

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK (TIP) DOKTORA PROGRAMI
DR-2023-0034

MİDE KANSERİ HÜCRELERİNE
SONODİNAMİK TERAPİ UYGULAMASINDA
HSP 70 İNHİBİSYONU VE KLORİN E6 YÜKLÜ
MİKROKABARCIKLARIN ROLÜ

DİDEM BAKAY İLHAN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-20034 proje numarası ve Yükseköğretim Kurulu Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı ÖYP 14020 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2023

TEŞEKKÜRLER

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN başta olmak üzere Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Özlem BOZKURT GİRİT ve Prof. Dr. Mehmet BİLGİN'e çok teşekkür ederim. Ayrıca Anabilim Dalımızdan çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Mahmut Alp KILIÇ, Dr. Ergün Cem KÖKEN, Ayşegül TÜRKOL ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından çalışma arkadaşım Arş. Gör. Esra GÖKMEN YILMAZ'a bilgi ve deneyimlerini esirgemedikleri için teşekkürü bir borç bilirim.

Lisansüstü eğitimim ve tez çalışmam süresince hem hep yanımda oldukları için hem de gösterdikleri sabır, özveri ve destekleri için eşim Cafer İLHAN ve tüm aileme çok teşekkür ederim.

Bu araştırmayı, tüm hayatım boyunca hep yanımda olan ve olmaya devam edecek olan canım anneme ve hayatıma anlam katan canım oğluma ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜRLER	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Mide Kanseri ve İnsidansı.....	6
2.1.2. Kanserde Tedavi Yöntemleri	7
2.2. Heat Shock Proteinleri	9
2.2.1. Heat Shock Protein 70.....	11
2.2.2. Heat Shock Protein 70'in Kanserlerde Rolü ve İnhibitörler	13
2.3. Pifithrin	17
2.4. Ultrases.....	18
2.5. Sonodinamik Terapi.....	20
2.5.1. Sonodinamik Terapinin Etki Mekanizmaları	24
2.6. Sonoduyarlaştırıcılar	27
2.6.1. Klorin e6	29
2.7. Mikrokabarcıklar.....	30

2.7.1. Mikrokabarcık ve Ultrases Etkileşimi.....	34
2.7.2. Sonoporasyon.....	37
3.GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. GEREÇ.....	39
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	39
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	39
3.2. YÖNTEM.....	40
3.2.1. Hücre Hattının Temini, Ekimi, Çoğaltılması ve Deney Protokolüne Uygun Hazırlanması.....	40
3.2.2. Kimyasalların Hazırlanması.....	42
3.2.3. Mikrokabarcık Üretimi.....	43
3.2.4. Dinamik Işık Saçılımı Cihazı ile Mikrokabarcık Boyut Analizi.....	44
3.2.5. Görüntü İşleme Yöntemi ile Mikrokabarcık Boyut Analizi	44
3.2.6. Ultrases Kavite Analizi.....	44
3.2.7. Ultrases Aracılı Mikrokabarcık Yıkımı	44
3.2.8. Spektroskopik Yöntemler ile Mikrokabarcık İçi Klorin Tayini.....	45
3.2.9. Deney Grupları ve Şematize Hali	46
3.2.10. Hücre Canlılığı Analizi	48
3.2.11. Hoechst Boyama ile Apoptotik Yapıların İncelenmesi.....	49
3.2.12. Western Blot Yöntemi ile Apoptotik Belirteçlerin İncelenmesi	50
3.2.12.1. Hücrelerden Protein İzolasyonu.....	50
3.2.12.2. Bikinkoninik Asit (BCA) ile Protein Miktarı Tayini	52
3.2.12.3. SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi	55
3.2.12.4. SDS-PAGE Jel Elektrofrezinde Kullanılan Ayırıcı ve Toplayıcı Jelin Hazırlanışı.....	56
3.2.12.5. SDS-PAGE Jel Elektrofrezinde Örneklerin Hazırlanması ve Jele Yüklmesi.....	57
3.2.12.6. SDS-PAGE Jelin Membrana Transfer Edilmesi, Blotlama	59

3.2.12.7. Membranın Primer ve Sekonder Antikor ile Muamele Edilmesi ve Görüntüleme	60
3.2.13. Caspase 3-7 Analizi.....	63
3.2.14. Annexin V ve Ölü Hücre Analizi.....	63
3.2.15. Oksidatif Stress Analizi.....	64
3.2.16. İstatistiksel Değerlendirme	65
4.BULGULAR	66
4.1. Mikrokabarcık Üretimi	66
4.2. DLS cihazı ile Mikrokabarcık Boyut Analizi	67
4.3. Görüntü işleme yöntemi ile Mikrokabarcık Boyut Analizi.....	69
4.4. Ultrases kavitasyon analizi.....	70
4.5. Ultrases Aracılı Mikrokabarcık Yıkımı	71
4.6. Spektroskopik Yöntemler ile Klorin Analizi	72
4.8. Hücre Canlılığı Analizi	75
4.9. Hoechst Boyama ile Apoptotik Yapıların İncelenmesi.....	89
4.10. Western Blot Yöntemi ile Apoptotik Belirteçlerin İncelenmesi	92
4.11. Caspase 3-7 Analizi	101
4.12. Annexin V ve Ölü Hücre Analizi.....	102
4.13. Oksidatif Stress Analizi.....	103
5.TARTIŞMA	104
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	114
KAYNAKLAR	116
ÖZ GEÇMİŞ	124

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	: Apoptozu indükleyen faktör
CnFn+2	: Perflorokarbon gazları
Ce6	: Klorin e6
DSPC	: Distearoylphosphatidylcholine
FDT	: Fotodinamik terapi
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HSP	: Heat shock protein (Isı şok protein)
ING	: İnhibitör büyüme
MB	: Mikrokabarcık
MTT	: Metabolik tetrazolyum tuzu
NBD	: Nükleotid bağlanma alanı
PDT	: Fotodinamik terapi
PEG	: Polietilen glikol
Pi-μ	: Pifithrin-μ
RES	: Retikülo-endotel sistem
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SBD	: Substrat bağlanma alanı
SDT	: Sonodinamik terapi
SF₆	: Kükürt heksaflorür

