



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**MALİGN MELANOM KANSER KÖK HÜCRESİNE
DÜŞÜK YOĞUNLUKLU KESİKLİ ULTRASON
UYGULANMASI SONRASI OTOFAJİ VE
APOPTOZİSİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Doktora Tezi

Ömer DİKİCİ

Kök Hücre Anabilim Dalı Adı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**MALİGN MELANOM KANSER KÖK HÜCRESİNE
DÜŞÜK YOĞUNLUKLU KESİKLİ ULTRASON
UYGULANMASI SONRASI OTOFAJİ VE
APOPTOZİSİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

ÖMER DİKİCİ

Danışman
Prof. Dr Hüseyin AKTUĞ

Kök Hücre Anabilim Dalı
Doktora Programı

İzmir
2023

Tez Deęerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan (Danışman) :

Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ

Üye :

Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

Üye :

Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM

Üye :

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

Üye :

Prof. Dr. Meltem KURUŞ

Üye :

Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Bu çalışmada terapötik ultrason ile elde edilen mekanik gücün kanser kök hücreler üzerine olan etkisini araştırdık. Bu tez ile birlikte uzun yıllardır Fizik Tedavi alanında ağrı için kullanılan, benim hastalarımın hemen her gün reçete ettiğim terapötik ultrasonu kök hücreler üzerine kullanma fırsatım oldu. Hatta kanser tanısı olan hastalara sakıncalı görüp uygulamadığımız bu terapötik ultrasonu laboratuvarında kanser kök hücrelerine uyguladık ve elde edeceğimiz sonuçlar için heyecanlandık.

Tıp alanında “dejenere olan veya ölen hücrelerin kök hücreler ile yenilenmesi” fikri çalıştığım alan Fizik Tedavi için bende yeni ufuklar açıyordu. Çünkü her gün dejenere olan kıkırdak-kas-tendon ve hasarlı sinir dokuyla uğraşıyordum. Kök hücre bu alanda bir umuttu. Bu nedenle kök hücreleri ve onların dünyasını öğrenme isteğiyle 2018 yılında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre programına başladım. Tıp fakültesindeyken aldığım hücreler ile ilgili derslerin üzerinden yaklaşık 15 yıl geçmişti. Yıllar sonra tekrar hücrelerin dünyasına dalmak özellikle de kök hücrelerin dünyasına dalmak daha doğrusu işin “mutfağına girmek” beni oldukça heyecanlandırıyordu. Kök hücrelerle ilgili etrafta o kadar çok bilim dışı, yalan yanlış bilgi vardı ki derslerde okudukça, öğrendikçe, tartışıkça bu konu benim için daha netleşiyordu. Her şey benim için netleştikçe de bu alanda daha çok şeyi öğrenmeye ihtiyacım olduğunu düşünüyordum. Kendi alanım için farklı olabilecek bu tezi tamamlayabildiğim için çok mutluyum. Böylece hayatımda bir dönemin daha sonuna geldim ama bilimin ışığında yürümek, öğrenmek, heyecanlanmak benim için devam edecek.

Tez çalışmamda planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 15.02.2023

Ömer DİKİCİ

Özet

Malign Melanom Kanser Kök Hücrelerine Düşük Yoğunluklu Kesikli Ultrason Uygulanması Sonrası Otofaji ve Apoptozisin Değerlendirilmesi

Giriş: Kanser kök hücreleri tümörün başlatılmasına ve büyümesine, radyasyona, kimyasal ajanlara ve apoptozise dirençli hücrelerdir. Malign melanom (MM) diğer kanser türlerine göre oldukça fazla kanser kök hücresi içerir. Ayrıca diğer cilt kanserlerine göre daha az görülmesine rağmen agresif seyreder. MM'un erkenden tespit edilip tedavi edilmesi oldukça önemlidir, ancak cerrahi yapılan hastalarda bile erken dönem de nüksler meydana gelebilir. Bu nedenle cerrahi sonrası kemoterapötik tedaviler kullanılır. Kemoterapötiklere karşı direnç gelişmesi, bu ilaçların yan etkileri ve yüksek maliyetleri olması sorun oluşturmaktadır.

Son yıllarda terapötik ultrasonun kanser tedavisinde kullanımı önem kazanmaktadır. Ses dalgaları ile hücre membranında sonoporasyon oluşturulur. Böylece terapötik ultrason kullanılarak ilaçların hücre içerisine girişi artırılır. Sonuçta hem ilaçların etkinliği artırılmış hem de ilaçlara karşı direnç gelişiminin önüne geçilmiş olur. Ayrıca terapötik ultrason ile kanser hücrelerinde apoptozisin ve otofajinin aktive edildiğinin gösterilmesi kanser tedavisi için oldukça önemlidir. Kanser hücresinde aktive edilen apoptozis ve otofajinin kanser kök hücresinde özellikle de MM kanser kök hücresinde elde edilebilmesi MM'un nüksünün, metastazının ve kemoterapötiklere karşı gelişecek direncin önlenmesini sağlayacaktır. Düşük yoğunluklu kesikli ultrasonun (LİPUS) düşük yan etki profili, düşük maliyeti ve yüksek etkinliği olması nedeniyle kanser tedavisinde tercih edilebileceğini gösteren çalışmalar vardır. Ancak LİPUS'un kanser kök hücreleri üzerine etkisini araştıran çalışma sayısı oldukça azdır. Bu çalışmadaki amacımız LİPUS uygulaması sonrası MM kanser kök hücrelerinde meydana gelebilecek apoptozis ve otofajinin gözlenerek MM kanser hücreleri ile karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: MM kanser kök hücresi (CD133+) ve MM kanser hücresi (CD133-) olmak üzere iki grup oluşturuldu. CD133+ ve CD133- hücre platelerine 1 Mhz, %20 duty cycle, 1 w/cm² LİPUS 1-5-10 dk olmak üzere uygulandı. Her iki grubun LİPUS

öncesi (0 dk) ve LİPUS sonrası 1-5-10 dk olmak üzere Casp 3-Casp 8 (apotozis), mTOR-LC3 (otofaji) boyamaları yapıldı.

Sonuçlar: Her iki grupta başlangıca göre 1-5-10 dk LİPUS uygulama sonrası Casp 3-Casp 8 ve mTOR-LC3 aktivitelerinde artış saptandı. Casp 3 ve mTOR 5 dakika LİPUS uygulama sonrası, LC3'te 10 dakika LİPUS uygulama sonrası CD133+ grupta istatistiksel olarak daha fazlayken, Casp 3 1 dakika LİPUS uygulama sonrası, LC3'te 5 dakika LİPUS uygulama sonrası CD133- grupta göre istatistiksel olarak daha fazlaydı.

Tartışma: LİPUS uygulama sonrası MM kanser kök hücrelerinde apoptozis ve otofaji aktivitesi artmıştır. Ayrıca bu sonuçlara göre bu etkiyi elde etmek için MM kanser kök hücrelerine LİPUS uygulama süresi MM kanser hücrelerine göre daha uzun olmalıdır.

Anahtar Kelimeler; Kaspaz 3; LC3; Kanser Kök Hücresi; LİPUS; Melanom

Abstract

Evaluation of Autophagy and Apoptosis after Low Intensity Intermittent Ultrasound Application to Malignant Melanoma Cancer Stem Cell

Introduction: Cancer stem cells are resistant to tumor initiation and growth, radiation, chemical agents and apoptosis. Malignant melanoma (MM) includes much more cancer stem cells than other cancer. In addition, although it is less common than other skin cancers, its prognosis is an aggressive. Early diagnosis and treatment of MM is very important, but recurrences may occur even in patients who have surgery. Therefore, chemotherapeutic treatments are administered after surgery. The drug resistance, side effects and high costs of these chemotherapeutics pose problems. The use of therapeutic ultrasound in cancer treatment has become crucial in recent years. Sonoporation is constituted in the cell membrane with sound waves. Thus the penetration of drugs into the cell is increased by using therapeutic ultrasound. As a result, the use of therapeutic ultrasound both increases the drug activity and prevents the drug resistance. In addition, that apoptosis and autophagy are activated in cancer cells by therapeutic ultrasound is very important for cancer treatment. The apoptosis and autophagy are activated in cancer cells to be activated in cancer stem cells, especially in MM cancer stem cells, will prevent MM recurrence, metastasis and chemotherapeutics resistance. There are studies reported that low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) can be preferred in cancer treatment due to its low side-effect profile, low cost and high efficiency. However, the number of studies investigating the effect of LIPUS on cancer stem cells is very few. Our aim in this study is to observe the apoptosis and autophagy that may occur in MM cancer stem cells after LIPUS application and compare the results with MM cancer cells.

Materials and Methods: There are two groups which MM cancer stem cell (CD133+) and MM cancer cell (CD133-). LIPUS that 1 Mhz, 20% duty cycle, 1 w/cm² was applied to CD133+ and CD133- cell plates for 1-5-10 minutes. Both groups Casp 3- Casp 8 (apoptosis), mTOR-LC3 (autophagy) stainings were performed before (0 min) and after (1-5-10 mins) LIPUS.

Results: In both groups, Casp3-Casp8 and mTOR-LC3 activities were increased after 1-5-10 minutes of LIPUS application compared to baseline. Casp 3 and mTOR were statistically higher after 5 minutes and LC3 was statistically higher 10 minutes of LIPUS application in the CD133+ group, while Casp 3 was statistically higher after 1 minute and LC3 was statistically higher 5 minutes of LIPUS application in the CD133-group.

Discussion: The apoptosis and autophagy activities were increased in MM cancer stem cells after LIPUS application. In addition, according to these results, the application time of LIPUS to MM cancer stem cells should be longer than to MM cancer cells in order to achieve this effect.

Keywords; Cancer Stem Cell; Caspase 3; LC3; LIPUS; Melanoma



İçindekiler

Önsöz	II
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini	X
Grafikler Dizini	XI
Kısaltma Listesi	XII
Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	2
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	2
Genel Bilgiler	3
2.1. Malign Melanom	3
2.2. Kök Hücreler	4
2.2.1. Kanser Kök Hücresi.....	4
2.2.2. Malign Melanom Kanser Kök Hücresi	5
2.3. Hücre Ölüm Modaliteleri	5
2.3.1. Apoptozis.....	6
2.3.1.1. İntrinsik apoptozis	6
2.3.1.2. Ekstrinsik Apoptozis.....	7
2.3.2. Otofaji.....	7
2.4. Mekanik Güçlerin Kök Hücre Davranışı Üzerine Etkisi	8
2.4.1. Terapötik Ultrason.....	8
2.4.2. Düşük Yoğunluklu Kesikli Ultrason	9
Gereç ve Yöntem	10
3.1. Araştırmanın Tipi	10
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	10

3.3.	Çalışmada Kullanılan Cihazlar	10
3.4.	Hücre Kültürü Uygulamaları.....	13
3.4.1.	Hücrelerin genel protokole uygun kültüre edilmesi	13
3.4.2.	Hücre Pasajı.....	13
3.4.3.	Hücre Sayımı	13
3.5.	Deney Grupları.....	15
3.6.	Floresanla Aktive Hücre Ayırma Yöntemi Kullanılarak CD133+ Kanser Kök Hücrelerinin Toplanması.....	16
3.7.	Kanser Kök Hücre Hattının Üretilmesi	16
3.8.	Hücre Sayımı	16
3.9.	LİPUS Uygulaması.....	17
3.10.	İmmünofloresan Öncesi Hazırlıklar.....	20
3.10.1.	Triton-X100 Hazırlanması	20
3.10.2.	Sığır Serum Albümin Hazırlanması.....	21
3.10.3.	Hücrelerin İmmünofloresan Boyama İçin Hazırlanması.....	21
3.10.4.	İmmünofloresan Boyama	21
	Bulgular.....	23
4.1.	Kanser Kök Hücresi İzolasyonu Bulguları.....	23
4.1.1.	CD 133+ Hücre İzolasyonu Bulguları	23
4.2.	İmmünofloresan Boyama Sonuçları.....	25
4.2.1.	Apoptozis.....	25
4.2.1.1.	Kaspaz 3 boyama sonuçları.....	25
4.2.1.2.	Kaspaz 8 boyama sonuçları.....	28
4.2.2.	Otofaji.....	31
4.2.2.1.	mTOR boyama sonuçları	31
4.2.2.2.	LC3 boyama sonuçları.....	34
	Tartışma	37
	Sonuç ve Öneriler	41
	Kaynaklar	42
	Teşekkür	49
	Özgeçmiş	50

Tablolar Dizini

Tablo 1: Çalışmada kullanılan cihazların isimleri ve işlevleri.....	11
----------------------------------------------------------------------------	----



Şekiller Dizini

Şekil 1: Ultrason cihazı ve probu	12
Şekil 2: Laboratuvar çalışmaları	14
Şekil 3: Çalışma grupları	15
Şekil 4: 6 kuyucuklu polistiren tabakalar	18
Şekil 5: Probu yerleştirilmesi	19
Şekil 6: Ultrason uygulaması sırasında görülen titreşimler	20
Şekil 7: Akış sitometresi	24
Şekil 8: CD133+ ve CD133- grupların Casp 3 proteini immünfloresan boyama görüntüleri	27
Şekil 9: CD133+ ve CD133- grupların Casp 8 proteini immünfloresan boyama görüntüleri	30
Şekil 10: CD133+ ve CD133- grupların mTOR proteini immünfloresan boyama görüntüleri	33
Şekil 11: CD133+ ve CD133- grupların LC3 proteini immünfloresan boyama görüntüleri	36

Grafikler Dizini

Grafik 1: Casp 3 protein ışımlarının gruplar arası karşılaştırma grafiği	26
Grafik 2: Casp 8 protein ışımlarının gruplar arası karşılaştırma grafiği	29
Grafik 3: mTOR protein ışımlarının gruplar arası karşılaştırma grafiği	32
Grafik 4: LC3 protein ışımlarının gruplar arası karşılaştırma grafiği	35



Kısaltma Listesi

ATG	: Otofaji İlişkili Genler
BSA	: Sığır Serum Albümini
Casp 3-8	: Kaspaz 3-8
CDKN2A	: Siklin Bağımlı Kinaz 2A
DR	: Death Receptors
FACS	: Floresan Aktif Ayırma Yöntemi
KIT	: Tirozin Protein Kinaz KIT
LC3	: Light Chain 3
LİPUS	: Düşük Yoğunluklu Kesikli Ultrason (Low Intensity Pulsed Ultrasound)
Mhz	: Mega Hertz
MITF	: Mikroftalmia Transkripsiyon Faktörü
MM	: Malign Melanom
mTOR	: Mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1-2	: mTOR Kompleksi 1-2
PFA	: Paraformaldehid
TNFR1	: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1
UV	: Ultraviyole

Giriş

Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize bir hastalıktır. Aynı zamanda tek bir dokuda çoğalabildiği gibi uzak dokulara da yayılarak etkisini gösterir. Bazı standart yaklaşımlar olsa da kanseri tek bir hastalıkmiş gibi tanımlamak doğru olmaz. Her kanser türü farklıdır hatta her insanın farklı DNA'lara sahip olmasından dolayı kanseri de kendine özgüdür. Bu yüzden kansere yaklaşım karmaşık hale gelmektedir.

Kanser, tıp alanındaki gelişmelere rağmen halen dünya ülkelerinin çoğunda önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır.

İnsan malign melanomu (MM), konvansiyonel tedavilere belirgin şekilde dirençli olan oldukça metastatik bir kanserdir. Malign melanom teşhisi konan hastaların hayatta kalma oranı son on yılda önemli ölçüde iyileşmiş olsa da melanom nedeniyle yaşam boyu risk ve genel ölüm oranı her yıl artmaktadır. Melanom heterojen hücre gruplarından oluşur ve diğer kanser türlerine göre oldukça fazla kanser kök hücresi içerir. Kanser kök hücreleri kök hücre özellikleri bakımından normal kök hücrelere benzerdirler. Bununla birlikte kanser kök hücreleri tümörün başlatılmasına, büyümesine ve radyasyona, kimyasal ajanlara ve apoptozise dirençli olmasıyla normal kök hücrelerden ayrılır. Kanser tedavisinde hücrelerde apoptozisin ve otofajinin aktive edilebilmesi oldukça önemlidir. Ses dalgalarının (ultrason) uygulandığı çalışmalarda kanser hücrelerinde apoptozisin ve otofajinin aktive edildiği ortaya konulmuştur. Ancak ultrasonun kanser kök hücreleri üzerine etkisini araştıran çalışma sayısı azdır.

1.1. Araştırmanın Problemi

Düşük yoğunluklu kesikli ultrason (LİPUS) uygulamasının kanser kök hücresi ve normal kanser hücresi üzerine karşılaştırmalı olarak ne düzeyde etki gösterdiğinin netleştirilmesidir.

1.2. Araştırmanın Sorusu

LİPUS uygulaması MM kanser kök hücresi üzerine olan etkisi bu hücreleri MM kanser hücrelerine yaklaştırır mı?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

LİPUS uygulaması MM kanser kök hücresi üzerine olan etkisi bu hücreleri MM kanser hücrelerine yaklaştırır.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

LİPUS uygulaması ile MM kanser kök hücre ve MM kanser hücrelerinde apoptozis ve otofaji aktive olur.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Hücre kültürü (*in vitro*) çalışması olması ve LİPUS uygulamasında doz-zaman-siklus-sıklık standartının olmamasıdır.

