



# *In vitro* Tümör Erken Tanısı İçin Biyobozunabilir Indosiyanın Yeşili Nano Prob Biodegradable Indocyanine Green Nanoprobe for *In vitro* Early Tumor Diagnosis

Zeynep Rüya EĞE<sup>1</sup>, Aydın AKAN<sup>2</sup> Faik N. OKTAR<sup>3</sup>  
Biyomedikal Mühendisliği Bölümü<sup>1,2</sup>, Biyomühendislik<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, <sup>2</sup>İzmir Katip Çelebi Üniversitesi,  
<sup>5</sup>Marmara Üniversitesi  
<sup>1,3</sup>İstanbul, <sup>2</sup>İzmir, Türkiye  
[zruyadeveli@gmail.com](mailto:zruyadeveli@gmail.com), [aydin.akan@ikc.edu.tr](mailto:aydin.akan@ikc.edu.tr),  
[foktar.biomaterials@gmail.com](mailto:foktar.biomaterials@gmail.com)

Cevriye KALKANDELEN<sup>4</sup>, Betül KARADEMİR<sup>5</sup> ve  
Oğuzhan GÜNDÜZ<sup>6</sup>  
Biyomedikal Cihaz Tek. TBMYO<sup>4</sup>, Tıp Fak.<sup>5</sup>, Metalurji ve  
Malzeme Müh.<sup>6</sup>  
<sup>4</sup>İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, <sup>5,6</sup>Marmara University  
[kalkan@istanbul.edu.tr](mailto:kalkan@istanbul.edu.tr)  
[betulkarademir@marmara.edu.tr](mailto:betulkarademir@marmara.edu.tr)  
[ucemogu@gmail.com](mailto:ucemogu@gmail.com)

**Özetçe**— Gelişmiş biyomedikal görüntüleme teknikleri, akıllı ilaç tasarımları ve kontrollü ilaç salım çalışmaları, sağlıklı hücelere zarar vermeden kanserli hücrelerin erken tespiti ile hastaların hayatlarını koruma altına almaktadır. Bu çalışmada yakın infrared bölgesinde (NIR) yüksek ışık emilimi ve yayılımına sahip olan İndosiyanın yeşili (ICG) boyası biyo bozunabilir ve biyo uyumlu polikaprolakton (PCL) polimerine eş eksenli elektroçirme yöntemi ile kapsülendirilerek ICG nano prob üretilmiştir. Eş eksenel fiber oluşumu sırasında ICG çözeltisinin saf PCL solüsyonuna fiziksel etkisinin anlaşılması için ICG ve PCL solüsyonların viskozite, elektriksel iletkenlik, yoğunluk ve yüzey gerilimi eş eksenel elektroçirme işleminden önce karakterize edilmiştir. ICG solüsyonunun yüksek elektriksel iletkenliği ve düşük viskozitesi, PCL/ICG nanofiber çaplarının ( $\Phi=627.15\pm 157.77$  nm), saf PCL nano fiber çaplarına ( $\Phi=930.71\pm 210.27$  nm) kıyasla azalmasına neden olmuştur. PCL nanofiber içerisine kapsüllenen ICG boyası, FT-IR ve konfokal mikroskopu ile belirlenmiştir. PCL/ICG nanofiberlerinden kontrollü ICG salımı 21 gün süreyle yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler** — Polikaprolakton; İndosiyanın Yeşili; Nano fiber; Eş-eksenel Elektroçirme; Kapsülleme; Nano prob.

**Abstract**— Advanced biomedical imaging techniques, intelligent drug designs and controlled drug release studies let patients can be safeguarded via early detection of cancerous cells without damaged to healthy cells. In this study, the ICG nanoprobe was fabricated via co-axial electrospinning method by encapsulating of ICG, which has high light absorption and emission in the near infrared region (NIR), in biocompatible and biocompatible Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) polymer. During co-axial fiber formation, in order to understand of the physical effect of ICG solution onto pure PCL solution, viscosity, electrical conductivity, density and surface tension were characterized before co-axial electrospinning process. The high electrical conductivity and low viscosity of ICG, caused the

PCL/ICG nanofiber diameters ( $\Phi=627.15\pm 157.77$  nm) decreased compared to pure PCL nanofibers ( $\Phi=930.71\pm 210.27$  nm). Encapsulated ICG dye in the PCL nanofiber was determined by FT-IR and confocal microscopy. Controlled ICG release from PCL / ICG nanofibers was performed up to 21 days in PBS (pH 7).

