-1225
19. Torchilin VP, Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. *AAPS J* 2007; 9: 128-147

Figure 1: Injection of tumor cells in mice. The 4T1 cancer cells (4×10^5) were injected subcutaneously into the left rear leg of each Mouse



Figure 2: 3D measurement of tumor volumes under ultrasound after reaching 1 cm of tumor size



Figure 3: Sacrified of the mice after 4 after drug administration



Figure 4. Image of 4T1 breast cancer cells under an inverted microscope

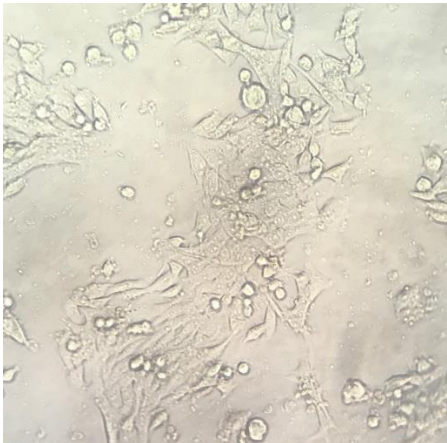
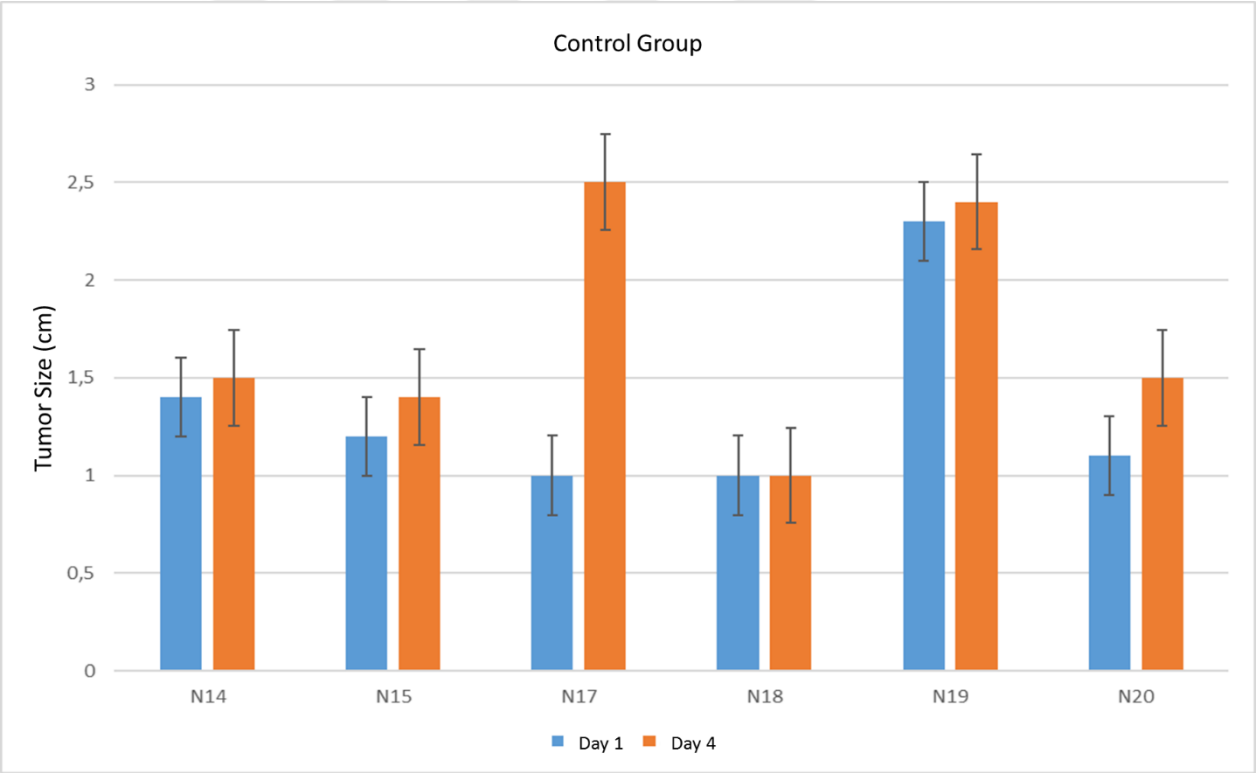
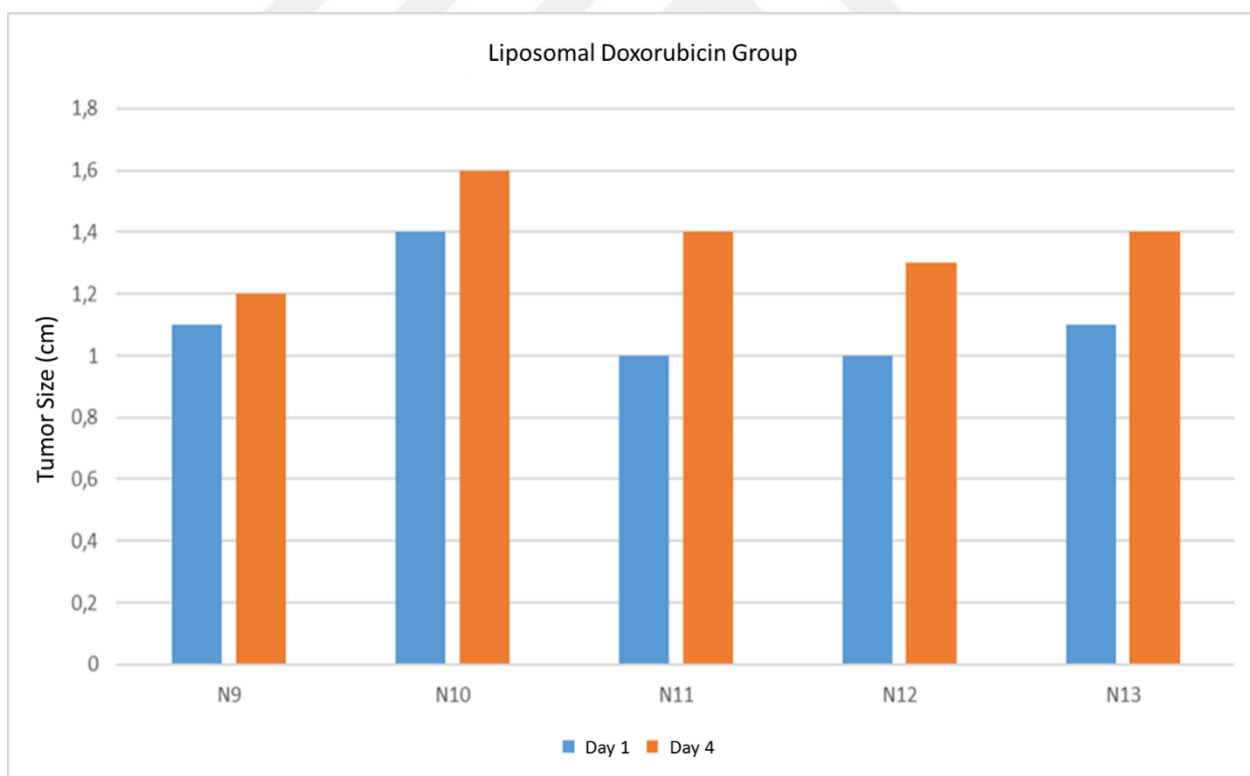
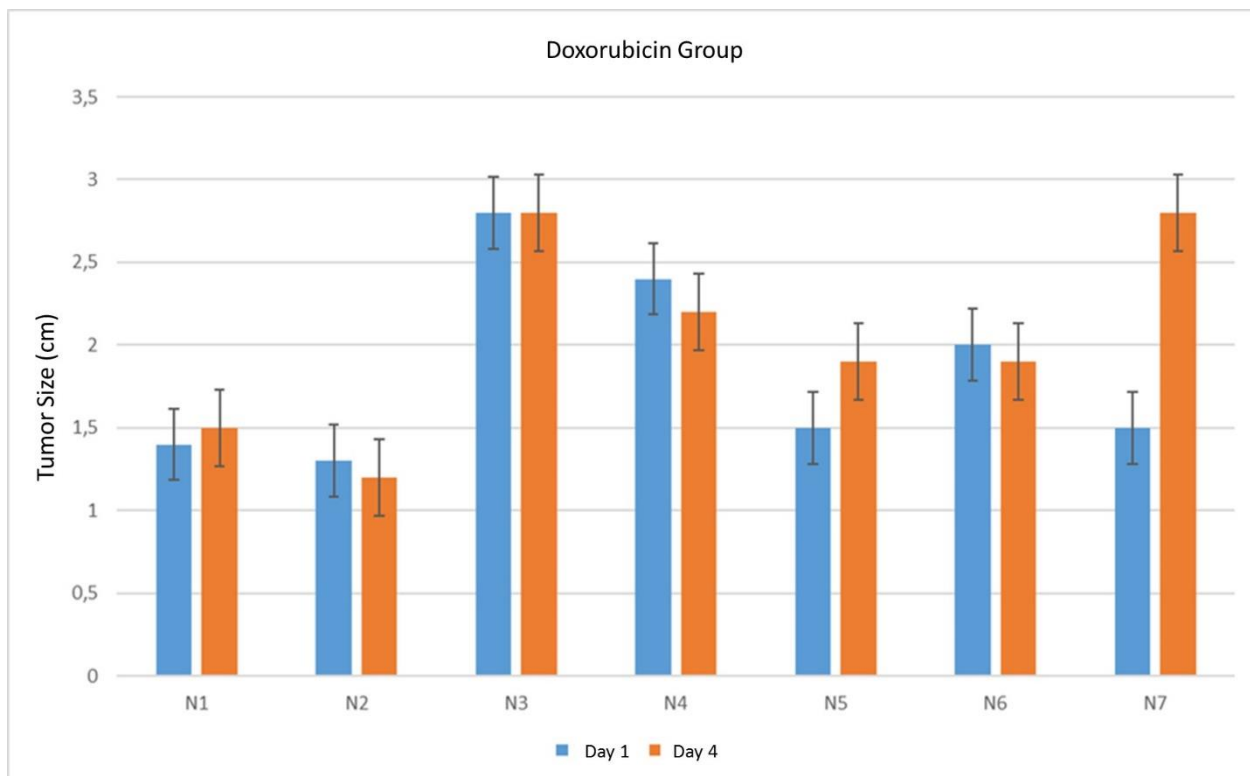