SOD	: Süperoksit dismutaz
TNF-α	: Tümör nekrozis faktörü- α
UTMD	: Ultrases hedefli mikrokabarcık imhası
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanser hücresi ve sağlıklı hücrenin morfolojik farklılıkları.....	4
Şekil 2. Tümör ilerlemesi ve invazyonu	5
Şekil 3. Kanser hücrelerinin sahip olduğu tüm özellikler ve davranış biçimleri	6
Şekil 4. Dünya Sağlık Örgütü 2020 Türkiye kanser verileri.....	7
Şekil 5. Heat shock proteinlerin ifadesinin artması sonucu dahil oldukları fonksiyonel olaylar	10
Şekil 6. Heat şok protein yapısı ve substrat döngüsü.....	13
Şekil 7. FDT kaynaklı apoptozda heat shock proteinler	15
Şekil 8. Pifithrin- μ yapısı	17
Şekil 9. Ses spekturumu	18
Şekil 10. Tıbbi uygulamalarda kullanılan farklı ultrases frekanslarına genel bakış	19
Şekil 11. Jablonski diyagramı üzerinde tip 1 ve tip 2 fotoduyarlaştırıcı mekanizmalarının şematik gösterimi.....	20
Şekil 12. SDT’de olası hücre hasarı mekanizması.....	22
Şekil 13. Hücre kültüründe SDT’yi değerlendirmek için kullanılan deneysel konfigürasyonlar.....	24
Şekil 14. SDT’nin ROS bağımsız mekanizması	25
Şekil 15. SDT’nin hücrelerdeki ana etki mekanizmalarının temsili hali.....	27
Şekil 16. Organik sonoduyarlaştırıcıların şematik gösterimi	28
Şekil 17. Fotoduyarlaştırıcılar, kimyasal yapıları ve maksimum absorpsiyon dalgaboyları	30
Şekil 18. Mikrokabarcık yapısının şematik gösterimi	31
Şekil 19. Mikrokabarcıklarda olası ilaç kargo alanlarının şematik gösterimi.....	33
Şekil 20. Ultrasesin mikrokabarcıklar üzerindeki fiziksel etkileri ve mikrokabarcıkların endotel üzerindeki biyofiziksel etkileri	34
Şekil 21. Literatürde bildirilen akustik açıdan hassas lipozomların bazılarını göstermektedir	37
Şekil 22. Mikrokabarcıklar tarafından üretilen sonoporasyon sırasında meydana gelen başlıca biyofiziksel etkilerin şematik genel görünümü	38
Şekil 23. Hücre kültürü aşamaları şematize hali	42

Şekil 24. Mikrokabarcık üretim aşamaları şematize hali	43
Şekil 25. Ultrases uygulama düzeneğinin şematize hali	45
Şekil 26. Deney gruplarının şematize hali	48
Şekil 27. Protein tayini sonucunda elde edilen standart grafiği	54
Şekil 28. Bloklama için transfer sandviçinin hazırlanması (Bio-rad)	59
Şekil 29. İnvert ışık mikroskobu 10x büyütmede DSPC mikro kabarcıklarının görüntüsü.	67
Şekil 30. Boş DSPC mikrokabarcıkların DLS cihazı ile elde edilen boyut analizi grafiği	68
Şekil 31. Klorin e6 yüklü DSPC mikrokabarcıkların DLS cihazı ile elde edilen boyut analizi grafiği.....	68
Şekil 32. DSPC mikrokabarcıkların çaplarının ImageJ programında parçacık boyut analizi eklentisi kullanılarak analizi sonucunda elde edilen verilerle GraphPAD programından elde edilen histogram dağılım grafiği ve gaussian eğrisi	69
Şekil 33. Kaviteasyon verisi toplanan lokasyonlar	70
Şekil 34. Klorin e6 yüklü DSPC mikrokabarcıklar.....	72
Şekil 35. UV-Vis Spektrometresinde ölçümü yapılan PBS’de çözünmüş klorin e6 trisodyum tuzunun farklı molaritelerdeki optik yoğunluk grafiği	73
Şekil 36. Floresan invert mikroskop ışık ve rhod filtre altında 10x büyütmede Ce6 yüklü DSPC mikro kabarcıklarının görüntüsü ve bunların ImageJ ile birleştirilmiş görüntüleri.....	75
Şekil 37. Farklı MTT inkübasyonları ile bu inkübasyonu takip eden sürede uygulanan 15dk DMSO’da bekletme protokolüne bağlı elde edilen % hücre canlılığı değişimi	76
Şekil 38. Farklı MTT inkübasyonları ile bu inkübasyonu takip eden sürede uygulanan gece boyunca DMSO’da bekletme protokolüne bağlı elde edilen % hücre canlılığı değişimi.....	77
Şekil 39. Farklı molaritelerde doz denemesi yapılacak olan klorin e6’nın çözündüğü PBS miktarlarının hücreye etkisi	78
Şekil 40. Klorin e6 farklı dozlarının hücre canlılığına etkisi	79
Şekil 41. Farklı molaritelerde doz denemesi yapılacak olan pifithrin- μ ’nün çözündüğü DMSO miktarlarının hücreye etkisi	80
Şekil 42. Pifithrin- μ farklı dozlarının hücre canlılığına etkisi	81
Şekil 43. Ultrases dozlarının hücre canlılığına etkisi.....	82
Şekil 44. Belirlenen etkin dozlar ile oluşturulmuş deney düzeneğinde tüm gruplarda hücre canlılığı	84