**Keywords** — Poly( $\epsilon$ -caprolactone); Indocyanine Green; Nanofiber; Co-axial Electrospinning; Encapsulating; Nanoprobe.

## I. GİRİŞ

İndosiyanın Yeşili, yakın kızıl ötesinde (NIR) 600 ve 900 nm bant aralığında güçlü emilim özelliğine sahiptir ve 1956'dan beri tıbbi görüntülemelerde kontrast madde olarak kullanılmaktadır [1]. NIR' da aktif boyaların biyolojik doku içinde emilmeden ve saçılmadan görünür bölge ajanlarına göre daha derine nüfuz etmeleri görüntüleme tekniklerinde oldukça büyük bir avantajdır [2]. Ancak ICG boyası vücuda kan damarı yoluyla verildiğinde plazma proteinlerine bağlanır ve vücuttan kısa sürede atılır. Damar görüntüleme uygulamalarında bu durum avantaj olsa da, hedefli doku görüntülemelerde dezavantajdır. Ayrıca ICG ışık ve ısı ile bozunuma uğramaktadır. Sulu ortamlarda kararsızlığı da ICG'nin görüntüleme ajanı olarak kullanımını sınırlamaktadır [3]. Bu çalışmada ICG'nin görüntüleme maddesi olarak kullanımındaki sınırlamaları ortadan kaldırmak için, ICG polikaprolakton polimeri içerisine eş eksenli elektroçirme yöntemi ile kapsülendirilmiştir. Böylece ICG hedeflenen dokulara bozunmadan nanofiberler aracılığıyla ulaştırılmıştır. ICG boyasının 21 gün boyunca kontrollü salımının yapılması polikaprolakton nanofiber içerisinde bozunmadan uzun süreli muhafazasının gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

## II. MALZEME VE YÖNTEM

### A. Malzeme

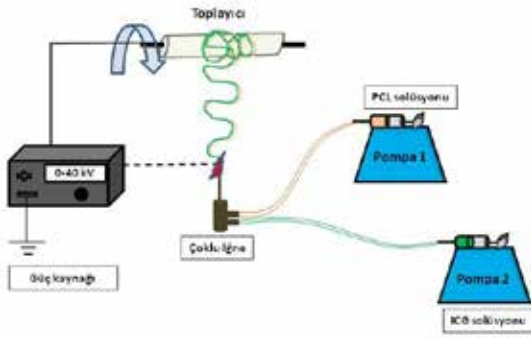
Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) Mn: 80,000 Sigma-Aldrich'den satın alındı. Dimetil formamid (DMF) ve Kloroform çözücülerini Fisher Scientific, Atlanta, GA'dan satın alındı. Tween80 (viskoz sıvı) Sigma-Aldrich'den satın alındı. Indosyanin Yeşili (IR-125) Acros Organics'den satın alındı. Metanol çözücüsü Sigma-Aldrich'den satın alındı.

### B. Polimer Solüsyonlarının hazırlanması

%10 (w/v) Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) polimeri (8:2, v/v) oranında Dimetil formamid (DMF) ve Kloroform solvent karışımı içerisinde 2 saat magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. Polimer tamamen çözüldükten sonra %1 (w/v) oranında Tween80 eklenerek 10 dakika daha karıştırıldı. ICG (1 mg/ml) 100  $\mu$ L oranında metanol içerisinde çözüldü. ICG ve PCL solüsyonları ayrı ayrı 10 ml'lik şırıngalara dolduruldu.

### C. Eş-eksenli Elektroegirme Metodu

Elektroegirme metodu, mikron seviyelerden nano seviyelere kadar uzanan boyutlarda nanofiber üretimi için basit ve oldukça ucuz bir yöntemdir [4]. Eş eksenli elektroegirme yöntemi ise tek basamakta çok katmanlı nanofiber üretimi için oldukça elverişlidir [5]. Eş eksenli elektroegirme düzeneği basitçe; Yüksek voltajlı DC güç kaynağı, Toplayıcı, İnfüzyon pompası (kullanılacak iğne sayısına bağlı miktarda) ve çok uçlu iğne sisteminden oluşmaktadır. Şekil'1 de eş eksenli elektroegirme düzeneği verilmiştir.