1.6. Araştırmanın Amacı

LİPUS uygulaması sonrası MM kanser kök hücrelerinde meydana gelebilecek apoptozis ve otofajinin gözlenerek MM kanser hücreleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Genel Bilgiler

2.1. Malign Melanom

Vücudumuzda melanosit hücreleri genellikle ciltte bulunur ve pigment üretiminden sorumludurlar. Malign melanom (MM)'da bu melanosit hücrelerinden köken alan bir kanser türüdür. En önemli yerleşim yeri cilttir (kütanöz melanom), ancak melanosit içeren diğer dokularda da (mukozalar, gözler, iç organlar ve santral sinir sistemi) ortaya çıkabilir (Danshina, Markov, Huldani, & Achmad, 2020). (Dünya genelinde kütanöz melanom insidansı yıllar içerisinde giderek artmaktadır ve özellikle batı toplumlarında yaşam boyu melanom riski 1:50 oranına ulaşmıştır (Meyle & Guldborg, 2009). Melanom insidansı Avrupa'da 100000'de <25 hasta, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 100,000'de 30 hasta, melanomun dünyada en sık görüldüğü yer olan Avustralya'da ise 100,000'de 60 hasta oranındadır (Conforti & Zalaudek, 2021). Türkiye'deki durum ise Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2021 yılında yayınladığı kanser istatistikleri verilerine göre kütanöz melanomun 2017 yılındaki insidansı erkeklerde 100,000'de 1,7 iken kadınlarda 1,2'dir. Kütanöz melanom Türkiye'de en sık görülen ilk 10 kanser türü arasında değildir (Türkyılmaz et al., 2021). Ancak kütanöz melanom insidansı yıllar geçtikçe artmaktadır. Dünya'da 2020 yılı verilerine göre 324,635 yeni kütanöz melanom vakası ve 57,043 kütanöz melanomdan ölüm bildirilmiştir. Bu sayılara göre kütanöz melanom dünyada görülen kanserler sıralamasında 19. sırada yer alırken ölüme neden olan kanserler sıralamasında 23. sırada yer almaktadır. Kütanöz melanomun mortalite oranı Türkiye'de 100,000'de 0,83 iken, Avrupa'da 0,44-3,2 arasında, ABD'de 1,1 ve Avustralya'da 2,4'tür (Sung et al., 2021). Artan yaşla birlikte melanom görülme sıklığı da artmaktadır. Erkeklerde kadınlara göre daha fazla görülür. Türkiye'de her iki cinsiyette de görülme sıklığı 30'lu yaşlardan sonra artış gösterir ve bu oran 60 yaşından sonra daha da artmaktadır (Türkyılmaz et al., 2021).

Malign melanomun etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Ancak bazı durumlar melanom gelişimi açısından yüksek risk oluşturur. Bunlar; cilt rengi ve tipi (beyaz ve açık ten gibi), ultraviyole (UV) özellikle UV-B maruziyeti, ailede melanom varlığı, daha önce melanom geçirmiş olmak, genetik faktörler (siklin bağımlı kinaz 2A gen

mutasyonu, BRAF gen mutasyonu), spesifik genetik durumlar (ksero derma pigmentozum, retinoblastom)'dır (Watts et al., 2015). MM heterojen bir hastalık grubu olduğu için bu risk faktörleri her MM tipi veya her hasta için geçerli olmayabilir.

Malign melanom tanısı almış hastalarda en yaygın karşılaşılan hikaye daha önceden var olan veya yeni ortaya çıkan benin karakterinde değişiklik olmasıdır.

Malign melanomun erkenden tespit edilip tedavi edilmesi önemlidir. MM'da prognoz tümörün artan derinliği ile doğru orantılıdır.

Malign melanom düşünülen vakalarda eksizyonel biyopsi yapılmalıdır. Biyopsi materyali doğru histolojik tanı için cildin tüm tabakalarını içermelidir. Biyopsi sonuçları rezeksiyon sınırlarını ve hangi hastaların sentinel lenf nodu biyopsisi ve diğer adjuvan tedavi için aday olacağını belirler.

Sentinel lenf nodu biyopsisi ile geniş lokal eksizyon, elektif nod diseksiyonu veya her ikisi gibi cerrahi yöntemler erken evre melanom için kesin tedavidir. Tıbbi medikal tedavi (interferon alfa, pegile interferon, granülosit-makrofaj uyarıcı faktör, ipilimumab, dakarbazin, temozolomid, interlokin-2 gibi ajanlar) ilerlemiş melanomlu hastaların adjuvan tedavisi olarak uygulanır.

Malign melanom tanısı alan hastalarda 5 yıllık yaşam oranı hastalığın evresine göre %27 ile 90 arasında değişir. Ancak metastaz yapmış olgularda bu oran %20'nin altındadır (Barnhill, Fine, Roush, & Berwick, 1996).

2.2. Kök Hücreler

2.2.1. Kanser Kök Hücresi

Önceki yıllarda yapılan birçok çalışmada kanser hücrelerinin içerisinde kendini yenileyebilme, farklılaşabilme gibi kök hücre özellikleri gösteren hücrelerin varlığı bildirilmiştir. Kanser kök hücreleri ilk olarak hematopoetik sistem içerisinde tanımlanmıştır. Bonnet ve ark akut miyeloid lösemide kanser kök hücresini izole etmiştir ve insandan immün yetmezlikli farelere aktarmışlardır. Bu hücreler CD34+/CD38- hücre yüzey markerları ile tanımlanmıştır (Bonnet & Dick, 1997). Kanser kök hücreleri kök hücre özellikleri bakımından normal kök hücrelere benzerdirler. Bununla birlikte kanser kök hücreleri tümörün başlatılmasına,

büyümesine ve radyasyona, kimyasal ajanlara ve apoptozise dirençli olmasıyla normal kök hücrelerden ayrılır (Ural, 2012). Kanser kök hücrelerinin kökenleri tam olarak anlaşılammıştır. Erişkin kök hücrelerden mutasyonla oluştuğu ileri sürülmüştür. Ancak her zaman böyle olmadığı düşünülmektedir. Transit amplifiye hücrelerin, progenitör hücrelerin veya farklılaşmış hücrelerin onkojenik dönüşümünden de kanser kök hücrelerinin oluşabileceği tahmin edilmektedir (Girouard & Murphy, 2011).

2.2.2. Malign Melanom Kanser Kök Hücresi

Melanom heterojen hücre grupları içeren bir tümördür. Heterojen hücre gruplarının olması tümörojeniteye ve kemorezidansa neden olur (Kozovska, Gabrisova, & Kucerova, 2016). Fang ve ark. 2005 yılında yayınladıkları makalede insan melanomundaki kök hücre özellikleri gösteren hücre varlığından bahsettiler (Fang et al., 2005). Bu hücreler sferoid oluşturuyorlardı ve CD20+ yüzey belirtecini oldukça fazla taşıyorlardı. Ancak bu hücre gruplarının asıl kök hücre kabul edilmesi kendilerini yenileyebilme, farklılaşma ve tümör oluşturabilme yetilerinden kaynaklanmaktaydı (Girouard & Murphy, 2011). Bazı kanser tiplerinde kök hücreleri tanımlamak için kullanılan CD133+ yüzey belirteci daha sonra melanomlu hastalardan izole edilen kök hücre benzeri hücrelerde de fazlaca tespit edilmiştir (Monzani et al., 2007). CD133 glikoprotein yapısında olan transmembran proteinidir. CD133+ hücrelerin tümör oluşturma potansiyelleride artmaktadır. Melanoma diğer tümör türlerine göre oldukça fazla kanser kök hücresi içerir (%27> %0.0001) (Perego et al., 2010). Bu durum araştırmalarda kullanılması için iyi bir seçenek olduğunu gösterir.

2.3. Hücre Ölüm Modaliteleri

Hücre ölümü, hücre yaşamının temel süreçlerindedir. Ortam homeostazının korunmasında önemli rol alır. Hücre ölümü makroskobik morfolojik olarak farklı özellikler gösterir (Lorenzo Galluzzi et al., 2018). Daha önceleri bu özelliklere bakılarak 3 tipe ayrılmıştır: 1) Tip 1 hücre ölümü (apoptozis), 2) Tip 2 hücre ölümü (otofaji) ve 3) Tip 3 hücre ölümü (nekroz).

2.3.1. Apoptozis

Apoptozis, fizyolojik olan programlı bir hücre ölümüdür. Fonksiyonları bozulan, yaşlanan, hasarlanan veya ihtiyaç duyulmayan hücrelerin ortama zarar vermeden yok edilmesi sürecidir. Yaşamın her döneminde apoptotik hücre ölümü vardır (Gökbayrak Atay, Gezer, & Kasap, 2021). Apoptozis süreci intrinsik, ekstrinsik ve perforin/granzim sinyal yolları ile aktive edilir (Elmore, 2007). Bu sinyal yollarının aktivasyonu sonucunda kaspaz kaskadı harekete geçer. Bu üç sinyal yolu kaspaz 3 üzerinde ortak nokta olarak birleşir. Kaspazlar, sistein proteaz enzim ailesidir. Kaspaz 1-2-3...14 olmak üzere 14 tip kaspaz vardır ve bunlar görev olarak 3 gruba ayrılır; apoptozis başlatıcılar (Kaspaz 2-8-9-10), apoptozis yürütücüler (Kaspaz 3-6-7) ve inflamasyon mediatörleri (1-4-5-12-14) (Behzadi & Ranjbar, 2015). Kaspazlar genellikle inaktif monomerik yapıda prokaspaz olarak bulunurlar ve gerektiğinde aktive edilirler (McIlwain, Berger, & Mak, 2015).

2.3.1.1. İntersik apoptozis

İntersik apoptozis; mikroçevresel dengenin bozulmasına yol açan DNA hasarı, büyüme faktörü azalması, ekstrasellüler matrikse temasın kaybolması, hipoksi, antikanser ilaçların varlığı, reaktif oksijen radikallerinin aşırı artması gibi uyarılar sonucunda başlar (Lorenzo Galluzzi et al., 2018; Iannolo, Conticello, Memeo, & De Maria, 2008). Bu uyarılar bir dizi sinyal yolağını aktive ederek mitokondri bütünlüğünün bozulmasına, sitokrom C salınmasına ve kaspaz 9 aktivasyonuna yol açar. Buradaki kritik ve geri dönüşümsüz olan nokta mitokondri dışı membran permeabilitesinin artmasıdır (Tait & Green, 2010). Mitokondride meydana gelen bozulma sonucu ortama sitokrom C salgılanır. Sitokrom C, Apaf-1 ve pro-kaspaz 9 bir araya gelerek apoptozom oluşturur. Pro-kaspaz 9 aktif hale geçer ve kaspaz 3'ü uyarır (McIlwain et al., 2015).

2.3.1.2. Ekstrinsik Apoptozis

Ekstrinsik apoptozis; ligandların ölüm reseptörlerine (DR: death receptors; Tümör nekrozis faktör reseptör-1 (TNFR1), CD95 (Fas ve APO-1), DR3, TNF-ilişkili apoptozis başlatıcı ligand reseptörü-1 (TRAIL-R1; DR4) ve TRAIL-R2; DR5) veya bağımlı reseptörlere bağlanmasıyla aktive olur (Flusberg & Sorger, 2015). Bu ligandlar hücre dışında dengenin bozulmasıyla ortaya çıkar. Bu reseptörler adaptör proteinler (FAS-ilişkili ölüm zinciri (FADD) veya TNFR- ilişkili ölüm zinciri (TRADD)) aracılığıyla kaspaz 8 ve 10'un fonksiyonunu düzenler (Lorenzo Galluzzi et al., 2018).

2.3.2. Otofaji

Otofaji, hasarlı makromolekülleri, organelleri ortadan kaldıran ve çeşitli hücre dışı uyarılara yanıt olarak oluşan bir süreçtir. Hücrel stres durumlarında (besin azalması, oksidatif hasar, patojen enfeksiyon gibi) otofaji tetiklenir. Apoptozisten farklı olarak, hücrel stres durumlarında hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücre homeostazisini korumaya yardımcı olmaktadır (Anding & Baehrecke, 2015).

Hücrel metabolizmanın ana düzenleyicilerinden olan mTOR bir serin/treonin kinazdır ve PI3K/AKT sinyal yolunun hedef proteindir (Kim & Guan, 2015). mTOR, birkaç proteine bağlanarak mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) olmak üzere iki farklı sinyal kompleksi oluşturur. Hücrel besin azalması, düşük hücrel enerji seviyeleri mTORC1 inhibisyonuna yol açar. mTORC1 inhibisyonu otofaji başlangıcını ve otofagozom çekirdeklenmesini destekleyen ULK1, ATG13 (otofaji ilişkili gen), AMBRA1 ve ATG14L gibi çoklu otofaji ile ilgili proteinlerin defosforilasyonu yoluyla otofajinin aktivasyonuna yol açar (Kim & Guan, 2015).

ATG8/MAP1LC3 (mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3) konjugasyon sistemi, otofagozomun uzaması ve olgunlaşması için gereklidir. Atg8/LC3'ün otofagozomdaki

hücrel lokalizasyonu, olgunlaşması sırasında otofagozomun kapanması, hemifüzyonu veya taşınması ile ilişkilendirilmiştir. LC3, otofagozomların yanı sıra otofajik aktiviteyi izlemek için yaygın olarak kullanılmıştır (Lee & Lee, 2016).

2.4. Mekanik Güçlerin Kök Hücre Davranışı Üzerine Etkisi

Kök hücreler ve onların mikroçevreleri, hücre davranışını ve kaderini belirlemek üzere mekanik güçlerle etkileşim içerisindedir (Vining & Mooney, 2017). Farklı mekanik güçler hücrelerde farklı yanıtların oluşmasına yol açar. Hatta aynı gücün uygulanması hücrenin konumuna, geometrisine, tipine, kromozom yoğunlaşmasına ve farklılaşma aşamasına göre farklı hücrel fonksiyonlara yol açabilir (Manokawinchoke et al., 2021). Kök hücreler mekanik güçlere proliferasyon, migrasyon, kendini yenileme ve farklılaşma olarak yanıt verir. Mekanik güçler mekanik gerilme (çekme, gerilme, esneme), mekanik yüklenme, vibrasyon, mekanik kompresyon, basınç ve ses dalgaları örnek verilebilir (Marrelli et al., 2018).

2.4.1. Terapötik Ultrason

Ultrason mekanik bir enerji çeşididir. Mekanik titreşim artan frekanslarda ses enerjisi olarak bilinir. İnsan kulağı 15-20000 Hz frekans aralığındaki sesleri işitebilir. Bu üst limitin üzerindeki mekanik titreşimler ultrason olarak tanımlanır. Ultrason görüntüleme ve tedavi amacıyla kullanılabilir. Tedavi amacıyla kullanılan ultrasona terapötik ultrason denir (ter Haar, 1999). Tedavide kullanılan frekanslar 0,7-3,3 MegaHertz (Mhz) aralığıdır (Sengupta & Balla, 2018). Ayrıca ultrasonun etkisi için birim alana uygulanan enerjinin miktarı yani yoğunluğu da önemlidir ve yoğunluğun birimi W/cm^2 'dir. Tedavide devamlı ve kesikli (pulsed/aralıklı: 1:1-1:4 siklus şeklinde) ultrason olarak iki şekilde kullanılır. Devamlı ultrasonda ses dalgaları dokuya geçtiğinde dokudaki moleküler vibrasyonda artışa ve bunun sonucunda ısı artışına yol açar (Baker, Robertson, & Duck, 2001). Böylece devamlı ultrason ısı ve mekanik etkileri ile tedavide kullanılır. Kesikli ultrason dokularda ısı oluşturmaz, mekanik etkileri ile tedavide kullanılır. Ses dalgalarıyla elde edilen mekanik etkiden

mikrobubbleların bir araya gelmesi ile oluşan kavitasyon, akustik akış ve mikromasaj sorumlu tutulabilir (Baker et al., 2001; ter Haar, 1999; Williams, 1987; Wu & Nyborg, 2008).

2.4.2. Düşük Yoğunluklu Kesikli Ultrason

Düşük yoğunluklu kesikli ultrason (Low Intensity Pulsed Ultrasound-LİPUS) termal olmayan ve dokuları tahrip etmeyen bir tedavi yöntemidir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) kaynamayan kırıklarda LİPUS kullanımını onaylamıştır (Katiyar, Duncan, & Sarkar, 2014). Son zamanlarda LİPUS kullanımını kanser tedavisinde önem kazanmaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız; *in vitro* malign melanom kanser kök hücresine LİPUS uygulaması sonrası bu hücrelerde kaspaz 3 (Casp 3) ile kaspaz 8 (Casp 8) düzeylerine bakarak apoptozisi ve mammalian target of rapamycin (mTOR) ile light chain 3 (LC3) düzeylerine bakarak otofajiyi değerlendirmektir. Böylece apoptozis veya otofajiyi gözlemleyerek LİPUS ile oluşturulan mekanik gücün etkisiyle malign melanom kanser kök hücrelerin kök hücre özelliğini kaybedip kaybetmediğini incelemektir.