Şekil 45. Belirlenen etkin dozlar ile oluşturulmuş deney düzeneğinde tüm gruplarda Cristal viyole boyaması sonrasında alınan görüntülerinin ImageJ analizi sonucunda hücre canlılığı verileri.....	86
Şekil 46. Tüm grupların Cristal viyole boyaması sonrasında alınan görüntülerinin ImageJ analizi sonucunda hücre canlılığı verilerinin kolorimetrik gösterimi	87
Şekil 47. HSP70 inhibitörü olarak kullanılan pifithrin- μ ve quercetin moleküllerinin karşılaştırmalı olarak elde edilmiş MTT hücre canlılığı verileri	88
Şekil 48. Floresan mikroskopta görüntüleri alınmış deney gruplarına ait apoptotik yapılar	90
Şekil 49. Floresan mikroskopta görüntüleri alınmış deney gruplarına ait apoptotik yapıların istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte ifade edilişi	91
Şekil 50. Hücre kültürü deney gruplarından western blot yöntemiyle elde edilen Bax/ β -tubulin ekspresyon oranını gösteren bar grafiği	93
Şekil 51. Hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen Bax ekspresyonunu (23 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β -tubulin ekspresyonu (50 kDa).....	94
Şekil 52. Hücre kültürü deney gruplarından western blot yöntemiyle elde edilen HSP70/ β -tubulin ekspresyon oranını gösteren bar grafiği.....	95
Şekil 53. Hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen HSP70 ekspresyonunu (70 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β -tubulin ekspresyonu (50 kDa).....	96
Şekil 54. Hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen HSP70 ekspresyonunu (70 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β -tubulin ekspresyonu (50 kDa).....	96
Şekil 55. Hücre kültürü deney gruplarından western blot yöntemiyle elde edilen Bcl2/ β -tubulin ekspresyon oranını gösteren bar grafiği	97
Şekil 56. Hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen Bcl2 ekspresyonunu (26 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β -tubulin ekspresyonu (50 kDa).....	98
Şekil 57. Hücre kültürü deney gruplarından western blot yöntemiyle elde edilen Bax/ Bcl2 ekspresyon oranını gösteren bar grafiği	98
Şekil 58. Hücre kültürü deney gruplarından western blot yöntemiyle elde edilen parkin/ β -tubulin ekspresyon oranını gösteren bar grafiği.....	99

Şekil 59. Hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen parkin ekspresyonunu (55 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β -tubulin ekspresyonu (50 kDa).....	100
Şekil 60. Deney grupları arasında Caspas 3-7 aktivasyonu değişimleri incelenmiştir .	101
Şekil 61. Tasarlanan deney gruplarının Muse Cell Analyser cihazındaki Annexin V ve Ölü hücre analizi sekmesinde okutularak elde edilmiş veriler	102
Şekil 62. Gruplar arası ROS profillerinin değişimi incelenmiştir.....	103



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. UIltrasonikatör cihazı ile hücre lizatı elde edilmesi	51
Resim 2. SDS-PAGE jellerinin cam levhalar arasında dondurulması	57
Resim 3. Protein denatürasyonunda kullanılan ısı bloğu	58
Resim 4. SDS-PAGE Elektroforez sisteminde örneklerin yürütülmesi.....	58
Resim 5. Jelden membrana bloklama aşaması	60
Resim 6. Transfer sonrası membran görüntüsü.....	61
Resim 7. G:Box görüntüleme cihazı	61
Resim 8. Mekanik aktivasyonun ardından DSPC mikrokabarcık içeren tüpler.....	66
Resim 9. Blank olarak PBS ve PBS’de çözünmüş klorin e6 trisodyum tuzunun farklı molaritelerde UV-Vis Spektrometresinde ölçüm sonrası görüntüleri	74

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kanserde yüksek ısı şoku proteinleri	11
Tablo 2. HSP70 inhibitörleri	16
Tablo 3. SDT sonuçlarını etkileyen in vitro deneysel faktörler ve değişkenleri.....	23
Tablo 4. Sdt'nin etkilerinin altında yatan önerilen mekanizmaların özeti.....	26
Tablo 5. Organik küçük sonoduyarlaştırıcı moleküller ve bu moleküllerin muhtemel sonodinamik etki mekanizması	29
Tablo 6. BCA protein miktarı tayini yöntemi için hazırlanan standart tablosu	52
Tablo 7. BCA protein miktarı tayini yöntemi için 1:5 oranında örneklerin seyreltilmesi	53
Tablo 8. BCA protein miktarı tayini yöntemi ile hazırlanan örnekler ve standartların well plate'e yükleme planı.....	54
Tablo 9. Ultrases kavitasyon analizi betimleyici istatistiksel verileri.....	71
Tablo 10. Farklı molaritelerde doz denemesi yapılacak olan klorin e6'nın çözündüğü PBS miktarlarının hücreye etkisinin betimleyici istatistiksel verileri	78
Tablo 11. Klorin e6 farklı dozlarının hücre canlılığına etkisinin betimleyici istatistiksel verileri.....	79
Tablo 12. Farklı molaritelerde doz denemesi yapılacak olan pifithrin-μ'nün çözündüğü DMSO miktarlarının hücreye etkisinin betimleyici istatistiksel verileri.....	81
Tablo 13. Pifithrin-μ farklı dozlarının hücre canlılığına etkisinin betimleyici istatistiksel verileri.....	82
Tablo 14. Ultrases dozlarının hücre canlılığına etkisinin betimleyici istatistiksel verileri	83
Tablo 15. Belirlenen etkin dozlar ile oluşturulmuş deney düzeneğinde tüm gruplarda hücre canlılığının betimleyici istatistiksel verileri.....	85
Tablo 16. HSP70 inhibitörü olarak kullanılan pifithrin-μ ve quercetin moleküllerinin karşılaştırmalı olarak elde edilmiş MTT hücre canlılığının betimleyici istatistiksel verileri...	88

ÖZET

MİDE KANSERİ HÜCRELERİNE SONODİNAMİK TERAPİ UYGULAMASINDA HSP 70 İNHİBİSYONU VE KLORİN E6 YÜKLÜ MİKROKABARCIKLARIN ROLÜ

**Bakay İlhan D. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Biyofizik (Tıp) Doktora Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2023**

Amaç: Araştırmamızın amacı mide kanseri hücrelerine sonodinamik terapi uygulamasında ısı şok protein 70 inhibisyonu ve klorin e6 yüklü mikrokabarcıkların rolünün araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Elde edilen mikrokabarcıkların boyut analizleri çeşitli yöntemlerle elde edildikten sonra MKN28 mide kanseri hücre hattında ısı şok protein 70'in inhibisyonunu sağlamak için hücreler 48 saat pifithrin- μ ile inkübe edilmiştir. Pifithrin- μ inkübasyonunu takiben ultrases (1MHz, 3W/cm², %20 puls, 30sn) ile yıkımı sağlanan klorin e6 yüklü mikrokabarcıklar varlığında 12 saat inkübe edilmiştir. Son olarak gruplar arasında sitotoksosite ve apoptoz süreçleri hakkındaki farklılıklar moleküler yöntemlerle incelenmiştir.