Şekil 1. Eş eksenli Elektroegirme Düzeneği

Şekil 1'de gösterilen çoklu iğne çalışma grubumuz tarafından geliştirilmiştir. Dıştaki iğnenin dış ve iç çapı DÇ: 2.13 mm, İÇ: 1.88 mm iken içerideki iğnenin dış ve iç çapı ise sırasıyla DÇ: 1.30 mm, İÇ: 1.20 mm şeklindedir. Eş eksenli elektroegirme işlemi sırasında, polimer solüsyonu ve ICG solüsyonu bağlandıkları infüzyon pompaları (NE-300, New Era Pump Systems, Inc., USA) ile istenilen akış hızı (ml/h) oranlarında iğne ucuna itilmektedir. Elektroegirme yöntemi sırasında, sisteme iğne ucu (pozitif elektrot) ile toplayıcı (negatif uç) arasında uygulanan elektrik alan, iğne ucundan çıkan polimer sıvısının fiber şeklinde eğrilerek toplayıcıya katı halde ulaştırılmasını sağlamaktadır. Eğrilen fiberlerin karakteristik özellikleri kullanılan solüsyonların viskozite (mPas), iletkenlik ( $\mu$ S/m), yoğunluk ( $g/cm^3$ ) ve yüzey gerilimi

(mN/m) gibi fiziksel özelliklerine bağlı olduğu gibi elektroegirme parametrelerine de (uygulanan voltaj (kV), polimer akış hızı (ml/h) ve iğne toplayıcı arasındaki mesafe (cm)) bağlıdır. Solüsyonların fiziksel karakterizasyonları yapılmıştır. PCL ve ICG çözeltilerinin viskozitesi dijital viskozimetre (DV-E, Brookfield AMETEK, ABD), yoğunlukları 10 mL özgül ağırlık şişesi kullanılarak ölçülmüştür. Çözeltilerin iletkenliği dijital iletkenlikmetre (Cond 3110 SET 1, WTW, Almanya) ile değerlendirildi. Yüzeyi gerilimi ölçmek için kuvvet tansiyometre (Sigma 703D, Attension, Germany) kullanılmıştır. Tüm ölçümler oda sıcaklığında (25 ° C) yapılmıştır. Düzgün fiber yapılarının elde edilmesi için elektroegirme parametreleri optimize edilmiştir.

### D. Nanofiberlerin Karakterizasyonu

Nano fiberlerin morfolojik özellikleri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile yapılmıştır. Nano fiberlerin yapısını oluşturan materyaller Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) (PerkinElmer, Waltham, Mass., USA) ile belirlenmiştir. PCL nano fiberlerinin içine kapsül lenerek kararlılığı artırılan ICG boyası konfokal mikroskop (Zeiss, LSM 700) yardımıyla görüntülenmiştir.

### E. Kontrollü ICG Salımı

PCL/ICG nanofiberinden ICG'nin kontrollü salımı, 20 mg'lık nanofiber kesitlerinin ayrı ayrı 1ml PBS (pH 7)'de 21 gün süreyle çalkalayıcıda (Biosan TS-100) 300 rpm' de ve 37 °C' de yatay çalkalanarak yapılmıştır. Önceden belirlenmiş zaman aralıklarında örneklerin üst fazları alınarak UV spektrometrede (Shimadzu UV-3600 spectrometer) analiz edilmiştir. Ölçüm sonrası taze PBS (1mL) yeniden örnek üzerine eklenerek salım devam ettirilmiştir. PCL/ICG nano fiberden alınan 3 örnek ile deney tekrar edilmiştir. Eş eksenli üretilen PCL/ICG nano fiberinden belirlenen zamanlarda salınan ICG miktarı, ICG'nin (1mg/ml) farklı konsantrasyonlarından elde edilen kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır.