Gereç ve Yöntem

3.1. Araştırmanın Tipi

Malig n melanom kanser hücre hattına ve malig n melanom kanser kök hücre hattına LİPUS uygulanması sonucu apoptozis (Casp 3 ve Casp 8) ve otofajinin (mTOR ve LC3) incelenmesi amaçlanan *in vitro* deneysel tanımlayıcı bir laboratuvar çalışmasıdır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında Ağustos 2021 - Ocak 2023 tarihleri arasında yapılmıştır.

3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan cihazların isimleri ve işlevleri

Cihaz	İşlev
Binder ve Eppendorf Galaxy 170r CO ₂ 'li İnkübatör	Hücrelerin yaşam ortamını sağlamak
Eppendorf New Brunswick -80°C Derin Dondurucu	Dondurulan hücrelerin saklanması
Eppendorf Soğutuculu Santrifüj	Hücre pasajında ve deneylerde hücreleri solüsyondan ayırmak
Nüve Su Banyosu	Hücre açma protokolünde ani sıcaklık değişimini sağlamak, -80°C'den çıkan hücreleri direk 37°C'ye aktarmak
ESCO Biyogüvenlik Kabini Sınıf II	Deneylerin yapılması için gerekli sterilizasyonu sağlamak
Olympus CKX41 İverted Mikroskop	Hücrelerin gözlemi ve takibi
Olympus BX50 Floresan Mikroskop	İmmünofloresan hücre boyamalarını görüntülemek ve fotoğraflamak
Düşük yoğunluklu kesikli ultrason cihazı (SONOPULS 190, Enraf Nonius, Amsterdam) (Şekil 1)	Ses dalgası oluşturmak



Şekil 1: Ultrason cihazı ve probu

3.4. Hücre Kültürü Uygulamaları

3.4.1. Hücrelerin genel protokole uygun kültüre edilmesi

CHL-1 (ATCC® CRL-9446TM) pigmente olmayan insan melanom hücre hatları, Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. CHL-1 malign melanoma hücre hattı Eagle's Minimum Essential Medium olarak adlandırılan EMEM besi yerinde kültüre edildi (Şekil 2A). Hücrelerin kültüre edilmesini sağlamak için EMEM besi yeri içerisinde %10 fetal sığır serumu (Biowest, S1810), kontaminasyonu önlemek için ise %1 penisilin streptomisin eklendi. CHL-1 hücre hattı pasaj 6 ve 8 aralığında kullanılırken; akış sitometrisi elde edilen CD133+ ve CD133- hücre hatları pasaj 2 ve 4 aralığında kullanıldı.

3.4.2. Hücre Pasajı

Hücreler T25 flask içerisinde kültüre edilmiştir. Hücrelerin T25 flask yüzeyini kaplamaya yakın hale geldikten sonra, diğer bir deyişle konfluent olduklarında hücreler pasajlandı. CHL-1 hücreleri pasajlanarak akış sitometrisi için hazırlandı; CD133+ ve CD133- hücreler pasajlanarak deneysel süreçte kullanıldı. Pasaj işlemi için öncelikle var olan besi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler bir kez yıkandıktan sonra tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırıldı. Kaldırma işlemi 37°C inkübatör içerisinde yaklaşık 4 dakikada gerçekleşti. Hücre eldesi mekanik kuvvetle hem flask yüzeyine hafif vuruşlar ile hem de pipetleme ile maksimum gerçekleştirildi. Sonrasında hücreler tüpe aktarılıp santrifüj edildi. Pellet sayım için 1 ml taze besi yerinde çözüldü (Şekil 2B).

3.4.3. Hücre Sayımı

Hücre sayımı tripan mavisi ile gerçekleşti. Bunun için 1 ml hücre solüsyonu içerisinde 10 mikrolitre alındı ve 10 mikrolitre tripan mavisi ile karıştırıldı; hemositometre ile sayım yapıldı. Ölü hücreler mavi renk alırken, canlı hücreler parlak ve beyaz renkliydi.

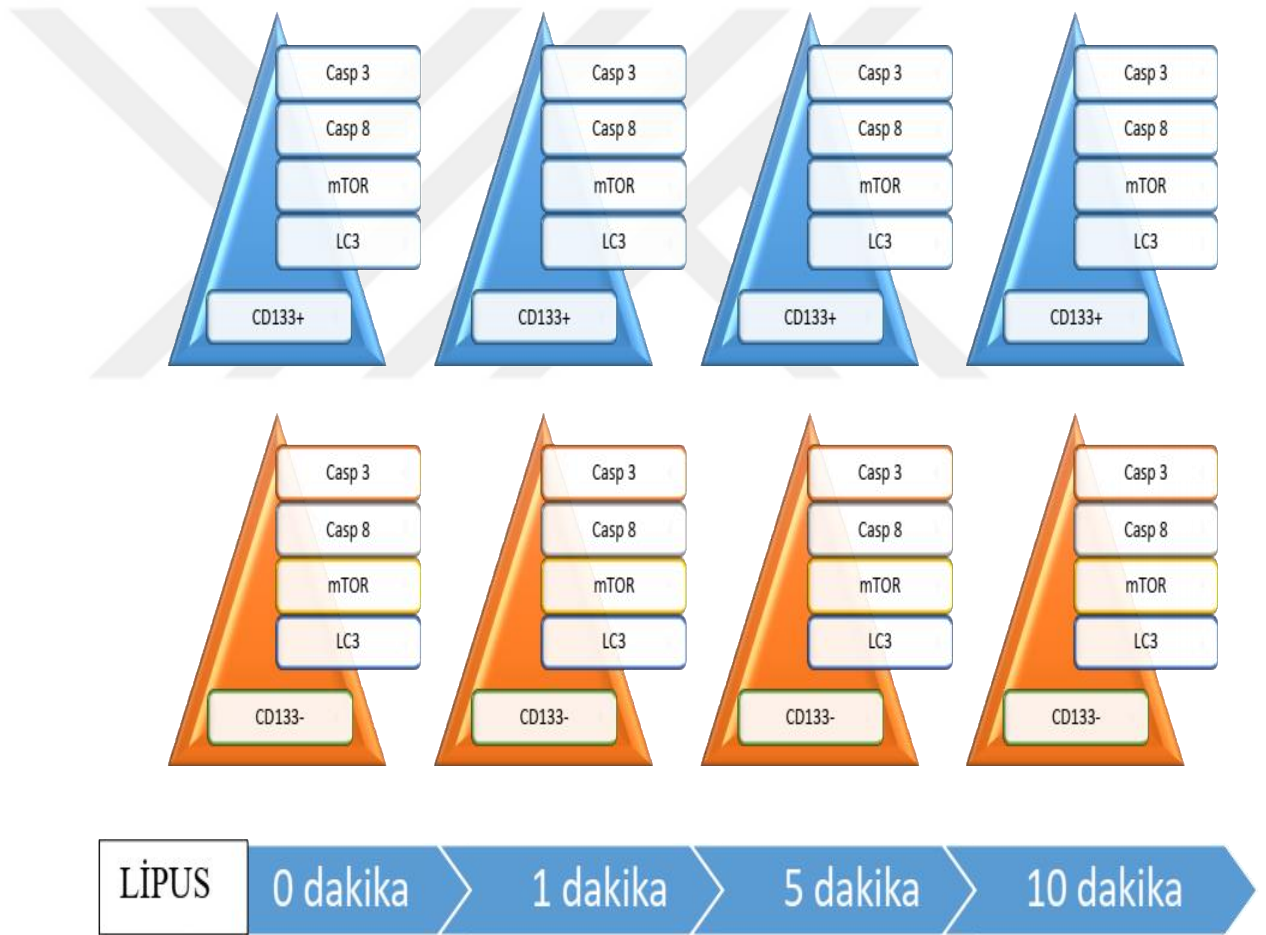
Canlı hücre sayısına göre deneysel süreç için 1 ml hücre solüsyonu 2×10^5 hücre/ml seyreltildi (Şekil 2C).



Şekil 2: Laboratuvar çalışmaları

3.5. Deney Grupları

Çalışmada MM kanser kök hücresi (CD133+) ve MM kanser hücresi (CD133-) olmak üzere iki grup oluşturuldu (Şekil 3). CD133+ ve CD133- hücre platelerine 1 Mhz, %20 duty cycle, 1 w/cm² LİPUS 1-5-10 dk olmak üzere uygulandı (Bernard, Mornstein, Škorpíková, & Jaroš, 2012; Sengupta & Balla, 2018; Yang et al., 2018). Her iki grubun LİPUS öncesi (0 dk) ve LİPUS sonrası 1-5-10 dk olmak üzere Casp 3, Casp 8, mTOR ve LC3 boyamaları yapıldı.



Şekil 3: Deney grupları

3.6. Floresanla Aktive Hücre Ayırma Yöntemi Kullanılarak CD133+ Kanser Kök Hücrelerinin Toplanması

Malign melanoma kanser kök hücrelerinin izolasyonunu sağlamak için Floresan Aktif Ayırma (FACS) yöntemi kullanıldı. EMEM ortamında kültürlenmiş kanser kök hücreleri polistiren flasklarda çoğaltıldı. Belli yoğunluğa ulaşan hücrelerin bulunduğu flasktan besi ortamının uzaklaştırılmasının ardından besi yeri kalıntılarının da flasktan arındırılması için 2 ml 1X PBS ile hücrelerin yıkama işlemi yapıldı. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılabilmesi için flaska 1 ml %0.25 Tripsin-EDTA (Thermo, USA) eklendi ve 3 dakika inkübatörde (37 °C, %5 CO₂) bekletildi. Tripsinin uygun süresinden fazla durması hücreye zarar vereceğinden, Tripsin-EDTA inaktivasyonunun sağlanması için ortama 2 ml EMEM besi yeri ortamı eklendi. Daha sonra hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant kısmı atılarak tüpe 3 ml 1X'lik PBS eklenerek yıkama işlemi yapıldı. PBS eklenen tüpler tekrar 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant kısım tekrar atılarak hücreler 1X PBS ile süspanse edilerek karanlık ortamda 10 mikrolitre CD133 antikoru eklendi ve hücrelerin karışması için pipetleme işlemi yapıldı. Hücreler vortex cihazında karıştırıldıktan sonra alüminyum folyo ile etrafı sarılarak +4 °C'de 10 dakika inkübe edildi. İşlem sırasında bağlanması gerçekleşmemiş antikolar için hücrelere tekrar 5 ml 1X PBS eklenerek yıkama işlemi yapıldı, ardından 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüm bu işlemlerin ardından hücreler 5 ml'lik filtreli tüp içerisinden geçirildi. Bu şekilde FACS için hazır hale getirilen hücreler cihazdan (FACS Aria, BD Pharmingen) geçirilerek sort edildi. Böylece CD133+ MM kanser kök hücrelerinin ayrımı gerçekleştirildi.

3.7. Kanser Kök Hücre Hattının Üretilmesi

CHL-1 hücre hattından FACS yöntemi ile izole edilen kök hücrelerin üretimi ise %10 FBS ve 5 ml streptomisin içeren EMEM ortamında gerçekleştirildi.

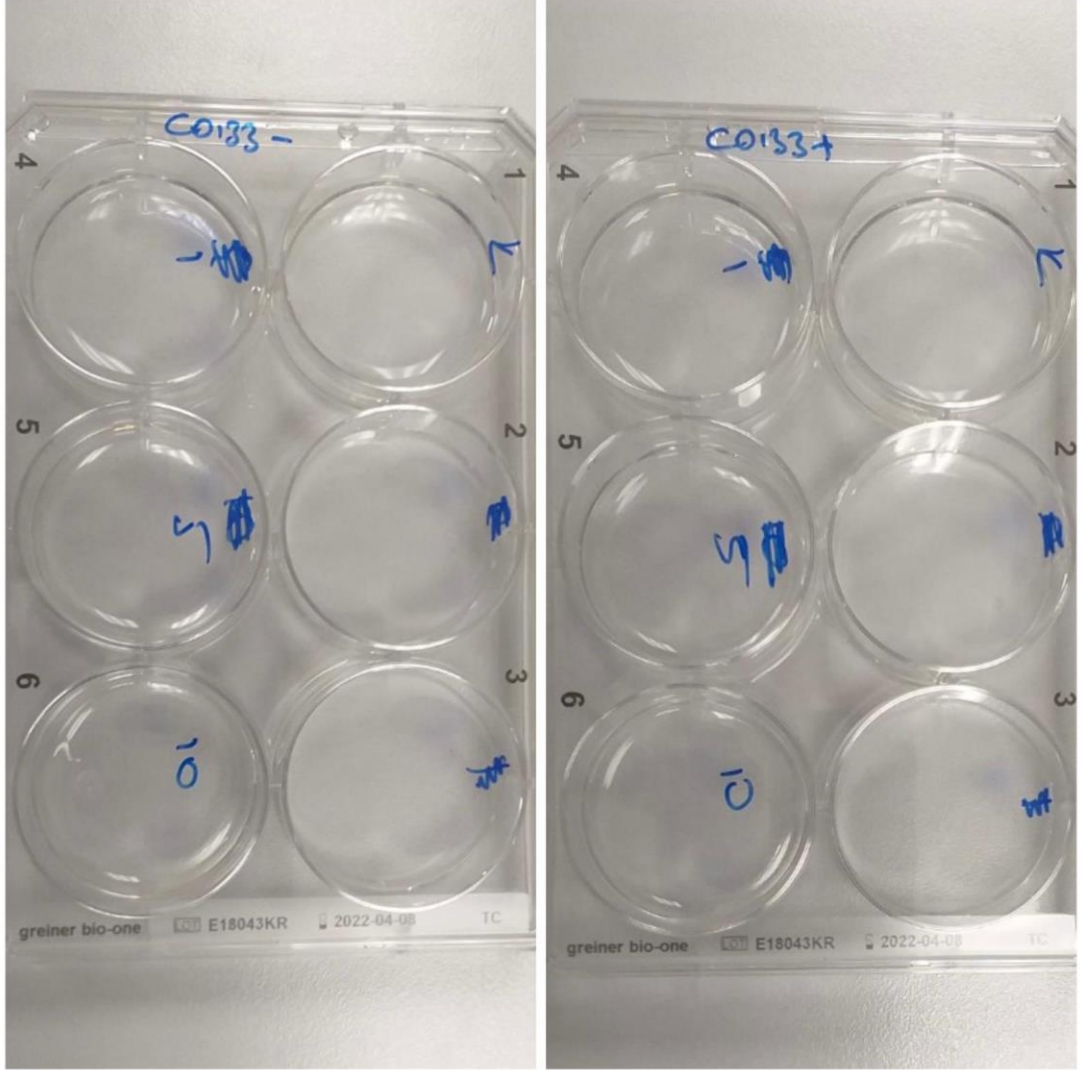
3.8. Hücre Sayımı

FACS işlemi sonrası elde edilen CD133+ malign melanom kanser kök hücreleri ve kök hücre olmayan malign melanom kanser hücreleri iki grup olmak üzere belirlendi. Her deney grubundaki hücreler 37 °C %5 CO₂'li ve nemli ortamda üretilen hücrelerin belli yoğunluğa ulaşmasıyla birlikte ortamdan besi yeri atılarak hücre kültürü uygulamaları yapıldı. Besi yerinin uzaklaştırılmasının ardından 2 ml 1X PBS ile hücreler yıkandı ve hücrelerin yüzeyden kaldırılması için %0.25 Tripsin-EDTA (Thermo, USA) eklendi ve 3 dakika inkübatörde (37 °C, %5 CO₂) bekletildi. Tripsin-EDTA'nın ortamdan uzaklaştırılması için %10 FBS içeren EMEM besi yeri ortamı hücrelere eklenerek inaktivasyon işlemi gerçekleştirildi. Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı atılarak pelet üzerine 1'er ml besi ortamı eklenerek homojenize edildi. Hücrelerden 50 µl hücre eppendorflara alınarak üzerlerine 50 µl tripan mavisi eklendi. Pipet yardımıyla homojenize edildikten sonra hücrelerin thoma lamında sayımı gerçekleştirildi.