Bulgular: Boyut analizleri sonucunda elde edilen mikrokabarcıkların 1-5 μ m boyutunda dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Klorin e6 içeren mikrokabarcıkların ultrases ile yıkımı esnasında istatistiksel anlamlı artan kavitasyon verisi elde edilmiştir. Spektroskopik ölçümler sonucunda klorin e6 trisodyum salt çözeltisinde agregasyon oluşmadığı fakat farklı ölçümlerle de teyit edilmesi gereken bir bulgu olduğu düşünülmektedir. Yapılan sitotoksosite testleri sonucunda 1MHz frekans ve 3W/cm² güçte 30sn süresince %20 puls ultrases uygulanmasına karar verilmiştir. Uygulama dozu olarak pifithrin- μ için 5 μ M ve klorin e6 için 5 μ M dozları seçilmiştir. Deney grupları incelendiğinde klorin e6 yüklü mikrokabarcıkların ultrases ile yıkımı sonucu sitotoksitede ve apoptoz süreçlerinde istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Isı şok proteini inhibisyonu ile sinerjetik etki gösteren veriler elde edilmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak, kombine gruplarda gözlenen artmış hücre ölümü ve apoptoz verisinin tek başına ultrases, pifithrin- μ ve klorin e6 yüklü mikrokabarcık gruplarında görülen etkinin toplamından istatistiksel anlamlı olarak daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Mikrokabarcık, ısı şok protein, sonodinamik terapi, mide kanseri

ABSTRACT

ROLE OF HSP70 INHIBITION AND CHLORIN E6 LOADED MICROBUBBLES IN SONODYNAMIC THERAPY FOR STOMACH CANCER CELLS

Bakay İlhan D. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Biophysics (Medicine) Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2023

Objective: The aim of our research is to investigate the role of HSP 70 inhibition and chlorine e6 loaded microbubbles in the application of sonodynamic therapy to gastric cancer cells.

Materials and Methods: After analyzing microbubble sizes using different methods, cells were treated with pifithrin- μ for 48 hours to inhibit heat shock protein 70 in MKN28 gastric cancer cells. Post pifithrin- μ treatment, cells were exposed to chlorine e6-loaded microbubbles for 12 hours, collapsed using ultrasound (1MHz, 3W/cm², 20% pulse, 30sec). Cytotoxicity and apoptosis variations between groups were assessed through molecular techniques.

Results: Microbubbles, sized 1-5 μ m, showed even distribution. Ultrasound disruption of chlorin e6-loaded microbubbles led to significant cavitation increase. Spectroscopy revealed no aggregation in chlorin e6 trisodium solution, awaiting confirmation. Cytotoxicity tests favored 5 μ M pifithrin- μ and chlorin e6 doses. Pulsed ultrasound (1MHz, 3W/cm², 20% duty, 30s) led to significant cytotoxicity and apoptosis with disrupted chlorin e6 microbubbles, synergizing with HSP inhibition.

Conclusion: As a result, it was observed that the increased cell death and apoptosis data observed in the combined groups were statistically significantly higher than the sum of the effect seen in the ultrasound, pifithrin- μ and chlorine e6 loaded microbubble groups alone.

Keywords: Microbubble, heat shock protein, sonodynamic therapy, gastric cancer

1.GİRİŞ

Mide kanseri, Dünya Sağlık Örgütü 2020 verilerine göre Türkiye özelinde bakıldığında kanserden ölüm sıralamasında ikinci sırada görülen kanserdir (WHO Cancer Country Profiles, 2020). Ayrıca çeşitli araştırmalarda artmış heat shock protein 70 (hsp70) ekspresyonu ya kanser ile ya da kanserde kötü klinik sonuç ile ilişkilendirilmiştir (Bauer ve diğerleri, 2012; Yusuf ve diğerleri, 2016). Bu nedenle hsp70'i doğrudan inhibe eden moleküller üzerinde araştırmalar yapılmış ve pifithrin- μ tasarlanmıştır. Bu molekül hsp70'in doğrudan inhibitörüdür (McKeon ve diğerleri, 2016). Kanser tedavi araştırmalarında yer almakta olan sonodinamik terapinin etkinliğinin arttırılmaya çalışıldığı birçok araştırma bulunmaktadır. Ve kanser terapisi araştırmalarında sonodinamik terapinin (SDT) etkinliğini arttırmak için heat shock proteini ekspresyonunun azaltılmasının rol oynadığı düşünülmektedir (Bonosi ve diğerleri, 2023; Yang ve diğerleri, 2023). Tümör odaklı tedavi anlayışının artmasıyla birlikte hedefli ilaç dağıtımı önem kazanmıştır. Bu amaç doğrultusunda üretilen mikrokabarcıklar pekçok araştırmanın odağı haline gelmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, tümör odaklı terapi etkinliğinin artırılması amacıyla kullanılan ajanın mikrokabarcıklarla tümörlü dokuya spesifik olarak ulaştırılması literatürde yer bulmaktadır ve elde edilen anlamlı sonuçlar uygulama olarak kliniğe girebilmesi açısından umut vaat eden bir tedavi yöntemi olacağını göstermektedir (Chowdhury ve diğerleri, 2017; Kooiman ve diğerleri, 2014). Mikrokabarcıklar yardımıyla tümör odaklı tedavi anlayışında kullanılan fotoduyarlı ajanlardan biri olan klorin e6'nın sonodinamik terapi ile ROS üretimini ve apoptozu arttırdığı, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, kanser hücrelerinin göç yeteneğini ve koloni oluşturma yeteneğini doz bağımlı bir biçimde azalttığı gösterilmiştir (Choi ve diğerleri, 2020).

