



**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI  
BYF-YL-2014-0001**

**EHRİCH ASİT TÜMÖR HÜCRELERİ ÜZERİNDE  
KLORALUMİNYUM FTALOSİYANİN VE DOSETAKSELİN  
SONODİNAMİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ergün Cem KÖKEN**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN**

**AYDIN-2014**

**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI  
BYF-YL-2014-0001**

**EHRİCH ASİT TÜMÖR HÜCRELERİ ÜZERİNDE  
KLORALUMİNYUM FTALOSİYANİN VE DOSETAKSELİN  
SONODİNAMİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ergün Cem KÖKEN**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN**

**AYDIN-2014**

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ergün Cem KÖKEN tarafından hazırlanan “Ehrlich Asit Tümör Hücreleri Üzerinde Kloralüminyum Ftalosiyanin ve Dosetakselin Sonodinamik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez, 22/07/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

**Ünvanı, Adı ve Soyadı :**

- 1- Prof. Dr. Mehmet Dinçer Bilgin
- 2- Prof. Dr. Erol Ömer Atalay
- 3- Yard. Doç. Dr. Özlem Bozkurt

**Üniversitesi :**

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp  
Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı  
Pamukkale Üniversitesi Tıp  
Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı  
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp  
Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı

**İmzası:**

*Mehmet Dinçer Bilgin*  
*Erol Ömer Atalay*  
*Özlem Bozkurt*

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun  
..... Sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Unvanı, Adı Soyadı  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ

## ÖNSÖZ

Kanser tedavisinde kullanılmakta olan geleneksel yöntemlerin yanında noninvaziv ve mevcut tedavi yöntemlerinin sahip olduğu dezavantajları barındırmayan terapi teknikleri geliştirebilmek adına pek çok bilimsel çalışma yürütülmektedir. Sonodinamik terapi (SDT), fotodinamik terapinin (FDT) prensiplerini temel alarak geliştirilen noninvazif, alternatif bir kanser tedavi yöntemidir. FDT selektif olarak lokalize hedef doku tarafından alınan ışığa duyarlı ajanın ortamda bulunan moleküler oksijen varlığında, uygun dalga boyunda görünür ışığa maruz bırakılması sonucu hedef hücrelerde apoptoz ve nekroza neden olan ve başlıca singlet oksijen oluşumu prensibine dayanan bir fotokemoterapi yöntemidir. SDT’de ise, FDT’e benzer şekilde *sonosensitif* olarak adlandırılan ultrasese duyarlı bir molekülün seçici olarak hedef dokuya alınması ve bu ajanın ultrases ile uyarılarak aktive edilmesi sonucu hedef hücrelerde hasara uğratması prensibine dayanmaktadır. SDT’de kullanılan ultrases daha derine nüfuz etmektedir ve özellikle non-termal etkisi sonucu akustik kavitasyon oluşumu gözlenmektedir. Oluşan kavitasyon sonucu ortamdaki su moleküllerinin parçalanmasıyla ortaya çıkan serbest radikaller (hidroksil, hidrojen, hidrojen peroksit, süperoksit) hedef hücreleri harap etmektedir. Aynı zamanda ultrases membran geçirgenliğini artırarak ilaçların hücre içine alınmalarını kolaylaştırabilmektedir. Bazı kemoterpi ilaçlarının düşük yoğunluklu ultrases ile sinerjistik etki gösterebildikleri bildirilmektedir. Bu çalışmanın amacı Ehrlich asit tümör hücrelerinde kloralüminyum ftalosiyaninin sonodinamik etkinliğini araştırmak ve bunun yanında bir kemoterpi ilacı olan dosetakselin ultrases ile sinerjistik etkinliğinin olup olmadığını belirlemektir.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
	No
KABUL ve ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser .....	2
1.1.1. Kanser oluşumu .....	2
1.1.2. Kanserin nedenleri .....	3
1.1.3. Kanser tedavi yöntemleri .....	5
1.2. Ehrlich Asit Tümör .....	5
1.3. Sonodinamik Terapi .....	6
1.3.1. Sonodinamik terapide kullanılan sensitizörler ve hücre hasarı.....	8
1.3.2. Ultrasesle kemoterapi etkinliğinin artırılması.....	12
1.4. Ultrases .....	14
1.4.1. Fiziksel özellikleri .....	14
1.4.2. Ultrasesin tıpta kullanımı .....	15
1.4.3. Biyolojik etkileri .....	16
1.4.3.1. Ultrasesin termal etkileri.....	16
1.4.3.2. Ultrasesin nontermal etkileri.....	17
2. GEREÇ VE YÖNTEM .....	19
2.1. Gereç .....	19
2.1.1. Hayvanlar .....	19
2.1.2. İlaçlar .....	19
2.1.3. Ultrases kaynağı .....	20
2.2. Yöntem .....	21
2.2.1. Ehrlich Asit Tümör hücrelerinin elde edilmesi .....	21
2.2.2. Tedavi grupları .....	21
2.2.3. İlaçların hazırlanması .....	22
2.2.4. Ultrases uygulama .....	22

2.3. Değerlendirme Yöntemleri .....	24
2.3.1. Hücre canlılığı .....	24
2.3.2. Apoptoz .....	24
2.3.3. Western Blot .....	25
2.3.3.1. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi .....	25
2.3.3.2. Nitroselüloz membrana aktarım .....	32
2.3.4. İstatistik.....	35
3. BULGULAR .....	36
3.1. Hücre Canlılığı Değerlendirme .....	36
3.2. Western Blotlama .....	38
3.3. Hoechst-propidyum iyodid boyama .....	40
3.3.1. SDS poliakrilamid jel elektroforezi .....	40
3.3.2. Western blotlamada elde edilen bantlar .....	41
4. TARTIŞMA .....	44
5. SONUÇ .....	49
ÖZET .....	51
SUMMARY .....	52
TEŞEKKÜR.....	53
6. KAYNAKÇA .....	54
ÖZGEÇMİŞ .....	61

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AICIPc	: Kloralüminyum ftalosiyenin
AIPcS <sub>4</sub>	: Alüminyum ftalosiyenin tetrasülfonat
CAT	: Katalaz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EAT	: Ehrlich asit tümör
FDT	: Fotodinamik terapi
GSH	: Glutasyon
HMME	: Hematoporfirin monometil eter
Hp	: Hematoporfirin
MDA	: Malondialdehid
PpIX	: Protoporfirin IX
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDT	: Sonodinamik terapi
SOD	: Süperoksit dismutaz
US	: Ultrases
5-FU	: 5-Florourasil

## TABLÖLAR

	<b>Sayfa No</b>
Tablo 1.1. Frekans aralıklarına göre ultrasesin genel sınıflandırılması.....	16
Tablo 2.1. Tedavi grupları.....	21



## ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1.1. SDT’de olası hücre hasarı mekanizması .....	9
Şekil 1.2. Kloraluminyum ftalosiyanınin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 1.3. Dosetakselin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.1. BTL 5710 ultrases terapi cihazı.....	20
Şekil 2.2. Ultrases uygulama düzeneği.....	23
Şekil 2.3. Laboratuvarımızdaki ultrases uygulama düzeneği.....	23
Şekil 2.4. Olympus BX51 floresan mikroskop.....	25
Şekil 2.5. Elektroforez düzeneğinde cam levhaların yerleştirilmesi.....	27
Şekil 2.6. Jel solüsyonunun cam levhalar arsına dökülmesi.....	28
Şekil 2.7. a) Jelin üzerinin %70 etanolle kapatılması, b) jel donduktan sonra alkolün kurutma kağıdıyla uzaklaştırılması.....	28
Şekil 2.8. Elektroforez düzeneğinde tarağın jele yerleştirilmesi.....	29
Şekil 2.9. Elektroforezde jelin çukurlarına marker ve örnek tampon solüsyonu ve antijen karışımının konulması.....	30
Şekil 2.10. Elektroforez düzeneğinde cam levhaların elektrot tankına koyulmadan önce gerekli aparatlara takılması.....	30
Şekil 2.11. Elektroforez düzeneğinde jelin elektrot tankına koyulması.....	31
Şekil 2.12. Proteinlerin jelden nitroselüloz membrana aktarılması.....	33
Şekil 2.13. Nitroselüloz membranlar saniyede bir devirde çalışan rotari çalkalayıcı üzerinde.....	34
Şekil 2.14. Boyama sonrası üzerinde bantların belirginleştiği nitroselüloz membrane...	35
Şekil 3.1. Sonikasyon sonrası EAT hücre canlılığı oranları.....	36
Şekil 3.2. Üç doz US ile birlikte veya tek başına uygulanan AICIPc'nin konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığındaki değişim gösterilmektedir.....	37
Şekil 3.3. Dosetaklelin tek başına ve değişik yoğunluklarda US varlığında hücre canlılığına etkisi.....	38
Şekil 3.4. HOPI boyamanın ardından tedavi gruplarının floresan mikroskop görüntüleri (10X25 büyütme).....	39
Şekil 3.5. Hücre lizatı konsantrasyon denemelerinin ardından elde edilen elektroforez görüntüsü.....	41

Şekil 3.6. Western blotlama sonucu elde edilen kaspaz-3 ve $\beta$ -aktine ait bantlar.....	42
Şekil 3.7. Kaspaz-3 ekspresyonunun $\beta$ -actin ekspresyonuna oranlanması.....	42

# 1. GİRİŞ

Kanser gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir (Jemal 2011). Cerrahi, kemoterapi ve radyasyon terapisini içeren geleneksel kanser tedavileri hala kanser tedavisinde en çok kullanılan yöntemler olmakla birlikte, bu geleneksel yöntemler, sistemik toksisite, düşük seçicilik, ilaç direnci ve uzun vadede potansiyel yan etkiler gibi kısıtları barındırmaktadır (Dy 2013) Bu nedenle yüksek seçicilik özelliğine sahip ve minimal invaziv kanser tedavi yöntemlerine şiddetle ihtiyaç duyulmaktadır.

Yirmi yıldan fazla bir süredir, minimal-invaziv bir tedavi yöntemi olan fotodinamik terapi (FDT), büyük oranda ilaç ve tıbbi kimya sektörünün ilgi alanındadır (Chen 2014). FDT düşük enerjili ışık ile toksik olmayan ışığa duyarlılaştırıcı ajan arasındaki sinerjistik etkiyi barındıran etkili ve özgül bir tedavi yöntemidir (Dolmans 2003). FDT'nin klinik uygulamalarında iki önemli kısıtlaması bulunmaktadır. Birincisi görünür ışığın derin dokuların içine kısıtlı oranda nüfuz edebilmesidir ki bu, FDT'nin sadece ışığın ulaşabileceği lezyonlarda kullanılabilmesine ve geniş tümörlerde daha az etkili olmasına neden olmaktadır. İkinci dezavantajı ise kutanöz dokularda fotosensitif ajanların uzun atılım sürelerine bağlı olarak uzayan deri toksisitesi durumudur. Bu nedenle fotosensitif ajan verilmesinin ardından fotosensitif ajanın türüne bağlı olarak bir kaç hafta hastanın doğrudan güneş ışığıyla temastan kaçınması gerekmektedir (Chen 2014). Yeni jenerasyon fotosensitif ajanlarda bu süre bir haftanın altına inmiştir.

1989 yılından bu yana sonodinamik terapi (SDT), FDT temelinde oluşturulan ve geliştirilmekte olan, yeni ve ümit vadeden bir yaklaşımdır (Yumita 1989, Umemura 1990). FDT ile benzer olarak sonodinamik terapi düşük yoğunluklu ultrases ve sonikasyonla aktive edilebilen bir kimyasalın (sonosensitizör veya kematerapötik bir ilaç) kullanımını içeren ultrases temelli bir tedavi yaklaşımıdır (Rosenthal 2004).

Ultrases, görünür ışığın aksine derin dokularda bulunan hedef kanserli alana nüfuz edebilmektedir. Dolayısıyla sonodinamik terapi FDT'nin en önemli kısıtlamasını aşmış olmaktadır. Buna ek olarak ultrases spesifik bir tümör bölgesine tam olarak odaklanabilmekte ve tümör dokusunu çevreleyen sonosensitizörü aktif hale getirebilmekte

veya sitotoksitesini arttırabilmektedir. Sonodinamik terapi kanser hücrelerine bitişik sağlıklı dokuya zarar vermeden nekroz ve apoptoz oluşturabilmektedir (Chen 2014).

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları güçlü yan etkilere sahiptirler. Kemoterapi ilaçlarıyla ultrasesin bir arada kullanımı antikanser kimyasalların sitotoksik etkilerini arttırabilmektedir (Tachibana 2008). Yani ultrases ile sinerjistik etkileşime sahip kemoterapi ilaçları mevcuttur (Rosenthal 2004).

Sonosensitizörlerin büyük kısmını porfirin ve türevleri oluşturmaktadır (Miyoshi 2003), bundan başka, kemoterapötik ilaçlar ve nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, (tenoxicam<sup>TM</sup>, piroxicam<sup>TM</sup>) ultrases ile uyarılabilmektedirler (Yu 2004, Yumita 2002).

Güncel çalışmalarda ikinci nesil sonosensitizör olarak ftalosiyanınler sonodinamik tedavide kullanılmak üzere test edilmektedirler. Yumita ve Umemura (2004) kloralüminyum ftalosiyanın tetrasülfonatın antitümör etkisini farelerde deri altında oluşturdukları kolon 26 karsinomada göstermişlerdir.

Bu çalışmada Ehrlich Asit Tümör hücrelerinde

1. Kemoterapötik bir ajan olan Dosetaksel<sup>TM</sup> ile sonosensitif bir ajan olan kloralüminyum ftalosiyanın'in ultrases uygulanmasıyla tümör hücreleri üzerindeki etkinliklerinin *in vitro* olarak incelenmesi
2. Dosetaksel<sup>TM</sup>'in ultrases ile sinerjistik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## **1.1. Kanser**

### **1.1.1. Kanser oluşumu**

Kanser dünyada en önemli insan sağlığı problemlerinden birisidir. Yapılan araştırmalarla kanserin ortaya çıkışı ve gelişim mekanizmasına dair önemli bilgiler açığa çıkarılmış olmasına rağmen dünya sağlık örgütü, 2030 yılında dünya çapında 12 milyon kişinin kanser nedeni ile hayatını kaybedeceğini bildirmektedir. Kanser nedeni ölümlerin başında akciğer, mide, kolorektal, karaciğer ve meme kanseri gelmektedir ve bu ölümlerin %70'inden fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde gerçekleşmektedir.

Kanseri hücrelerimizin çoğalmasını (proliferasyonunu), farklılaşmasını (differansiyasyonunu) ve oluşumunu kontrol eden genlerin hastalığı olarak tanımlamak mümkündür. Kompleks bir hastalık olan kanser hem çevresel hem de kalıtsal faktörlerden kaynaklanmaktadır (Lichtenstein 2000). Başka bir deyişle kanser çok basamaklı ve çok

etkenli bir hastalıktır. Günümüzde elimizde olan verilere göre, kanser gelişiminin çok kompleks bir süreci olduğu açıktır. Diyet, çevresel faktörler, kalıtılan mutasyonlar ve somatik mutasyonlar gibi faktörler kanserin açığa çıkma nedenleri arasında yer almaktadır.

Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesi genomun hasara uğramasına neden olan birçok mutasyonu gerektirmektedir. Genomdaki bu hasar, DNA replikasyonunda meydana gelen hataların sonucu olabileceği gibi, metabolizma sırasında meydana gelen serbest radikallerin DNA bazlarına etki etmesi gibi nedenlerden de kaynaklanabilmektedir. DNA hasarı, iyonize radyasyon, ultraviyole radyasyon ve kimyasal karsinojen gibi ajanların etkileşimi ile de gerçekleşebilmektedir (Bertram 2001). DNA'nın birçok hasarı tamir etme mekanizması vardır. Ancak DNA tamir mekanizmasının işlevsiz veya yetersiz kaldığı durumlarda onarılamayan bu hasarlar, DNA dizisindeki kalıcı değişiklikleri meydana getirmektedir.

Hanahan ve Weinberg kanser hücrelerini karakterize eden altı özelliği, büyüme sinyallerinde kendi kendine yetebilme, büyümeyi durdurabilecek sinyallere duyarsızlık, programlanmış hücre ölümünden (apoptozis) kaçabilme, sınırsız bölünme, çoğalma potansiyeline sahip olma, anjiogenezi sürekli destekleyebilme, doku invazyonu ve metastaz yapabilme olarak tanımlamışlardır (Oláh 2005).

Normal hücresel işleyişte hücrenin yaşam süresi dolduğunda veya onarılamayacak düzeyde bir DNA hasarı meydana geldiğinde hücre programlı bir şekilde ölmesi apoptozis olarak adlandırılır. Bu mekanizmanın herhangi bir nedenle bozulması sonucu başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Martinez 2003).

### **1.1.2. Kanserinin nedenleri**

Kanser %90-95 oranda çevresel faktörlere ve %5-10 oranında kalıtsal faktörlere bağlanan bir hastalıktır. Kanserle ilişkilendirilen yaygın çevresel nedenler tütün kullanımı (%25-30), diyet ve obezite (%30-35), enfeksiyonlar (%15-20), radyasyon (hem iyonize hem de iyonize olmayan radyasyon, %10'dan fazla), stres, fiziksel aktivite eksikliği ve çevre kirliliğini içerir (Anand 2008).

**Kimyasallar-** Polisiklik aromatik karbonlar, asbest, silika, alkol gibi kimyasallar çeşitli kanser türleriyle ilişkilendirilmişlerdir. Özellikle tütün kullanımı birçok kanser türüyle ilişkilendirilmiş olup, akciğer kanserinin ana nedenini teşkil etmektedir (Sasco,

2004). Tütün dumanı nitrozaminler ve polisiklik aromatik karbonlarında bulunduğu yaklaşık olarak 50 karsinojen içermektedir (Kuper 2002).

**Diyet ve egzersiz-** Diyet, fiziksel aktivite ve obezite yaklaşık %30-35 oranında kanserle ilişkilendirilmiştir (Anand 2008). Özellikle mide kanseri, kolon kanseri gibi sindirim sistemini etkileyen kanserler beslenme alışkanlıklarıyla ilişkilendirilmektedir (Kushi 2006).

**Enfeksiyon-** Dünya genelinde kanserden ölümlerin yaklaşık %18'i enfeksiyöz hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Kansere neden olan enfeksiyöz ajanların başında virüsler gelse de bakteriler ve parazitler de etkili olabilmektedirler. Kansere neden olabilen virüsler (onkovirüsler) arasında HPV, serviks kanserine, Epstein-Barr virüsü, B-hücreli lenfoproliferatif hastalık ve nasofaringeal karsinomaya, Herpes virüsü, Kaposi sarkomuna, Hepatit B ve Hepatit C virüsleri, hepatoselüler karsinoma neden olan virüsler olarak sayılabilir. Ayrıca bir bakteri olan *Helicobacter pylori*'nin mide kanserine neden olduğu bilinmektedir. *Schistosoma haematobium* (squamos hücreli mesane karsinomu), *Opisthorchis viverrini* ve *Clonorchis sinensis* (kolanjiokarsinoma) kanserle ilişkili bilinen parazitler arasında sayılmaktadır (Samaras 2010).

**Radyasyon-** Hem iyonize hem de non iyonize radyasyona maruziyet invaziv kanser nedenlerinin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Anand, 2008). Özellikle iyonize radyasyonun DNA kırıklarına neden olabilen güçlü bir mutajen olduğu ve lösemi, retinablastom, bazal hücreli karsinoma ve melanom gibi kanserlerle neden olabildiği bildirilmektedir. Cep telefonlarının yaydığı iyonlaştırıcı olmayan radyasyonun akustik nöroblastoma riskini arttırdığı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 2011 yılında duyurulmuştur.