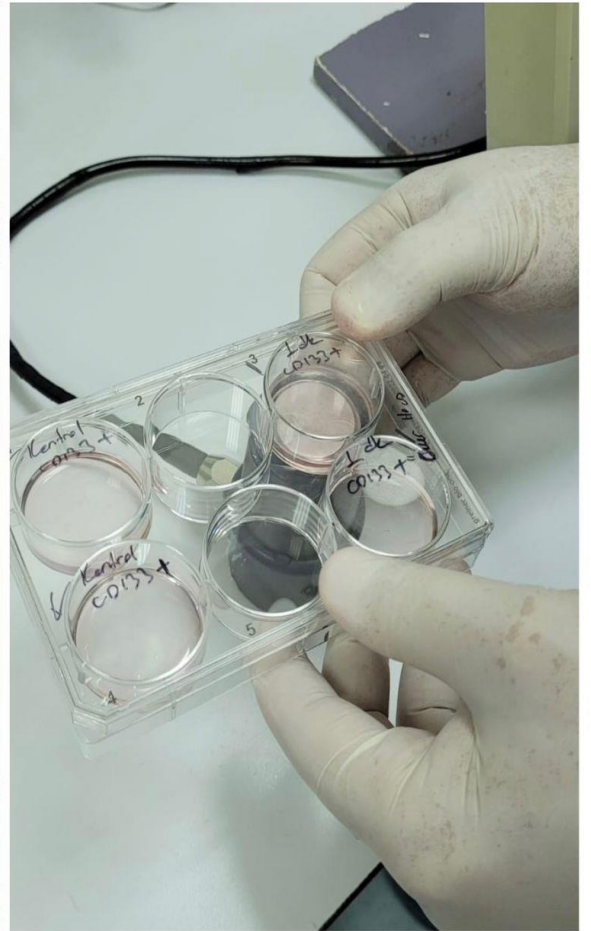
3.9. LİPUS Uygulaması

CD133+ MM kanser kök hücreleri ve MM hücreleri, 37°C %5 CO₂'li ve nemli ortamda üretildi. Belli yoğunluğa gelen hücrelerden besi yeri ortamı uzaklaştırılarak 2 ml 1X PBS ile hücrelerin yıkanması sağlandı. Hücrelerin yüzeyden kaldırılması için %0.25 Tripsin-EDTA (Thermo, USA) eklendi ve 3 dakika inkübatörde (37 °C, %5 CO₂) bekletildi. Tripsin-EDTA'nın ortamdan uzaklaştırılması amacıyla hücrelere EMEM besi yeri ortamı eklenerek inaktivasyonu sağlandı. Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınmış ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım atılarak tüpe 5 ml 1X'lik PBS eklenerek yıkanması sağlandı. PBS eklenen tüpler tekrar 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant kısım tekrar atılarak hücreler 1X PBS ile süspansiyon edilen hücreler, 6 kuyucuklu polistiren tabakalara ekildi (Şekil 4). 37 °C, %5 CO₂'de 24 saat inkübe edilen hücrelere LİPUS cihazı (SONOPULS 190, Enraf Nonius, Amsterdam) uygulandı. LİPUS uygulaması için, cihazın probu hücre kültür platenin altına yerleştirildi ve öncesinde ses dalgalarının geçişini kolaylaştırmak amacıyla probun üzerine ultrason jeli sürüldü ve cihaz çalıştırıldı (Huang et al., 2020) (Şekil 5). Her uygulama öncesi cihazın çalışıp çalışmadığını test etmek için probun ucuna bir damla su damlatılarak oluşan titreşimler gözlemlendi. Ayrıca uygulama

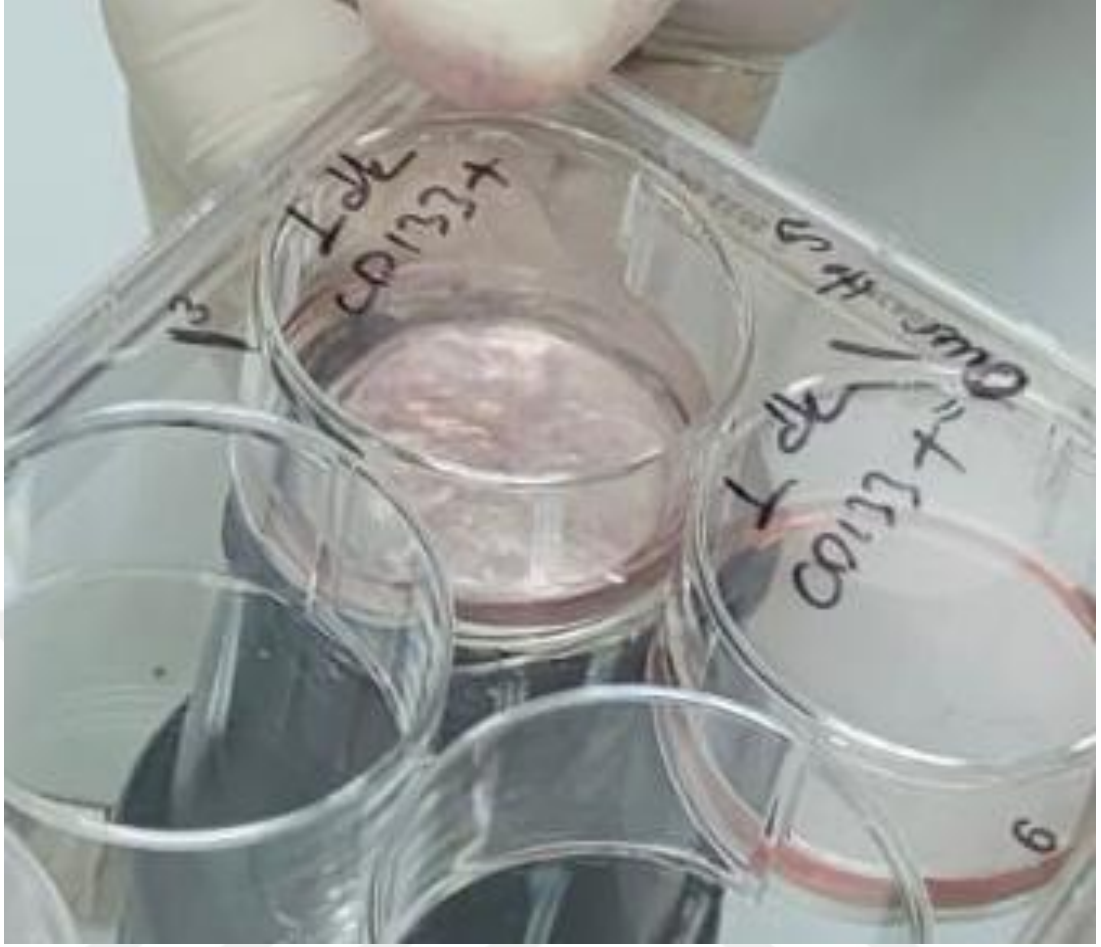
sırasında yine cihazın çalıştığının gözlenmesi amacıyla platelerin içerisindeki sıvıda meydana gelen titreşimler de ara ara kontrol edildi (Şekil 6). Ultrason uygulanan hücreler 48 saatlik sürelerde inkübe edilmiştir (37 °C, %5 CO₂).



Şekil 4: 6 kuyucuklu polistiren tabakalar



Şekil 5: Proben yerleştirilmesi



Şekil 6: Ultrason uygulaması sırasında görülen titreşimler

3.10. İmmünofloresan Öncesi Hazırlıklar

3.10.1. Triton-X100 Hazırlanması

%0.25 Triton-X100, immünofloresan boyama işleminin permeabilizasyon aşamasının gerçekleştirilmesi için 25 mikrolitre Triton-X100 uygulandı ve 5 dakika beklenildikten Triton-X100 ortamdan uzaklaştırıldı. 3 defa PBS ile yıkama yapıldı.

3.10.2. Sığır Serum Albümin Hazırlanması

Bloklama için sığır serum albümini (BSA) hazırlandı. Bunun için 1 gr BSA tozu 100 ml 1X PBS içerisinde çözdürüldü, bunun için manyetik karıştırıcı kullanıldı. Elde edilen solüsyon filtreden geçirilerek +4 °C’de saklandı.

3.10.3. Hücrelerin İmmüno Floresan Boyama İçin Hazırlanması

İmmüno floresan aşamasından önce hücrelerin hazırlanması gerçekleştirildi. Bunun için hücreler T75 flasklardan besi yeri uzaklaştırılarak 6 kuyucuklu platelere aktarıldı. Sonrasında 2 ml 1X PBS ile hücreler yıkandı. Hücrelerin yüzeyden kaldırılması için %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 3 dakika inkübatörde (37°C, %5 CO₂) bekletildi. İverted mikroskop ile hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi ve uygun olan hücreler laminar kabine alındı. Hücrelere 2 ml EMEM besi yeri ortamı eklenerek Tripsin-EDTA’nın inaktivasyonu sağlandı. Hücreler 15 ml’lik santrifüj tüpünde toplandı ve 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından hücrelerin süpernatant kısmı atılarak üzerlerine besi yeri eklendi. Hücrelerin Thoma Lamı ile sayımı gerçekleştirildikten sonra 6 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğuna 15 mm’lik yuvarlak lamellerden pens yardımı ile eklenmiştir. Lamellerin kuyucuklara iyice oturması sağlandıktan sonra üzerlerine mikropipet yardımıyla hücreler ekildi ve 37°C, 5% CO₂ ortamda inkübasyona bırakıldı.

3.10.4. İmmüno Floresan Boyama

Bu işlemlerin ardından immüno floresan boyama için hücre fiksasyonu gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle hücrelerin buldukları besi yeri ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 1X PBS ile 3 defa yıkandı.

Hücre fiksasyonu için hücreler oda sıcaklığında 30 dakika %4 paraformaldehid (PFA) ile muamele edildi. Bu süre sonunda hücrelerden PFA’nın uzaklaştırılması için hücreler tekrar 1X PBS ile yıkandı. Hücre boyamasının aynı gün yapılacağı örnekler

için işlemler devam etti. Daha sonraki günler devam edilmesi planlanan örnekler için, hücreler +4°C 'de saklandı.

Permeabilizasyon için hücreler önceden hazırlanmış %0.25 Triton-X100 içerisinde 5 dakika bekletildi. Triton-X100 solüsyonunu ortamdan uzaklaştırmak için hücreler 1X PBS ile yıkandı.

Bloklama aşaması için hücreler oda sıcaklığında %1 BSA içerisinde 1 saat boyunca bekletildi.

Antikorlar (mTOR, LC3, Casp 3 ve Casp 8) %1 BSA içerisinde 1/100 oranında dilüe edilerek hazırlandı. Hücreler 24 saat boyunca primer antikor içerisinde nemli ortamda bekletildi. 24 saat sonunda antikorun uzaklaştırılması için hücreler 1X PBS ile 3 kez yıkandı. Kullanılacak sekonder antikor hazırlandı ve 1 saat boyunca hücrelerle teması gerçekleştirildi. Tekrar 1X PBS ile 3 kez yıkanan hücreler kapama mediumu ile kaplandıktan sonra görüntülemeler Olympus BX50 Floresan Mikroskobu ile gerçekleştirildi ve 20X ve 40X'te fotoğrafları çekildi. Bütün fotoğraflar Fiji:İmagej programı ile analiz edildi.

Bulgular

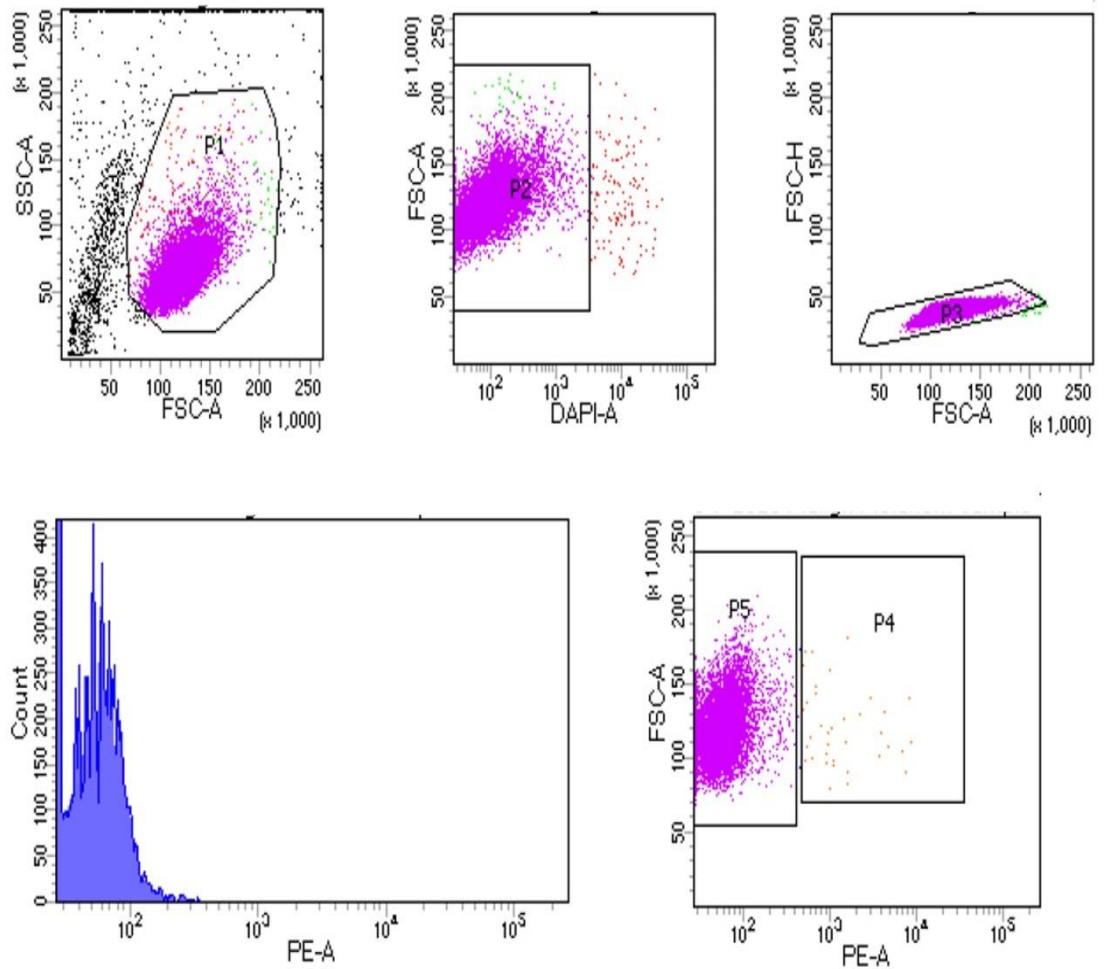
Hücre gruplarının kültüre edilme aşamasından sonra deneysel kısma geçebilmek için hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayım için pasaj sonrasında hücreler 1 ml taze besi yerinde seyreltilmiş, ve içerisinde 10 mikrolitre hücre solüsyonularınarak 10 ml tripan mavisi ile karıştırılmıştır. Karışım hemositometre ile ölçülmüştür. CD133+ ve CD133- hücre sayısı genel olarak T25 flask pasajlaması sonucunda yaklaşık 6×10^6 hücre/ml içermektedir. Deneyler için bu sayı taze besi yeri eklenerek 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

4.1. Kanser Kök Hücresi İzolasyonu Bulguları

4.1.1. CD 133+ Hücre İzolasyonu Bulguları

Malign melanom hücreleri, Ege Üniversitesi AREL'de FACS sistemi ile ayrılmıştır. CD133 antikoruna ile işaretlenen hücreler CD133+ MM kanser kök hücreleri olarak, işaretlenmemiş olanlar CD133- MM kanser hücreleri olarak adlandırılarak iki deney grubu oluşturulmuştur. Hücreler, akış sitometrisi ile CD133+ hücrelerin toplanması için hazırlandı ve önce P4 kapısına, daha sonra P5 kapısına göre pozitif ve negatif hücreler olmak üzere ayrıldı (Şekil 7).

BD FACSDiva 8.0



Tube: sample-1

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
█ P1	7,673	76.7	76.7
█ P2	7,552	98.4	75.5
█ P3	7,538	99.8	75.4
█ P4	16	0.2	0.2
█ P5	7,522	99.8	75.2

Nozzle size: 100nm

Flow rate:5

User chose P4 as positive sorting gate

P5 negative sorting gate

Şekil 7: Akış sitometresi

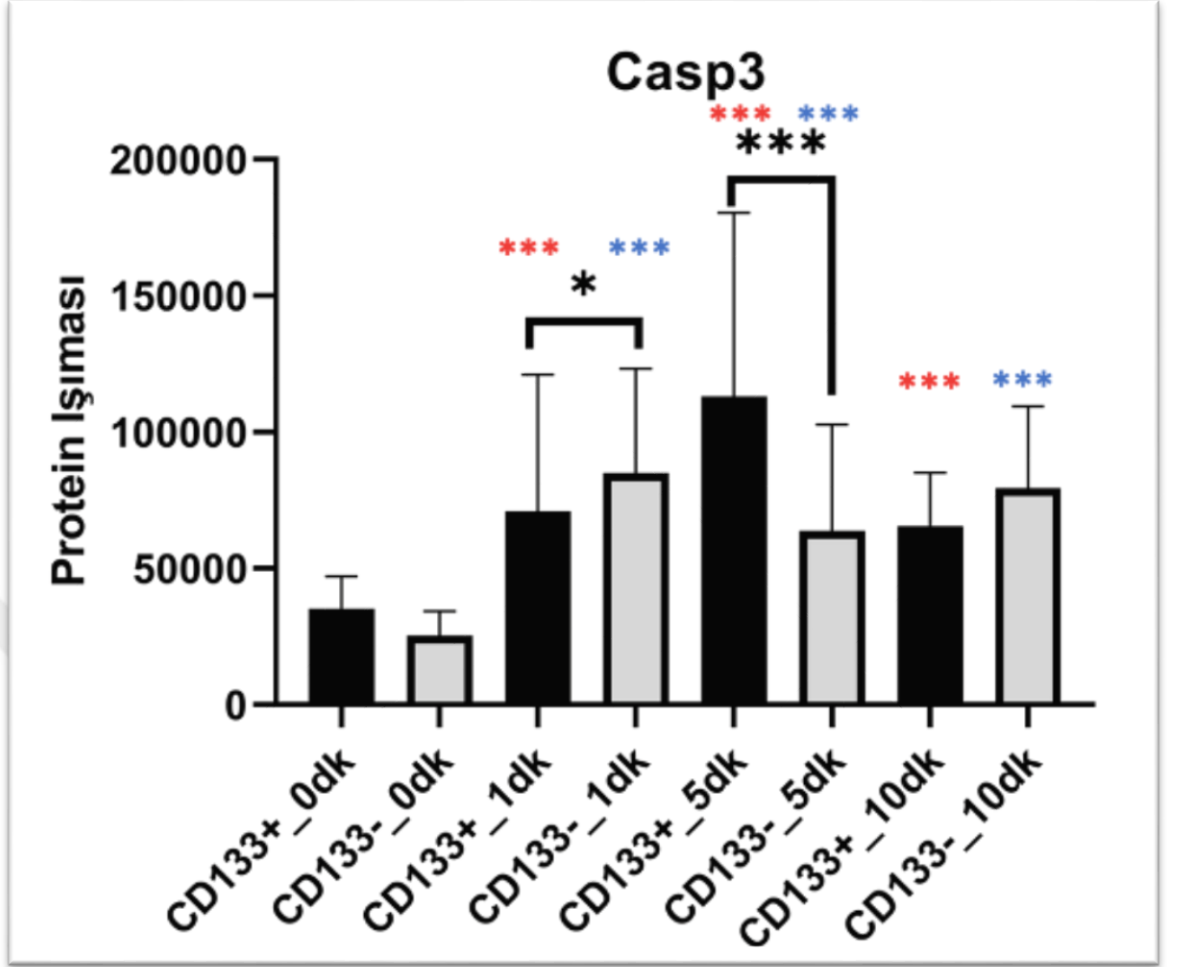
4.2. İmmünofloresan Boyama Sonuçları

4.2.1. Apoptozis

Apoptozis aktivitesini göstermek için Casp 3 ve Casp 8 boyaması yapılmıştır.