Bu bilgiler ışığında bu araştırmada mide kanserleri klinik tedavisinde hsp70 inhibisyonu ve klorin e6 yüklü mikrokabarcık aracılı sonodinamik terapinin kombine uygulanmasındaki etkinliği araştırılmıştır. Sonodinamik terapi uygulaması ve tüm bu uygulamaların birbirleri ile korele oluşturacakları sinerjetik etki araştırmanın özgün değerini oluşturmaktadır.

Amacımız; mide kanseri hücrelerine sonodinamik terapi uygulamasında HSP 70 inhibisyonu ve klorin e6 yüklü mikrokabarcıklar ile sonodinamik terapi etkinliğinin arttırılmasıdır.

Özetle, hedefimiz mide kanserinde fotoduyarlı ajan yüklü mikrokabarcık aracılı sonodinamik terapinin etkinliğinin gösterilmesi ve heat shock proteinlerinin inhibisyonuyla korale sonodinamik terapinin etkinliğinin artırılabilmesidir.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir, çok büyük maliyetler doğurur ve insanlık için büyük bir yüküdür. 2020 GLOBOCAN veri tabanı raporuna göre, dünyadaki yıllık kanser vakası sayısının 2020'de 19,3 milyondan 2025'te 28,4 milyona (2020'ye göre %47 artış) çıkacağı tahmin edilmektedir (Papież ve Krzyściak, 2021). Onkologlar, klasik kemoterapinin etkinliğinin sınırlarına ulaştığını, bu nedenle birçok kanser türünün tedavisinde ilerlemeyi sağlayacak başka yöntemlere ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadırlar (Papież ve Krzyściak, 2021).

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyerek vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır ve trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunun hemen her yerinde başlayabilmektedir. Normalde insan hücreleri, vücudun ihtiyaç duyduğu yeni hücreleri oluşturmak için büyür ve çoğalırlar (hücre bölünmesi adı verilen bir süreçle). Hücreler yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde ölürler ve yerlerini yeni hücreler alır. Bazen bu düzenli süreç bozulur ve anormal veya hasarlı hücreler büyüüp çoğalmamaları gerektiği halde çoğalırlar ve bu durum kanser olarak adlandırılmaktadır (National Cancer Institute [NCI], 2021).

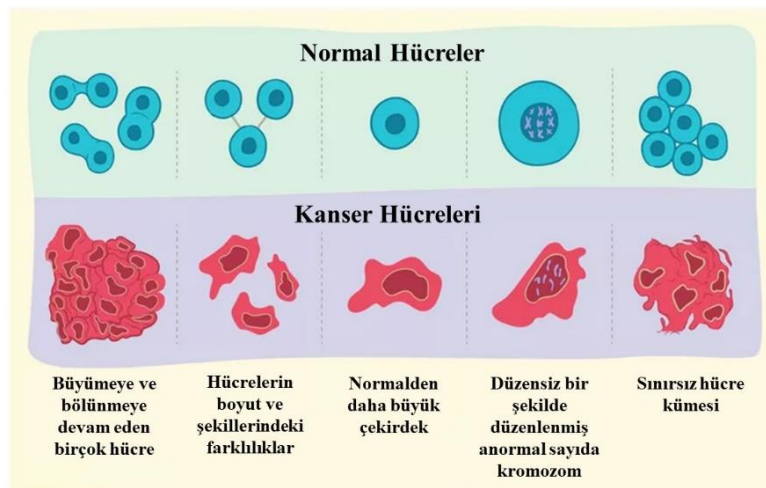
Kanser hücreleri birçok yönden normal hücrelerden farklıdırlar. Örneğin kanser hücreleri;

- büyümelerini söyleyen sinyallerin yokluğunda bile büyürken normal hücreler ancak bu tür sinyalleri aldıklarında büyürler.
- bölünmeyi durdurmalarını veya ölmelerini (programlanmış hücre ölümü veya apoptoz olarak bilinen bir süreç) söyleyen sinyalleri dikkate almazlar.
- yakındaki bölgeleri istila edip ve vücudun diğer bölgelerine yayılırlar. Normal hücreler, diğer hücrelerle karşılaştıklarında büyümeyi durdurur ve normal hücrelerin çoğu vücutta hareket etmezler.
- kan damarlarının tümörlere doğru büyümesini söylerler. Bu kan damarları, tümörlere oksijen ve besin sağlar ve atık ürünleri tümörlerden uzaklaştırırlar.

- bağışıklık sisteminden saklanırlar. Bağışıklık sistemi normalde hasarlı veya anormal hücreleri ortadan kaldırır.
- bağışıklık sistemini, kanser hücrelerinin hayatta kalmasına ve büyümesine yardımcı olması için kandırırlar. Örneğin, bazı kanser hücreleri, bağışıklık hücrelerini tümöre saldırmak yerine onu korumaya ikna ederler.
- kromozom parçalarının kopyalanması ve silinmesi gibi kromozomlarında birden fazla değişiklik biriktirirler. Bazı kanser hücreleri normal kromozom sayısının iki katına sahiptirler.
- normal hücrelerden farklı besin türlerini enerji kaynağı olarak kullanırlar. Ek olarak, bazı kanser hücreleri, çoğu normal hücreden farklı bir şekilde besinlerden enerji üretir. Bu, kanser hücrelerinin daha hızlı büyümesini sağlar (National Cancer Institute [NCI], 2021).