**Kalıtım-** Kanserlerin büyük çoğunluğunu kalıtsal olmayan (sporadik) kanserler oluşturmaktadır. Populasyonun %0.3'ünden azı kanser oluşumuyla güçlü ilişkisi bulunan genetik mutasyonların taşıyıcısıdır ve bu bütün kanser nedenleri arasında genetik faktörler %3-10'luk bir yer tutmaktadır. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki kalıtılan belirli mutasyonların taşıyıcılığı meme ve over kanserine neden olmaktadır. Kalıtımın önemli rol üstlendiği bir diğer kanser türü ise kalıtsal nonpoliposis kolorektal kanserdir (Roukos 2009).

**Fiziksel etkenler-** Fiziksel olarak tahriş edici maddeler de kansere neden olmaktadır. Dokuda oluşan harabiyet hızlı bir mitoz faaliyetiyle tahrip olan hücrelerin

yerine yeni hücreler oluşturmaktadır. Mitoz ne kadar fazla ve hızlı olursa mutasyon riski o kadar artmaktadır (Gaeta 2000).

### 1.1.3. Kanser tedavi yöntemleri

Günümüzde, kanser tedavisinde en çok kullanılan geleneksel tedavi yöntemleri şunlardır.

- **Cerrahi:** Kanserli dokuyu ve çevresindeki invazyon riski taşıyan bir miktar sağlıklı dokuyu alıp çıkartmak. Bazı durumlarda kanserli dokuyu cerrahi müdahale ile çıkartmak imkânsız olabilir. Bu durumda radyoterapi veya kemoterapi uygulanır.)
- **Kemoterapi:** Kanser hücrelerini öldürme özelliğine sahip ilaçların kullanılmasıdır.
- **Radyoterapi:** Uygun dozda gama radyasyonu uygulayarak kanser hücrelerinin öldürülmesi işlemidir.
- **Alternatif tedaviler.**

**Fotodinamik Terapi (FDT)**

**Sonodinamik Tedavi (SDT)**

## 1.2. Ehrlich Asit Tümör

Kanser üzerine araştırmalar oldukça uzun bir süredir devam etmektedir. 14. yy'dan günümüze bu alanda çalışmalar devam yapılmaktadır. Bu süre zarfında çeşitli kimyasallarla model oluşturma denemeleri yapılmış fakat onkolojik olarak daha somut veriler elde etme ihtiyacı kendini göstermiştir. Bu nedenle kanser modelleri oluşturularak yapılan deneysel çalışmaların önemi artmaktadır. Kansere ilişkin çalışmalarda kullanılan spontan ve indüklenen tümör modelleri için fazla miktarda maddi kaynak, çok sayıda deney hayvanı ve bu uygulamalar için uzun zaman gerektiğinden araştırmacılar tarafından daha az tercih edilen yöntemlerdir. Ancak transplante edilebilir tümörler yukarıda bahsedilen dezavantajları barındırmadığından daha çok kullanılmaktadır. Özellikle 1950'li yıllardan bu yana transplante edilebilen tümörlerle oluşturulan modellerin araştırmacılar tarafından tercih edildiği görülmektedir (Zeybek 1996).

Deneysel hayvan tümörlerinden biri olan Ehrlich Asit Tümörü (EAT) ilk olarak dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkmış ve Ehrlich & Apolant (1905) tarafından tümör parçaları fareden fareye deri altına transplante edilerek deneysel

tümör haline getirilmiştir (Aktaş 1996). 1932 yılında Loewenthal ve Jahn bu tümörün farelerin peritonunda sıvı halde büyüyen formunu elde etmeyi başarmışlar ve peritonda kanser hücrelerinin yanı sıra asit sıvısı da oluştuğu için tümör Ehrlich Ascites Tümörü adını almıştır (Taşkın 2002).

Asit, gri-beyaz bazen hafif kanlı görünümde koyu bir sıvıdır ve 0.1 cc'de yaklaşık 10 milyon neoplastik hücre içerir (Aktaş 1996). EAT'nin sıvı formunun elde edilmesiyle birlikte, çalışmalarda yoğun bir şekilde sıvı tümör kullanılmıştır. Kullanımdaki yoğunluğun nedeni, sıvı formun serbest tümör hücrelerini içeren süspansiyon şeklinde olması ve bunun sonucunda istenilen sayıdaki hücrenin bir başka hayvana transplante edilebilmesidir. Dolayısıyla alışılmış basit sayma yöntemleriyle hem transplante edilen tümör hücre sayısının, hem de oluşan tümör büyüklüğünü kolay bir şekilde saptanabilmesi mümkün olmaktadır (Ekinci 2000).

Bu çalışmada kullanılan tümör modeli olan Ehrlich Asit Tümörü (Ehrlich Ascites Tumor, EAT) transplante edilebilir bir tümör modelidir ve farelere özgü olmasından (Zeybek 1996) dolayı EAT'nin çalışılması tümör değerlendirmesi ve izlenmesi açısından kolaylık sağlar. EAT'ın asit formu çok agresif bir tümördür.

Klinik durumlarda, asit oluşumu genellikle yumurtalık kanseri gibi ilerlemiş kanserli hastalarda sıklıkla gözlenir (Mycek 1998). Intraperitoneal dağılım gösteren asit birikimi bir kez oluştuğunda prognozun kötüleşmesine neden olur. Abdominal parasentez hastanın semptomlarını azaltmak için uygulanabilir. Fakat hastanın genel şartlarının zayıflığına bağlı olarak yeterli miktarda anti-tümör ilaç verilemediğinden tekrar asit birikimi çok hızlı gelişmektedir (Mycek 1998). Bu yüzden, asit taşıyan kanser hastalarının tedavisi için yeni, efektif uygulamaların geliştirilmesi son derece önemlidir.

### **1.3. Sonodinamik Terapi**

Sonodinamik terapi (SDT) kavramı, fotosensitif ajanların ışıkla etkileşmesi sonucu oksijen radikalleri (özellikle singlet oksijen) oluşturarak hücre ölümü ve/veya apoptozise götüren fotodinamik terapi (FDT) prensibi temel alınarak geliştirilmiştir. FDT'de uygulanan ışığın etkilerinin SDT'de ultrases dalgaları ile oluşturulması sağlanmaktadır. SDT ultrasesin non-termal etkilerinden, özellikle kavitasyon oluşumuyla ilişkilidir ve ultrasonik kavitasyon su moleküllerinin parçalanmasıyla serbest radikaller (H, OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, süperoksit) oluşumuna neden olmaktadır.



Ultras ses ile uyarılarak aktif hale getirilebilen ajanlara sonosensitif ajanlar adı verilmektedir. Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma, tek başına ultras ses ve tek başına sonosensitif ajanın tümör hücrelerinde sitotoksik etkisinin olmadığını veya çok az olduğunu belirtmiş fakat ultras ses ve sonosensitif ajanın birlikte kullanılmasının yani SDT'nin tümör hücrelerini etkili biçimde yok ettiğini göstermiştir (Tachibana 2008).

SDT'nin tümöre odaklanabilmesi ve derin dokulara da nüfuz edebilmesi hedefe yönelik terapi olanağını arttırmaktadır. Ayrıca ajanın dokuya özel antikorla birlikte verilmesi sayesinde de dokuya özgün hasar oluşturmak mümkün olabilmektedir. FDT'de fotonun hedef dokulara nüfuz etmesi için hedef dokuya yakın olması gerekmektedir. Bu kanserin konumu nedeniyle her zaman mümkün olmamaktadır. Bu nedenle ulaşılması zor olan biyolojik dokulara daha iyi nüfuz edecek alternatif yollar aranmıştır. Umemura ve arkadaşları tümör tedavisinde sonosensitif bir ajan ile ultras sesin sinerjik etkisinden ilk olarak bahsetmişler ve bu alternatif tedavi yöntemine “Sonodinamik Terapi” ismini vermişlerdir (Yumita 1990, Umemura 1999).

Fotodinamik terapi benzer özellikler gösteren SDT'nin en önemli üstünlüğü biyolojik dokulara fotondan daha iyi nüfuz eden ultras sesin kullanılmasıdır. Bu durum, SDT'nin hedefe yönelik tedaviler için daha uygun olduğunu göstermektedir. SDT'nin birincil etkisi ultrasonik kaviteasyon oluşturmaktır. Kaviteasyon olgusu, ultras ses ile ışınlanmış bir ortamda baloncukların üretilmesi, genişletilmesi ve çökmesi ile karakterize edilir.

Sonolüminesans, yerel şok dalgaları ile oluşturulan kabarcık çökmeleri serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Sıvı ortamda bazı mikro kabarcıklar ultrasonik ışın altında büyür ve daralır. Suyun ultras ses dalgalarıyla ışınması sonucu hidrojen peroksit oluşabilir. Bazı ilaçların ultras ses ışın etkisiyle birlikte aktif süperoksit radikalleri ve singlet oksijen gibi oksijen türlerinin oluştuğu ve oluşan bu türlerin kanserli dokulara hasar verdiği belirlenmiştir (Miyoshi 1997). Çalışmalar hematoporfirinin sonolüminesans ile foto-uyarılması sonucu sitotoksik singlet oksijenin oluştuğu ileri sürülmektedir (Yumita 1990, 1996, Umemura 1996, Umemura 1999, Liu 2008). Yumita ve arkadaşları sonodinamik etki için ultras sese maruz bırakılmış ortamda oksijenin bulunmasının önemli olduğunu ifade etmişlerdir. SDT kaynaklı hücre ölümü, döteryumun (D<sub>2</sub>O) varlığından iki kat fazla etkili olduğu belirtilmiştir. Oksijen-döteryum bağları su içindeki oksijen-hidrojen bağlarından daha kırılgandır. Bu durum ortamdaki oksijenin serbest kalmasını böylece uyarılmış ajan ile reaksiyona girmesini kolaylaştırmaktadır (Yumita 1990).

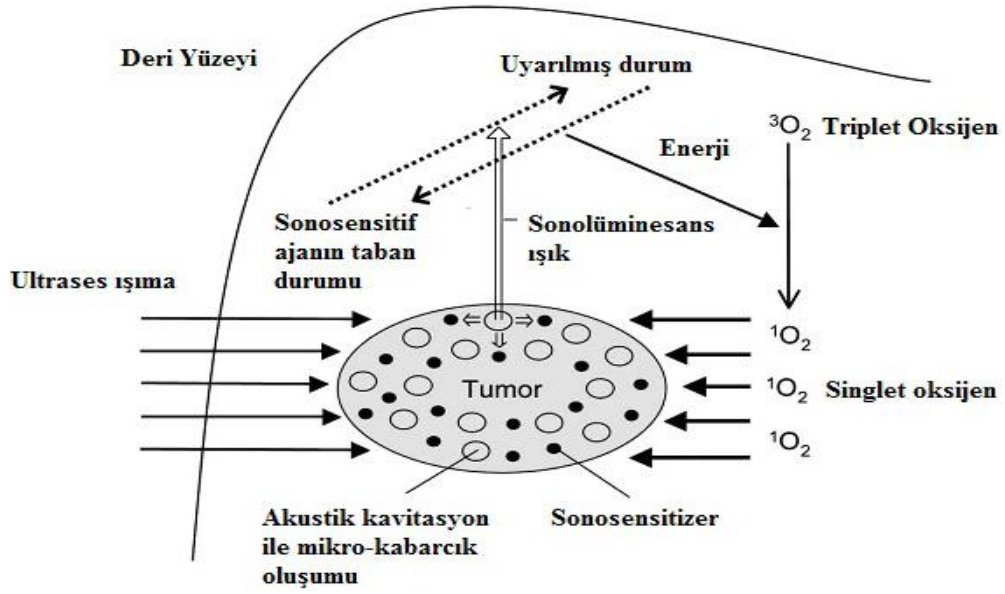
Yapılan çalışmalar ile ultrasonik kavitasyon etkisinin meydana getirdiği enerji ile porfirin gibi bazı fotosensitif ajanların aktive edildiği ve bu aktivasyon sonucunda önemli hücre hasarlarının gözlemlendiği gösterilmiştir (Tachibana 1993, Yumita 1989, Tata 1996, Umemura 1997). Bu uyarılma sonucu, hematoporfirin türevlerinin pirolizi veya çöken kabarcıkların çevresindeki hidrojen atomları ve OH radikalleriyle reaksiyonu sonucu gerçekleşmekte ve sitotoksik serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır.

Buna ek olarak, Nomura ve arkadaşları porfirinin ultrases ile uyarılmasıyla ortamda  $\text{NO}_3^-$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonlarının arttığını belirtmişlerdir (Kojimura 1997). Bu nedenle, fotosensitif bir ajan, ultrases ile kombine edildiğinde sonosensitif ajan olarak etki etmektedir ve bu etkinin uygulanabilirliği oldukça yüksektir. Bu sonosensitif ajanlar, tümör dokusu etrafında seçici olarak biriktirilebilir ve ultrasese maruziyet ile aktifleştirilebilirler. Kullanılan ajanların tek başına anti tümör aktivitesi olmamasına rağmen, ultrases ışına ile bu aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Tachibana sonosensitif ajanların tümör tedavisinde yan etkilerinin olmadığını ileri sürmüştür (Tachibana 2008).

SDT'in temel çalışma alanları, kemoterapinin geliştirilmesi, gen terapisi ve apoptoz terapilerdir (Yu 2004). Ultrases ışımının uygulanan enerjisi, dokulara daha az zarar vermesi ve biyolojik dokulara daha fazla nüfuz etmesi sebebiyle radyoterapi ve ışık (lazer ışını) kullanılan tedavilere göre daha üstün olduğu belirtilmektedir (Tachibana 2008).

### **1.3.1. Sonodinamik terapide kullanılan sensitizörler ve hücre hasarı**

SDT'nin sitotoksikite mekanizması teorik olarak FDT ile benzerdir. Sonosensitif ajanın ultrases ile uyarılmasıyla elde edilen akustik kavitasyon aktif oksijen üretimini sağlar (Didenko 1999, Rosenthal 2004). Sonokimyasal reaksiyonlar ile elde edilen ultrases ışına tümör hücresi etrafında kavitasyon oluşumunu uyarmaktadır. Tümör hücresinin yüzeyine tutunan sonosensitif ajan uyarıldığında, temel seviyeden uyarılmış seviyeye geçmektedir ve aktifleşmiş ajanın temel seviyeye geri dönerken enerji salarak hücrel toksisiteye sebep olan singlet oksijen, serbest radikaller gibi reaktif oksijen türleri oluştururlar .



Şekil1.1. SDT’de olası hücre hasarı mekanizması. Sonolüminesans ışık ile oluşturulan ultras ses ışması tümör hücreleri etrafında kavitasyona neden olur. Tümör hücresine tutunan ajan ışık ile uyarılır ve temel durumundan uyarılmış duruma geçer. Takiben temel duruma geçen ajan bu geçiş sırasında enerji yayarak reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur (Kuroki 2007).

Birinci nesil fotosensitizörler olarak geliştirilen porfirinler fotodinamik terapide geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Bu nedenle son yirmi yıldır sonosensitizör olarak hematoporfirin (Hp), Photofrin®, hematoporfirin monometil eter (HMME), protoporfirin IX (Pp IX), ATX-70 ve pek çok yeni porfirin türevi geliştirilmesi şartı olamamaktadır (Chen 2014).

HMME iki monomer porfirinden oluşan, hematoporfirinle ilişkili bir sensitif ajandır. HMME tümör dokusuna yüksek seçicilikte lokalize olması dokulardan çabuk uzaklaşması ve düşük toksisite gibi birkaç harika özelliğe sahiptir. İlk çalışmalar HMME'nin C6 glioma hücreleri üzerinde sonodinamik antitümör etkisi olduğunu göstermiştir (Li 2008, Li 2011). HMME aracılı SDT ile oluşan reaktif oksijen türleri oluşumu *in vitro* apoptoz ve nekroz ile sonuçlanmıştır (Li 2008). CNE-2 hücreleri üzerinde HMME'nin düşük konsantrasyonlarının apoptozu, yüksek dozlarının ise nekrozu indüklediği bildirilmiştir (Jin 2011). Daha sonraki çalışmalarda, HMME kullanılan SDT uygulamalarında mitokondriyal sinyal yolağının göstergesi olan Bax, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonları artarken, Bcl-2 ve Fas-L ekspresyonlarının azaldığını saptanmıştır (Dai 2009). Ayrıca osteosarkoma üzerinde *in vivo* ve *in vitro* yapılan güncel çalışmalar HMME

ve ultrases uygulamasının insanlarda kanser tedavisi için umut vadeden bir tedavi yöntemi olabileceğini göstermektedir (Tian 2009; Su 2013). Güncel çalışmalarda, HMME kullanılan sonodinamik tedavi uygulamalarının adriamycin ile kombine edildiğinde sinerjistik antitümör etkilerinin önemli oranda arttığı bildirilmektedir (Liang 2013).

PPIX hızlı çoğalan tümör hücrelerinde birikebilmektedir ve ultrases ile uyarıldığı zaman tümör hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır. *In vitro* çalışmalar PpIX'un etkili bir sonosensitif ajan olarak sonodinamik tümör tedavisinde büyük bir potansiyeli olduğunu işaret etmektedir (Chen 2014).

Hepatoma-22 hücrelerinde PpIX ve SDT'nin antitümör etkisi incelendiğinde PpIX'un tümörlü dokularda seçici olarak biriktiği ve SDT etkisiyle lipid peroksidasyon düzeyini arttırarak ve anti-oksidatif enzimlerin aktivitesini azaltarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu engellediği belirtilmiştir (Wang 2011). Sarkoma 180 hücrelerinde SF1 ajanı ile SDT'nin etkisinin incelendiği *in vivo* bir çalışmada ultrases ve ilacın birlikte kullanıldığı grupta tümör inhibisyonunun belirgin olarak arttığı belirtilmiştir (Wang 2009).

PpIX ve Hp'in sonodinamik antitümör etkinliklerinin karşılaştırıldığında, ultrases uyarısı altında PpIX'un sitotoksik etkisinin Hp'e oranla daha büyük olduğu bildirilmektedir (Liu 2007, Wang 2010, Zhu 2010). PpIX kullanılan SDT'in Sarkoma 180 hücreleri üzerinde hücre zarı hasarı, mitokondri şişmesi ve DNA fragmentasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Liu 2007). S180 üzerinde sonraki bir çalışmada ise PpIX'un antitümör etkisini Fas-etkileşimli sinyal yolağı boyunca apoptozu tetikleyerek gösterebileceği bildirilmiştir (Wang 2008). Güncel çalışmalar ROS oluşumunun PpIX ve ultrasesin sitotoksik etkisinde önemli bir rol üstlediğini hepatoma-22 hücrelerinde (H-22) göstermektedir (Wang 2010). Muhtemel bir inhibisyon mekanizması da *in vivo* olarak gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre lipid peroksidasyon (LPO) seviyesindeki yükselme ve tümör dokusundaki antioksidan enzim aktivitelerindeki düşüş sonodinamik antitümör etkiler olarak sayılabilmektedir (Wang 2011).

Bir galyum-porfirin türevi olan ATX-70 üzerinde yapılan ilk *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bu ajanın birçok kanser türünde sonodinamik antitümör etkisinin olduğunu bildirmektedirler (Rosenthal 2004). ATX-70'in farmakokinetiği ve doku dağılımıyla ilgili olarak, vücuda ATX-70 verilmesinden 24 saat sonra ATX-70'in tümör dokusundaki konsantrasyonunun plazma, kan ve kasdakinden önemli oranda yüksek olduğunu göstermektedir (Yumita 2004). Ayrıca ATX-70'in ultrases uygulaması altında singlet

oksijen oluşumuna yol açtığı ve bunun HL-60 hücrelerinde apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (Yumita 2010).

İnsan akciğer adenokarsinoma SPAC-1 hücrelerinde klorin-e6 ve SDT uygulamasının *in vivo* incelendiğinde deney hayvanına klorin-e6 verilmesinin ardından tümör hücrelerindeki klorin-e6 konsantrasyonunun normal hücrelere kıyasla daha fazla olduğu belirtilmiştir ve hem ajanın hem de ultrasesin tek başına herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığını ancak ikisinin birlikte kullanıldığında ortaya çıkan etkinin tümör hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği belirtilmiştir (Chen 2013).