Figure 5. a-e. Tumor size difference before injection and before sacrifice for control (a), Doxorubicin (b), Liposomal Doxorubicin (c), Microbubble (d) and Doxorubicin Loaded Targeted Microbubble Groups.





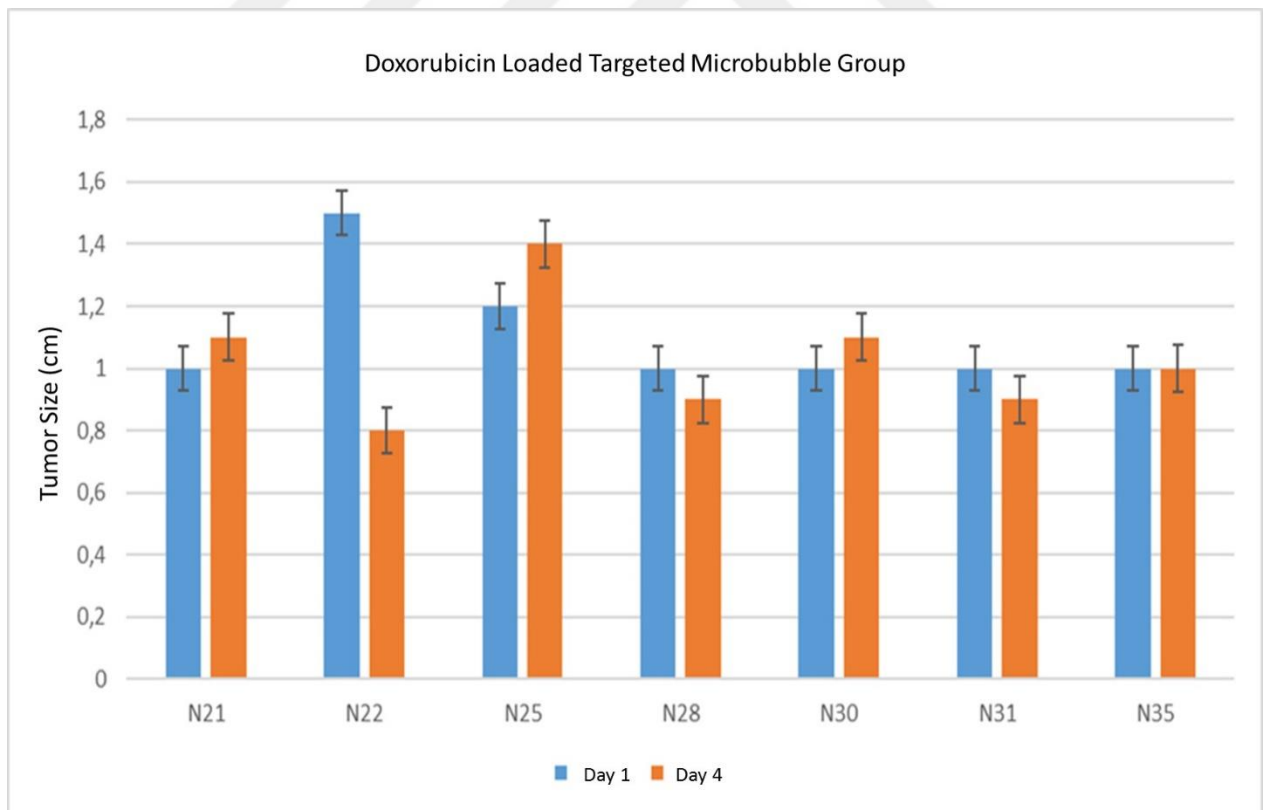
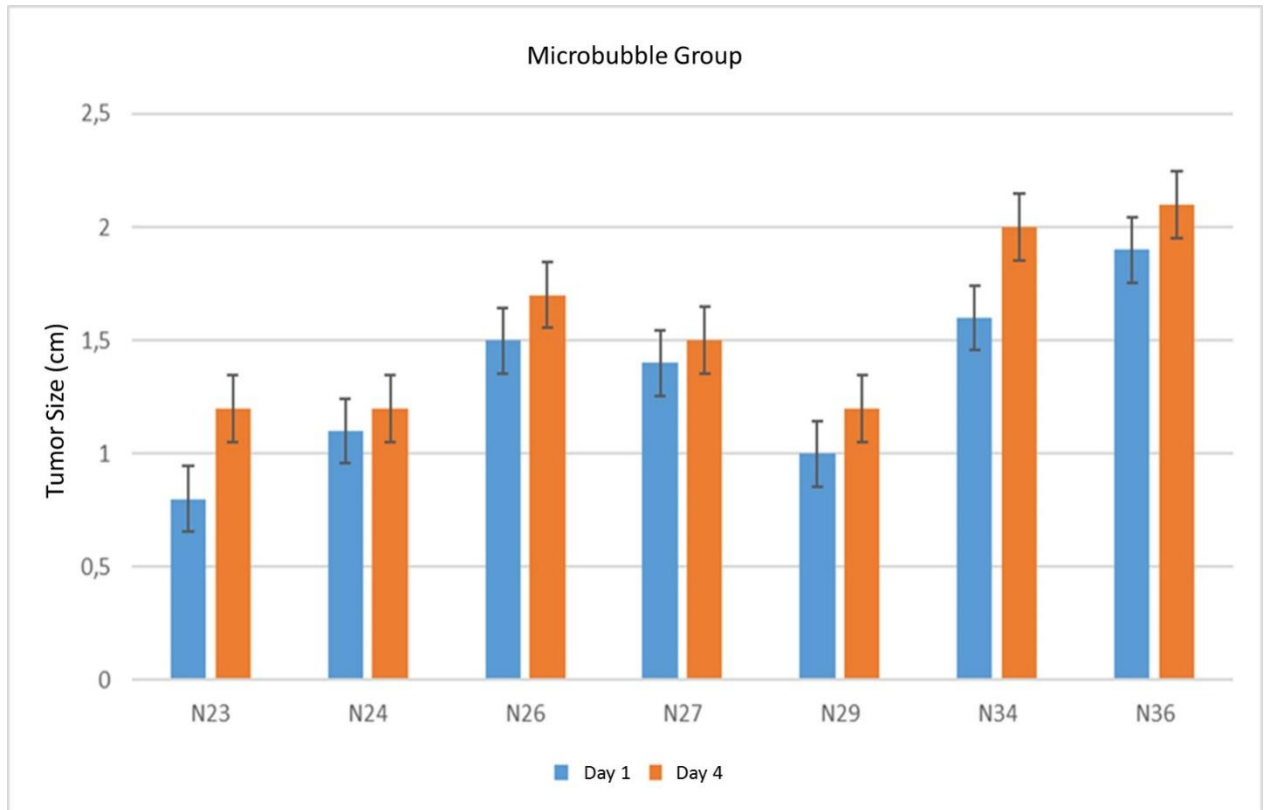