4.2.1.1. Kaspaz 3 boyama sonuçları

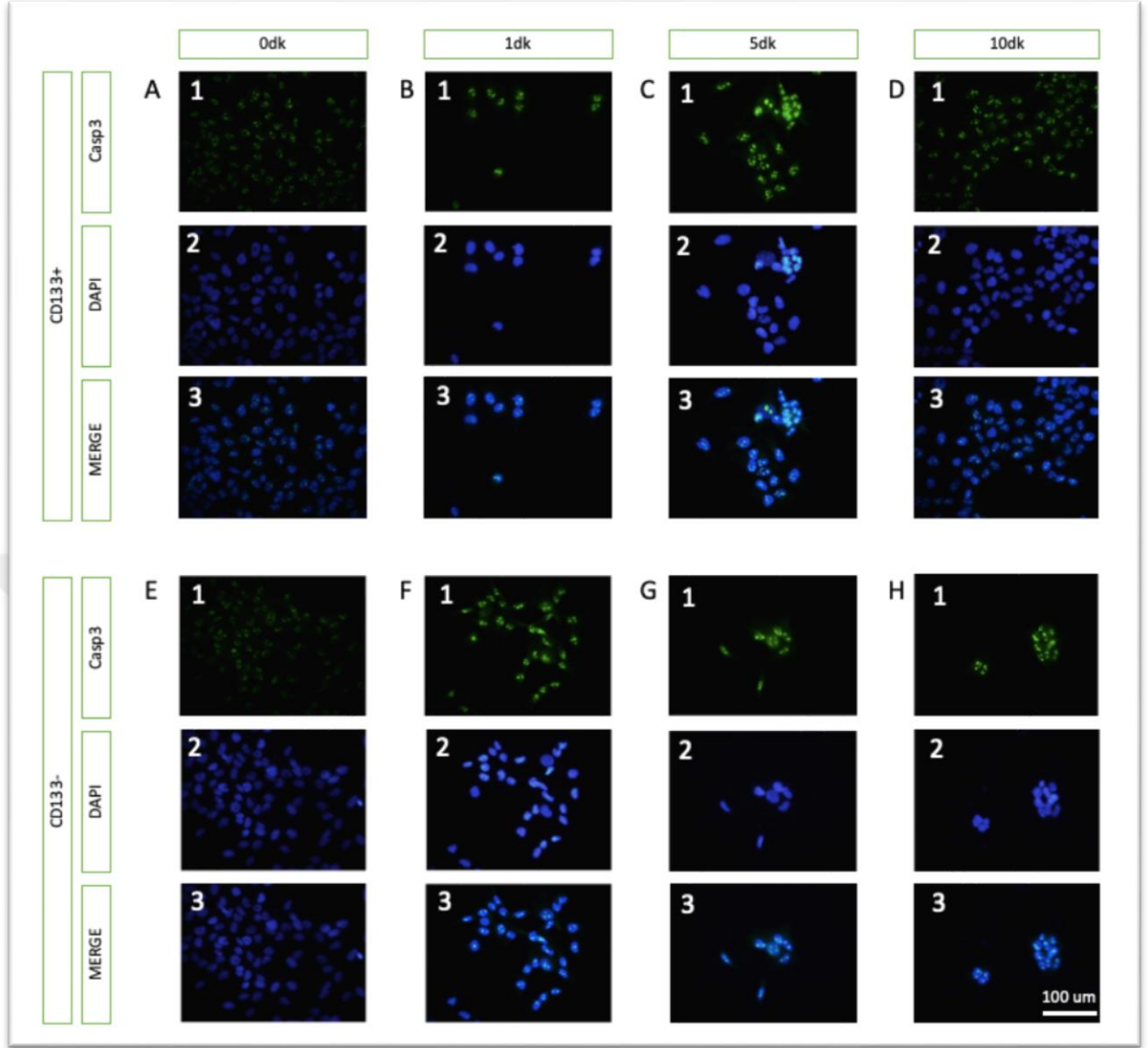
Casp 3 protein ışımalarının gruplar arasında karşılaştırılma grafiği Grafik 1'de görülmektedir. CD133+ grupta LİPUS uygulaması öncesi (0 dakika) ile LİPUS uygulaması sonrası 1-5-10 dakikalar karşılaştırıldığında 1-5-10 dakikalarda Casp 3 protein ışımalarının istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır ($p<0.001$). Bu artış en yüksek 5 dakikada kaydedilmiştir. Aynı durum CD133- grupta da benzerdir. LİPUS uygulanması ile Casp 3 protein ışımaları istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0.001$). Bu artış en yüksek 1 dakika uygulamada kaydedilmiştir. Başlangıçta (0 dakika) CD133+ ile CD133- grubu arasında istatistiksel fark bulunamamıştır ($p=0.052$). LİPUS uygulaması sonrası her iki grubun birbirleriyle karşılaştırılması sonucu 1-5 dakika uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.05$ ve $p<0.001$) bulunmuştur. 1 dakikada Casp 3 protein ışımaları CD133- grupta en fazla tespit edilirken 5 dakikada CD133+ grupta en fazla tespit edilmiştir.



Grafik 1: Casp 3 protein ışımalarının gruplar arası karşılaştırma grafiği

Grafik her iki grupta Casp 3 proteinin LİPUS uygulama sürelerine göre ışımasını göstermektedir. Kırmızı yıldız (*) CD133+ grupta başlangıca göre 1-5-10 dakika uygulama karşılaştırmalarındaki istatistiksel anlamlı değişikliği gösterirken, mavi yıldız (*) CD133- gruptaki istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir. Siyah yıldız da (*) CD133+ ile CD133- gruplar arasındaki karşılaştırmalarda saptanan anlamlı değişikliği göstermektedir. Her iki grupta LİPUS uygulama sonrası başlangıca göre Casp 3 protein ışıması artmıştır (**p<0.001, ***p<0.001). Casp 3 protein ışıması 1 dakika LİPUS uygulamasında CD133- grupta en fazla tespit edilirken (*p<0.05), 5 dakika uygulamada CD133+ grupta en fazla tespit edilmiştir (**p<0.001).

Apoptozis aktivitesinin gösterilmesi amacıyla Casp 3 proteini immünfloresan yöntemi ile boyanmıştır (Şekil 8).

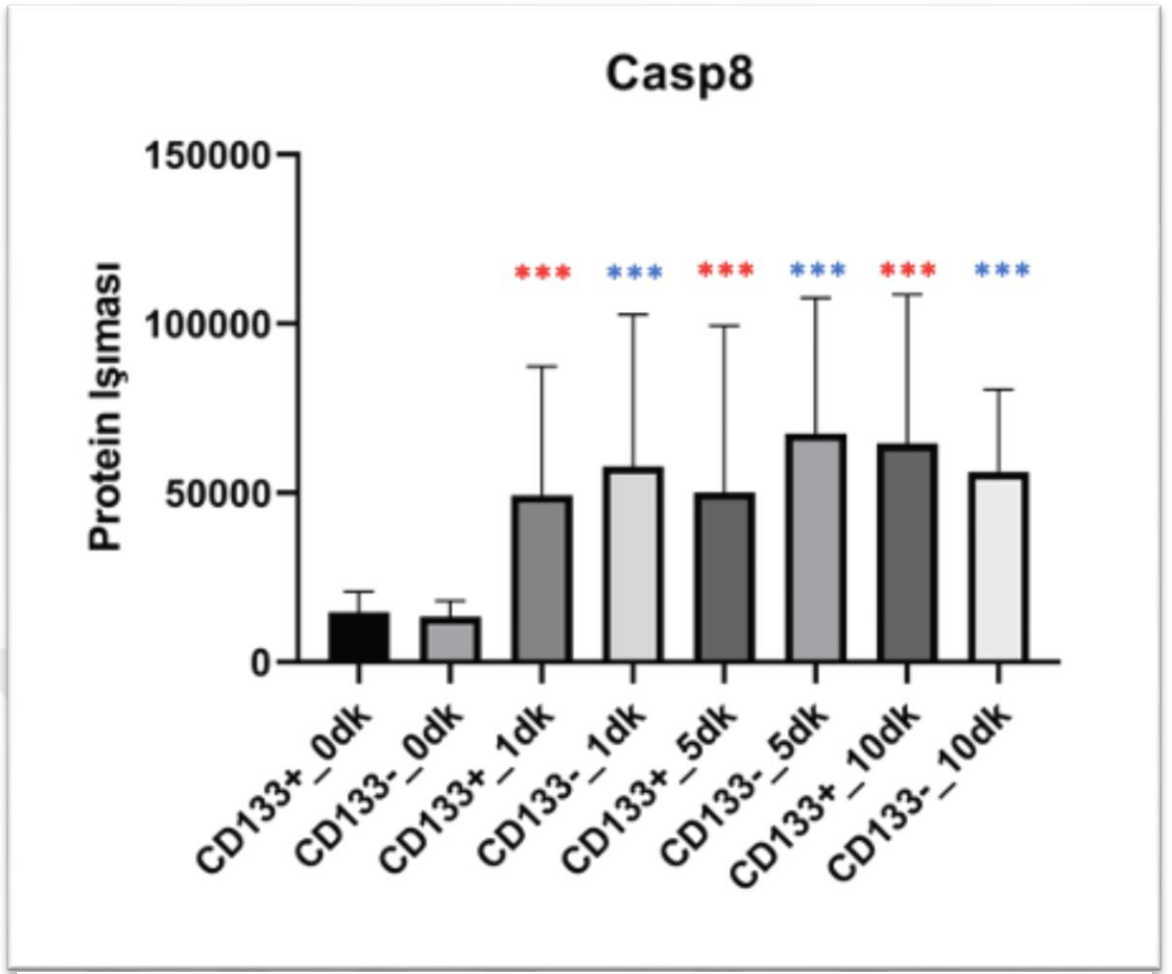


Şekil 8: CD133+ ve CD133- grupların Casp 3 proteini immünfloresan boyama görüntüleri.

Yeşil renk (1 numaralı görüntüler) Casp 3, mavi renk (2 numaralı görüntüler) hücre nükleusuna aittir. 3 numaralı görüntüler 1 ve 2 numaralı görüntülerin birleştirilmesi ile elde edilmiştir. LİPUS uygulama süreleri şeklin en üstünde, gruplarda şeklin solunda belirtilmiştir. Her görüntü grubu büyük harflerle adlandırılırken, görüntülerde kendi içerisinde rakamlar verilmiştir. 1) CD133+ grupta B3-C3-D3 numaralı görüntülere bakıldığında A3'e göre daha fazla Casp 3 proteininin ışması görülmektedir. 2) CD133- grupta F3-G3-H3 numaralı görüntülere bakıldığında E3'e göre daha fazla Casp 3 proteininin ışması görülmektedir. 3) CD133+ grup ile CD133- grup karşılaştırılmasında A3 ile E3 arasında ışma açısından fark gözlenmemiştir. Ancak CD133- grupta F3'te B3'e göre daha fazla ışma, CD133+ grupta C3'te G3'e göre daha fazla ışma görülmüştür.

4.2.1.2. Kaspaz 8 boyama sonuçları

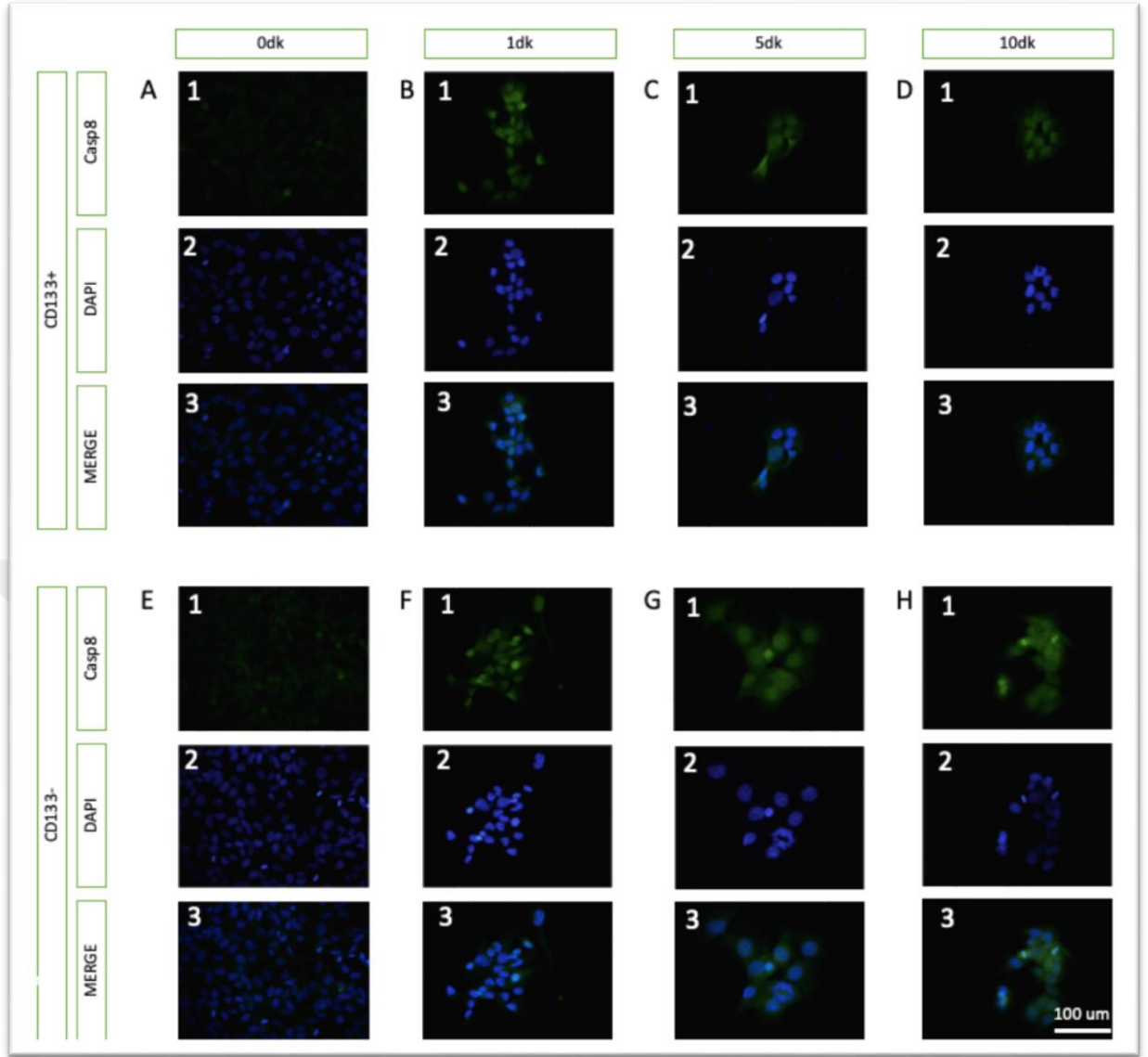
Casp 8 protein ışımalarının gruplar arasında karşılaştırılma grafiği Grafik 2'de görülmektedir. CD133+ grupta LİPUS uygulaması öncesi (0 dakika) ile LİPUS uygulaması sonrası 1-5-10 dakikalar karşılaştırıldığında 1-5-10 dakikalarda Casp 8 protein ışımalarının arttığı istatistiksel olarak saptanmıştır ($p<0.001$). Bu artış en yüksek 10 dakikada kaydedilmiştir. Aynı durum CD133- grupta da benzerdir. LİPUS uygulanması ile Casp 8 protein ışımaları artış göstermiştir ($p<0.001$). Bu artış maksimum 5 dakika uygulamada kaydedilmiştir. Başlangıçta ve LİPUS uygulaması sonrası CD133+ ile CD133- gruplarını birbirleriyle karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).