Kloroalüminyum fitalosiyenin disülfonat ajanının sonodinamik ve fotodinamik tedaviler için uygun bir ajan olduğu belirtilmiştir (Kolarova 2009). Tomankova ve ark. (2009) G361 melanoma hücrelerinde uygulanan SDT ve FDT'ye bağlı olarak ROS oluşumunu gözlemlediklerini, bu tedaviler için en uygun dozların ise SDT için (BTL-4000) 2 W/cm<sup>2</sup> ve 1MHz, FDT için 15 J/cm<sup>2</sup>, ajanın da en uygun konsantrasyonunun 100 µM olduğunu bildirmişlerdir (Tomankova 2009).

Xiang ve ark. (2011) metilen mavisinin sonosensitif ajan olarak kullanıldığı SDT uygulamasında, SDT'in over kanseri HO-8910 hücreleri üzerinde ROS artışına bağlı olarak hücrelerin apoptozuna neden olduğunu bildirmiştir.

Suzuki ve ark. (2007) akridin sarısı ile SDT'nin sinerjik etkisinin sarkoma 180 hücrelerinde etkisini incelemişlerdir ve 1.0 µg/ml akridin sarısı ile 2.0 W/cm<sup>2</sup> ultrases uygulaması sonrası hücrelerin sağ kalım oranını %35 olarak belirtmişler, sağ kalan hücrelerin üçte birinin apoptoz geliştirdiğini bildirmişler ve sonuç olarak bu terapinin tümör hücrelerinde hem apoptoza hem de nekroza neden olduğunu ifade etmişlerdir.

Ultrases ve çinko fitalosiyenin birlikte kullanımının eritrositlerde hemolize yol açtığı ve lipid peroksidasyon ürünleri ile ozmotik frajiliteyi arttırdığı gösterilmiştir (Milowska, 2008). Fitalosiyenin alüminyum ve çinko gibi farklı metallerle şelat oluşturabilmektedirler fakat bu diyamanyetik metaller fitalosiyenin tümör hücreleri üzerinde fototoksisitelerini arttırmaktadır. Fitalosiyenin bir halkası ile sülfonat grupların yer değiştirmesi bu grupları suda çözünür hale getirmekte ve fitalosiyenin hücreye girişini arttırmaktadır (Liu 2004).

Alüminyum fitalosiyenin tetrasülfonatın (AlPcS<sub>4</sub>) ultrases ile uyarılmasına bağlı olarak gerçekleştirilen sonodinamik tedavide subkutan olarak implante edilmiş kolon karsinoma hücrelerindeki etkisi incelendiğinde AlPcS<sub>4</sub>'ün ilk jenerasyon FDT ilacı olan

Photofrin™'ye göre insan vücudundan daha hızlı sürede atıldığını gösterilmiştir. Bu durum fitalosiyanın kullanımının diğer ajanlardan daha avantajlı olduğunun bir göstergesidir (Yumita 2004a). Ayrıca başka bir çalışmada ise fitalosiyanın ile ultrasesin sinerjik etkisinin tümör boyutunu azaltıcı olduğu ve tümör hücrelerini yok ettiği belirtilmiştir (Yumita 2004b).

Ultrases ile uyarılan ftalosiyanın eritrositlerin morfolojik olarak değişiklik göstermesine ve membran yüzey akıcılığını arttırarak hücrelerin hemolizine yol açmaktadır (Milowska 2008). Ftalosiyanın ile ultrasesin birlikte kullanımı eritrositlerin hemolizin ve lipid peroksidasyon ürünlerinin artışına neden olurken, eritrosit çekirdeğinin ozmotik direncini azaltmaktadır. Buna karşın, ftalosiyanın ve ultrasesin sinerjik etkisinin DNA hasarına neden olmadığı bildirilmiştir (Milowska 2007).

Dubuc ve ark. mono- karboheksil eklenmiş ALPcS<sub>4</sub>, serbest (konjuge olmamış) ALPcS<sub>4</sub> ve bombesin & gastrin salıcı peptit reseptörünün konjugasyonuna bağlı ALPcS<sub>4</sub> moleküllerinin PC-3 prostat kanseri hücre dizisinde fotodinamik etkilerini incelemişler ve sonuçta bombesin ile konjuge olmuş ALPcS<sub>4</sub> moleküllerinin daha etkili olduklarını belirtmişlerdir (Dubuc 2008).

### **1.3.2. Ultrasesle kemoterapi etkinliğinin arttırılması**

Sağlıklı dokulara olumsuz etkileri olsa da, kemoterapi kanser terapisinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Kemoterapi çalışmalarında malign hücreleri yıkıma götürmenin yanında oluşacak yan etkilerin de azaltılmasına odaklanılmaktadır. Hastalarda ilaca karşı direnç gelişmesi de tedavinin başarısızlığa uğramasına neden olabilmektedir.

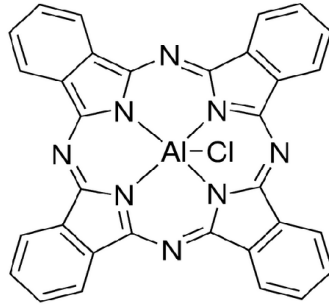
Ultrases uygulaması, antikanser ilaçların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini arttırmaktır. Aynı konsantrasyon sitotoksik ilacın ultrasesle birlikte kullanımı tek başına kullanımından daha fazla hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. Bu da daha düşük doz ilaçla terapötik etkinliğin sürdürülmesini veya hatta geliştirilmesini mümkün kılmaktadır (Yu 2004). Sonuçta bu yaklaşımla hastalarda kemoterapinin yan etkilerinin azaltılması gerçekleştirilebilir.

Araştırmalar ultrases uygulamasının adriamisin, diaziquone, 5-florourasil (5-FU), arabinosil sitosin (Ara C), dihidroksi boron (oksibi-guanido) ve bleomisin gibi ilaçlarla sinerjik etkisinin olabileceğini göstermişlerdir (Tachibana 2000, Rosenthal 2004). Ultrases kullanımı ile antikanser ilaçların etkilerini arttırmadaki temel etkenin kavitasyon olduğu

düşünülmektedir. Akustik kaviteyle meydana gelen serbest radikaller hücre membranına zarar verebilmekte ve membran geçirgenliğini arttırabildiği öne sürülmüştür (Yu 2004).

### **Kloralüminyum ftalosiyanın (Alüminyum ftalosiyanın klorid)**

Ftalosiyanınlar simetrik aromatik makrohalkalar içerir ve porfirinlerle yakında ilişkilidirler. Tıpkı porfirinler gibi ftalosiyanın makrohalkasında merkezi boşluğunda farklı metal iyonları (çinko, alüminyum gibi) taşıyabilir. Ftalosiyanınların fizyokimyasal özellikleri merkezine bağlanan metal iyonlarının türüne ve eklenen diferansiyel periferel gruplara bağlıdır (Milowska 2008). Merkezinde paramanyetik metaller içeren sensitif ajanlar zayıf aktivite gösterirlerken, diyamanyetik metaller bağlananlar (çinko, alüminyum gibi) yüksek fotobiyolojik aktivite göstermektedirler. Bu tür diyamanyetik metallerle şelatlanarak daha geniş triplet seviye ömrüne sahip ftalosiyanınlar oluşturulmaktadır (Ball 1998). Eklenen gruplar aynı zamanda ftalosiyanınların aktivitelerini de belirler çünkü çözülebilirliklerini de etkilemektedirler (Milowska 2008). Kloralüminyum ftalosiyanının kimyasal yapısı Şekil 1.2'de görülmektedir.



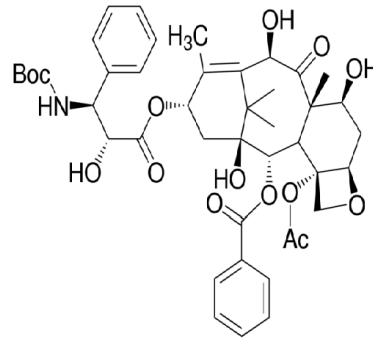
Şekil 1.2. Alüminyum ftalosiyanın kloridin kimyasal yapısı (www.sigmaaldrich.com)

Ftalosiyanınların hücre içerisindeki lokalizasyonları polarite ve çözülebilirliklerine bağlıdır. Daha polar ftalosiyanınlar stoplazma yerleşimlidirler ve daha az oranda hücre membranında bulunmaktadırlar (Nunes 2004). Ftalosiyanınların seçici olarak tümör dokusunda lokalize olduğu bildirilmiş ve fotodinamik özellikleri açısından tıbbi uygulamalar için aday bir ajan olarak gösterilmesine rağmen (Pogue 2001, Wiktorowicz 2004) ftalosiyanınların ultrasesle sinerjistik etkisi üzerine daha az çalışılmıştır (Milowska 2008). Yumita ve Umemura (2004) ftalosiyanının ultrases ile sinerjistik etkisini fark etmişlerdir. Çalışmalarında kloralüminyum ftalosiyanın tetrasülfonatın farelerde in vivo aktivasyonunu değerlendirmişlerdir. Tümör boyutundaki küçülme değerlendirildiğinde,

sonuçlar kloralüminyum ftalosüyanin tetrasülfonatin kaydadeğer bir antitümör etkisi olduğunu göstermektedir (Yumita 2004a). Ayrıca ftalosüyaninler ile ultrasesin sinerjik etkisinin tümör boyutunu azaltıcı etkisi olduğu ve tümör hücrelerini yok ettiği belirtilmiştir (Yumita 2004b).

## Dosetaksel

Taksoid ailesi taksan gövdesine sahip doğal ve sentetik bileşikleri içermektedir. Taksoid adlandırması bu ilaçların sahip olduğu taksan iskeletini ifade eder. Dosetakselin kimyasal yapısı Şekil 1.3'de görölmektedir. Paklitaksel 1992'de kanser tedavisinde kullanılır hale gelmiştir (Cortez 1995). Dosetaksel kemoterapötik bir ilaç olan paklitakselin geliştirilmesiyle elde edilmiş bir ilaçtır. Özellikle hormon tedavisine yanıt vermeyen agresif tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Dosetakselin kimyasal yapısı Şekil 1.3'de görölmektedir.



Şekil 1.3. Dosetakselin kimyasal yapısı (www.sigmaaldrich.com)

Dosetakselin hücredeki mikrotubullere etkiyerek anti-mitotik etki gösterdiği ve dosetakselin proapoptotik genlerin ekspresyonunu arttırarak hücreyi apoptoza götürdüğü bildirilmiştir (Hernandez-Vargas 2007).

## 1.4. Ultrases

### 1.4.1. Fiziksel özellikleri

Ses moleküllerin hızlı hareketidir. Bu moleküler titreşimler enerjiyi bir vericiden, ses tellerimiz gibi bir ses kaynağından, kulaklarımız gibi bir alıcıya transfer ederler. Ses enerjiyi bir bölgeden diğerine taşırken basınç dalgaları halinde yol alır. Moleküller birbirine yaklaştığında buna sıkışma denir ve ayrıldıklarında buna seyrelme denir. Bu



mekanik hareket, hızlı ileri ve geri hareket, sesin mekanik olarak yayılan bir dalga olarak adlandırılmasının nedenidir (O'brien 2007).

İnsanlar 16 Hz ile 20 kHz arası frekansa sahip sesleri işitebilmektedir. Frekansı 20 kHz üzerinde olan ses dalgaları ultrases olarak değerlendirilmektedir (Yu 2004).

Ses dört kategoride sınıflandırılabilir:

- Infrases (Infrasound): Frekansı 0-20 Hz arasındadır.
- Duyulabilir Ses (Audible Sound): Frekansı 20-20.000 Hz arasındadır.
- Ultrases (Ultrasound): Frekansı 20.000 Hz ile 1 GHz arasındadır.
- Hiperses: Frekansı 1 GHz'den yukarı olan sestir.

Ultrases dalgalarının elde edilmesinde temel ilke, piezoelektrik olayıdır. Piezoelektrik kavramı, elektrik enerjisi uygulandığında atomlarının genişleyip sıkışmasını tanımlar. Bu özelliğe sahip kristallere elektrik enerjisi uygulanarak kristalin atomlarının genişleyip sıkışması sağlanır ve sonuçta oluşan mekanik enerji de ultrases dalgalarını oluşturur. Piezoelektrik özelliğine sahip en önemli kristal "Quartz"dır. Ancak ultrases üreten cihazlarda artık daha çok sentetik kristaller ( Barium titanat, zikronat titanat ve lityum sülfat gibi ) kullanılmaktadır.

#### **1.4.2. Ultrasesin tıpta kullanımı**

Ultrases tıpta temel olarak tanı ve terapi amaçlı olarak kullanılmakta ve pek çok uygulaması bulunmaktadır. Tablo 1.1'de farklı alanlarda kullanılan ultrasesin frekans aralıları verilmektedir.

Tablo 1.1. Frekans aralıklarına göre ultrasesin genel sınıflandırılması

<b>Kullanım</b>	<b>Frekans Aralığı</b>
Duyulabilir ses	16 Hz-20 kHz
Düşük frekanslı ultrases	20 kHz-100 kHz
Fizyoterapi/SDT	1 MHz-3 MHz
Tanısal ultrases	3 MHz-10 MHz

**Tanısal:** Ultrases diğer tanı sistemlerine göre yumuşak dokuları da görüntüleyebilmesi ve bilinen iyonlaştırıcı etkisinin olmayışı nedeniyle tanı amaçlı kullanımda çok tercih edilmektedir. Son yıllarda bilgisayar teknolojisinin katkısı ile gelişen modlar yardımıyla görüntüleme aygıtı olarak kullanılmaktadır. Klinikte ultrases hem tek başına, hem de çeşitli kontrast maddelerle birlikte tanısal amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (Miller 2007).

**Terapötik:** Ultrasesin klinikte tedavi amaçlı pek çok kullanımı bulunmaktadır. Ultrases, fizyoterapi uygulamalarında, cerrahide, diş hekimliğinde, gözde katarakt tedavisinde, litotripsi, ve tümör hücrelerinin yok edilmesinde (sonodinamik tedavi ve HIFU) vb için kullanılmaktadır.

### 1.4.3. Biyolojik etkileri

Terapötik ultrasonun biyolojik dokular üzerine etkisi genel olarak termal ve nontermal etkiler olarak ayrılmaktadır (Baker 2001). Sonodinamik tedavi üzerine olan araştırmalar ultrasesin nontermal etkilerini araştırmaya odaklanmıştır.

#### 1.4.3.1. Ultrasesin termal etkileri

Hedef doku içinde yayılan ultrases dalgasının taşıdığı enerji, dokuda sıcaklık artımına neden olur. Ultrases uygulamaları sırasında oluşan sıcaklıktaki artışın miktarı, ultrasesin frekansına, şiddetine ve oluşum döngüsüne bağlıdır. Bunun yanında ultrasesin canlı dokularda ilerlemesi

esnasında oluşacak sıcaklık artışı miktarı dokunun damarlanmasına, türüne hedef dokunun önünde ve arkasında bulunan kuvvetli yansıtıcı dokuların varlığına da bağlı olmaktadır.

#### 1.4.3.2. Ultrasesin nontermal etkileri

Sonodinamik terapinin kesin mekanizması sonosensitif ajanın tipine frekans ve yoğunluk gibi ultrases uygulama parametrelerine bağlıdır (Tachibana 2008). Her ne kadar kesin bir mekanizma bulunmasa da ultrasesin nontermal etkileri içinde i) ultrasonik kavitasyon, ii) serbest radikaller, iii) singlet oksijen, iv) ultrasona bağlı apoptoz ve v) birden fazla mekanizmanın birleşiminin etkin olduğu durumlardan bahsedilebilmektedir.

Nontermal ultrases etkide akustik enerji hücre yüzeyine kavitasyondan kaynaklanan basınçla iletilir (Mo 2012, Baker 2001). Kavitasyon ultrasesin doku sıvısında ilerlemesi sırasında meydana gelen basınç değişimlerinden kaynaklanan mikroskobik baloncukları tarif etmektedir.

Kavitasyon eylemsiz ve eylemli olarak iki kategoride sınıflandırılabilir. Eylemsiz kavitasyon, mikro baloncukların doku sıvısında salınıp genişlediği ve şiddetle patladığı süreci tanımlar. Akustik yoğunluğun mikroskobik hava baloncuklarını hızlıca patlatmak için uygun olduğu durumlarda, patlayan hava baloncuklarının enerjisiyle sonosensitizörlerin aktive olduğu sonolimunesans olayı gerçekleşebilir (Rosenthal 2004). Eylemli kavitasyon ise küçük hava baloncuklarının akustik bir dalga içinde belli bir biçim ve ebatla salındığı ve akustik dalga uygun olmadığında bu baloncukların patladığı durumdur (Yu 2004, Rosenthal 2004).

Eylemli ve eylemsiz kavitasyonların her ikisi de mekanik etkiler oluştursa da sonokimyasal türlerin oluşmasına neden olan eylemsiz kavitasyondur. İki ana sonokimyasal tür bulunmaktadır:

**i) Serbest radikaller-** ultrasonik kavitasyon patlayan mikrobaloncukların içinde bulunan veya etrafını saran sonosensitizörleri uyarmaktadır. Sonosensitif ajanın kimyasal olarak aktive olmasıyla elde edilen serbest radikaller direk termolizi ile veya suyun termolizi ile oluşan  $H^+$  ve  $OH^-$  türleriyle reaksiyon sonucu oluşmaktadırlar. Bunun ardından sonosensitizör ve ultrases tarafından oluşturulan serbest radikaller hava baloncuğun içindeki oksijenle reaksiyona girerek peroksil ve alkoksil radikallerini oluşturmaktadırlar. Bu radikaller lipid peroksidasyon (LPO) ve tümör hücre hasarına neden olan zincirleme reaksiyonları tetiklemektedirler (Rosenthal 2004).

**ii) Singlet oksijen ( $^1O_2$ )** - Sonosensitif ajanlar akustik enerjiyle uyarılmaktadırlar.. Aktive olmuş sonosensitizör temel enerji seviyesine dönerken enerjiyi salmaktadır. Eğer oksijen molekülleri salınan enerjiyi edinirlerse temel triplet seviyeden uyarılmış singlet seviyeye geçmektedirler. Güçlü bir reaktif ajan olarak singlet oksijen hedef tümör doku hücrelerinde geri dönüşümsüz hasara neden olabilmektedir (Chen 2014).

Buna ek olarak yeterli reaktif oksijen türleri (ROS) oluştuğunda hücre iskeletinin büzülmesi, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmantasyonu ve sonuçta apoptoza neden olan biyolojik olayları içeren bir kaskad aktive edilmiş olmaktadır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

Çalışmamızda kullandığımız deney hayvanları, ilaçlar ve ultrases cihazı hakkında bilgiler aşağıda verilmiştir.

#### 2.1.1. Hayvanlar

Deneylede Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Laboratuvarında yetiştirilmiş 20 adet erkek Balb/c fare kullanılmıştır. Çalışma süresince fareler  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  çevre sıcaklığı, 12/12 saat aydınlık/karanlık döngüsünün sağlandığı, bağıl nem oranı (%40-50) ve havalandırması kontrol edilen semiklimatize bir odada barındırılmıştır. Fareler standart yem ile serbest beslenmiş ve suluktan serbestçe su içmeleri sağlanmıştır. Çalışma süresince farelerin tamamı Ehrlich Asit Tümör pasajı için kullanılmıştır. Tüm deneysel süreç Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Komitesi'nden alınan 64583101/2013/063 sayılı izin çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

Cerrahi işlemler öncesinde farelere anestezi ve analjezi için 50 mg/kg Ketamin ve 5mg/kg ksilazin intramuskular olarak uygulanmıştır. Tüm cerrahi işlemler aynı kişi tarafından ve standart teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cerrahi işlemler batın bölgesinde gerçekleşmiştir. İşlem sonunda fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edilmişlerdir.