## III. SONUÇLAR VE YORUM

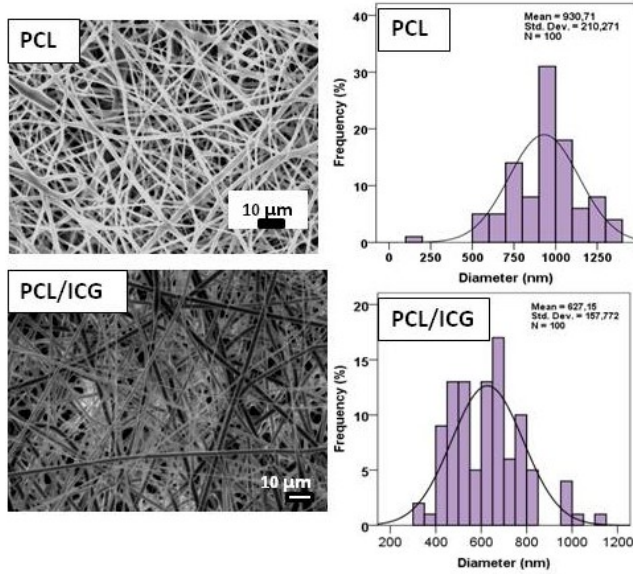
### A. PCL/ICG Nano fiberlerin Eş eksenli Elektroegirme Yöntemi ile Üretimi

ICG boyasının kararlılığının ve biyolojik ortamlarda bozunmadan bulunma süresinin artırılması amacıyla PCL/ICG nanofiberleri üretilmiştir. İdeal nano fiber yapılarının elde edilmesi için elektroegirme parametreleri optimize edilmiştir. Elde edilen nano fiberler tek düze dağılıma sahip olmalı ve boncuk yapısı içermemelidir. Bu amaçla, üretilen saf PCL nano fiberleri ve PCL/ICG çok katmanlı nano fiber üretiminde sisteme uygulanan voltaj, toplayıcı ile iğne ucu arasındaki mesafe, polimer ve ICG solüsyonunun akış hızı optimize edilmiştir. Ayrıca ideal fiber yapısının elde edildiği solüsyonların fiziksel özellikleride belirlenmiştir. Solüsyonların fiziksel özellikleri ve optimize edilen elektro egirme parametreleri Tablo 1'de verilmiştir.

TABLO I. OPTİMİZE EDİLMİŞ ELEKTROEĞİRME PARAMETRELERİ VE SOLÜSYONLARIN FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ

	Saf PCL	PCL/ICG (Dış/iç)
Akış hızı (ml/h)	1.2	0.6/0.3
Voltaj (kV)	17.6	17.6
Mesafe (cm)	15	15
Vizkosite (mPas)	56±0.5	56±0.5/0.95±0.1
İletkenlik (µS/m)	1.1±0.2	1.1±0.2/31.9±1.8
Yoğunluk (kg /m <sup>3</sup> )	970±50	970±50/780±10
Yüzey gerilimi (mN /m)	30.06±0.53	30.06±0.53/21.24±0.12

Nanofiberlerin boncuksuz ve düzgün dağılımlı yapıları alınan SEM görüntüleri ile ortaya konmuştur. Optimize edilen saf PCL ve PCL/ICG nanofiberlerinin SEM görüntüleri Şekil 2'de verilmiştir.



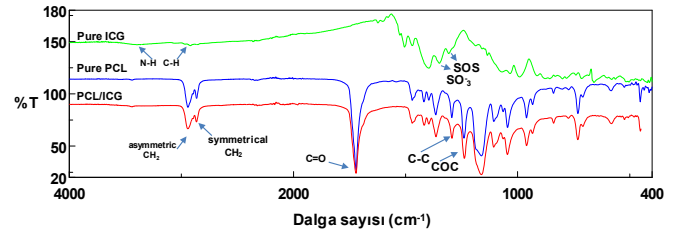
Şekil 2. PCL ve PCL/ICG nanofiberlerinin SEM görüntüleri ve Çap analizleri

Şekil 2'de görüldüğü gibi ICG ile eş eksenli elde edilen PCL/ICG nano fiberinin çap değeri ( $\Phi=627.15\pm157.77$  nm) saf PCL nano fiberlerinin ( $\Phi=930.71\pm210.27$  nm) çap değerine göre daha düşüktür. Bu sonuç ICG'nin yüksek elektriksel iletkenliğinin ve düşük vizkositesinin bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