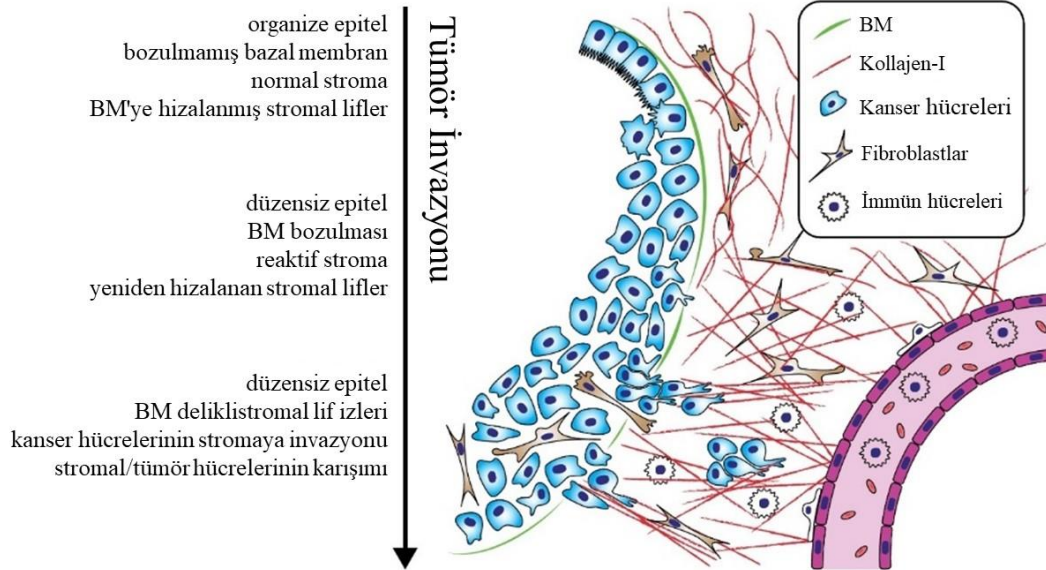
Çoğu zaman, kanser hücreleri bu anormal davranışlara o kadar çok güvenirlir ki onlar olmadan hayatta kalamazlar. Araştırmacılar, kanser hücrelerinin anormal özelliklerini hedef alan tedaviler geliştirerek bu gerçeği kullanmışlardır. Örneğin, bazı kanser tedavileri, kan damarlarının tümörlere doğru büyümesini önleyerek tümörü gerekli besinlerden mahrum bırakır (National Cancer Institute [NCI], 2021).

Şekil 1’de normal hücre ile kanser hücresi arasındaki hücresel boyuttaki farklar özetlenmiştir.



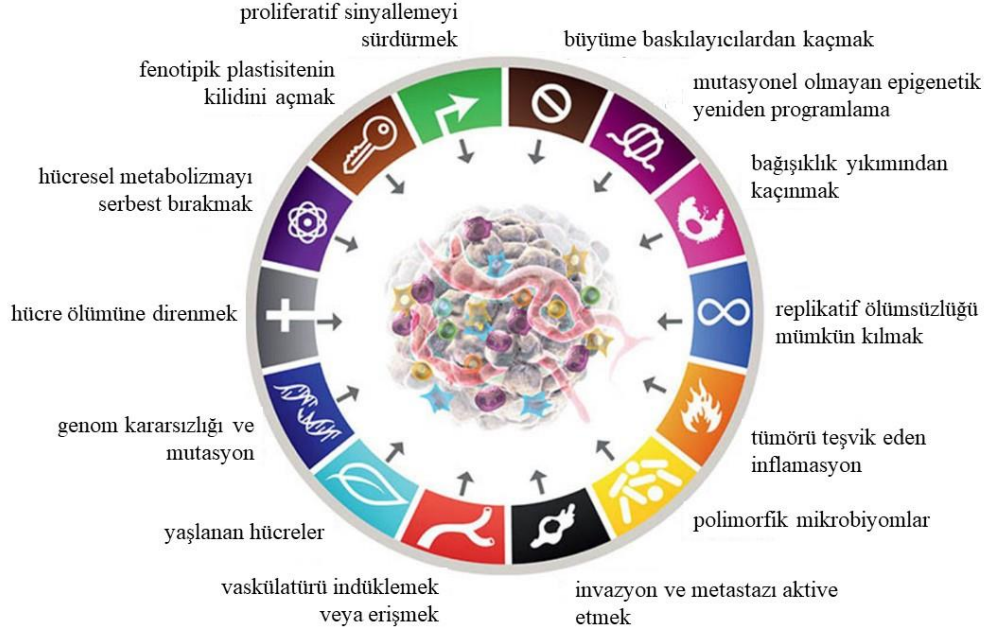
Şekil 1. Kanser hücresi ve sağlıklı hücrenin morfolojik farklılıkları. (Verywell, 2017’den uyarlanmıştır)

Şekil 2’de görüldüğü gibi epitel kaynaklı tümörlerde veya karsinomlarda, hipertrofik hücre büyümesi, epitel tabakasının kalınlaşmasına neden olmaktadır. Daha ileri aşamalarda, karsinom hücreleri genellikle apikal-bazal polariteyi ve apikal silia'yı kaybetmekte ve hücre-hücre temaslarındaki azalma ve hücre iskeletinin yeniden organizasyonu nedeniyle düzensiz görünmektedirler. Bu aşamada, kanser hücreleri hala bazal membran tarafından kapsüllenmektedir. Tümör hücreleri ve stromal hücreler arasındaki çapraz konuşma nedeniyle, stroma reaktif hale gelmektedir. Reaktif stroma, ekstra celluler matrixi biriktirmeye ve stromal ağı yeniden düzenlemeye yardımcı olabilecek bağışıklık hücrelerinin ve fibroblastların artan varlığı ile karakterize edilmektedir. Stromal ağ lifleri başlangıçta gevşek bir şekilde düzenlenmektedir ve "kıvrımlı" görünmektedir. Daha sonra yoğunluk ve sertlik artmaktadır. Geç aşamalarda, kollajen demetleri bazal membrana dik 'izler' oluşturmaktadır. İnvaziv tümörlerde, kanser hücreleri bazal membranı delmekte ve tümör hücrelerinin stromaya invase olmasına ve kan akışına doğru göç etmesine izin vermektedir. Stromal hücreler de tümöre girerek hücre tiplerinin karışmasına ve dokuda daha fazla düzensizliğe yol açmaktadır (Clark ve Vignjevic, 2015).



Şekil 2. Tümör ilerlemesi ve invazyonu. (Clark ve Vignjevic, 2015'den uyarlanmıştır)

Kanser hücrelerinin sahip olduğu tüm özellikler ve davranış biçimleri Şekil 3’te bir arada gösterilmiştir.