#### 2.1.2. İlaçlar

Çalışmamızda kullanılmak üzere Kloralüminyum ftalosiyenin (aluminum phthalocyanine chloride, Sigma-Aldrich, 362530) ve dosetaksel (docetaxel™, Sigma-Aldrich, 01885) adlı kimyasallar Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 D-89555 STEINHEIM ) firmasından satın alınmıştır.

### 2.1.3. Ultrases kaynağı ve teknik özellikleri

Ultrases uygulaması BTL 5710 (BTL Türkiye Medikal Cihazlar, Ankara, Türkiye) ultrases terapi cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. BTL 5710 ultrases terapi cihazı

BTL 5710 ultrases cihazının özellikleri aşağıda sıralanmıştır.

- BTL ultrases aplikatörleri 1 cm<sup>2</sup> ve 5 cm<sup>2</sup> ebatlarındadır.
- Problar su geçirmez özellikli olup görsel temas kontrolü sağlanabilmektedir.
- Her ultrason başlığı 1 MHz veya 3 MHz frekans iletir.
- Ultrases sürekli modda uygulanabildiği gibi 10 – 150 Hz aralığında ( 10 Hz'lik adımlarla ayarlanabilmektedir ) kesikli modda da uygulama yapılabilmektedir.
- En yüksek ultrases yoğunluğu sürekli modda 2 W/cm<sup>2</sup> iken, kesikli modda 3 W/cm<sup>2</sup> 'dir.
- Ultrasonik alan penetrasyonu 1 MHz 'de 82 mm'ye kadarken, 3 MHz 'de 27 mm'ye kadardır.
- Tedavi uygulamasına dair bütün ayarlamalar cihazın üzerindeki ekrandan yapılabilmekte ve kaydedilebilmektedir.
- Çalışmamızda 5 cm<sup>2</sup>'lik aplikatör seçilmiştir ve hücrelere 1 MHz frekansta, 1, 1.5 ve 2 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta sürekli ultrases uygulanmıştır.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Ehrlich Asit Tümör hücrelerinin elde edilmesi

Ehrlich Asit Tümör Hücreleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi Araştırma Merkezi Deney Hayvanları Laboratuvarından sağlanmıştır. Hücreler uygulama öncesi -20°C bekletilmiştir. Hücrelerin hayvanlara inokülasyonu öncesinde hücrelerin önce oda sıcaklığında çözümleri sağlanmış ve ardından 37 °C inkübatörde bekletilmişlerdir.

Tümör hücrelerini pasajlamak üzere 12 haftalık 35-40 gr ağırlığında fareler rastgele seçilmiştir. Her bir fareye 0.5 ml Ehrlich Asit Tümör hücre süspansiyonu intraperitoneal olarak enjekte edildimiştir. Hücrelerin inokülasyonundan 4-6 hafta sonra çoğaltılan tümör hücreler tekrar periton içinden enjektör yardımıyla toplanmıştır.

### 2.2.2. Tedavi grupları

Tablo 2.1. Tedavi grupları

	Deney Grubu	İşlem
1	Kontrol grubu*	Tümör hücrelerine tedavi uygulanmamış olan grup.
2	Ultras es grubu*	Tümör hücreleri üzerine sadece ultras es uygulanması.
3	Kloralüminyum ftalosiyanın (AICIPc)*	Tümör hücreleri üzerine AICIPc tedavisi uygulanması.
4	Ultras es ve AICIPc*	Tümör hücreleri üzerine AICIPc ve Ultras es uygulanması.
5	Dosetaksel**	Tümör hücreleri üzerine Dosetaksel tedavisi uygulanması.
6	Ultras es ve Dosetaksel**	Tümör hücreleri üzerine Dosetaksel ve Ultras es uygulanması.

\*n=4

\*\*n=3

1. Kontrol grubu: Sadece tümör hücreleri konulmuş, ultrases, dosetaksiel veya AICIPc'den herhangi biri uygulanmamıştır.
2. Ultrases grubu: Tümör hücreleri karanlıkta 60 dk bekledikten sonra 1, 1.5 ve 2 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta 1 MHz frekansta ultrases 1 dk boyunca uygulanmıştır.
3. Kloralüminyum ftalosiyenin (AICIPc): Tümör hücreleri üzerine 5, 10, 15, 20 ve 25 µM AICIPc tedavisi uygulanmıştır.
4. Ultrases ve AICIPc: Tümör hücrelerine 5, 10, 15, 20 ve 25 µM AICIPc uygulamasını takiben (60 dk sonra) ultrases grubu ile aynı yoğunluk ve frekansta ultrases yine 1 dk boyunca uygulanmıştır.
5. Dosetaksiel: Tümör hücreleri üzerine 1 µM Dosetaksiel tedavisi uygulanmıştır.
6. Ultrases ve Dosetaksiel: Tümör hücrelerine 1 µM Dosetaksiel uygulamasını takiben (60 dk sonra) yine 1 MHz frekans ve 2 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ultrases 1 dk boyunca uygulanmıştır.

Hücreler sonikasyon tedavisi uygulamadan önce tedavi ajanları (AICIPc veya dosetaksiel) ile 37 °C'de 60 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir.

### **2.2.3. İlaçların hazırlanması**

İlaçlar uygulama için hazırlanırken kloralüminyum ftalosiyenin, etanolde, dosetaksiel ise dimetil sülfoksitte (DMSO) çözülmüştür. AICIPc tümör hücre süspansiyonu içindeki final konsantrasyonlar 5, 10, 15, 20 ve 25 µM olacak şekilde hazırlanmıştır. Dosetaksielin tümör hücre süspansiyonu içindeki son konsantrasyonu 1 µM olmuştur.

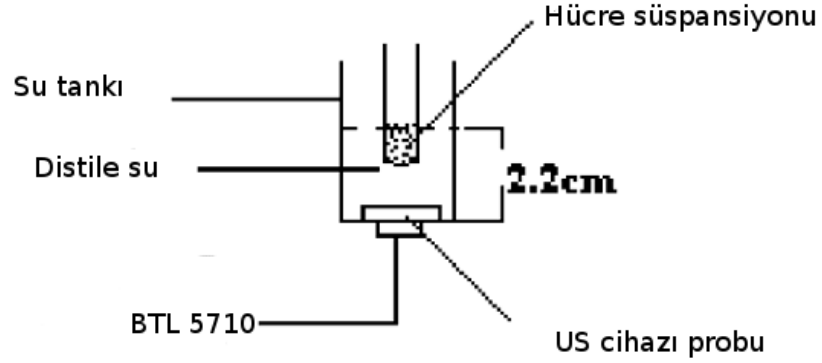
Hücre süspansiyonu içindeki etanol ve DMSO oranı %0.5 olarak kalmış ve bu iki kimyasaldan kaynaklanan herhangi bir hücre hasarı gözlenmemiştir. İlaçları çözme işlemi oda sıcaklığında ve loş ışık altında gerçekleştirilmiştir.

### **2.2.4. Ultrases uygulama**

Ehrlich Asit Tümör hücreleri tedavi öncesi Thoma lamında sayılarak, PBS içinde 4x10<sup>6</sup> hücre/ml bulunacak şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 0.5 ml polistritlen tüplere aktarılıp Şekil 2.2.'deki deney düzeneği esas



alınarak laboratuvarımızda hazırlanan deney düzeneğinde (Şekil 2.3.) ultrasese maruz bırakılmıştır.



Şekil 2.2. Ultrases uygulama düzeneği (Liu, 2006)

Düzenekte, hücrelerin bulunduğu polistrilen tüp distile su dolu tanka daldırılmış ve yine tankın tabanında bulunan ultrases cihazının 5 cm çapındaki probunun tam üzerine gelecek şekilde yerleştirilmiştir.

Uygulama esnasında prob ile hücre süspansiyonu arasındaki mesafe 2 cm olarak ayarlanmıştır. Uygulamada 1 MHz frekansta sürekli ultrases dalgaları kullanılmış ve hücreler 1, 1.5 ve 2 W/cm<sup>2</sup> yoğunluklarda ultrasese maruz bırakılmıştır.



Şekil 2.3. Laboratuvarımızdaki ultrases uygulama düzeneği

Bütün ultrases uygulamaları sırasında ultrasesin termal etkisi gözlenmiş ve sıcaklık artışı 1 °C'yi geçmemiştir.

## **2.3. Değerlendirme Yöntemleri**

### **2.3.1 Hücre canlılığı**

Ultrases uygulamasının hemen ardından hücre canlılığı tripan mavisi boyama yöntemiyle değerlendirilmiştir. Test tüplerinden 0.2 ml hücre süspansiyonu alınmış ve 0.2 ml %0.4 tripan mavisi ile boyanmıştır. Ardından hücreler thoma lamına aktarılmış ve ışık mikroskobu altında sayım yapılmıştır. Tripan mavisi ile boyanan canlılığını yitirmiş hücreler sayılarak toplam hücre sayısına oranlanmıştır.

Bütün gruplar için tedavi uygulanmadan önce hücre canlılığı değerlendirilmiş ve hücre canlılığı her zaman %97'nin üzerinde bulunmuştur.

### **2.3.2 Apoptoz**

Tedavi ve kontrol gruplarındaki apoptotik hücreleri değerlendirmek için HOPI (Hoechst & Propidyum İyodid) boyama yapılmıştır. Bunun için bütün gruplara ait hücre süspansiyonları tedavinin ardından (tedavi uygulanmayan kontrol grubu dahil olmak üzere) iki saat boyunca 37°C inkübatörde bekletilmiştir. Bu sürenin ardından hücre süspansiyonları Hoechst 33258 (5 µg/ml) ve Propidyum İyodid (2 µg/ml) boylarıyla 5 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkanmış ve hemen ardından Olympus BX51 floresan mikroskop (Şekil 2.4.) altında incelenmişlerdir. Elde edilen floresan mikroskop görüntüleri (10x25 büyütme) kamera (Olympus C-4000 Zoom) yardımıyla kaydedilmiştir. HOPI boyama sonucu alınan görüntülerde canlı hücreler homojen olarak mavi boyanmış görünürken, preapoptotik hücrelerin içerisinde apoptotik cisimlerin varlığından kaynaklanan daha parlak odaklar görülmüştür.



Şekil 2.4. Olympus BX51 floresan mikroskop. ([www.olympus.com.uk](http://www.olympus.com.uk))

### 2.3.3 Western Blot

#### 2.3.3.1 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

SDS jel elektroforez uygulamasının yapılışına dair bilgiler aşağıda verilmektedir.

##### **Tesste Kullanılan Cihazlar:**

- Mini elektroforez cihazı (Bio Rad, 170-3930)
- Güç kaynağı (Bio Rad Power Pac 300, 165-5050)
- Sıcak su banyosu

##### **Kullanılan Kimyasal Maddeler:**

- %30 Akrilamid/Bis hazırlandı.
- Amonyum Persülfad (Applichem, A1142,0250).
- TEMED (N,N,N,N-Tetra-metil-etilendiamin) (Applichem, A1148,0100).
- Trizma Base (SIGMA, 034K5447).
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Merck, 822050).
- Glisin (Applichem, A1067,1000).
- Marker (Prestained SDS-Page standart Low Range) (Santa Cruz, SC2360).
- SDS-Page Sample Buffer (Novex, LC2676).

### **Elektroforezde Kullanılan Solüsyonlar:**

#### **%30 luk Akrilamid/Bis**

- Akrilamid 30.0 gr
- Bisakrilamid 0.8 gr
- Distile su ile 100ml'ye tamamlanmıştır.

#### **1M Trizma Base**

- Trizma Base : 12.11 gr

Distile su ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra pH' ı 6.8'e ayarlanmıştır.

#### **Amonyum persülfat (%10)**

- Distile su 1 ml
- Amonyum persülfat 0.1 gr

### **1.5 M Ayırıcı Jel**

- Tris 18.16 gr

100 ml distile su içinde çözüldü ve HCL ile pH 8.8'e ayarlandı.

#### **%10 SDS**

- SDS 10 gr
- Distile su 100 ml

#### **Elektrot Solüsyonu**

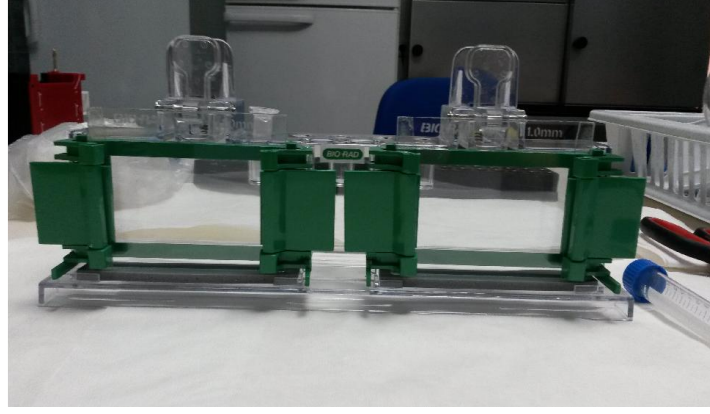
- Trizma Base 3 gr
- SDS 1 gr
- Glisin 14.4 gr

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

#### **Testin Yapılışı**

- Testteki bütün işlemler eldiven giyilerek yapılmıştır.
- Kullanılacak cam ve diğer malzemeler test öncesinde steril edilmiştir.

- Elektroforez aletinin, biri kalın diğeri ince iki cam levhası birbiri üzerine getirildikten sonra mengene şeklindeki alet yardımıyla düzgün bir zeminde, dik olarak Şekil 2.5.'deki gibi sehpaye yerleştirilmiştir.



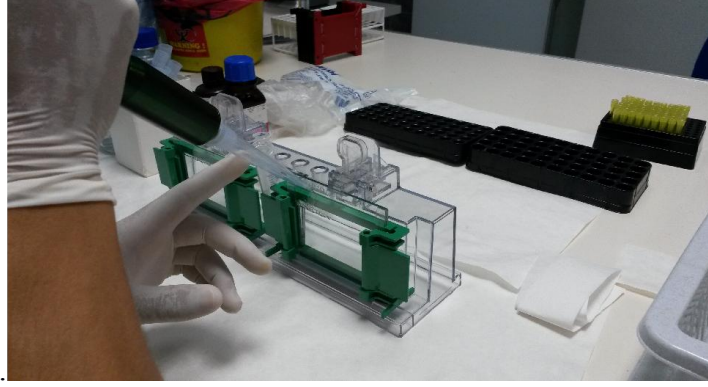
Şekil 2.5. Elektroforez düzeneğinde cam levhaların yerleştirilmesi

- Cam levhalardan sızıntı olup olmadığını kontrol etmek için camların arasında oluşan aralığa alkol doldurulmuş ve sızıntı olup olmadığı gözlemlendikten sonra alkol kurutma kağıdına emdirilerek uzaklaştırılmıştır. Ayırıcı jel solüsyonu 50 ml'lik santrifüj tüpü içinde aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

#### **Ayırıcı jel solüsyonu (%10'luk)**

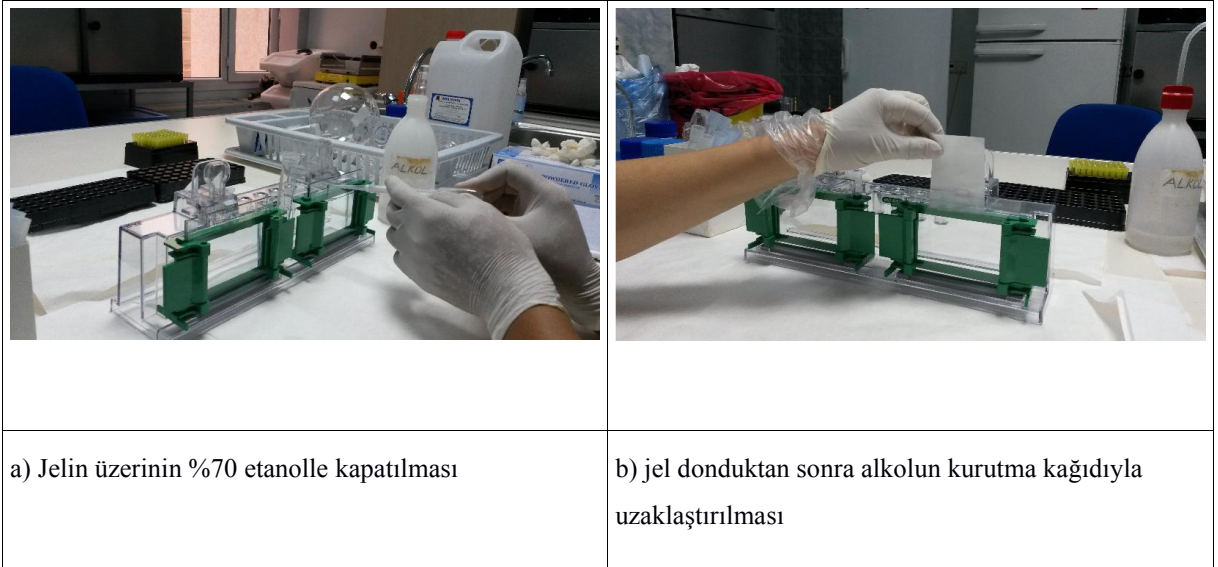
- Distile su 4000  $\mu$ l
- Akrilamid/Bis %30 3300  $\mu$ l
- 1.5M Tris solüsyonu (pH:8.8) 2500  $\mu$ l
- %10 SDS 100  $\mu$ l
- %10 Amonyum Persulfat 100  $\mu$ l
- TEMED 4  $\mu$ l

TEMED ve amonyum persülfat polimerizasyonu başlattıkları için en son eklenmiştir. Hazırlanan ayırıcı jel solüsyonu cam levhaların arasına bir pipet yardımıyla dökülmüştür (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Jel solüsyonunun cam levhalar arsına dökülmesi

- Jelin hava ile temasının kesilmesi için üzerine %70'lik alkol dökülmüştür (Şekil 2.7.a).
- Polimerizasyon için 45 dakika beklenmiştir.
- Polimerizasyon işleminden sonra jelin üzerindeki alkol kurutma kağıdı ile alınmıştır (Şekil 2.7.b).



Şekil 2.7. a) Jelin üzerinin %70 etanolle kapatılması, b) jel donduktan sonra alkolun kurutma kağıdıyla uzaklaştırılması

### Toplayıcı jel solüsyonu

- Distile su 3400 µl
- Akrilamid/Bis %30 830 µl
- 1M Tris solüsyonu 630 µl
- %10 SDS 50 µl
- %10 Amonyum persülfat 50 µl
- TEMED 5 µl

Toplayıcı jel solüsyonu de 50 ml'lik santrifüj tüpü içinde hazırlanmıştır.

- Toplayıcı jel solüsyonu ayırıcı jel solüsyonunun üzerine dökülmüştür ve hemen üzerine şekildeki gibi çok dişli tarak yerleştirilmiştir (Şekil 2.8.). Tarağın mutlaka toplayıcı jel içinde kalmasına, ayırıcı jel ile temas etmemesine ve jel ile tarak arasında hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilmiştir.



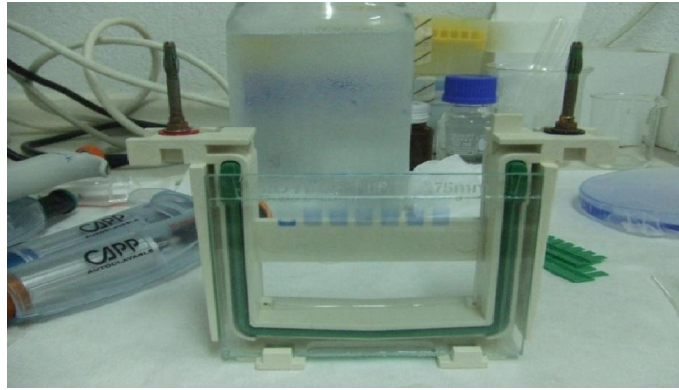
Şekil 2.8. Elektroforez düzeneğinde tarağın jele yerleştirilmesi.