Nanofiberlerin morfolojik karakterizasyonlarından sonra moleküler karakterizasyonları da FT-IR spektroskopisi ile yapılmıştır. Saf PCL'nin  $2949\text{ cm}^{-1}$  ve  $2850\text{ cm}^{-1}$ 'de sırasıyla karakteristik asimetrik  $\text{CH}_2$  bandı ve simetrik  $\text{CH}_2$  bandı bulunmaktadır. Ayrıca  $1720\text{ cm}^{-1}$ 'de karbonil gerilme bandı,  $1285\text{ cm}^{-1}$ 'de C-O ve C-C gerilme bandı ve  $1240\text{ cm}^{-1}$ 'de ise asimetrik COC gerilme bandı bulunmaktadır [6]. ICG'nin karakteristik bandları ise;  $3430\text{ cm}^{-1}$ 'de, N-H bandı,  $2910\text{ cm}^{-1}$

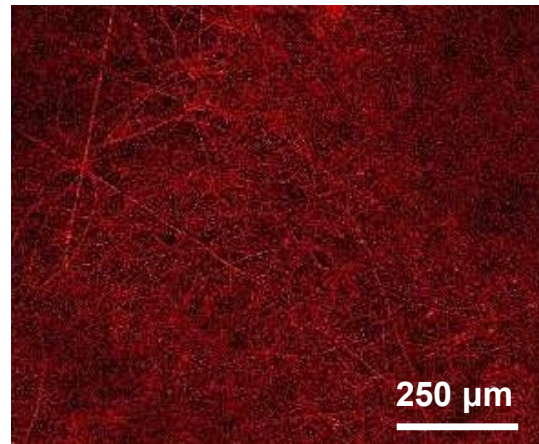
'de C-H bandı,  $1300\text{ cm}^{-1}$ 'de sülfon grubu ve  $1345\text{ cm}^{-1}$ 'de ise sülfonik grup) fonksiyonel gruplarıdır [7].

Şekil 3'de Saf PCL, PCL/ICG nano fiberlerinden ve saf ICG tozundan alınan FT-IR sonuçları verilmiştir. Nanofiber içerisinde bulunan ICG ( $100\text{ }\mu\text{L}$ ) miktarının polimere oranla az miktarda olması PCL/ICG kompozit nano fiber FT-IR spektrumunda ICG etkisinin görülmesini zorlaştırmaktadır. Şekil 3'de açık renk sütunlarla belirtilen dalga aralıkları ICG'nin PCL nanofiberler ile kapsülendiğini en açık ortaya koyan bantları içermektedir. ICG'nin kapsülendiği PCL/ICG nanofiberlerinin asimetrik ve simetrik  $\text{CH}_2$  bant yoğunluklarının azaldığı ve genişlediği spektrumda görülmektedir. Ayrıca, PCL'nin  $1720\text{ cm}^{-1}$ 'de karakteristik C-O gerilme bandının yoğunluğunun da azalması ve omuz oluşturması ICG'nin nanofiber ile kapsülendiğini ortaya koyan bir başka bölümdür.



Şekil 3. PCL, PCL/ICG nanofiberlerinden ve ICG tozundan alınan FT-IR spektrumları.

ICG'nin PCL polimeri ile eş eksenli elektroegirme yöntemi ile kapsülennmesi alınan konfokal görüntüler ile daha açık bir şekilde ortaya koyulmuştur. PCL/ICG çok katmanlı nanofiber kesitinden alınmış konfokal görüntüsü verilmiştir (Şekil 4).

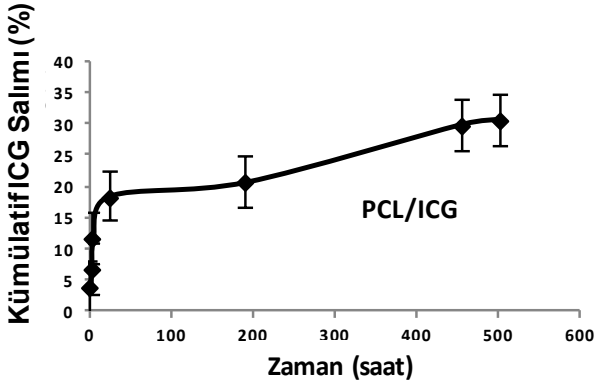


Şekil 4. PCL/ICG nanofiberlerinden alınan konfokal mikroskop görüntüsü.