Grafik 2: Casp 8 protein ışımalarının gruplar arası karşılaştırma grafiği

Grafik her iki grupta Casp 8 proteinin LİPUS uygulama sürelerine göre ışımasını göstermektedir. Kırmızı yıldız (*) CD133+ grupta başlangıca göre 1-5-10 dakika uygulama karşılaştırmalarındaki istatistiksel anlamlı değişikliği gösterirken, mavi yıldız (*) CD133- gruptaki istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir. Her iki grupta LİPUS uygulama sonrası başlangıca göre Casp 8 protein ışması artmıştır (***) $p < 0.001$, (***) $p < 0.001$). Casp 8 protein ışması 5 dakika LİPUS uygulamasında CD133- grupta en fazla tespit edilirken ($p < 0.001$), 10 dakika uygulamada CD133+ grupta en fazla tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Başlangıçta ve LİPUS uygulama sonrası grupları birbirleriyle karşılaştırdığımızda anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Apoptozis aktivitesinin gösterilmesi amacıyla Casp 8 proteini immünfloresan yöntemi ile boyanmıştır (Şekil 9).



Şekil 9: CD133+ ve CD133- grupların Casp 8 proteini immünfloresan boyama görüntüleri

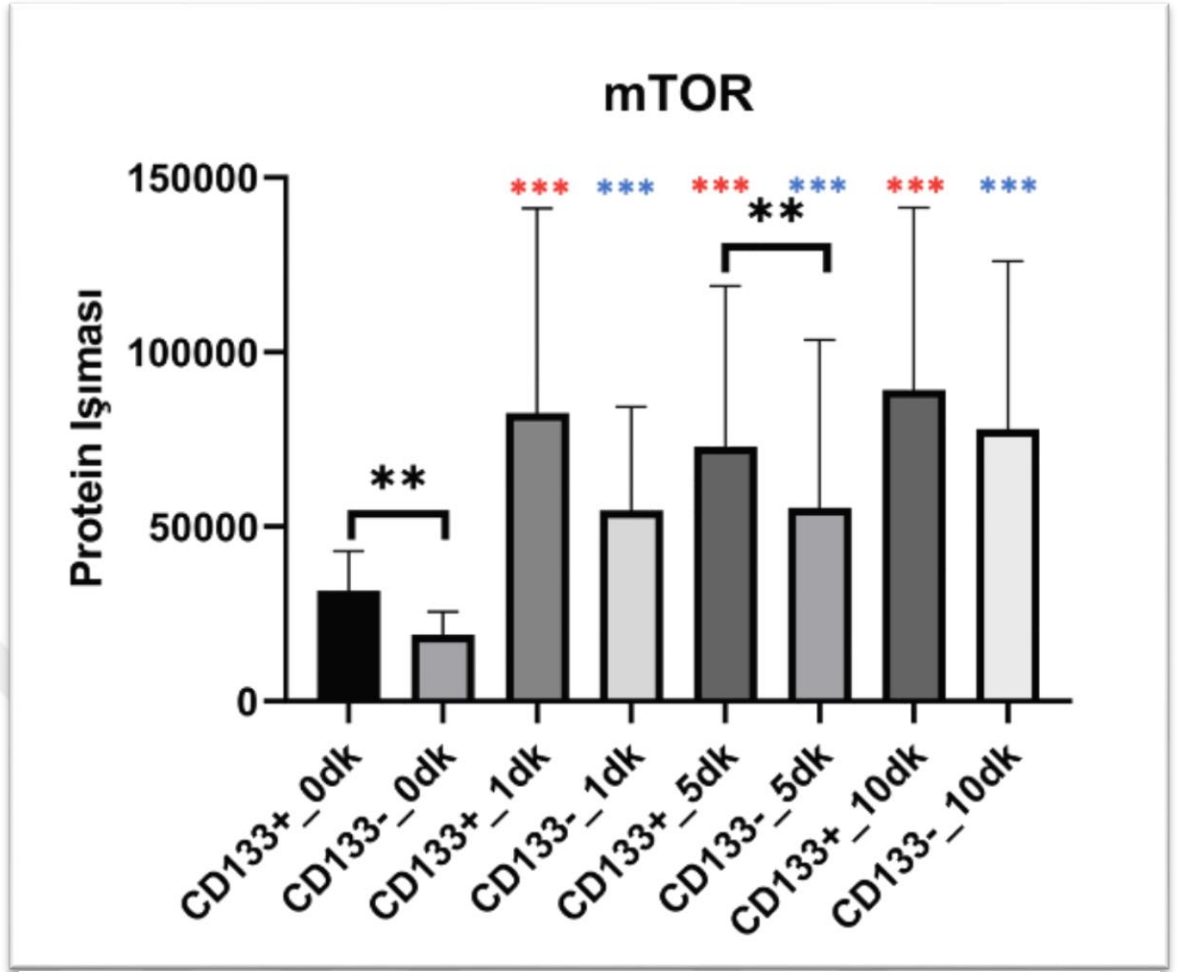
Yeşil renk (1 numaralı görüntüler) Casp 8, mavi renk (2 numaralı görüntüler) hücre nükleusuna aittir. 3 numaralı görüntüler 1 ve 2 numaralı görüntülerin birleştirilmesi ile elde edilmiştir. LİPUS uygulama süreleri şeklin en üstünde, gruplarda şeklin solunda belirtilmiştir. Her görüntü grubu büyük harflerle adlandırılırken, görüntülere de kendi içerisinde rakamlar verilmiştir. 1) CD133+ grupta B3-C3-D3 numaralı görüntülere bakıldığında A3'e göre daha fazla Casp 8 proteininin ışması görülmektedir. 2) CD133- grupta F3-G3-H3 numaralı görüntülere bakıldığında E3'e göre daha fazla Casp 8 proteininin ışması görülmektedir. 3) CD133+ grup ile CD133- grup karşılaştırılmasında A3-E3, B3-F3, C3-G3 ve D3-H3 arasında ışma açısından fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

4.2.2. Otofaji

Otofaji aktivitesini göstermek için mTOR ve LC3 boyaması yapılmıştır.

4.2.2.1. mTOR boyama sonuçları

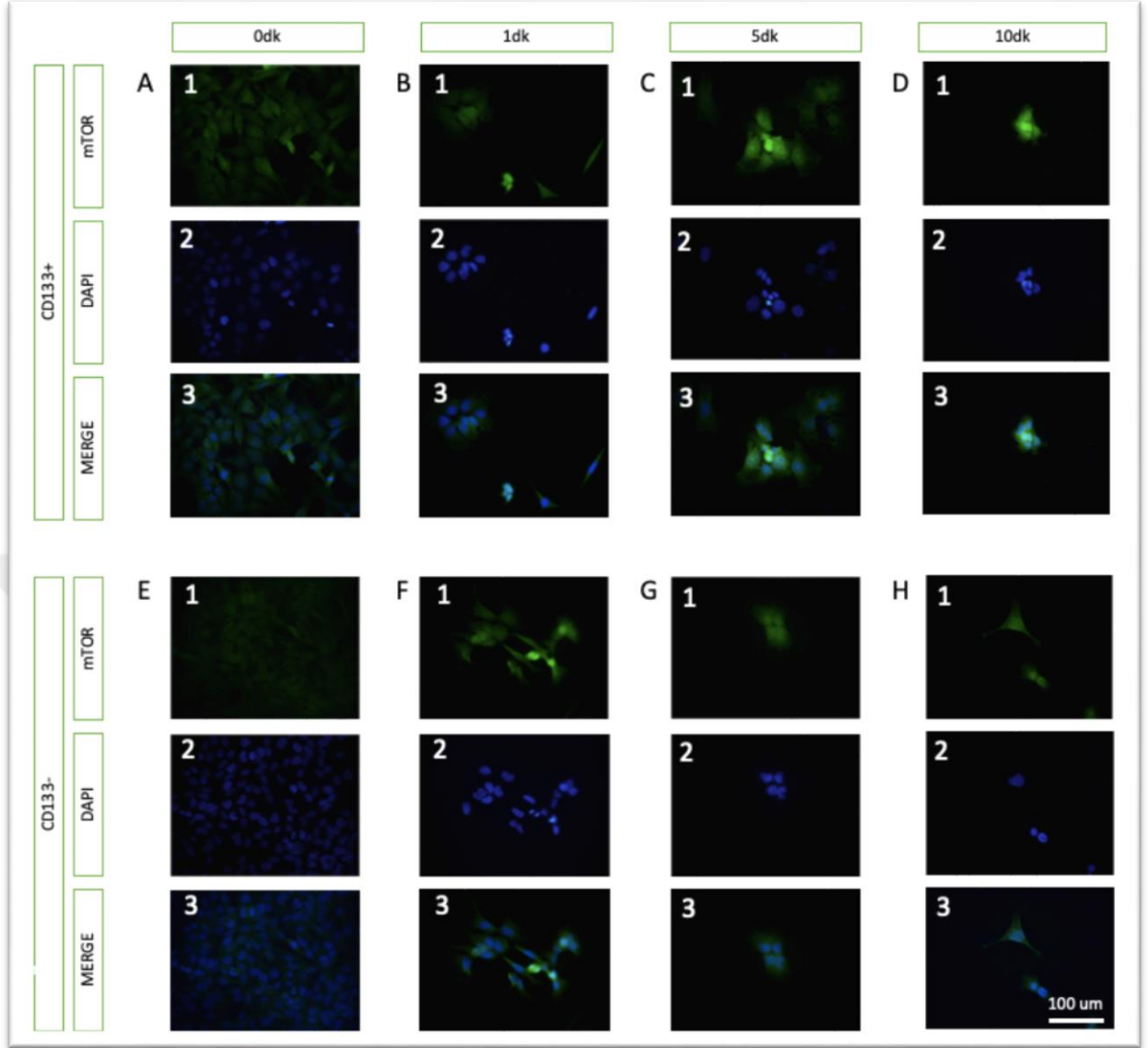
mTOR protein ışımalarının gruplar arasında karşılaştırılma grafiği Grafik 3'te görülmektedir. CD133+ grupta LİPUS uygulaması öncesi (0 dakika) ile LİPUS uygulaması sonrası 1-5-10 dakikalar karşılaştırıldığında 1-5-10 dakikalarda mTOR protein ışımalarının istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır ($p<0.001$). Bu artış en yüksek 10 dakikada kaydedilmiştir. Aynı durum CD133- grupta da benzerdir. LİPUS uygulanması ile mTOR protein ışımaları istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0.001$). Bu artış en yüksek 10 dakika uygulamada kaydedilmiştir. Başlangıçta (0 dakika) CD133+ ile CD133- grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur ($p<0.01$) ve CD133+ grupta daha fazladır. LİPUS uygulaması sonrası her iki grukarşılaştırıldığında sadece 5 dakika uygulamalarda istatistiksel olarak CD133+ grupta daha fazla bulunmuştur ($p<0.01$).



Grafik 3: mTOR protein ışımalarının gruplar arası karşılaştırma grafiği

Grafik her iki grupta mTOR proteinin LİPUS uygulama sürelerine göre ışımasını göstermektedir. Kırmızı yıldız (*) CD133+ grupta başlangıca göre 1-5-10 dakika uygulama karşılaştırmalarındaki istatistiksel anlamlı değişikliği gösterirken, mavi yıldız (*) CD133- gruptaki istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir. Siyah yıldız da (*) CD133+ ile CD133- gruplar arasındaki karşılaştırmalarda saptanan anlamlı değişikliği göstermektedir. Her iki grupta LİPUS uygulama sonrası başlangıca göre mTOR protein ışımaları artmıştır (** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$). 5 dakika LİPUS uygulamasında CD133+ grupta en fazla tespit edilirken ($p < 0.05$), 10 dakika uygulamada CD133+ grupta en fazla tespit edilmiştir ($p < 0.001$). mTOR protein ışımaları CD133+ grupta CD133- gruba göre başlangıçta (0 dakika) ve 5 dakika uygulamada anlamlı olarak daha fazladır (** $p < 0.01$).

Otofaji aktivitesinin gösterilmesi amacıyla mTOR proteinini immünfloresan yöntemi ile boyanmıştır (Şekil 10).

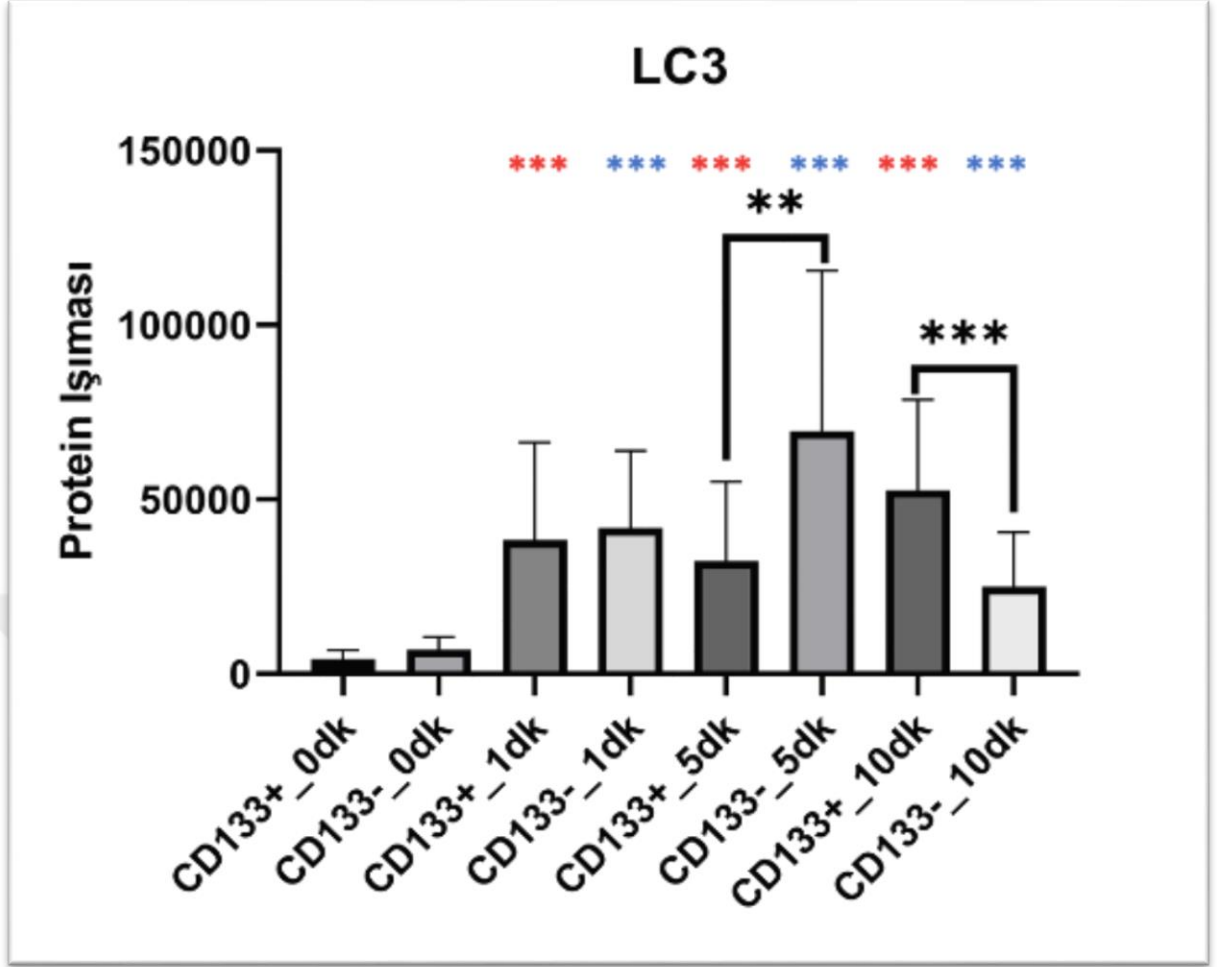


Şekil 10: CD133+ ve CD133- grupların mTOR proteini immünfloresan boyama görüntüleri.

Yeşil renk (1 numaralı görüntüler) mTOR, mavi renk (2 numaralı görüntüler) hücre nükleusuna aittir. 3 numaralı görüntüler 1 ve 2 numaralı görüntülerin birleştirilmesi ile elde edilmiştir. LİPUS uygulama süreleri şeklin en üstünde, gruplarda şeklin solunda belirtilmiştir. Her görüntü grubu büyük harflerle adlandırılırken, görüntülerde kendi içerisinde rakamlar verilmiştir. 1) CD133+ grupta B3-C3-D3 numaralı görüntülere bakıldığında A3'e göre daha fazla mTOR proteininin ışması görülmektedir. 2) CD133- grupta F3-G3-H3 numaralı görüntülere bakıldığında E3'e göre daha fazla mTOR proteininin ışması görülmektedir. 3) CD133+ grup ile CD133- grup karşılaştırıldığında A3'te E3'e göre, C3'te G3'e göre daha fazla ışma tespit edilmiştir.