- Toplayıcı jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklenmiştir.
- Antijenin ideal sulandırım oranını belirlemek amacıyla EAT hücre lizatının farklı sulandırımları çalışılmıştır ve
- 40 µl antijen, 10 µl örnek tampon karışımın en uygun sulandırma oranı olduğu belirlenmiştir.
- Hücre lizatının bulunacağı ependorf tüplerin kapakları üzerine iğne ile 3-4 delik açılmış ve kaynar su içinde 5 dakika bekletilmiştir.

- Buzdolabından çıkarılan marker kaynar suyun içine daldırılıp çıkarılarak ısıtılmıştır.

### Örneklerin Jelde Elektroforezi

- Taraklar jele zarar vermeden çıkarılmıştır.
- Jeldeki çukurlar çoklu tarak kullanılarak açıldığı için jelin baştaki çukuruna 5 µl standart işaret protein, diğer çukurlara 20 µl tedavi gruplarına ait örnek tampon solüsyonu ve antijen karışımı konulmuştur (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Elektroforezde jelin çukurlarına marker ve örnek tampon solüsyonu ve antijen karışımının konulması.

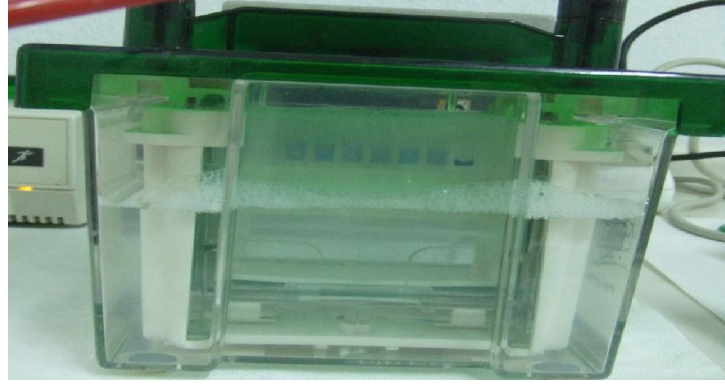


Şekil 2.10. Elektroforez düzeneğinde cam levhaların elektrot tankına koyulmadan önce gerekli aparatlara takılması.

- Arasında jel bulunan cam levhalar elektroforez tankına yerleştirilmiş ve sonra soğuk ortamdan çıkarılan elektrolit solüsyonu ile elektroforez tankı jelin üzerinden taşmıyacak şekilde doldurulmuştur.



- Bu işlemlerden sonra elektroforez aletinin kapağı anod ve katod uçlarının doğruluğu kontrol edilerek kapatıldı ve cihaz, proteinlerin ayrılması işlemi için 1 saat 30 dakika süre ile 100 V 'luk sabit akıma ayarlanarak çalıştırılmıştır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Elektroforez düzeneğinde jelin elektrot tankına koyulması.

- Bu süre sonunda markırın oluşturduğu rengin jelin alt ucuna kadar gelip gelmediği kontrol edildi.
- Jel, elektroforez aletinden dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır.
- Antijenin ayrışıp ayrışmadığını kontrol etmek ve uygun antijenik konsantrasyonu saptamak amacıyla jel boyanmıştır.

### **Jelin Boyanması**

#### **Boyama Solüsyonu**

- Commasie brillant blue 200mg
- Etanol 90ml
- Glasiyel asetik asit 20ml
- Distile su 90ml

#### **Boya Açıcı Solüsyon**

- Ethanol 100 ml
- Glasiyel asetik asit 100 ml
- Distile su 800 ml

### **Boyamanın Uygulanışı**

- Elektroforezden sonra jel dikkatlice çıkarılıp ultra distile suda bir süre bekletilmiştir.
- Ultra distile su dökülüp jel 10 ml'lik hazırlanan boyama solüsyonunda bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
- Ertesi gün boyama solüsyonu dökülmüş ve jel 10 ml boya açma solüsyonu içinde bantlar ortaya çıkıncaya kadar bekletilmiştir.
- Boyama işlemi uygun örnek konsantrasyonunu belirlemek için yapılmıştır.
- Blotlamaya devam edileceğinde jel boyanma işlemi yapılmamıştır.

### **2.3.3.2 Nitroselüloz membrana aktarım**

#### **Transfer Tampon**

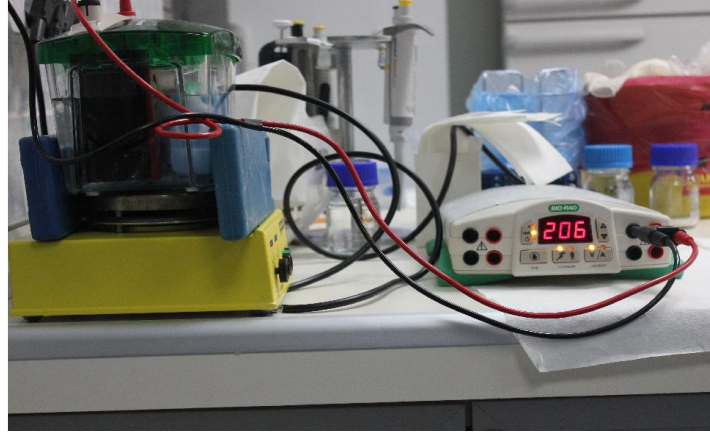
- Tris 3.781 gr
- Glycin 18 gr

Distile su ile 1 litreye tamamlanıp pH 8.5'a ayarlandı. Kullanmadan hemen önce 800 ml transfer tamponun üzerine 200 ml %96'lık methanol ilave edildi.

#### **Transfer İşlemi**

Elektroforezin ardından jel, nitroselüloz membranla üstüste gelecek şekilde transfer tankına ait kasete yerleştirilmiştir.

- Kaset transfer tankına yerleştirildikten sonra tanka transfer tamponu eklenmiştir.
- Elektrotların yerleştirilmesinin ardından 100 volt ve 300 mA 'de transfer işlemi başlatılmış.
- Üç saatlik transfer sürecinin ardından nitroselüloz membran tanktan çıkarılmıştır.
- Markerin Nitroselüloz membran üzerine geçtiği gözlenmiştir.



Şekil 2.12. Proteinlerin jelden nitroselüloz membrana aktarılması.

### **Membranın Boyanması ve Deteksiyon için Kullanılan Antikor ve Kit**

- Anti-Caspase 3, active (cleaved) form Polyclonal Antibody (Millipore™, AB3623)
- Beta-Actin Antibody (Santa Cruz, sc-130657)
- WesternBreeze® Chromogenic Western Blot Immundetection Kit (Invitrogen™, WB7105)

### **Hazırlanan Solüsyonlar:**

#### **Bloklama Solüsyonu**

- Ultra distile su 14 ml
- Bloker/Diluent (PartA) (WesternBreeze®) 4 ml
- Bloker/Diluent (PartB) (WesternBreeze®) 2 ml

#### **Birincil Antikor Diluenti**

Birincil antikorlar hazırlanan 10 ml bloklama solüsyonu içinde 1/1000 oranında sulandırılmıştır.

#### **Antikor Yıkama Solüsyonu**

- Ultra distile su 150 ml
- Antikor Yıkama Solüsyon (WesternBreeze®) 10 ml

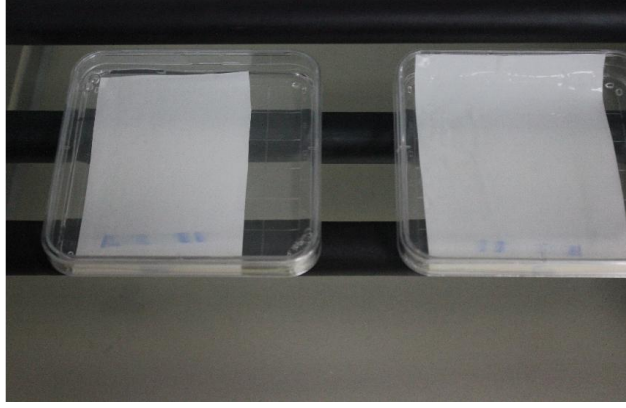
## Membranın Antikorlarla Muamele Edilmesi ve Boyama

- Proteinlerin membrana aktarma işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membran transfer tankından dikkatlice çıkarılmıştır.
- Membran, içinde 10 ml bloklama solüsyonu (WesternBreeze®) bulunan plastik kaba alınıp rotari karıştırıcıda 30 dakika inkübe edilmiştir (Şekil 2.13)



Şekil 2.13. Nitroselüloz membranlar saniyede bir devirde çalışan rotari çalkalayıcı üzerinde.

- Bloklama solüsyonu dökülmüş ve membran 20 ml ultra distile suyla 5 dakika boyunca durulanmıştır.
- Membran, hazırlanan 10 ml birincil antikor solüsyonuyla 1 saat inkübe edilmiştir.
- Membran, 20 ml distile suda 5 dakika boyunca yıkanmış ve bu işlem üç defa tekrarlanmıştır.
- Membran, 10 ml ikincil antikor solüsyonunda (WesternBreeze®) 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Membran, hazırlanan 20 ml antikor yıkama solüsyonuyla 5 dakika boyunca yıkanmış ve bu işlem üç defa tekrarlanmıştır.
- Membran 20 ml ultra distile su içinde beş dakika boyunca yıkanmıştır ve bu işlem iki defa tekrarlanmıştır.
- Membran, üzerinde mor bantlar belirinceye kadar 5 ml kromojenik substratla inkübe edilmiş işlem yaklaşık 1 saat sürmüştür (Şekil 2.14.).
- Membran 20 ml ultra distile su ile durulanmış ve bu işlem iki defa tekrarlanmıştır.
- İşlemlerin ardından membran kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 2.14. Boyama sonrası üzerinde bantların belirginleştiği nitroselüloz membran.

#### 2.3.4. İstatistik

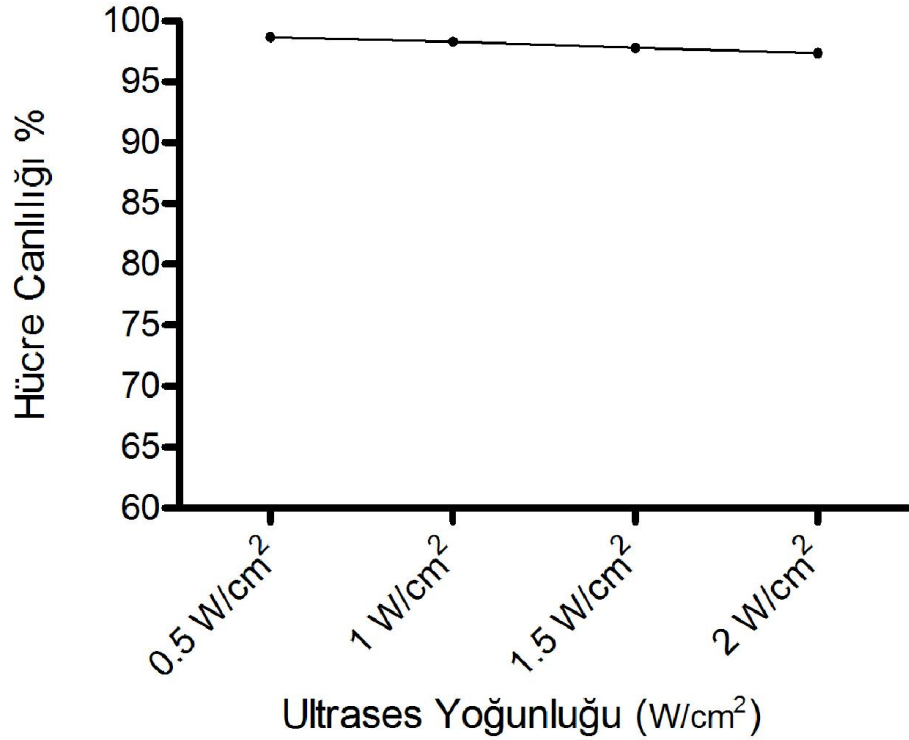
İstatistiksel analizler GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapıldı. Gruplara tek yön varyans analizi (ANOVA) Dunnett testi ile uygulanarak örneklerin birbirleri arasındaki ilişki araştırıldı (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.

### 3. BULGULAR

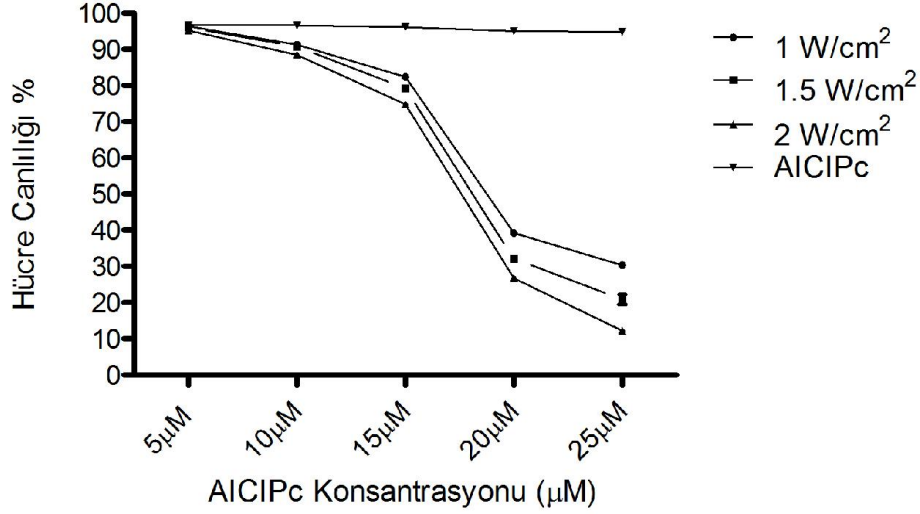
#### 3.1 Hücre Canlılığı Değerlendirme

İlaç ya da ultrasese maruz bırakılmayan EAT hücreleri %0.4 Tripan mavisi ile boyanmış ve hücre canlılığı her zaman %97 nin üzerinde bulunmuştur.

İkinci tedavi grubunda EAT hücreleri herhangi bir kimyasalla inkübe edilmeden sadece düşük yoğunluklu ultrasese maruz bırakılmıştır. Tripan mavisi ile boyanan hücrelerde hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Şekil 3.1.'de görüldüğü üzere ultrases yoğunluğu artarken hücre canlılığında azalma görülse de hücre canlılığı %97'nin altına inmemiştir.



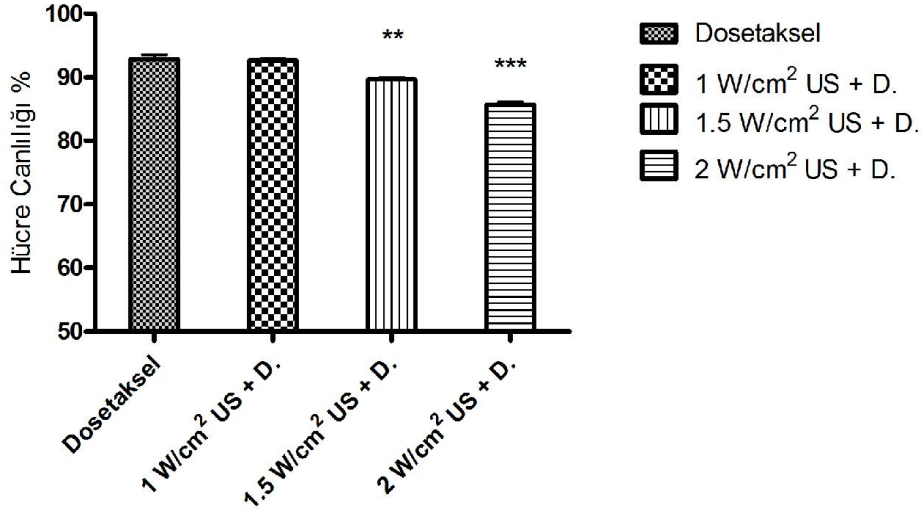
Şekil 3.1. Ultrases uygulaması sonrası EAT hücre canlılığı oranları. Veriler bağımsız üç tekrar sonunda elde edilmiştir. Üç ayrı ultrases doz uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ). Hata barları ortalamanın standart hatasını (SEM) belirtmektedir.



Şekil 3.2. Üç doz US ile birlikte veya tek başına uygulanan AICIPc'nin konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığındaki değişim gösterilmektedir. Veriler birbirinden bağımsız dört tekrar sonucu elde edilmiştir. Hata barları sırtalamanın standart hatasını (SEM) belirtmektedir.

EAT hücrelerine AICIPc'nin tek başına uygulanması ve EAT hücreleri üzerinde AICIPc ile birlikte sonikasyon uygulanması sonucu hücre canlılığındaki değişimler Şekil 3.2. de görülmektedir. AICIPc'nin artan dozlarda tek başına uygulanmasının ardından hücre canlılığındaki değişim SDT uygulamalarına göre çok sınırlı kalmıştır.

SDT uygulanan gruplarda ise AICIPc konsantrasyonu arttırıldığında hücre canlılığının azaldığı görülmektedir. AICIPc'nin artan konsantrasyonlarda uygulandığı çalışmamızda 15 µM'dan yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığının kayda değer oranlarda azaldığı gözlenmiştir. 25 µM AICIPc'nin kullanıldığı SDT uygulamalarında ise tümör hücrelerinin tamamına yakını canlılıklarını kaybetmişlerdir. Çalışmamızda SDT uygulamalarında hücreler, ultrasesin üç farklı dozunda (1, 1.5 ve 2 W/cm<sup>2</sup>) sonikasyona maruz bırakılmışlardır. Şekil 3.2'de de görüldüğü üzere US yoğunluğu arttıkça hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Üç ayrı doz ultrases uygulanan SDT gruplarından elde edilen veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).