ICG boyasının  $750\text{ nm}$ 'de konfokal lazeri ile uyarılması sonucunda yaydığı florasan ışığın oluşturduğu desen nanofiberlerin ağısı yapısını yansıtmaktadır. PCL/ICG nanofiberinden alınan bu görüntü, ICG'nin PCL nanofiber yapısı içerisinde kapsülendiğini açıkça ortaya koymaktadır.

### B. Kontrollü ICG Salımı

PCL/ICG elektrospun nano fiberden ICG' nin *in vitro* salım profili, önceden tanımlanmış zaman aralıklarında UV spektrofotometre ile pH 7'de PBS içinde incelenmiştir. Serbest kalan ICG miktarı, 780 nm'de farklı ICG ( $0.2-1 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) konsantrasyonlarda alınan absorpsiyon değerleri ile çizilen kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır ( $r^2 = 0.9753$ ) [8].



Şekil 5. ICG'nin PCL/ICG nanofiberinden kümülatif salım profili.

Şekil 5'de görüldüğü gibi Şekil 5'te görülebileceği gibi, ICG salımı sürdürülebilir şekilde meydana gelmiştir. PCL nanofiberin biyobozunumunun oldukça uzun süre alması bu sonucu doğurmuş olabilir [9]. ICG salımının 21 güne dek sürmesi, ICG' nin PCL nanofiberler içerisinde kapsüllemesi sonucunda kararlı hale gelerek bozunmadan uzun süreli muhafazası ortaya koyulmuştur.

### IV. TARTIŞMA

Bu çalışmada, eş eksenli elektroğirme metodu ile bir aşamada, yüksek elektrik iletkenliğine sahip olan ICG boyası PCL polimeri içerisine kapsüllemeye ICG'nin biyolojik ortamlarda ki kararsızlığı ortadan kaldırılmıştır. Böylece biyolojik ortamlarda kalım süresi artırılan ICG boyasının ileri tıbbi görüntüleme uygulamalarında nano prob olarak kullanılabilirliği ortaya koyulmuştur.

### BİLGİLENDİRME

Bu çalışma finansal olarak TÜBİTAK tarafından (Proje no:217M028) desteklenmektedir.

### KAYNAKLAR

- [1] Abels C., and Fickweiler S., "Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation", *Arch Dermatol Res.*, 292:404-411, 2000.
- [2] Zheng C., Zheng M., Gong P., "Indocyanine green-loaded biodegradable tumor targeting nanoprobes for in vitro and in vivo imaging", *Biomaterials*, 33: 5603-5609, 2012.
- [3] Ma Y., Sadoqi M., Shao J., "Biodistribution of Indocyanine green-loaded nanoparticles with surface modifications of PEG and folic acid", *International Journal of Pharmaceutics.*, 436:25-31, 2012.
- [4] Sadri M., karimi E., "New Chitosan/poly (ethylene oxide)/Thyme Nanofiber Prepared by Electrospinning Method for Antimicrobial Wound Dressing", *J Nanostruct* 6 (4):322-328, 2016.

- [5] Nazari K., Kontogiannidou E., "Fibrous polymeric buccal film formulation, engineering and bio-interface assessment", *European Polymer Journal*, 97:147-157, 2017.
- [6] T. Elzein, M. N. Eddine, C. Delaite, S. Bistac, P. Dumas, FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, 273, 381-387.
- [7] R. J. Chung, K. L. Ou, S. P. Chen, H. L. Liu, Preparation of ICG-FePt nanoparticles promising for magnetic resonance imaging contrast agent and hyperthermia applications, *Advanced Powder Technology*, 2016, 27, 994-999.
- [8] Z. R. Ege, A. Akan, F. N. Oktar, C. C. Lin, B. Karademir, O. Gunduz, "Encapsulation of indocyanine green in poly(lactic acid) nanofibers for using as a nanoprobe in biomedical diagnostics," *Materials Letters*, vol. 228, June 2018, pp.148-151.
- [9] Y. M. Sahin., S. Su., B. Ozbek., "Production and characterization of electrospun fish sarcoplasmic protein based nanofibers," *Journal of Food Engineering*, 2018, 222: 54-62.