4.2.2.2. LC3 boyama sonuçları

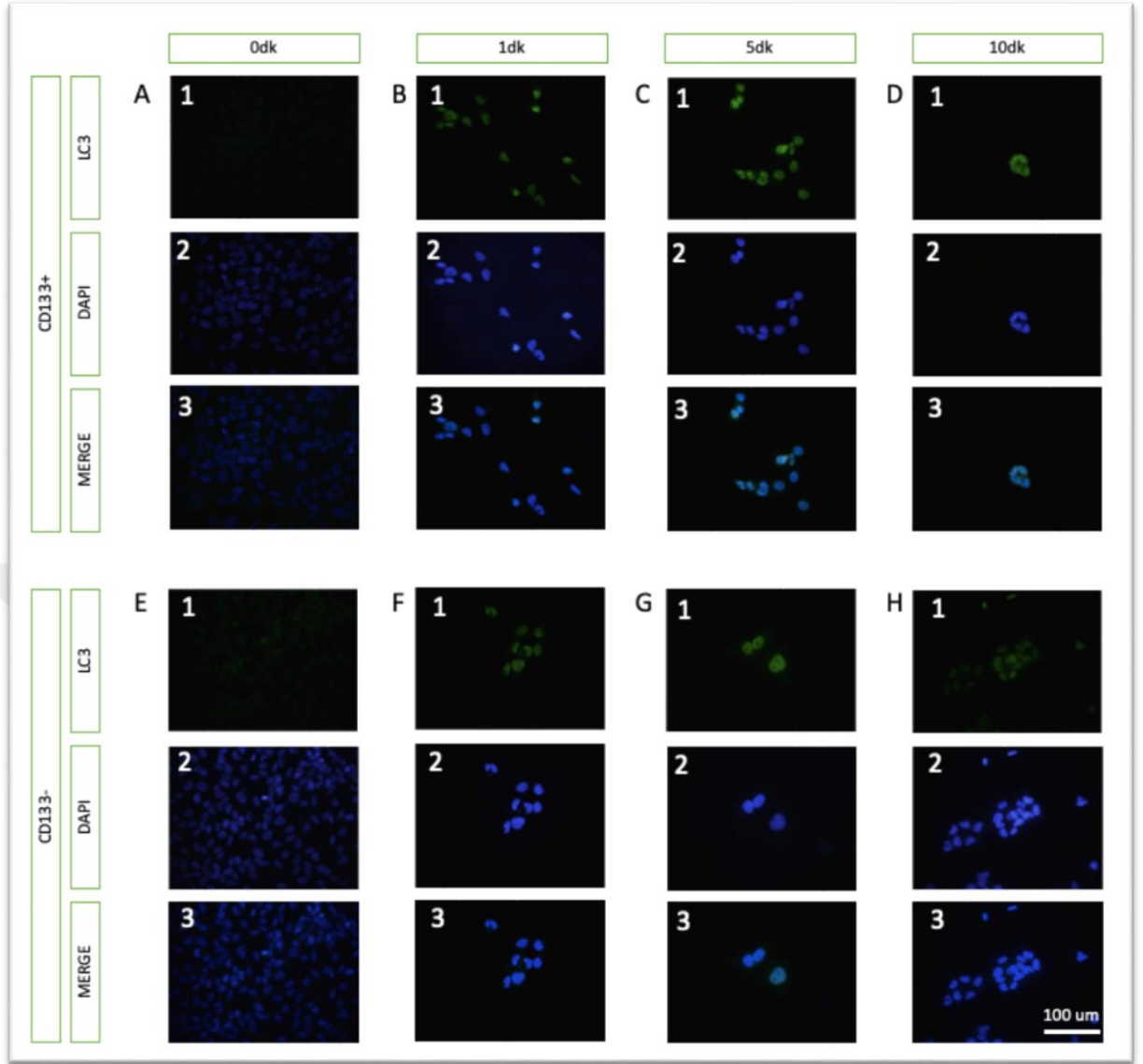
LC3 protein ışımalarının gruplar arasında karşılaştırılma grafiği Grafik 4'te görülmektedir. CD133+ grupta LİPUS uygulaması öncesi (0 dakika) ile LİPUS uygulaması sonrası 1-5-10 dakikalar karşılaştırıldığında 1-5-10 dakikalarda LC3 protein ışımalarının istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır. Bu artış en yüksek 10 dakikada kaydedilmiştir. Aynı durum CD133- grupta da benzerdir. LİPUS uygulanması ile LC3 protein ışımaları istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. Bu artış en yüksek 5 dakika uygulamada kaydedilmiştir. Başlangıçta (0 dakika) CD133+ ile CD133- grubu arasında istatistiksel fark bulunamamıştır ($p>0,05$). LİPUS uygulaması sonrası her iki grubun birbirleriyle karşılaştırılması sonucu 5-10 dakika uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.01$ ve $p<0.001$) bulunmuştur. 5 dakikada LC3 protein ışımaları CD133- grupta fazla tespit edilirken ,10 dakikada CD133+ grupta fazla tespit edilmiştir.



Grafik 4: LC3 protein ışımalarının gruplar arası karşılaştırma grafiği

Grafik her iki grupta LC3 proteinin LİPUS uygulama sürelerine göre ışımasını göstermektedir. Kırmızı yıldız (*) CD133+ grupta başlangıca göre 1-5-10 dakika uygulama karşılaştırmalarındaki istatistiksel anlamlı değişikliği gösterirken, mavi yıldız (*) CD133- gruptaki istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir. Siyah yıldız da (*) CD133+ ile CD133- gruplar arasındaki karşılaştırmalarda saptanan anlamlı değişikliği göstermektedir. Her iki grupta LİPUS uygulama sonrası başlangıca göre LC3 protein ışması artmıştır (**p<0.001, ***p<0.001). LC3 protein ışması 5 dakika LİPUS uygulamasında CD133- grupta fazla tespit edilirken (**p<0.01), 10 dakika uygulamada CD133+ grupta fazla tespit edilmiştir (**p<0.001).

Otofaji aktivitesinin gösterilmesi amacıyla LC3 proteini immünfloresan yöntemi ile boyanmıştır (Şekil 11).



Şekil 11: CD133+ ve CD133- grupların LC3 proteini immünfloresan boyama görüntüleri. Yeşil renk (1 numaralı görüntüler) LC3, mavi renk (2 numaralı görüntüler) hücre nükleusuna aittir. 3 numaralı görüntüler 1 ve 2 numaralı görüntülerin birleştirilmesi ile elde edilmiştir. LİPUS uygulama süreleri şeklin en üstünde, gruplarda şeklin solunda belirtilmiştir. Her görüntü grubu büyük harflerle adlandırılırken, görüntülere de kendi içerisinde rakamlar verilmiştir. 1) CD133+ grupta B3-C3-D3 numaralı görüntülere bakıldığında A3'e göre daha fazla LC3 proteininin ışması görülmektedir. 2) CD133- grupta F3-G3-H3 numaralı görüntülere bakıldığında E3'e göre daha fazla LC3 proteininin ışması görülmektedir. 3) CD133+ grup ile CD133- grup karşılaştırılmasında A3 ile E3 arasında ışma açısından fark gözlenmemiştir. Ancak CD133+ grupta D3'te H3'e göre daha fazla ışma, CD133- grupta G3'te C3'e göre daha fazla ışma görülmüştür.

Tartışma

Malign melanom, diğer cilt kanserlerine göre daha az görülmesine rağmen en agresif seyreden ve mortalitesi yüksek olan cilt kanseridir (Lai, Cranwell, & Sinclair, 2018). Son yıllarda dünya nüfusunun yaşlanmasıyla birlikte dünyada ki insidansı da artmaktadır. MM olgularının etyopatogenezinde tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu veya protoonkogenlerin aktivasyonu vardır. Ayrıca NRAS/MAPK, PI3K/AKT hücre içi sinyal yollarında görev alan proteinlerde (RAS, RAF, PTEN gibi) oluşabilecek mutasyonlar MM'a yol açar. Tümörün derinliği arttıkça metastaz olasılığı artar. MM'un erkenden tespit edilip tedavi edilmesi hasta sağkalımı yönünden önemlidir. Ancak erkenden tanı konulup cerrahi eksizyon yapılan hastalarda bile yine erken dönem de nüksler görülebilmektedir (Richards, Mehta, Ramming, & Skosey, 1992). MM'un heterojen hücre grupları içermesinden dolayı biyolojik davranışının nasıl olacağını kestirmek kolay değildir. Bu nedenle cerrahi sonrası yapılacak kemoterapötik tedavilerde önem kazanmaktadır. Ancak bu tedavilere karşı direnç gelişimi olabilmesi, tedavilerin maliyetli olması ve yüksek dozlarda yan etkilerinin olması gibi sorunlarla karşılaşmaktadır.

Kanser kök hücreleri, kök hücre özellikleri bakımından normal kök hücrelere benzer olsalar da radyasyona, kimyasal ajanlara ve apoptozise karşı dirençli olma özellikleriyle normal kök hücrelerden ayrılırlar (Ural, 2012). Bu hücreleri tanımlamak için bazı belirteçler kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda CD133+ yüzey belirteci melanomlu hastalardan izole edilen kök hücre benzeri hücrelerde de fazlaca tespit edilmiştir (Monzani et al., 2007). Bu belirteci taşıyan hücrelerin kanser oluşturma potansiyelleri de artmaktadır. Ayrıca MM kanser kök hücresi için CD271, Nanog, Oct3/4, Hedgehog, ALDH1, ABCB1, ABCB5, ABCG2, Sox10 gibi belirteçler de kullanılır (Parmiani, 2016). Melanoma diğer kanser türlerine göre oldukça fazla kanser kök hücresi içermesi nedeniyle kanser kök hücresi araştırmaları için iyi bir seçenektir (Perego et al., 2010).

Kök hücreler ve mikroçevreleri etraflarındaki mekanik güçler ile etkileşim halindedir (Vining & Mooney, 2017). Bu mekanik güçler gerilme, yüklenme, kompresyon,

vibrasyon, basınç ve ses dalgalarıdır. Kök hücreler bu güçlere maruz kaldığında o andaki durumlarına göre proliferasyon, migrasyon, kendini yenileme veya farklılaşma olarak yanıt verebilirler (Marrelli et al., 2018).

Ultrason tıp alanında hem görüntüleme hem de tedavi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Tedavi amacıyla kullanılan ultrason terapötik ultrason olarak adlandırılmıştır (ter Haar, 1999). Elektrik enerjisi ultrason cihazının probunda (başlığında) kristalleri titreştirir ve böylece ses dalgaları oluşturulur. Genellikle tedavide kullanılan frekanslar 0,7-3,3 Mhz aralığıdır (Sengupta & Balla, 2018). Terapötik ultrasonun etkisi için uygulanan enerji yoğunluğu önemlidir ve yoğunluk arttıkça dokulara zarar verme ihtimali artar (Zeqiri, 1997). LİPUS düşük yoğunluklu olduğu için dokuları tahrip etmez ve bu yüzden diş/kemik iyileşmesi ve rejenerasyon için kullanılabilir (Dedhia J, 2017). Son yıllarda kanser tedavisi için düşük yoğunluklu ultrason kullanımı önem kazanmaktadır. Hücre membranında sonoporasyona yol açıp kemoterapötiklerin hücre içine girişini artırarak veya kavitasyon etkisiyle serbest radikallerin açığa çıkmasını sağlayarak apoptozisi başlatıp kanser hücrelerinin ölümüne yol açar (MIŠÍK & RIESZ, 2000; Sengupta & Balla, 2018). Kanser tedavisinde hücrelerde apoptozisin ve otofajinin aktive edilebilmesi oldukça önemlidir. Önceki yıllarda LİPUS'un uygulandığı çalışmalarda kanser hücrelerinde apoptozisin ve otofajinin aktive edildiği ortaya konulmuştur. *İn vivo* olarak farelerde melanom oluşturularak yapılmış bir çalışmada bu farelere uygulanan terapötik ultrason ile melanom kanser hücrelerinde apoptozisin arttığı gösterilmiştir (Hu et al., 2015). İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattına LİPUS'un uygulandığı başka bir çalışmada da LİPUS'un doza bağımlı olarak (0,5 W/cm² ve üzerinde) hücrelerde apoptozisi başlattığı bildirilmiştir (Shi et al., 2016). Ayrıca ultrasonun kullanıldığı fare lösemi hücre hattı ile yapılan bir diğer çalışmada da apoptozis ve otofajinin başladığı gösterilmiştir (Wang et al., 2013). Genel olarak literatürde LİPUS ile yapılan çalışmalar kanser hücreleri ve kullanılan kemoterapötiklerin hücre içine girişi ile ilgilidir ve doğrudan kanser kök hücrelerine etkisini araştıran çalışma sayısı kısıtlıdır. Kanser tedavisinde kanser kök hücrelerinin yok edilerek tümörün başlamasının, metastazın oluşmasının ve geleneksel kemoterapinin yanı sıra genomik hedefli tedaviye direncin engellenmesi oldukça önemlidir. *İn vitro* overian kanser kök hücreleri ile yapılan bir çalışmada da LİPUS ile kanser kök hücrelerinde apoptozisin indüklendiği tespit edilmiştir (Gong, Zhang, Jia, & Pan, 2020). Bu çalışmanın aksine

in vivo ve *in vitro* olarak insan meme kanser kök hücreleri ile yapılan diğer bir çalışmada tek başına ultrason uygulamanın kontrol grubuna göre anlamlı etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Guo et al., 2017). Ancak Guo ve ark. yaptığı bu çalışmada uygulanan ultrason dozları 0,5-1,0-2,0-3,0-3,5-4,0 W/cm² olsa da uygulama süresi 1-5-10 saniye kadardır. Yapılan çalışmalar arasında LİPUS uygulamasında standart yoğunluk miktarı ve uygulama süresi yoktur. Bu nedenle sonuçlar değerlendirilirken LİPUS yoğunluğu ve uygulama süresi göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmalarda genel olarak uygulama süresi sabit tutulurken çeşitli dozlar araştırılmıştır (Katiyar et al., 2020; Shi et al., 2016; Ye et al., 2016). Bizim çalışmamızda genelden farklı olarak uygulama dozunu sabit tutulup üç farklı uygulama süresinin etkisi araştırıldı. Sonuç olarak çalışmamızda başlangıca göre hem MM kanser hücre hattında hem de MM kanser kök hücre hattında 1 dakikadan itibaren LİPUS uygulaması sonrası apoptozis ve otofaji aktivitesinin arttığı tespit edildi.

Apoptozis, organizmada homeostazisi sağlamak amacıyla programlı hücre ölümüdür. Kontrolünün kaybedilmesi ve apoptozisin gerçekleşmemesi kanserin ortaya çıkmasına neden olur. Apoptozis intrinsek ve ekstrinsek olmak üzere iki temel yolla başlatılabilir. İntrensek yol mitokondriyal yol olup kaskadın sonunda casp 3 aktivasyonu gerçekleşir. Ekstrinsek yol da casp 8 aktivasyonu ile sonuçlanır (Behzadi & Ranjbar, 2015; Elmore, 2007; Nitulescu et al., 2015). LİPUS'un çeşitli kanser hücreleri üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda casp 3 yolunun aktive edilerek apoptozisin başlatıldığı belirtilmiştir (Cao et al., 2021; Shi et al., 2016). Fare melanom hücreleri ile yapılan bir çalışmada da ultrason uygulaması sonrası casp 3 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Rosenblatt, Frank, & Burks, 2021). Literatürde LİPUS uygulaması sonrası casp 8'in değerlendirildiği çok fazla çalışmaya rastlamadık ancak pankreas kanser hücre hattına ultrason uygulanan bir çalışmada casp 8 aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı değişiklik göstermediği raporlanmıştır. Bu çalışmada ultrason ile mikrobubble etkisi oluşturduklarında Casp 8'in anlamlı olarak azaldığını ve bu durumun nekroptozis ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir (Cao et al., 2021). Bizim çalışmamızda LİPUS uygulaması sonrası her iki hücre hattında başlangıca göre casp 3 ve casp 8 aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. Literatürden farklı olarak her iki hücre hattı karşılaştırıldığında casp 3 aktivitesi 1 dakika LİPUS uygulaması sonrası CD133-grupta, 5 dakika LİPUS uygulaması sonrası CD133+ grupta fazla bulunmuştur. Ancak

casp 8 aktivitesi açısından iki grup arasında fark gözlenmemiştir. Bu sonuca göre LİPUS her iki grupta apoptozisi aktifleştirirse de uzun süreli uygulandığında MM kanser kök hücrelerinde daha etkili olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Otofaji, hücrel stres durumlarında (besin azalması, oksidatif hasar, patojen enfeksiyon gibi) tetiklenir ve otofaji kontrolünün kaybedilmesi kansere yol açabilir (L. Galluzzi et al., 2012). Otofajinin kanser hücresinde kanserin tipine, evresine ve genetik özelliklerine göre iki yönlü etki gösterip tümör baskılayıcı veya tümör destekleyici olabildiği gösterilmiştir (X. Li, He, & Ma, 2020). mTOR, mTORC1 kompleksini oluşturur ve mTORC1 inhibisyonu otofaji başlangıcı ve otofagozom oluşmasını destekleyen proteinlerin defosforilasyonu yoluyla otofajiyi aktive eder (Kim & Guan, 2015). Yani mTOR otofajinin negatif düzenleyicisidir (Saxton & Sabatini, 2017). LC3 oluşturduğu protein kompleksi ile otofagozomun uzaması ve olgunlaşması için gereklidir. Ayrıca LC3 otofaji aktivitesini izlemek için sıklıkla kullanılır (Lee & Lee, 2016). Yapılan çalışmalarda LİPUS uygulaması ile otofajinin etkilendiği gösterilmiştir (Y. Li et al., 2020; Zeng et al., 2019). Zeng ve ark yaptığı çalışmada akciğer kanser hücrelerinde LİPUS'un mTOR'u düşük dozlarda aktive edebileceğini, yüksek dozlarda da inhibe edebileceğini ortaya koymuşlardır. Aynı çalışmada LC3 için düşük doz LİPUS uygulamasında inhibe edildiği, yüksek dozlarda da aktive edildiği bildirilmiştir (Zeng et al., 2019). Bizim çalışmamızda hem MM kanser hücre hattında hem de MM kanser kök hücre hattında başlangıca göre LİPUS uygulaması sonrası mTOR ve LC3 ışımada artış gözlenmiştir. Uygulama süresi uzadıkça MM kanser kök hücre hattında mTOR aktivitesinde bir dalgalanma gözlenirken LC3 aktivitesi istikrarlı bir şekilde artmış ve 10 dakika uygulama sonrası MM kanser hücre hattına göre daha fazla artış gözlenmiştir. mTOR ve LC3 zamansal ve otofaji çeşitliliği açısından farklılık gösterebilir. Bu durumda mTOR ve LC3'ün birbirine karşı otofaji açısından kompensasyon mekanizmalarında görev alabileceği düşünülmektedir.