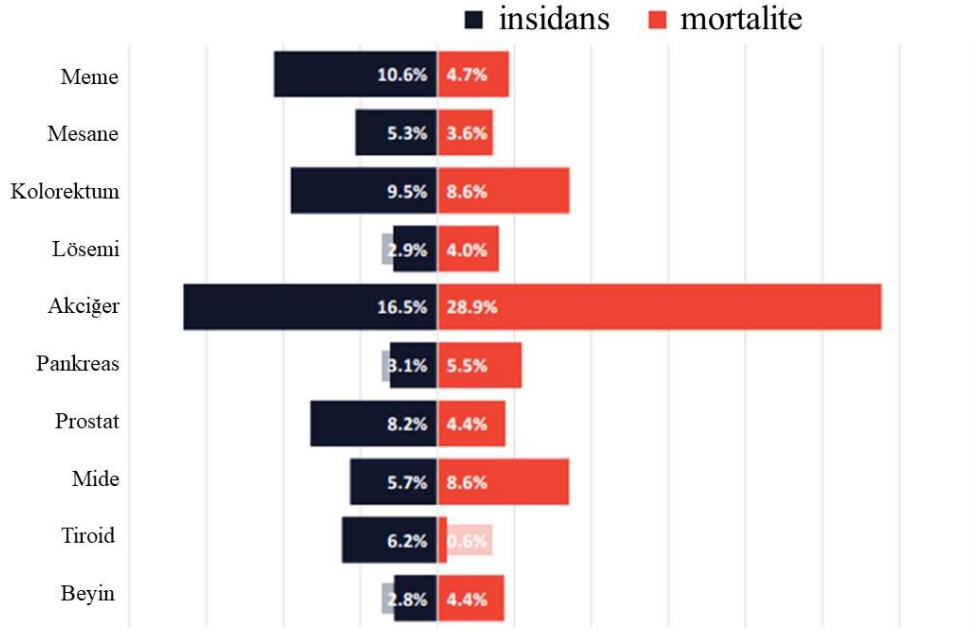


Şekil 3. Kanser hücrelerinin sahip olduğu tüm özellikler ve davranış biçimleri. (Hanahan, 2022'den uyarlanmıştır)

Genel olarak kanser, hücreler arası sinyalleri bozmakta ve hayati genlerin işlevsiz kalmasına neden olmaktadır. Bu bozukluk hücre döngüsünde etkilidir ve anormal proliferasyona yol açmaktadır (Hassanpour ve Dehghani, 2017).

2.1.1. Mide Kanseri ve İnsidansı

Günümüzde mide kanserleri, kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerindendir. Dünya Sağlık Örgütü 2020 verilerine göre, mide kanseri, Türkiye özelinde bakıldığında kanserden ölüm sıralamasında ikinci sırada görülen kanserdir (Şekil 4) (World Health Organization [WHO], 2020).



Şekil 4. Dünya Sağlık Örgütü 2020 Türkiye kanser verileri. (WHO, 2020'den uyarlanmıştır)

2.1.2. Kanserde Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavi yöntemlerini sıralayacak olursak (NCI, 2021);

Biyobelirteç testi, kanser hakkında bilgi sağlayabilecek genleri, proteinleri ve diğer maddeleri (biyobelirteçler veya tümör belirteçleri olarak adlandırılır) aramanın bir yoludur.

Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek için ilaçların kullanıldığı bir kanser tedavisi türüdür. Kanserli hücrelerin büyümesini ve yayılmasını durdurmada etkili olan çok sayıda ilaç vardır. Kemoterapi sıklıkla radyasyon tedavisi ve cerrahi ile birlikte kullanılır. Ayrıca birden fazla araştırma, kemoterapinin tek bir ilaç yerine birden fazla ilacın kombinasyonu kullanıldığında çok daha etkili olduğunu göstermiştir. Ameliyattan veya radyasyon tedavisinden önce verildiğinde kemoterapi, tümörün boyutunu azaltmaya yardımcı olmak için neoadjuvan kemoterapi olarak bilinirken, ameliyat sonrası veya radyasyon tedavisi sonrası verilen kemoterapi, kalan kanserli hücreleri öldürmeye yardımcı olan adjuvan kemoterapi

olarak bilinir. Kemoterapi kullanmanın en büyük dezavantajı, kanserli hücrelerle birlikte sağlıklı hücreleri öldürmesi/yok etmesidir (Malik ve diğerleri, 2021).

Cerrahi yöntem, bir cerrahın kanserli dokuyu vücuttan çıkardığı bir prosedürdür.

Hormon terapisi, büyümek için hormon kullanan meme ve prostat kanserlerinin büyümesini yavaşlatan veya durduran bir terapi.

Hipertermi, normal dokuya çok az zarar vererek veya hiç zarar vermeden kanser hücrelerinin zarar görmesine ve öldürülmesine yardımcı olmak için vücut dokusunun 45° C'ye kadar ısıtıldığı bir terapi türüdür.

İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin kanserle savaşmasına yardımcı olan bir kanser terapisi türüdür. Basit bir ifadeyle immünoterapi, kansere karşı savaşmak için vücudun doğal savunmasını güçlendirmek anlamına gelir. Bağışıklık sisteminin kanserli hücrelere karşı doğal savunması antikor yapmaktır. Bu antikorlar bir laboratuvarı üretilir ve monoklonal antikorlar olarak bilinen formlar oluşturulabilir ve bunlar hastanın vücuduna enjekte edilebilir. Bu monoklonal antikorlar, kanser hücrelerinde anormal proteinlerin ve spesifik genlerin aktivitesini bloke ederek kansere karşı mücadeleye yardımcı olabilir. Kanserle savaşmanın bu özel yolu, hedefe yönelik tedavi olarak bilinir. Monoklonal antikorlar, kanserli hücreler tarafından bağışıklık sistemi tepkisinden saklanmak için kullanılan bağışıklık kontrol noktalarını bloke ederek kansere karşı mücadelede yardımcı olan bağışıklık sistemini de geliştirebilir. Bu bağışıklık kontrol noktalarını bloke ederek monoklonal antikorlar, insan bağışıklık sisteminin kanserli hücreleri bulma ve yok etme kabiliyetini artırır. İmmünoterapi genellikle diğer kanser tedavileriyle birlikte kullanılır (Malik ve diğerleri, 2021).