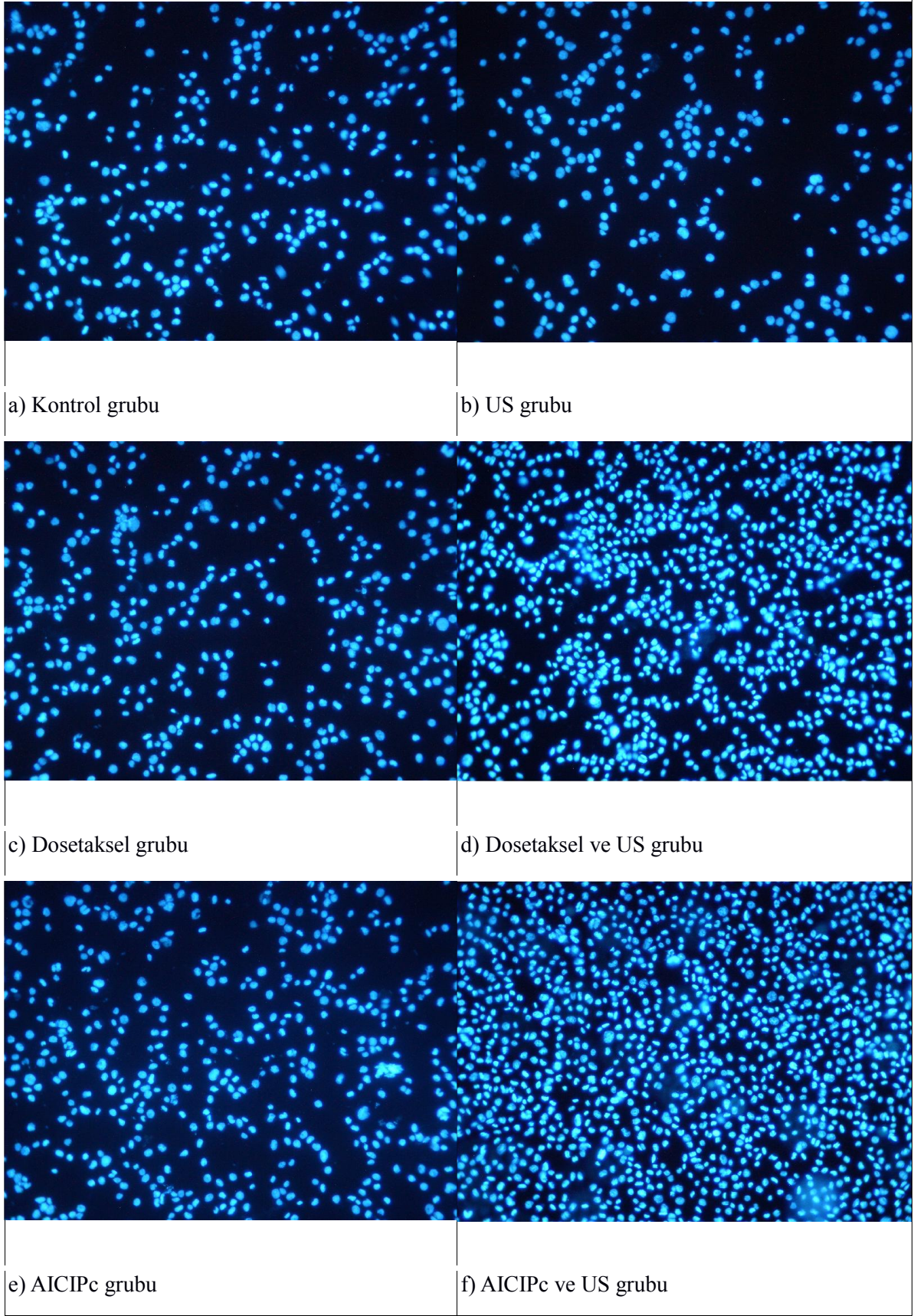
Şekil 3.3. Dose-takselin tek başına ve değişik yoğunluklarda US varlığında hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir. Tedavi gruplarına ait veriler bağımsız üç tekrar sonucu elde edilmiştir ve hata barları ortalamanın standart hatasını (SEM) belirtmektedir. (D: Dose-taksel; US: Ultrases)

Hücreler, 1 $\mu$ M dose-takselle inkübe edilmelerinin ardından ultrasese maruz bırakılmışlardır. Veriler birbirinden ayrı üç tekrar sonucu elde edilmiştir. En yüksek yoğunlukta (2 W/cm<sup>2</sup>) ultrasese uygulanan gruptaki hücre ölüm oranı ve tedavi grupları içindeki en yüksek hücre ölüm oranı olmuştur. Dose-taksel aracılı SDT uygulamaları ile sadece dose-taksel verilen tedavi grubunun verileri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. 1.5 W/cm<sup>2</sup> ve 2 W/cm<sup>2</sup> ultrasesein dose-takselle birlikte uygulandığı gruplarla, tek başına dose-takselin uygulandığı gruba ait hücre canlılığı oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001).

### 3.2. Hoechst-propidyum iyodid boyama

SDT'nin apoptoza neden olup olmadığını araştırmak için tedavi gruplarındaki hücreler 20  $\mu$ M AICIPc veya 1 $\mu$ M dose-taksel ile inkübe edilmişlerdir. Sonikasyon uygulanan gruplar 1 MHz frekansta ve 1.5 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ultrasese maruz bırakılmışlardır. Tedavi gruplarında apoptozu göstermek için yapılan Hoechst-propidyum iyodid boyamasının ardından floresan mikroskopta görüntü alınmıştır (Şekil 3.4.).





Şekil 3.4. HOPI boyamanın ardından tedavi gruplarının floresan mikroskop görüntüleri (10X25 büyütme).

Şekil 3.4.'de görüldüğü gibi hiçbir tedavi uygulanmayan, sadece EAT hücrelerinin bulunduğu kontrol grubu (a) ve sadece ultrases uygulamasının yapıldığı US grubundaki (b) hücrelerin HOPI boya ile uniform olarak mavi boyandıkları ve herhangi bir nukleus değişimine işaret eden yapıların bulunmadığı gözlenmiştir. 1µM dosetakselin bulunduğu SDT grubunda (d) nukleus fragmentasyonunun belirteci olan parlak mavi noktaların bulunduğu apoptotik hücrelerin çoğunlukta, sadece 1µM dosetaksel'in verildiği gruptaki (c) hücrelerin çoğunluğu uniform olarak maviye boyanan hücreler olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde 20 µM AICIPc tek başına verildiği gruptaki (e) hücreler apoptotik özellik göstermezken, AICIPc aracılı SDT uygulanan gruptaki (f) hücrelerin büyük oranda apoptotik hücreler oldukları gözlenmiştir.

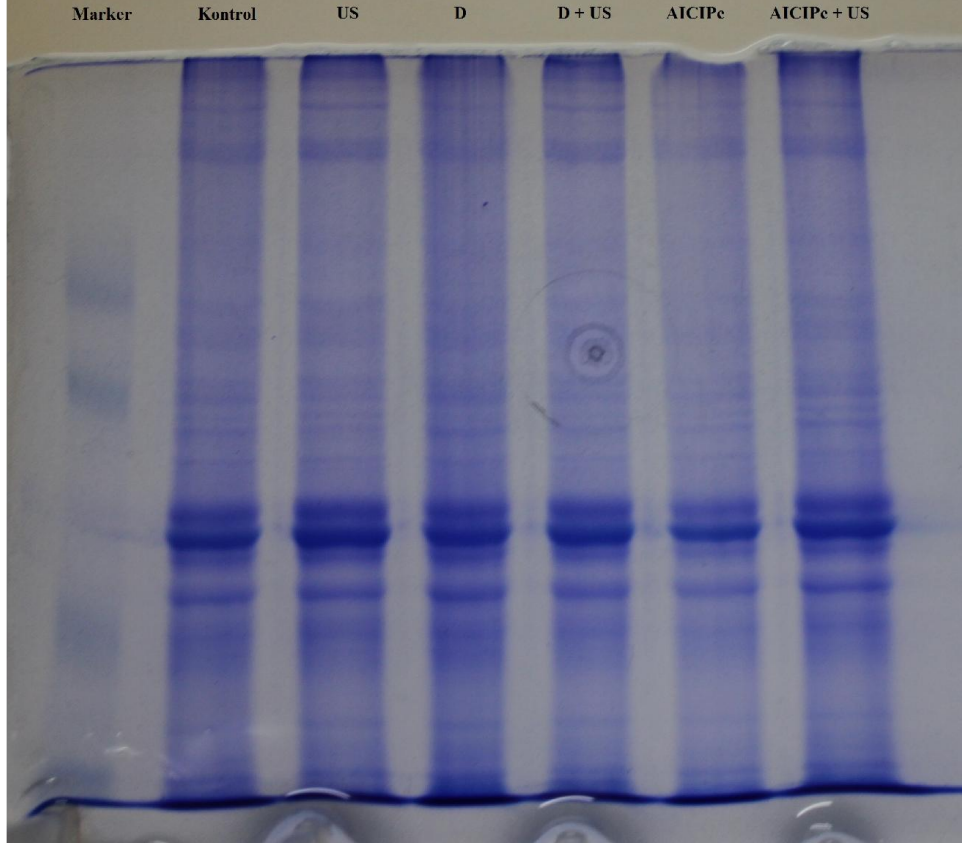
Hücreler Hoechst boyasıyla mavi boyanmış fakat propidyum iyodid ile kırmızı boyanmamıştır. Bu da bize hücrelerin nekroza uğramadıklarını düşündürmektedir. Mavi boyanan hücrelerden bir kısmı bir ya da birden fazla daha parlak mavi ışımaya sahiptir. Bu hücreler erken dönem apoptotik hücreler olarak değerlendirilmiştir.

### **3.3. Western Blotlama**

Western blotlamanın ardından nitroselüloz membran üzerinde apoptoz belirteci olan kaspaz-3 proteinine ait bantların oluştuğu ve tedavi grupları arasında bant kalınlığı ve yoğunluğu açısından farklar olduğu belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılmak üzere β-aktin proteinlerinin oluşturduğu bantların kalınlıkları ve yoğunluk açısından birbirine yakın oldukları gözlemlenmiştir.

#### **3.3.1. SDS Poliakrilamid jel elektroforezi**

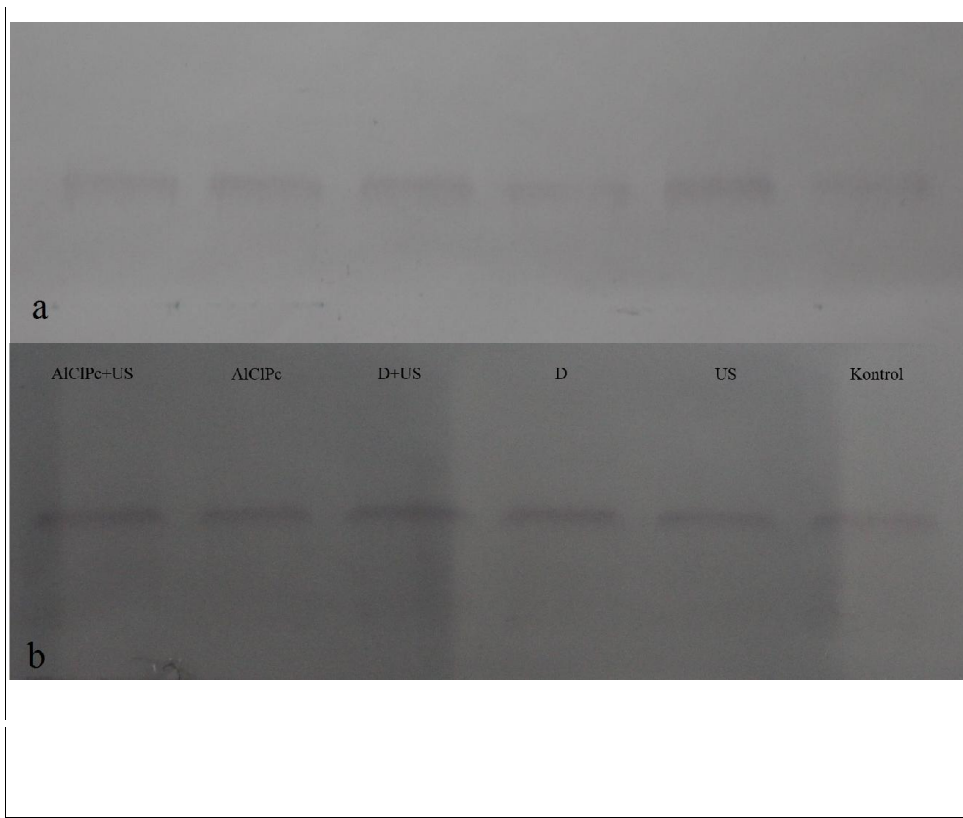
Tedavi uygulamalarının ardından Western blotlamadan önce jelde yürütülecek hücre lizatı konsantrasyonlarının ayarlanabilmesi commasie brilliant blue boyasıyla bantların jel üzerinde oluşturdukları bantlar kontrol edildi. 40 µl konsantrasyonda oluşan protein bantlarının net bir şekilde jel üzerinde ayrıştıkları görülmüş ve bu konsantrasyon Western Blotlama için uygun konsantrasyon olarak belirlenmiştir.



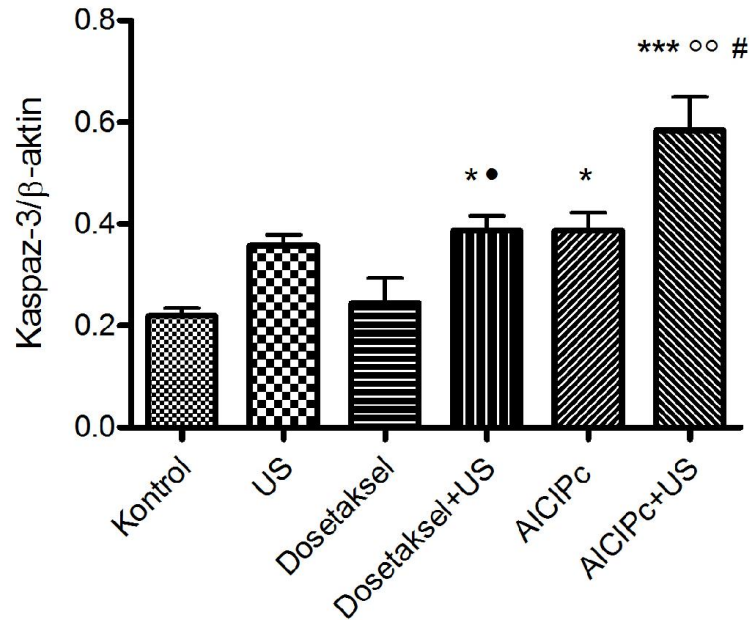
Şekil 3.5. Hücre lizatı konsantrasyon denemelerinin ardından elde edilen elektroforez görüntüsü. Soldan sağa gruplar: 1) Marker, 2) Kontrol grubu, 3) ultrases grubu (US), 4) dosetaksel grubu (D), 5) dosetaksel ve ultrases (D+US) grubu , 6) AICIPc , 7) AICIPc ve ultrases grubu (AICIPc+US)

### 3.3.2. Western Blotlamada elde edilen bantlar

Jelde yürütmede kullanılacak hücre lizatı miktarı belirlendikten sonra, proteinler nitroselüloz membrana aktarılmışlar ve daha sonra antikorlar ve kromojen boya ile muamele edilmiştir. Bunun ardından nitroselüloz membran üzerinde bantların oluştuğu gözlemlenmiştir. Kaspaz- 3 (17 kDa) ve  $\beta$ -aktin (43 kDa) bantları nintroselüloz membran üzerinde oluşmuştur.



Şekil 3.6. Western blotlama sonucu elde edilen kaspaz-3 ve  $\beta$ -aktine ait bantlar. a) oluşan kaspaz-3 bantları b) oluşan  $\beta$ -aktin bantları. Soldan sağa gruplar: 1) AICIPc ve ultrases grubu (AICIPc+US), 2) AICIPc, 3) dosetaksel ve ultrases grubu (D+US), 4) dosetaksel grubu (D), 5) ultrases grubu (US), 6) Kontrol grubu



Şekil 3.7. Tedavi gruplarında kaspaz-3 ekspresyonunun  $\beta$ -aktin ekspresyonuna oranlanması. Veriler bağımsız üç tekrarlar elde edilmiştir ve hata barları ortalamanın standart hatasını (SEM) ifade etmektedir. (\* $p < 0.05$ ;

\*\*\* $p < 0.001$ ; °° $p < 0.01$ ; • $p < 0.05$ ; # $p < 0.5$ ) (US:Ultrases)

Western blot işleminden sonra hem de  $\beta$ -aktine ait bant kalınlıkları ImageJ programı kullanılarak ölçülmüştür. Şekil 3.7.'de görüleceği gibi Western blotlama sonrası elde edilen kaspaz-3 ve  $\beta$ -aktine ait bant kalınlıkları oranlanmıştır. Hem dosetaksel hem de AICIPc için ultrases ile birlikte uygulandıklarında kaspaz-3 ekspresyonlarının tek başlarına uygulanmalarından daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca tüm gruplar içerisinde en fazla kaspaz-3 sentezlenen grup AICIPc aracılı SDT uygulanan tedavi grubu olduğu anlaşılmaktadır. Tedavi gruplarından elde edilen veriler, tedavi uygulanmayan kontrol grubuyla istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Dosetaksel aracılı SDT grubu, AICIPc'nin tek başına uygulandığı grup ve AICIPc aracılı gruplardan elde edilen veriler, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (\* $p < 0.5$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). AICIPc aracılı ultrases uygulaması ile tek başına AICIPc uygulanan grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (<sup>#</sup> $p < 0.5$ ) Ayrıca SDT uygulamalarının yapıldığı grupların verileri tek başına ultrasesin uygulandığı grubun verileriyle karşılaştırılmıştır. Sadece AICIPc aracılı SDT uygulaması ile, tek başına ultrasesin uygulandığı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (<sup>oo</sup> $p < 0.01$ ). Dosetaksel aracılı SDT uygulaması ile sadece dosetakselin verildiği grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır (<sup>.</sup> $p < 0.05$ ).

## 4. TARTIŞMA

Çalışmamızda bir sonosensitif ajan olan AICIPc ve bir kemoterapi ilacı olan dosetakselin ultrases ile birlikte uygulandıklarında EAT hücreleri üzerinde *in vitro* olarak etkileri incelenmiştir.

Düşük yoğunluklu ultrasesin herhangi bir sonosensitif ajan olmaksızın tek başına hücre canlılığı üzerine etkisinin sınırlı kaldığı, ancak artan yoğunluklarda ultrases uygulamalarında hücre canlıklarının etkilendiği bildirilmiştir (Wang 2009, Feng 2010). Wang ve arkadaşları S180, H-22 ve EAT hücreleri üzerinde tek başına ultrases uygulamasının etkilerini incelemişler ve bu hücre dizinlerine ait farklı konsantrasyonlardaki hücre süspansiyonları üzerine 2.2 MHz frekansta bir dakika boyunca çeşitli yoğunluklarda (1-7 W/cm<sup>2</sup>) ultrases uygulanmıştır. Ultrasese maruz bırakılan hücre sayısının artmasıyla, hücre lizis oranlarının azaldığı belirtilmiştir. Bu kapsamda 1x10<sup>6</sup> hücre/ml konsantrasyonda hücre süspansiyonu üzerine 2 W/cm<sup>2</sup> ve altı yoğunluklarda ultrases (2.2 MHz) uygulamasında S180 hücrelerinde hücre canlılığı yaklaşık %90 ve H-22 hücrelerinde yaklaşık %95'ken, EAT hücrelerinde hücre canlılığı %95'in üzerinde kaldığı gösterilmiştir (Wang 2009). Ayrıca Feng ve ark. (2010) SMMC-7721 hücre süspansiyonu (2x10<sup>6</sup> hücre/ml) üzerine 1.2 MHz frekansta ve farklı yoğunluklarda (1, 2, 3, 4, 5 W/cm<sup>2</sup>) bir dakika boyunca ultrases uygulamışlar ve 2 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ultrases uygulaması sonrası hücre canlılığı %80'in üzerinde kalırken, 1 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ultrases uygulaması sonrasında ise hücre canlılığının %100'e yakın olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda 1x10<sup>6</sup> konsantrasyonda EAT hücresi süspansiyonu üzerine 1, 1.5 ve 2 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ultrases (1 MHz) 60 saniye boyunca uygulanmış, kullanılan en yüksek US yoğunluğunda (2 W/cm<sup>2</sup>) dahi hücre canlılık oranının %97'nin üzerinde kaldığı gözlenmiştir.

SDT'nin etkililiğini belirleyen ana etken sonosensitizörlerdir, ve güncel olarak kullanılan sonosensitif ajanlar esas olarak fotosensitizörlerdir. AICIPc ikinci nesil fotosensitizörlerdendir. Yumita ve Umemura ftalosiyanınin ultrases ile sinerjistik etkisini fark etmişler ve ftalosiyanın aracılı SDT uygulamasının tümör boyutunu küçülttüğünü bildirmişlerdir (Yumita 2004a, 2004b). G361 hücreleri üzerinde kloralüminyum

ftalosiyanın disülfonat (CIAIPcS<sub>2</sub>) ile birlikte 1 MHz frekansta ve 2 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ultrases uygulanmış (CIAIPcS<sub>2</sub> aracılı SDT), tek başına ultrases ve tek başına CIAIPcS<sub>2</sub> uygulanan gruba göre daha fazla ROS oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Kolarova 2009). Ayrıca Milowska ve Gabryelak (2008) da çalışmalarında ftalosiyanın ultrasesle sinerjik etki gösterdiğini ve sonodinamik özellikler içerdiğini bildirmişlerdir. Nukleuslu balık eritrositlerinde AICIPc ve ZnPc'in (çinko ftalosiyanın) ultrasesle birlikte uygulandıklarında her iki ftalosiyanın ve ultrasesin tek başına uygulandığı gruplardan daha fazla oranda hemolize neden olduğu bildirilmiştir (Milowska 2008).