Figure 6. Ultrasonographic procedure in 96 well plates

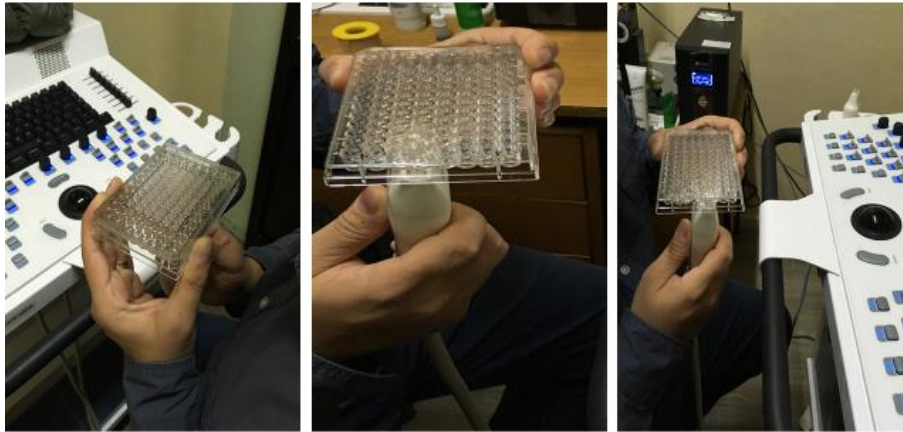


Figure 7. Apoptotic fractions of other groups compared to the control group.(* p<0,05)

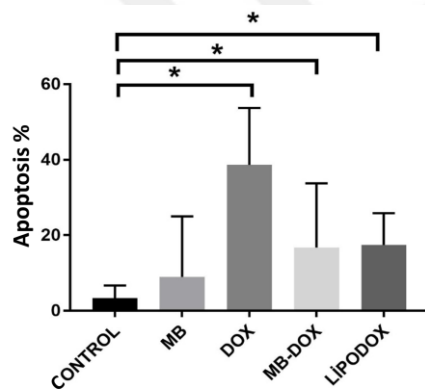


Figure 8. Histopathological image of lung tissue in groups Control (A), DOX (B), MB (C) and MB-DOX (D). Histopathologic examination of the sections taken from lung tissue revealed normal histopathology for all groups.

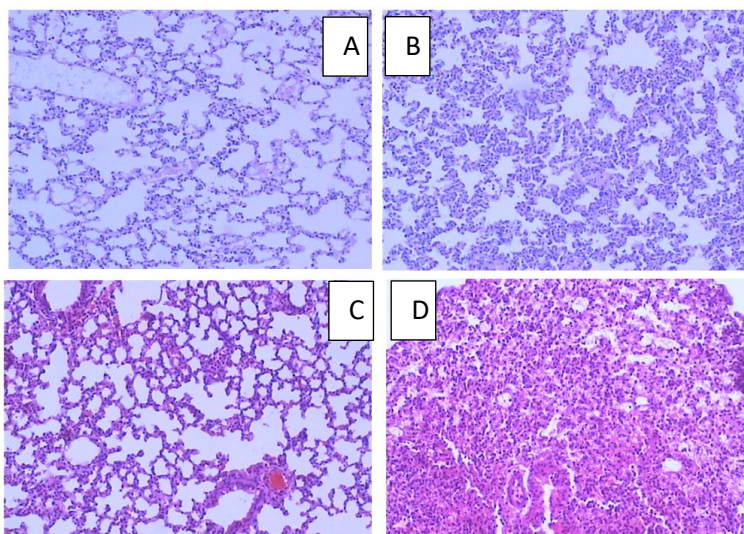


Figure 9. Histopathological image of kidney tissue in groups Control (A), DOX (B), MB (C) and MB-DOX (D). Histopathologic examination of the sections taken from lung tissue revealed normal histopathology for all groups.