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmanın en önemli bulgusu *in vitro* koşullarda LİPUS uygulanması sonucu CHL-1 insan MM kanser kök hücreleri (CD133+) ile insan MM kanser hücrelerinde (CD133-) apoptozis ve otofajinin indüklendiğinin Casp 3-Casp 8 ile mTOR-LC3 aktivitesinin artışı ile ortaya konulmuş olmasıdır. Ayrıca CD133+ grubunda 5 dakika'da Casp 3 ve mTOR aktivitesinin CD133- grubuna göre daha çok artması apoptozis ve otofajinin malign melanom kanser kök hücrelerinde daha belirgin arttığını göstermektedir. Böylece CHL-1 insan MM kanser kök hücrelerinin apoptozisten kaçabilme ve otofajiden korunma özelliklerini kaybetmeleri kök hücre özelliklerinin azaldığı şeklinde yorumlanabilir.

Sonuç olarak LİPUS etkisinin ve dolayısıyla mekanik süreçlerin MM kanser kök hücresi ve MM hücresi üzerine olan etkilerinin biyofiziksel, morfolojik ve moleküler biyolojik detaylı analizlerle detaylandırılması gerekliliği sürmekte olup, hücre sinyalizasyon basamaklarının çeşitliliği ve bu çeşitliliğin araştırılması gelecek dönemlerde terapötik hedefler yaratma konusunda büyük önem taşımaktadır.

Kaynaklar

- Anding, A. L., & Baehrecke, E. H. (2015). Chapter Three - Autophagy in Cell Life and Cell Death. In H. B. T.-C. T. in D. B. Steller (Ed.), *Apoptosis and Development* (Vol. 114, pp. 67–91). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.012>
- Baker, K. G., Robertson, V. J., & Duck, F. A. (2001). A Review of Therapeutic Ultrasound: Biophysical Effects. *Physical Therapy*, 81(7), 1351–1358. <https://doi.org/10.1093/ptj/81.7.1351>
- Barnhill, R. L., Fine, J. A., Roush, G. C., & Berwick, M. (1996). Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer*, 78(3), 427–432. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19960801\)78:3<427::AID-CNCR8>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19960801)78:3<427::AID-CNCR8>3.0.CO;2-G)
- Behzadi, P., & Ranjbar, R. (2015). Caspases and Apoptosis. *Molecular Enzymology and Drug Targets*, 01(02), 21767. <https://doi.org/10.21767/2572-5475.10006>
- Bernard, V., Mornstein, V., Škorpíková, J., & Jaroš, J. (2012). Ultrasound and Cisplatin Combined Treatment of Human Melanoma Cells A375—the Study of Sonodynamic Therapy. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 38(7), 1205–1211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2012.02.006>
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730–737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>
- Cao, J., Hu, C., Zhou, H., Qiu, F., Chen, J., Zhang, J., & Huang, P. (2021). Microbubble-Mediated Cavitation Promotes Apoptosis and Suppresses Invasion in AsPC-1 Cells. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 47(2), 323–333. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.10.014>
- Conforti, C., & Zalaudek, I. (2021). Epidemiology and Risk Factors of Melanoma: A Review. *Dermatology Practical & Conceptual*, 11, 2021161S. <https://doi.org/10.5826/dpc.11s1a161s>
- Danshina, S. D., Markov, A., Huldani, & Achmad, H. (2020). Causes, symptoms, diagnosis and treatment of melanoma. *International Journal of Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.31838/ijpr/2020.12.03.265>

- Dedhia J, P. A. . (2017). Low Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) - The Future of Dental Therapeutics. *Journal of Dentistry and Oral Biology*, 2(13), Article 1080.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Fang, D., Nguyen, T. K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A. N., Hotz, S., ... Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Research*, 65(20), 9328–9337. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1343>
- Flusberg, D. A., & Sorger, P. K. (2015). Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells. *Trends in Cell Biology*, 25(8), 446–458. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.03.003>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., ... Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 107–120. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>
- Galluzzi, Lorenzo, Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Girouard, S. D., & Murphy, G. F. (2011). Melanoma stem cells: Not rare, but well done. *Laboratory Investigation*, 91(5), 647–664. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.50>
- Gökbayrak Atay, İ. N., Gezer, A. H., & Kasap, E. (2021). The importance of apoptosis in cancer development and treatment. *Türk Onkoloji Dergisi*, 36(3), 381–388. <https://doi.org/10.5505/tjo.2021.2574>
- Gong, T., Zhang, P., Jia, L., & Pan, Y. (2020). Suppression of ovarian cancer by low-intensity ultrasound through depletion of IL-6/STAT3 inflammatory pathway-maintained cancer stemness. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526(3), 820–826. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.136>
- Guo, L., Zheng, P., Fan, H., Wang, H., Xu, W., & Zhou, W. (2017). Ultrasound reverses chemoresistance in breast cancer stem cell like cells by altering ABCG2 expression. *Bioscience Reports*, 37(6), 1–11. <https://doi.org/10.1042/BSR20171137>

- Hu, Z., Fan, H., Lv, G., Zhou, Q., Yang, B., Zheng, J., & Cao, W. (2015). 5-Aminolevulinic acid-mediated sonodynamic therapy induces anti-tumor effects in malignant melanoma via p53-miR-34a-Sirt1 axis. *Journal of Dermatological Science*, 79(2), 155–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.04.010>
- Huang, D., Gao, Y., Wang, S., Zhang, W., Cao, H., Zheng, L., ... Chen, J. (2020). Impact of low-intensity pulsed ultrasound on transcription and metabolite compositions in proliferation and functionalization of human adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Scientific Reports*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69430-z>
- Iannolo, G., Conticello, C., Memeo, L., & De Maria, R. (2008). Apoptosis in normal and cancer stem cells. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 66(1), 42–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.09.004>
- Katiyar, A., Duncan, R. L., & Sarkar, K. (2014). Ultrasound stimulation increases proliferation of MC3T3-E1 preosteoblast-like cells. *Journal of Therapeutic Ultrasound*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2050-5736-2-1>
- Katiyar, A., Osborn, J., DasBanerjee, M., Zhang, L. G., Sarkar, K., & Sarker, K. P. (2020). Inhibition of Human Breast Cancer Cell Proliferation by Low-Intensity Ultrasound Stimulation. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 39(10), 2043–2052. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jum.15312>
- Kim, Y. C., & Guan, K. L. (2015). MTOR: A pharmacologic target for autophagy regulation. *Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 25–32. <https://doi.org/10.1172/JCI73939>
- Kozovska, Z., Gabrisova, V., & Kucerova, L. (2016). Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. *Neoplasma*, 63(4), 510–517. https://doi.org/10.4149/neo_2016_403
- Lai, V., Cranwell, W., & Sinclair, R. (2018). Epidemiology of skin cancer in the mature patient. *Clinics in Dermatology*, 36(2), 167–176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.10.008>
- Lee, Y. K., & Lee, J. A. (2016). Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: Differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Reports*, 49(8), 424–430. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.8.081>

- Li, X., He, S., & Ma, B. (2020). Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular Cancer*, *19*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1138-4>
- Li, Y., Sun, C., Feng, G., He, Y., Li, J., & Song, J. (2020). Low-intensity pulsed ultrasound activates autophagy in periodontal ligament cells in the presence or absence of lipopolysaccharide. *Archives of Oral Biology*, *117*, 104769. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104769>
- Manokawinchoke, J., Pavasant, P., Limjeerajarus, C. N., Limjeerajarus, N., Osathanon, T., & Egusa, H. (2021). Mechanical loading and the control of stem cell behavior. *Archives of Oral Biology*, *125*, 105092. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105092>
- Marrelli, M., Codispoti, B., Shelton, R. M., Scheven, B. A., Cooper, P. R., Tatullo, M., & Paduano, F. (2018). Dental pulp stem cell mechanoresponsiveness: Effects of mechanical stimuli on dental pulp stem cell behavior. *Frontiers in Physiology*, *9*(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01685>
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2015). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(4), 8656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026716>
- Meyle, K. D., & Guldberg, P. (2009). Genetic risk factors for melanoma. *Human Genetics*, *126*(4), 499–510. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0715-9>
- MÍŠÍK, V., & RIESZ, P. (2000). Free Radical Intermediates in Sonodynamic Therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *899*(1), 335–348. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06198.x>
- Monzani, E., Facchetti, F., Galmozzi, E., Corsini, E., Benetti, A., Cavazzin, C., ... La Porta, C. A. M. (2007). Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *European Journal of Cancer*, *43*(5), 935–946. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.01.017>
- Nitulescu, G. M., Draghici, C., Olaru, O. T., Matei, L., Ioana, A., Dragu, L. D., & Bleotu, C. (2015). Synthesis and apoptotic activity of new pyrazole derivatives in cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *23*(17), 5799–5808. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.010>
- Parmiani, G. (2016). Melanoma cancer stem cells: Markers and functions. *Cancers*, *8*(3), 4–8. <https://doi.org/10.3390/cancers8030034>
- Perego, M., Tortoreto, M., Tragni, G., Mariani, L., Deho, P., Carbone, A., ... Castelli,

- C. (2010). Heterogeneous Phenotype of Human Melanoma Cells with In Vitro and In Vivo Features of Tumor-Initiating Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, *130*(7), 1877–1886. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/jid.2010.69>
- Richards, J. M., Mehta, N., Ramming, K., & Skosey, P. (1992). Sequential Chemoimmunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma BT - Cytokines in Hemopoiesis, Oncology, and AIDS II. In M. Freund, H. Link, R. E. Schmidt, & K. Welte (Eds.) (pp. 721–727). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Rosenblatt, R. B., Frank, J. A., & Burks, S. R. (2021). Cytosolic Ca(2+) transients during pulsed focused ultrasound generate reactive oxygen species and cause DNA damage in tumor cells. *Theranostics*, *11*(2), 602–613. <https://doi.org/10.7150/thno.48353>
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, *168*(6), 960–976. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Sengupta, S., & Balla, V. K. (2018). A review on the use of magnetic fields and ultrasound for non-invasive cancer treatment. *Journal of Advanced Research*, *14*, 97–111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.003>
- Shi, M., Liu, B., Liu, G., Wang, P., Yang, M., Li, Y., & Zhou, J. (2016). Low intensity-pulsed ultrasound induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Ultrasonics*, *64*, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2015.07.011>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(9), 621–632. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>
- ter Haar, G. (1999). Therapeutic ultrasound. *European Journal of Ultrasound*, *9*(1), 3–9. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0929-8266\(99\)00013-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0929-8266(99)00013-0)
- Türkyılmaz, M., Öztürk, M., Dündar, S., Ergün, A. K., Sevinç, A., Tütüncü, S., & Seymen, E. (2021). TÜRKİYE Kanİstatistikleri 2017, 1–65. Retrieved from

https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf

- Ural, A. U. (2012). Cancer Stem Cells: Current Concepts and Therapeutic Implications BT - Adult and Embryonic Stem Cells. In K. Turksen (Ed.) (pp. 227–235). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-630-2_15
- Vining, K. H., & Mooney, D. J. (2017). Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(12), 728–742. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.108>
- Wang, X., Wang, P., Zhang, K., Su, X., Hou, J., & Liu, Q. (2013). Initiation of autophagy and apoptosis by sonodynamic therapy in murine leukemia L1210 cells. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1247–1259. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.023>
- Watts, C. G., Dieng, M., Morton, R. L., Mann, G. J., Menzies, S. W., & Cust, A. E. (2015). Clinical practice guidelines for identification, screening and follow-up of individuals at high risk of primary cutaneous melanoma: a systematic review. *British Journal of Dermatology*, 172(1), 33–47. <https://doi.org/10.1111/bjd.13403>
- Williams, R. (1987). Production and transmission of ultrasound. *Physiotherapy*, 73(3), 113–116.
- Wu, J., & Nyborg, W. L. (2008). Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10), 1103–1116. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.009>
- Yang, C., Li, B., Yu, J., Yang, F., Cai, K., & Chen, Z. (2018). Ultrasound microbubbles mediated miR-let-7b delivery into CD133+ ovarian cancer stem cells. *Bioscience Reports*, 38(5), BSR20180922. <https://doi.org/10.1042/BSR20180922>
- Ye, Q., Meng, C., Shen, Y., Ji, J., Wang, X., Zhou, S., ... Wang, Y. (2016). Caveolin-1 Mediates Low-Intensity Ultrasound-Induced Apoptosis via Downregulation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Phosphorylation in Laryngeal Carcinoma Cells. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 42(9), 2253–2260. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2016.04.017>
- Zeng, Q., Hong, S., Wang, X., Cheng, Y., Sun, J., & Xia, W. (2019). Regulation of exosomes secretion by low-intensity pulsed ultrasound in lung cancer cells. *Experimental Cell Research*, 383(1), 111448.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.029>

Zeqiri, B. (1997). Calibration and safety of physiotherapy ultrasound equipment.
Physiotherapy, 83(10), 559–560.



Teşekkür

Doktora programı eğitimim boyunca her türlü süreçte yanımda olan ve değerli fikirlerini benden esirgemeyen, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren Sayın Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Bu çalışmada, yardım ve fikirlerini her daim paylaşmaktan çekinmeyen ve gelecekteki hayatında çok daha başarılı olacağına inandığım kıymetli doktora öğrencisi Sn. Berrin ÖZDİL BAY'a, çalışmanın uygulama kısmında yardımlarını esirgemeyen kıymetli yüksek lisans öğrencisi Sn. Merve ÖZDEMİR'e, çizimlerin yapılmasında yardımcı olan kıymetli Arş. Gör. Dr. Taha Kadir YESİN'e de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora programım boyunca derslerde benden bilgilerini esirgemeyen Kök Hücre Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve çalışmanın uygulama kısmını gerçekleştirdiğim Ege Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her türlü durumda benden destek ve sonsuz güvenlerini esirgemeyen biricik annem Sn. Rukiye DİKİCİ ve babam Sn. Mehmet DİKİCİ'ye, her zaman olduğu gibi bu süreçte de hep yanımda olan, her şeyimi danışıp paylaştığım, bana her türlü motivasyonu sağlayan, bana her zaman destek olan biricik sevgili eşim Sn Dr. Aylin DİKİCİ'ye ve doktora programı sürecinde hayatımıza girerek hayatımızı daha da anlamlandıran biricik kızım H. Beril ve biricik oğlum A. Kerem'e, benden destek ve motivasyonlarımı esirgemeyen tüm arkadaşlarıma,
Sonsuz teşekkürler...

İzmir, 15.02.2023

Ömer DİKİCİ

Özgeçmiş

ADI SOYADI : ÖMER DİKİCİ
BRANŞ : FİZİKSEL TIP VE REHABİLİTASYON
AKADEMİK ÜNVAN : UZMAN DOKTOR
YABANCI DİL : İNGİLİZCE
E POSTA :
TELEFON :

EĞİTİM:

- 1- Doktora Programı: 2018-Halen EGE Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre ABD
- 2- Uzmanlık: 2015 AKÜ Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon ABD
- 3- Lisans: 2010 OMÜ Tıp Fakültesi

ÇALIŞTIĞI KURUMLAR:

- 1- İzmir Özel Sağlık Hastanesi 2022-Halen
- 2- İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi 2016-2022
- 3- İzmir Asker Hastanesi 2015-2016
- 4- Konya Ahırlı TSM 2011 (Pratisyen)

BİLİMSEL KURULUŞLARA ÜYELİK:

- 1- Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Derneği
- 2- Türkiye Romatizma Araştırma ve Savaş Derneği
- 3- Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Derneği