Over kanseri hücreleri (HO-8910) 100 µM metilen mavisi ile bir saatlik inkübasyonun ardından 1.7 MHz frekansta 0.46 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta sürekli ultrasesin 5 saniye uygulanmasının ardından hücre canlılığının yaklaşık %40'a düştüğü bildirilmiştir (Xiang 2011). Fare sarkoma ve sıçan asit 130 hücreleri Hp ile inkübasyonlarının ardından 1.92 MHz frekansta ve 1.27 ve 3.18 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ultrases uygulanmasının ardından hücre canlılığı fare sarkoma hücrelerinde %70'ten %1'e, sıçan asit 130 hücrelerinde ise %50'den %5'e düştüğü bildirilmiştir (Rosenthal 2004). THP-1 hücreleri 10 mM ALA ile inkübasyonun ardından 1 MHz frekans ve 0.5 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ultrasese maruz bırakıldıklarında hücre canlılığının yaklaşık %60'a düştüğü gösterilmiştir (Cheng 2013). Ayrıca Li ve ark. insan meme kanseri hücrelerine (MDA-MB-231) 1 µM PpIX ile inkübasyonun ardından 1 MHz frekans ve 1 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ultrases uygulamış ve SDT uygulamasının ardından hücre canlılığının yaklaşık %55'e düştüğünü göstermişlerdir (Li 2012). Wang ve ark. da hepatoselüler karsinoma (HepG2) hücrelerini 2.5 µM hipokrellin-B ile 4 saat inkübe ettikten sonra 8 saniye boyunca 1.7 MHz frekans ve 0.46 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta sürekli ultrases uygulamışlar ve hücre canlılığının SDT uygulamasının ardından yaklaşık %20'ye düştüğünü bildirmişlerdir Wang (2012).

Çalışmamızda EAT hücreleri üzerinde AICIPc kullanılan SDT uygulamasının hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. Bunun için sonosensitif ajan olarak kullandığımız AICIPc hücrelere artan dozlarda (5, 10, 15, 20, 25 µM) uygulanmıştır. SDT uygulamaları sırasında hücrelere 60 saniye boyunca 1 MHz frekansta, üç farklı yoğunlukta (1. 1.5 ve 2 W/cm<sup>2</sup>) ultrases uygulanmıştır. SDT uygulamasında AICIPc dozlarında artışa bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. Özellikle 15 µM konsantrasyonda AICIPc verilen hücrelerdeki canlılık oranı önemli oranda düşmüştür. Hücre ölümündeki artış 20 µM konsantrasyona çıkıldığında daha da belirgin olarak gözlenmiştir. Sonikasyon uygulanmadan AICIPc'nin hücrelere tek başına uygulanan dozlar arttırılsa da etkisinin çok

sınırlı kaldığı gözlemlenmiş, buna karşın 25 µM AICIPc ve 2 W/cm<sup>2</sup> US uygulanan tedavi grubundaki hücrelerin büyük çoğunluğunun canlılıklarını kaybettikleri gözlemlenmiştir.

SDT uygulamalarında kemoterapi ilaçlarının da kullanıldığı ve bazı kemoterapi ilaçlarıyla ultrasesin birlikte uygulanmasının tümör hücrelerinin ölüm oranlarını arttırdığı bildirilmektedir (Rosenthal 2004). Prostat kanseri hücrelerinde (PC3) doksorubisinin ultrasesle birlikte uygulandığında, tek başına uygulandığından daha fazla kanser hücrelerinin ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Siu 2007). Benzer olarak 160 µM adriyamisin ile inkübe edilen S180 hücre süspansiyonuna (5x10<sup>6</sup> hücre/ml) ultrases (1.93 MHz ve 6 W/cm<sup>2</sup>) uygulandığında hücre ölüm oranının, tek başına ultrases uygulamasından üç kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Umemura 1997).

Çalışmamızda EAT hücreleri üzerinde dosetakselin sonikasyonla birlikte hücre canlılığı üzerindeki etkileri *in vitro* incelenmiştir. Bunun için dosetakselle yapılan tedavi uygulamasında meme kanserinde klinik uygulamalarda kullanılan yüksek doz (1 µM) tercih edilmiştir (Bayert-Robert 2010). EAT hücrelerinin dosetakselle inkübasyonunun ardından US uygulanan gruptaki hücre ölüm oranı tek başına dosetakselle inkübe edilen gruptakinden daha fazladır. Tek başına dosetakselin uygulandığı gruptaki hücre canlılığı oranı ile 1.5 ve 2 W/cm<sup>2</sup> ultrasesin verildiği dosetakselle aracılı SDT uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Çalışmamızda hücre canlılığı değerlendirmesi için tripan mavisi ile boyama SDT uygulamasının hemen ardından yapılmıştır. Bir kemoterapi ilacı olan dosetakselin SDT uygulamasının ardından daha uzun inkübasyon sürelerinde tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin artması olası görülmektedir.

Apoptoz hücre boyunun küçülmesi, nuklear kondensasyon ve fragmentasyonu içeren özgül sitoplazmik ve nuklear özelliklerle karakterize programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozun indüklenmesi tümörlü hücrelerin ölümünün tetiklendiği kemoterapinin önemli bir mekanizması olarak kabul görmektedir (Muraglia 2000). Son zamanlarda ultrasesle indüklenmiş ultrason geniş çapta incelenmekte ve farklı tümör hücre hatlarında apoptotik cevap gözlenmektedir (Tachibana 2008, Wang 2010, Guo 2013). Sonikasyon öncesi sonosensitif ajan vermenin tümör hücreleri üzerinde ultrasonun tek başına yol açtığı apoptotik cevaptan daha fazla olduğu bildirilmiştir (Tachibana 2008). Tsuru ve ark (2012) yeni geliştirilen bir porfirin türevi sonosensitizör olan DEG ((7,12-bis(1-(2-(2-hidroksietoksi)etoksi)etil)-3,8,13,17-tetrametilporfirin-2,18-dipropiyonatmanganез) ile yaptıkları *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda SDT'den sonra sitotoksik etkiden başlıca membran lipid peroksidasyonu ile birlikte nekrozun sorumlu olduğunu ve



apoptozun bu aşamada etkili olmadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca apoptotik hücre sayılarının DEG ile yapılan *in vitro* SDT sonrası değişmediğini belirtmişlerdir. Buna karşılık Tang ve ark (2011) yaptıkları *in vivo* çalışmada, SDT uygulamasının ardından p53 gen aktivasyonuna bağlı olarak preapoptotik proteinlerin eksprese olduğunu ve hücrelerin apoptoza gittiklerini göstermişlerdir. Zhao ve ark. (2009) PpIX aracılı SDT'nin EAT hücrelerinde apoptotik etkileri araştırılmışlar ve hoechst boyama sonucu ultrasese veya PpIX'a maruz bırakılmayan kontrol grubu hücrelerinin uniform olarak mavi boyandığı ve apoptotik özellik göstermediği bildirilmiştir. Buna karşın 20  $\mu\text{M}$  PpIX ile inkübasyonunun ardından 1  $\text{W}/\text{cm}^2$  ultrases (1.34 MHz) uygulanan gruplarda 0, 2 ve dördüncü saatlerde inceleme yapıldığında SDT'nin hemen ardından hücrelerin kontrol grubuna benzer olarak apoptotik özellik göstermediği, buna karşın SDT uygulamasından sonraki 2. ve 4. saatte incelenen hücrelerin nükleuslarında nükleer fragmentasyonu işaret eden mavi parlak noktalar içerdikleri gösterilmiştir. Over kanseri hücreleri (HO-8910) 100  $\mu\text{M}$  metilen mavisi ile inkübe edilmelerinin ardından 0.46  $\text{W}/\text{cm}^2$  yoğunlukta ultrasese (1.7 MHz) 5 dakika maruz bırakılmış ve Hoechst boyamanın ardından alınan floresan mikroskopi görüntülerinde tek başına ultrases veya tek başına metilen mavisi uygulanan HO-8910 hücrelerinin apoptotik özellik göstermediği buna karşın metilen mavisi aracılı SDT uygulanan hücrelerde apoptotik cisimcikler bulunduğu bildirilmiştir (Xiang 2010).

Çalışmamızda EAT hücrelerinin SDT'ye bağlı hücre ölümünde apoptozun rolü araştırılmıştır. Buna göre kontrol grubu hücrelerin in HO/PI boyama sonucu apoptotik özellik göstermedikleri, tek başına ultrasesin uygulandığı gruba ait hücrelerde ise apoptotik özellik gösteren hücrelerin çok az sayıda olduğu gözlenmiştir. AICIPc (20  $\mu\text{M}$ ) aracılı SDT uygulamasının yapıldığı gruptaki hücrelerin anlamlı oranda apoptotik hücrelerden oluşurken tek başına AICIPc'nin böyle bir etkiye neden olmadığı görülmüştür. Benzer şekilde dosetakselin (1  $\mu\text{M}$ ) ultrasesle birlikte uygulamasının ardından yapılan incelemede hücrelerin çoğunun apoptotik özellikler göstermesine karşın tek başına dosetakselin bu oranda etki etmediği gözlenmiştir. Araştırmamızda hem AICIPc hem de dosetaksel aracılı SDT uygulamalarının EAT hücrelerinde apoptozu indükleyici etkisi olduğu gösterilmiştir. Dosetaksel aracılı SDT uygulamasının ardından hücre canlılık oranının çok fazla değişmemesi buna karşın hücrelerin iki saatlik inkübasyonunun ardından yapılan incelemede floresan mikroskopi görüntülerinde hücrelerin apoptotik özellik gösterdiği görülmüştür. Bu, dosetakselin hücreler üzerine etkisini daha fazla göstermesi için daha uzun inkübasyon süreleri (12-24 saat gibi) gerekebileceğini düşündürmektedir. Bu da EAT

hücrelerinde SDT uygulaması sonrası hücre ölümünde apoptozun etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Hücrede apoptozun başlaması için gerekli en kritik aşama apoptotik proteinlerin aktive olmasıdır (Zheng 2014). Kaspaz-3'ün aktive olması apoptozun tetiklenmesine neden olmaktadır (Sheridan 2010). Apoptozun tetiklenmesi daha az yan etkiye neden olması ve immün sistem açısından daha tercih edilen bir hücre ölümü şeklidir (Albert 2004, Feril 2005). Bazı çalışmalar SDT'nin mitokondri bağımlı bir yolağın da dahil olduğu çeşitli etkilerle apoptoza neden olduğunu öngörmektedir (Song 2011, Tang 2009). Dai ve ark. (2009) HMME aracılı SDT uygulamasının ardından C6 glioma hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Tang ve ark. (2010) S180 hücre süspansiyonuna ( $2 \times 10^6$  hücre/ml) Hp aracılı SDT uygulanmasının ardından diğer pro-apoptotik proteinlerle birlikte kaspaz-3'ün ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir.

Araştırmamızda SDT uygulaması sonrası EAT hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Buna göre, hem dosetaksel hem de AICIPc aracılı SDT uygulamaları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Ayrıca dosetaksel aracılı uygulaması tek başına dosetakselin verildiği grupla aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş, benzer olarak AICIPc aracılı SDT uygulanan gruptan elde edilen kaspaz-3/ $\beta$ -aktin verileri ile sadece AICIPc uygulanan gruptan elde edilen veriler arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır. Kaspaz-3'ün eksprese olması apoptozu tetiklediği için, SDT sonrası oluşan hücre ölümünde apoptozun etkili olduğunu düşündürmektedir.

## 5. SONUÇ

Yaptığımız bu çalışmada öncelikle AICIPc ve dosetaksel aracılı SDT uygulamasının EAT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve bu etkide apoptozun rolü araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre:

1. EAT hücreleri üzerine 2 cm mesafeden, 1MHz frekansta 0.5, 1, 1.5 ve 2 W/cm<sup>2</sup> yoğunlukta ultrases uygulanmıştır. Tek başına ultrases uygulamasının yapıldığı gruptaki hücre canlılığı oranlarıyla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.5).
2. EAT hücreleri üzerine tek başına AICIPc (5, 10, 15, 20 ve 25 µM) uygulanmış ve AICIPc uygulanan grupla kontrol grubu arasında hücre canlılığı bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.5)
3. Yapılan hücre canlılığı analizinde, EAT hücrelerinde AICIPc aracılı SDT uygulamasının ardından canlı hücre oranının azaldığı görülmüştür. Özellikle AICIPc 25 µM konsantrasyonda uygulandığı gruptaki hücrelerin yaklaşık %90'ı canlılıklarını kaybetmişlerdir.
  - a) AICIPc aracılı SDT uygulanan gruplarla sadece AICIPc verilen grup arasında hücre canlılığı oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p>0.001)
  - b) AICIPc aracılı SDT uygulamalarında EAT hücrelerinde üç farklı doz ultrases uygulandı ve ultrases yoğunluğu arttıkça hücre canlılığı oranlarının düştüğü belirlendi.
4. EAT hücrelerine AICIPc aracılı SDT uygulamasından iki saat sonra yapılan HO/PI boyama sonucunda SDT uygulanan hücreler apoptotik özellik göstermesine rağmen tek başına AICIPc'nin böyle bir etkisi saptanmamıştır.
5. AICIPc aracılı SDT uygulamasının yapıldığı hücrelerde kaspaz-3 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Bütün grupların EAT hücrelerinde kaspaz-3 ve β-aktine ait bantlar birbirine oranlanmıştır.
  - a) AICIPc aracılı SDT uygulamasının yapıldığı grup ile kontrol grubuna ait kaspaz-3/β-aktin oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p<0.001).

- b) AICIPc aracılı SDT uygulamasının yapıldığı grup ile sadece ultrases uygulanan gruba ait kaspaz-3/ $\beta$ -aktin oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.01$ ).
- c) AICIPc aracılı SDT uygulamasının yapıldığı grup ile sadece AICIPc uygulanan gruba ait kaspaz-3/ $\beta$ -aktin oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.5$ ).
6. Dosetakselin kullanıldığı SDT uygulamasında  $2 \text{ W/cm}^2$  US ve  $1\mu\text{M}$  dosetaksel uygulanan grubun EAT hücre canlılığının en az olduğu görülmüştür. Dosetakselin  $1.5 (**)$  ve  $2 \text{ W/cm}^2 (***)$  ultrasesle birlikte uygulandığı gruplarla tek başına dosetakselin uygulandığı gruplar arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (\*\* $p<0.01$ ;\*\*\*  $p<0.001$ ).
7. Gruplardaki hücrelerin Western blot analizi sonucu oluşturdukları kaspaz üç ve dosetaksel aracılı SDT uygulamasından iki saat sonra yapılan HO/PI boyama sonucunda SDT uygulanan EAT hücreleri apoptotik özellik gösterirken tek başına dosetakselin uygulandığı gruptakilerin büyük çoğunluğunun normal hücreler oldukları görülmüştür.
8. EAT hücrelerine üzeri dosetakselin US ile birlikte uygulandığında kaspaz-3'ü tek başına kullanıldığı gruptan daha fazla aktive ettiği görülmüştür.
- a) Dosetakselin ultrasesle birlikte uygulandığı grup ile kontrol grubuna ait kaspaz-3/ $\beta$ -aktin oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.5$ ).
- b) Dosetakselin ultrasesle birlikte uygulandığı grup ile tek başına dosetakselin uygulandığı gruba ait kaspaz-3/ $\beta$ -aktin oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.5$ ).

Sonuç olarak SDT uygulaması EAT hücreleri üzerinde hücre ölümünü tetiklediği gözlemlenmiştir. Ayrıca SDT uygulamasının kaspaz-3 miktarını arttırdığı görülmüş ve EAT hücrelerinde apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir. Fakat AICIPc'nin ve dosetakselin SDT uygulamalarında tümör hücreleri üzerine etki mekanizmalarının daha ayrıntılı açıklanabilmesi için farklı hücre hatları üzerinde ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç olduğu görüşüne varılmıştır.

## ÖZET

Sonodinamik terapi ultrasesin bir sonosensitizör veya kemoterapi ilacıyla birlikte kullanıldığı ve tümör hücrelerinde hücre ölümüne neden olan yeni ve umut vaadeden bir kanser terapisiidir.

Çalışmada AICIPc ve dosetaksel aracılı SDT'nin Ehrlich asit tümör hücrelerine etkileri araştırılmıştır. Bunun için tuzlu fosfat tamponuna alınan Ehrlich asit tümör hücreleri dosetaksel ve AICIPc'in varlığında 1MHz ultrasese 60 saniye boyunca maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığı tripan mavisi boyama testiyle değerlendirilmiştir. Hem AICIPc hem de dosetaksel aracılı SDTnin hücre ölümünü arttırdığı görülmüştür. Apoptoz değerlendirilmesi için HO/PI boyama yapılmış ve hücreler floresan mikroskopunda incelenmiştir. SDT uygulamasından iki saat sonra yapılan HO/PI boyama sonucunda SDT uygulanan hücreler apoptotik özellik göstermesine rağmen tek başına AICIPc veya dosetakselin böyle bir etkisi saptanmamıştır. Bunlara ek olarak kaspaz-3 düzeyini değerlendirmek için Western blotlama yapılmış. SDT uygulanan hücrelerde kaspaz-3 aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak SDT uygulaması EAT hücreleri üzerinde hücre ölümünü tetiklediği gözlemlenmiştir. Ayrıca SDT uygulamasının kaspaz-3 miktarını arttırdığı görülmüş ve EAT hücrelerinde apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir. Fakat AICIPc'nin ve dosetakselin SDT uygulamalarında tümör hücreleri üzerine etki mekanizmalarının daha ayrıntılı açıklanabilmesi için farklı hücre hatları üzerinde ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç olduğu görüşüne varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Kloralüminyum ftalosiyenin, dosetaksel, Ehrlich asit tümör, Sonodinamik Terapi, apoptoz

## SUMMARY

Sonodynamic therapy is a promising new cancer therapy which is used in combination with low intensity ultrasound and sonosensitizer or chemotherapy drugs and causing cell death in tumor cells.

In this study, effects of docetaxel and AICIPc-mediated SDT were investigated on Ehrlich ascites tumor cells (EAT). For this, taken into phosphate buffered saline, EAT cells were exposed for 60 seconds to 1 MHz ultrasound. Cell viability was assessed by trypan blue staining tests. Both AICIPc and docetaxel-mediated SDT appeared to increase cell death. For the evaluation of apoptosis HO / PI staining was performed and the cells examined in the fluorescence microscope. After two hours of AICIPc and docetaxel-mediated SDT application, cells had apoptotic bodies. In spite of this, among the cells which were treated with AICIPc or docetaxel alone, such an effect was not detected. In addition, to assess the level of caspase-3 Western immunoblotting was made. Caspase-3 activity in the cells treated with SDT, was found to be increased.

As a conclusion SDT application induced cell death on EAT cells was observed. In addition SDT application has been shown to increase the amount of caspase-3 and induce apoptosis on EAT cells. However, it is concluded that there is a need on the different cell lines and in vivo studies to explain the effects of AICIPc and docetaxel mediated-SDT applications on tumor cells in more detail.