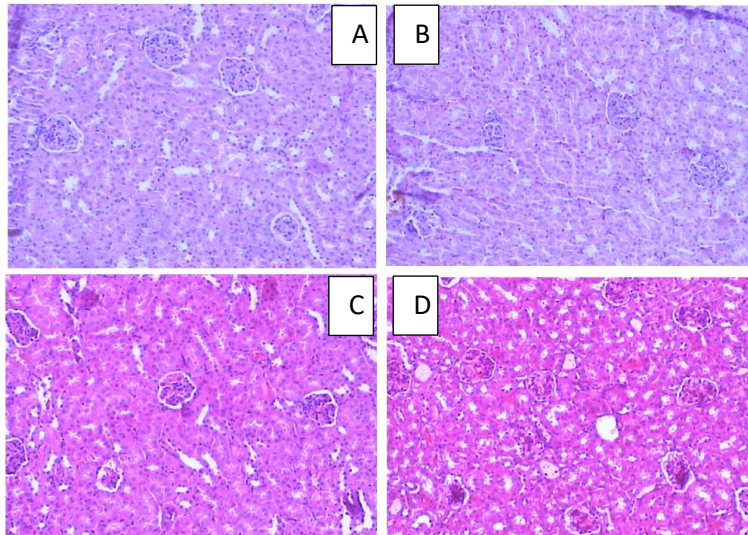


Figure 10. Histopathological image of brain tissue in groups Control (A), DOX (B), MB (C) and MB-DOX (D). Histopathologic examination of the sections taken from lung tissue revealed normal histopathology for all groups.

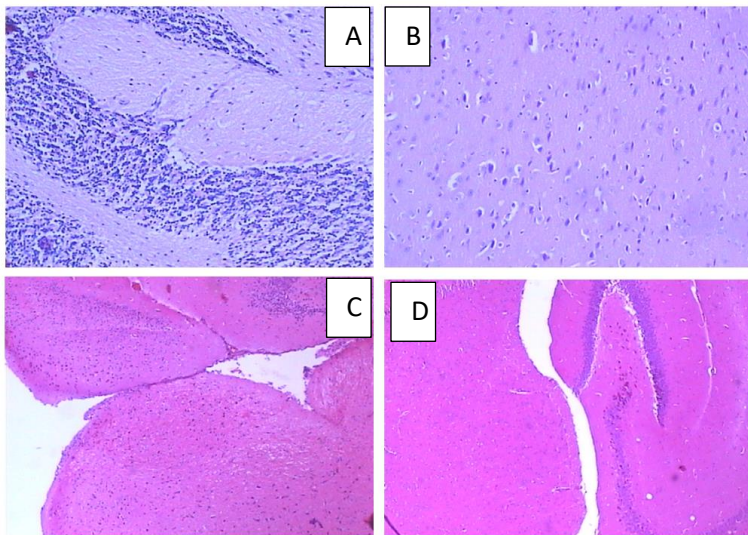


Figure 11. Histopathological image of liver tissue in groups Control (A), DOX (B), MB (C) and MB-DOX (D). Spotty necrosis-like damage was observed in the liver parenchyma of animals in groups DOX and Lipo-DOX at a mild level

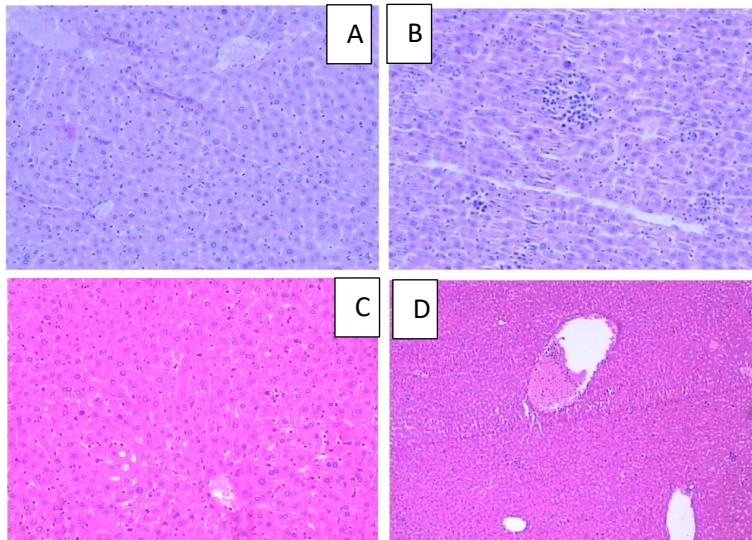


Figure 12. Histopathological image of tumor tissue in groups Control (A), DOX (B), MB (C) and MB-DOX (D).