**Keywords:** Chloroaluminum phthalocyanine, Docetaxel, Ehrlich Ascites Tumor, Sonodynamic Therapy, apoptosis

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın gerçekleşmesi sürecinde bilgisiyle beni yönlendiren, ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN'e, laboratuvarında çalışma imkanını veren Prof. Dr. Sema ERTUĞ'a, görüş ve bilgilerinden faydalandığım Doç. Dr. Ali ÖZMEN ve Yard. Doç. Dr. Özlem BOZKURT'a, Ehrlich asit tümör hücrelerini sağlayan Vet. Hek. Öznur İnan'a, deneysel çalışmalarım sırasında birlikte çalışma fırsatı bulduğum Serçin Özlem ve Vet. Hek. Serdar Aktaş ve Araş. Gör. Mehran Aksel'e ve Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman desteklerini hissettiğim aileme teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- Aktaş E (1996) *Ehrlich asit sıvısının L-hücrelerinin çoğalma hızına etkisi*. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.
- Albert ML (2004) *Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?*, Nature reviews Immunology, 4(3): 223–231.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. (2008) *Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes*, Pharm Res, 25(9): 2097-116. Baker KG, Robertson VJ, Duck FA (2001) *A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects*. Physical Therapy, 81, 1351–1358.
- Ball DJ, Wood SR, Vernon DI, Griffiths J, Dubbelman TMAR, Brown SB (1998) *The characterization of three substituted zinc phthalocyanines of differing charge for use in photodynamic therapy. A comparative study of their aggregation and photosensitising ability in relation to mTHPC and polyhaematoporphyrin*, J. Photochem. Photobiol. B: Biol, 45: 28–35.
- Bertram JS (2001) *The molecular biology of cancer*, Molecular Aspects of Medicine, 21: 167-223.
- Chen H, Zhou X, Gao Y, Zheng B, Tang F, Huang J (2014) *Recent progress in development of new sonosensitizers for sonodynamic cancer therapy*. Drug Discovery Today, 19(4): 502–9. doi:10.1016/j.drudis.2014.01.010.
- Cheng J, Sun X, Guo S, Cao W, Chen H, Jin Y, ... Tian Y, (2013) *Effects of 5-aminolevulinic acid-mediated sonodynamic therapy on macrophages*. International Journal of Nanomedicine, 8, 669–76.
- Dai S, Hu S, Wu C (2009) *Apoptotic effect of sonodynamic therapy mediated by hematoporphyrin monomethyl ether on C6 glioma cells in vitro*, Acta Neurochirurgica, 151: 1655–1661.
- Didenko YT, McNamara WB, Suslick KS (1999) *Hot spot conditions during cavitation in water*, Journal of the American Chemical Society, 121: 5817–5818.
- Didenko YT, McNamara WB, Suslick KS (1999) *Molecular emission from single-bubble sonoluminescence*, Nature, 407: 877-879.
- Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK (2003) *Photodynamic therapy for cancer*, Nature, 3: 380-387.
- Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK (2003) *Photodynamic therapy for cancer*, Nat Rev Cancer, 3: 380-387.
- Dubuc C, Langlois R, Benard F, Cauchon N, Klarskov K, Tone P, Lier JEV (2008) *Targeting gastrin-releasing peptide receptors of prostate cancer cells for photodynamic therapy with a phthalocyanine–bombesin conjugate*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 18: 2424–2427.



- Dy GK, Adjei AA (2013) *Understanding, recognizing, and managing toxicities of targeted anticancer therapies*, CA Cancer J Clin, 63: 249-79.
- Ekinci G (2000) *Katı Ehrlich ascites tümörünün büyüme kinetiği*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Feril LB, Kondo T, Cui ZG, Tabuchi Y, Zhao QL, Ando H, Umemura S (2005) *Apoptosis induced by the sonomechanical effects of low intensity pulsed ultrasound in a human leukemia cell line*, Cancer Letters, 221(2): 145–152.
- Gaeta J F (2000) *Trauma and inflammation*, Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, et al.(eds) Holland-Frei Cancer Medicine (5th ed.). Hamilton, Ontario: B.C. Decker.
- Guo S, Sun X, Cheng J, Xu H, Dan J, Shen J, ... Tian Y (2013) *Apoptosis of THP-1 macrophages induced by protoporphyrin IX-mediated sonodynamic therapy*, International journal of nanomedicine, 8: 2239–46.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) *Global cancer statistics: CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61: 69–90
- Jin H, Zhong X, Wang Z, Huang X, Ye H, Ma S, ... Cai J (2011) *Sonodynamic effects of hematoporphyrin monomethyl ether on CNE-2 cells detected by atomic force microscopy*, Journal of cellular biochemistry, 112(1): 169–78.
- Kajimura T, Satoh H, Nomura M (1997) *Effect of hyperprolactinemia induced by neuroleptic agent, timiperone, on porphyrin content of mouse harderian gland*, The Journal of toxicological sciences, 22: 219–229.
- Kolarova H, Tomankova K, Bajgar R, Kolar P, Kubinek R (2009) *Photodynamic and sonodynamic treatment by Phthalocyanine on cancer cell lines*, Ultrasound in Med. & Biol., 35(8): 1397-1404.
- Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D (2000) *Infections as a major preventable cause of human cancer*, J Intern Med, 248: 171-83.
- Kuroki M, Hachimine K, Abe H, Shibaguchi H, Kuroki M, Maekawa S, Yamashita Y (2007) *Sonodynamic therapy of cancer using novel sonosensitizers*. Anticancer Research, 27: 3673–3677.
- Kushi, LH, Byers T, Doyle C, Bandera EV, McCullough M, Gansler T, Andrews KS, Thun MJ, (2006) *American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity*, CA: a cancer journal for clinicians, 62(1): 30–67.
- LaMuraglia GM, Schiereck J, Heckenkamp J, Nigri G, Waterman P, Leszczynski D, Kossodo S (2000) *Photodynamic therapy induces apoptosis in intimal hyperplastic arteries*, The American journal of pathology, 157(3): 867–75.
- Li JH, Song DY, Xu YG, Huang Z, Yue W (2008) *In vitro study of haematoporphyrin monomethyl ether-mediated sonodynamic effects on C6 glioma cells*, Neurol. Sci., 29: 229-35.

- Li JH, Yue W, Huang Z, Chen ZQ, Zhan Q, Ren FB, ... Fu SB (2011) *Calcium overload induces C6 rat glioma cell apoptosis in sonodynamic therapy*, International journal of radiation biology, 87(10): 1061–6.
- Li Q, Liu Q, Wang P, Feng X, Wang H, Wang X (2014) *The effects of Ce6-mediated sonodynamic therapy on cell migration, apoptosis and autophagy in mouse mammary 4T1 cell line*, Ultrasonics, 54(4): 981–9.
- Liang L, Xie S, Jiang L, Jin H, Li S, Liu J (2013) *The combined effects of hematoporphyrin monomethyl ether-SDT and doxorubicin on the proliferation of QBC939 cell lines*, Ultrasound in Medicine & Biology, 39(1): 146–60.
- Lichtenstein PI, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K (2000) *Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland*, N Engl J Med, 343(2): 78-85.
- Liu MO, Tai C, Sain M, Hu AT, Chou F (2004), *Photodynamic applications of phthalocyanines*, J Photochem Photobiol A Chem, 165: 131–136,
- Liu Q, Li X, Xiao L, Wang P, Tang W (2008) *Sonodynamically induced antitumor effect of hematoporphyrin on Hepatoma 22*. Ultrasonics sonochemistry, 15(6): 943–8
- Liu Q, Wang X, Wang P, Xiao L (2007) *Comparison between sonodynamic effect with protoporphyrin IX and hematoporphyrin on sarcoma 180*, Cancer chemotherapy and pharmacology, 60(5): 671–80.
- Liu Q, Wang X, Wang P, Xiao L (2007) *Sonodynamic antitumor effect of protoporphyrin IX disodium salt on S180 solid tumor*, Chemotherapy, 53: 429–436.
- Manso C, Sugiura K, Wroblewski F (1958) *Glutathione reductase and lactic dehydrogenase activities of tissues of rodents with transplanted tumors*. Cancer Research, 18: 682-687.
- Martinez JD, Parker MD, Fultz KE, Ignatenko NA, Gerner EW (2003) *Molecular Biology of Cancer*, John Wiley&Sons, Inc, Chapter One, p. 1-50, Arizona.
- Miller D L (2007) *Overview of experimental studies of biological effects of medical ultrasound caused by gas body activation and inertial cavitation*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 93(1-3), 314–30.
- Milowska K, Gabryelak T (2007) *Reactive oxygen species and DNA damage after ultrasound exposure*, Biomol. Eng., 24: 263–267.
- Milowska K, Gabryelak T (2008) *Enhancement of ultrasonically induced cell damage by phthalocyanines in vitro*, Ultrasonics, 48(8): 724–30.
- Miyoshi N (2003) *Correlation between sonochemistry of surfactant solutions and human leukemia cell killing by ultrasound and porphyrins*, Free Radic Biol Med, 34(6): 710-719. doi:10.1016/S0891-5849(02)01428-4.

- Miyoshi N, Misik V, Riesz P (1997) *Sonodynamic toxicity of gallium-porphyrin analogue ATX-70 in human leukemia cells*, *Radiat Res*, 148(1): 43-7.
- Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC (1998) *Lippincott's illustrated reviews serisinden*, *Farmakoloji*.
- Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC (1998) *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden*, *Farmakoloji*.
- Nunes SMT, Sguilla FS, Tedesco AC (2004) *Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminium phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives*, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37: 273–284.
- O'Brien WD (2007) *Ultrasound-biophysics mechanisms*, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 93(1-3): 212–55.
- Oláh E (2005) *Basic concepts of cancer: genomic determination*, *The Journal of The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 16(2).
- Pogue B W, Pitts J D, Mycek M, Sloboda R D, Wilmot C M, Brandsema J F, O'Hara J (2001). *In vivo NADH fluorescence monitoring as an assay for cellular damage in photodynamic therapy*. *Photochemistry and Photobiology*, 74(6),
- Rosenthal I, Sostaric JZ, Riesz P (2004) *Sonodynamic therapya review of the synergistic effects of drugs and ultrasound*, *Ultrason Sonochem*, 11: 349-363. doi:10.1016/j.ultsonch.2004.03.004.
- Roukos DH (2009) *Genome-wide association studies: how predictable is a person 's cancer risk?* *Expert Rev Anticancer Ther*, 9: 389–392.
- Samaras V, Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Peppas G, Matthew E (2010) *Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review*. *Sasco, A. J., Secretan, M. B., & Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer a brief review of recent epidemiological evidence*, 2, 3–9.
- Sharman W, Allen C, van Lier JE (1999) *Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications*. *Drug Discov Today*, 4: 507-517.
- Sheridan C, Martin JS (2010) *Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis*, *Mitochondrion* 10(6): 640–648.
- Siu T, Jackson J, Burt H, Chiao M (2007) *Drug Uptake Enhancement Using Sonodynamic Effects at 4 MHz — A Potential Application for micro-ultrasonic transducers*, *IEEE Transactions On Biomedical Engineering*, 54(6), 1153–1156.
- Song W, Cui H, Zhang R, Zheng J, Cao W (2011) *Apoptosis of SAS cells induced by sonodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid sonosensitizer*, *Anticancer Research*, 31(1): 39–46.
- Su X, Wang P, Wang X, Cao B, Li L, Liu Q (2013) *Apoptosis of U937 cells induced by hematoporphyrin monomethyl ether-mediated sonodynamic action*, *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 28(3): 207–17.

- Suzuki N, Okada K, Chida S, Komori C, Shimada Y, Suzuki T. (2007) *Antitumor effect of acridine orange under ultrasonic irradiation in vitro*, *Anticancer research*, 27(6B): 4179–84.
- Tachibana K, Feril LB, Ikeda-Dantsuji Y (2008) *Sonodynamic therapy*, *Ultrasonics*, 48: 253-259.
- Tachibana K, Kimura N, Okamura M, Eguchi H, Tachibana S (1993) *Enhancement of cell killing of HL-60 cells by ultrasound in the presence of the photosensitizing drug Photofrin II*, *Cancer Lett.*, 72: 195–199.
- Tang W, Liu Q, Wang X (2009) *Potential mechanism in sonodynamic therapy and focused ultrasound induced apoptosis in sarcoma 180 cells in vitro*, *Ultrasonics* 49(8): 786–793.
- Tang W, Liu Q, Zhang J, Cao B, Zhao P, Qin X (2010). *In vitro activation of mitochondria-caspase signaling pathway in sonodynamic therapy-induced apoptosis in sarcoma 180 cells*. *Ultrasonics*, 50(6), 567–76.
- Tang W, Fan W, Liu Q, Zhang J, Qin X (2011) *The role of p53 in the response of tumor cells to sonodynamic therapy in vitro*, *Ultrasonics*, 51(7): 777–85.
- Taşkın Eİ (2002) *Ehrlich ascites tümörü ile Balb-C farelerde oluşturulmuş solid tümör modelinde curcuminin apoptoz üzerine etkileri*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Tata DB, Biglow J, Wu J, Triton TR, Dunn F (1996) *Ultrasound-enhanced hydroxyl radical production from two clinically employed anti-cancer drugs, adriamycin and mitomycin C*, *Ultrason. Sonochem*, 3: 39–45.
- Tata DB, Dunn F, Tindall DJ (1997) *Selective clinical ultrasound signals mediate differential gene transfer and expression in two human prostate cancer cell lines: LnCap and PC-3*, *Biochem Biophys Res Commun*, 234(1): 64-7.
- Tian, Z., Quan, X., Xu, C., Dan, L., Guo, H., & Leung, W. (2009) *Ether Enhances the Killing Action of*. , 2: 1695–1702.
- Tomankova K, Kolarova H, Kolar P, Kejlova K, Jirova D (2009) *Study of cytotoxic effect of photodynamically and sonodynamically activated sensitizers in vitro*, *Toxicology in vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 23(8): 1465–71.
- Tsuru, H., Shibaguchi, H., Kuroki, M., Yamashita, Y., & Kuroki, M. (2012) *Tumor growth inhibition by sonodynamic therapy using a novel sonosensitizer*, *Free Radical Biology & Medicine*, 53(3): 464–72.
- Umemura K, Yumita N, Nishigaki R, Umemura S (1996) *Sonodynamically induced antitumor effect of pheophorbide a*, *Cancer Lett.*, 102: 151-7.
- Umemura S, Yumita N, Nishigaki R, Umemura K (1990) *Mechanism of cell damage by ultrasound in combination with hematoporphyrin*, *Jpn J Cancer Res*, 81: 962-966.

- Umemura S, Yumita N, Umemura K, Nishigaki R (1999) *Sonodynamically induced effect of rose bengal on isolated sarcoma 180 cells*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 43: 389-93.
- Umemura S, Yumita N, Nishigaki R, Umemura K (1990) *Mechanism of cell damage by ultrasound in combination with hematoporphyrin*, *Japanese journal of cancer research, Gann*, 81: 962–966.
- Wang XB, Liu QH, Wang P, Zhang K, Tang W, Wang BL (2008) *Enhancement of Apoptosis by Sonodynamic Therapy with Protoporphyrin IX in Isolate Sarcoma 180 Cells*, *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 23(2): 238-46.
- Wang P, Wang X, Liu Q, Zhao X, Cao B, Zhao P (2010) *Comparision between sonodynamic effects with protoporphyrin IX and hematoporphyrin on the cytoskeleton of Ehrlich ascites carcinoma cells*, *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 25: 55–64.
- Wang X, Liu Q, Wang P, Wang Z, Tong W, Zhu B, ... Li C (2009) *Comparisons among sensitivities of different tumor cells to focused ultrasound in vitro*, *Ultrasonics*, 49(6-7): 558–64.
- Wang, X, Wang Y, Wang P, Cheng X, Liu Q (2011) *Sonodynamically induced anti-tumor effect with protoporphyrin IX on hepatoma-22 solid tumor*, *Ultrasonics*, 51(5): 539–46.
- Wang X, Wang Y, Wang P, Cheng X, Liu Q (2011) *Sonodynamically induced anti-tumor effect with protoporphyrin IX on hepatoma-22 solid tumor*, *Ultrasonics*, 51(5): 539–46.
- Wang X, Leung AW, Jiang Y, Yu H, Li X, Xu C (2012) *Hypocrellin B- mediated sonodynamic action induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells*. *Ultrasonics*, 52(4), 543–6.
- Xiang J, Xia X, Jiang Y, Leung AW, Wang X, Xu J, ... Xu C (2011) *Apoptosis of ovarian cancer cells induced by methylene blue-mediated sonodynamic action*, *Ultrasonics*, 51(3): 390–5.
- Yu T, Wang Z, Jiang S (2001) *Potentiation of cytotoxicity of adriamycin on human ovarian carcinoma cell line 3AO by low-level ultrasound*, *Ultrasonics*, 39(4): 307–309.
- Yu T, Wang Z, Mason TJ (2004) *A review of research into the uses of low level ultrasound in cancer therapy*, *Ultrason Sonochem*, 11(2): 95-103.
- Yu T, Wang Z, Mason TJ (2004) *A review of research into the uses of low level ultrasound in cancer therapy*, *Ultrasonics sonochemistry*, 11(2): 95–103.
- Yu T, Wang Z, Mason TJ (2004) *A review of research into the uses of low level ultrasound in cancer therapy*. *Ultrasonics sonochemistry*, 11(2): 95–103.
- Yumita N, Kawabata K, Sasaki K, Umemura S (2002) *Sonodynamic effect of erythrosin B on sarcoma 180 cells in vitro*, *Ultrason Sonochem*, 9(5): 259-65.

- Yumita N, Nishigaki R, Umemura K (1989) *Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound*, Jpn. J. Cancer Res., 80: 219–222.
- Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, Umemura S (1990) *Synergistic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180*, J. Jpn. Cancer Res., 81: 30-08.
- Yumita N, Sasaki K, Umemura S, Nishigaki R (1996) *Sonodynamically induced antitumor effect of a gallium-porphyrin complex, ATX-70*, Jpn. J. Cancer Res., 87: 310-6.
- Yumita N, Umemura S (2004a) *Sonodynamic antitumour effect of chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate on murine solid tumour*, J Pharm Pharmacol, 56: 85–90.
- Yumita N, Umemura S (2004b) *Ultrasonically induced cell damage and membrane lipid peroxidation by photofrin II: mechanism of sonodynamic activation*, J. Med. Ultrason, 31: 35–40.
- Yumita N, Kawabata K, Sasaki K, Umemura S (2002) *Sonodynamic effect of erythrosin B on sarcoma 180 cells in vitro*, Ultrasonics sonochemistry, 9(5): 259–65.
- Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, Umemura S (1989) *Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound*. Japanese journal of cancer research, Gann, 80: 219–222.
- Yumita N, Okudaira K, Momose Y, Umemura SI (2010) *Sonodynamically induced apoptosis and active oxygen generation by gallium-porphyrin complex, ATX-70*, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 66: 1071–1078.
- Yumita N, Sakata I, Nakajima S, Umemura S (2003) *Ultrasonically induced cell damage and active oxygen generation by 4-formyloximeethylidene-3-hydroxyl-2-vinyl-deuterio-porphyrin IX-6-7-diaspartic acid: on the mechanism of sonodynamic activation*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1620(1-3): 179–184.
- Zeybek ŞÜ (1996) *En uygun Ehrlich ascites tümör modellerinin farklı soy ve cinsiyetteki farelerde gösterilmesi*. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Zhao X, Liu Q, Tang W, Wang X, Wang P, Gong L, Wang Y (2009) *Damage effects of protoporphyrin IX - sonodynamic therapy on the cytoskeletal F-actin of Ehrlich ascites carcinoma cells*, Ultrasonics sonochemistry, 16(1): 50–6.
- Zheng L, Sun X, Zhu X, Lv F, Zhong Z, Zhang F, ... Tian Y (2014) *Apoptosis of THP-1 derived macrophages induced by sonodynamic therapy using a new sonosensitizer hydroxyl acetylated curcumin*, PloS one, 9(3): p.e93133.
- Zhu B, Liu Q, Wang Y, Wang X, Wang P, Zhang L, Su S (2010) *Comparison of accumulation, subcellular location, and sonodynamic cytotoxicity between hematoporphyrin and protoporphyrin IX in L1210 cells*, Chemotherapy, 56: 403–410.

## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Osmaniye'de doğdu ve ilköğretim ve liseyi Osmaniye'de tamamladı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümünden 2009 yılında mezun oldu. 2011 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim dalında Araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. 2012 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.