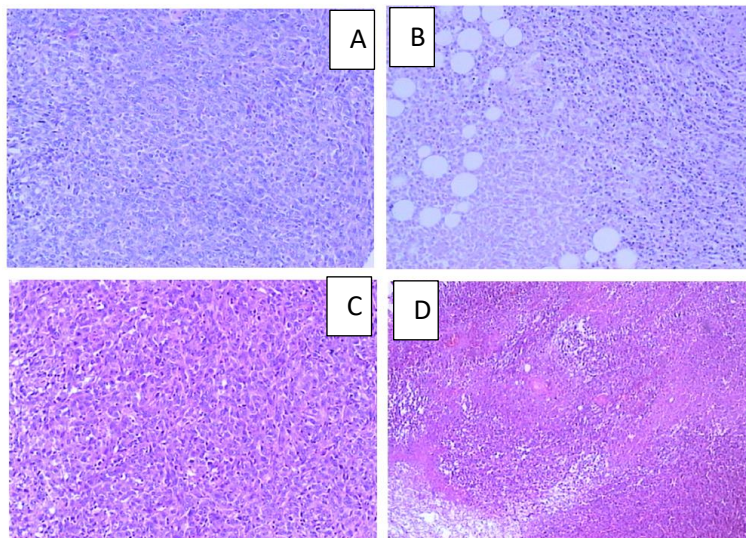


Table 1. Mean Values and statistical evaluation of tumor size difference, necrosis, apoptosis, viability and liver damage for all groups. (Values of $p < 0.05$ will be regarded as statistically significant.)

Parameters	Mean Value	p Value	Statistically Significant
Tumor Size Difference	1,6571	0,145	NO
Necrosis	35,4	0,000	YES
Apoptosis	17,2571	0,001	YES
Viability	63,0	0,000	YES
Liver Damage	-	0,000	YES

Table 2. Mean Values of viability, apoptosis and necrosis for each group by Kruskal Wallis-H Test.

Groups	Viability %	Apoptosis %	Necrosis %
Control	92%	3%	2,3
Doxorubicin	16%	38%	60%
Microbubble	80%	9%	6%
Liposomal Doxorubicin	66%	18%	63%
Doxorubicin-Loaded Microbubble	58%	16%	44%

Table 3. Statistical evaluation of tumor size difference, apoptosis , necrosis , viability and liver damage between Control vs. DOX, DOX vs. MB-DOX, MB vs. MB-DOX, Control vs. MB, Control vs. MB-DOX, Control vs. LipoDOX, DOX vs. MB-DOX groups by Mann Whitney-U test. (Values of $p < 0.05$ will be regarded as statistically significant.)

Groups	p Value of Tumor Size Difference	p Value of Necrosis	p Value of Apoptosis	p Value of Viability	p Value of Liver Damage
Control x DOX	0,259	0,01	0,01	0,01	0,026
DOX x MB-DOX	0,71	0,209	0,017	0,007	0,026
MB x MB-DOX	0,011	0,017	0,097	0,128	1
Control x MB	0,456	0,053	0,456	0,456	1
Control x MB-DOX	0,097	0,007	0,017	0,004	1
Control x LipoDox	0,902	0,001	0,004	0,001	0,026
Dox x LipoDox	0,535	0,902	0,011	0,001	1

Table 4. Statistical evaluation of urine-creatinine and urine-protein between Control vs. MB-DOX, Control vs. DOX, Control vs. Lipo-DOX groups by Mann Whitney-U test. (Values of $p < 0.05$ will be regarded as statistically significant.)

Groups	p Value of Urine-Creatinine	p Value of Urine-Protein
Control x MB-DOX	0,730	0,730
Control x MB-DOX	0,413	0,556
Control x Lipo-DOX	0,05	0,016