Fotodinamik terapi (PDT) , kanser ve diğer anormal hücreleri öldürmek için ışıkla aktive edilen bir ilacı kullanır. PDT, kanser için yaygın olarak kullanılmaktadır. PDT sırasında, kanser hücrelerine zarar verebilecek singlet oksijen gibi reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir. PDT'nin ilkesi, bir ışığa duyarlılaştırıcının, ışığın belirli bir uyarma dalga boyu tarafından uyarılmasıdır. ROS oluşturmak için enerjiyi hücredeki oksijen moleküllerine dönüştürür. Ve ROS, doğrudan hücre ölümünü indükleyebilen, tümör vaskülatürünü bozabilen ve doğuştan gelen bağışıklık sistemini aktive edebilen tümör hücreleri üzerinde hareket eder (Fan ve diğerleri, 2021).

Radyasyon terapisi, kanser hücrelerini öldürmek ve tümörleri küçültmek için yüksek dozda radyasyon kullanan bir kanser terapisi türüdür.

Kök hücre nakilleri, yüksek doz kemoterapi veya radyasyon terapisi ile kendi hücreleri yok edilmiş kişilerde kan hücrelerine dönüşen kök hücreleri geri kazandıran prosedürlerdir.

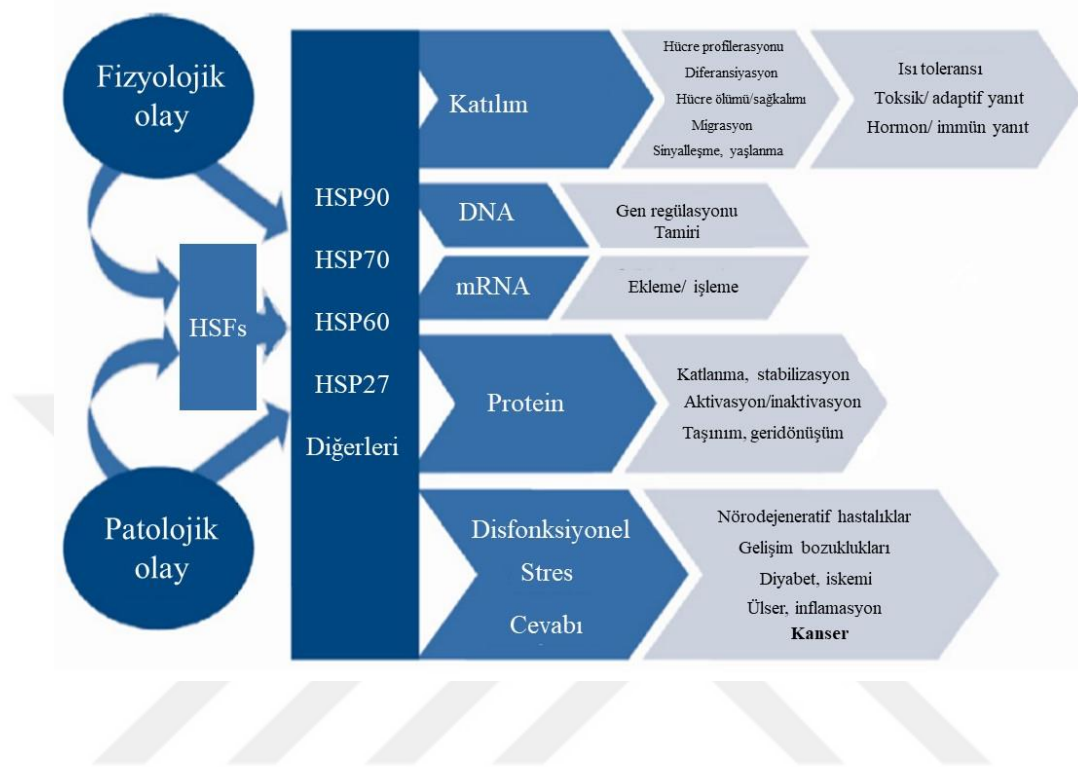
Hedefe yönelik terapi, kanser hücrelerinin nasıl büyüdüğünü, bölündüğünü ve yayıldığını kontrol eden proteinleri hedef alan bir kanser terapisi türüdür. Hassas tıbbın temelidir.

2.2. Heat Shock Proteinleri

Yukarıdaki bilgiler ışığında hedefe yönelik terapi yöntemleri geliştirilmek adına Heat shock protein 70 önem arzeden bir protein haline gelmiştir. Çeşitli araştırmalarda artmış heat shock protein 70 ekspresyonu ya kanser ile ya da kanserde kötü klinik sonuç ile ilişkilendirilmiştir (Bauer ve diğerleri, 2012; Yusuf ve diğerleri, 2016).

Meyve sineği *Drosophila melanogaster* hücreleri ısıya maruz bırakıldığında Ferruccio Ritossa (1962, İtalya) heat shock protein (HSP) genlerini keşfetmiştir. Bu proteinler sadece ısı ile değil, aynı zamanda farklı fizyolojik ve patolojik koşullar tarafından da indüklenebilir; tüm canlı hücrelerde ve mikroorganizmalarda bulunurlar ve birçok stres tarafından hızlı ve bol miktarda indüklenen bir moleküler şaperon alt kümesine aittirler. İnsan HSP familyalarının yeni bir terminolojisinin kullanımına yönelik yönergeler olmasına rağmen, moleküler ağırlıklarına dayalı eski isimler hala bolca kullanılmaktadır. HSP'ler, yeni oluşan polipeptitlerin doğru katlanmasına yardımcı olan ve stabilize eden protein homeostazına katılırlar; proteom bakımına katkıda bulunmaktadırlar (makromoleküler komplekslerin montajı, taşınması ve bozulması ve stresle denatüre proteinlerin yeniden katlanması veya ayrıştırılması). Bu nedenle HSP'ler, protein kalite kontrol sistemine dahil olurlar. Öte yandan, HSP'ler bozunma yollarında (ubikuitin proteazom sistemi, endoplazmik retikulumla ilişkili bozunma, otofaji ve apoptozun düzenlenmesi) yer almaktadırlar. Ek olarak, 96 HSP ailesi üyesi, protein lokalizasyonuna ve etkileşime girdikleri çeşitli moleküllere bağlı olarak önemli derecede fonksiyonel çeşitlilik göstermektedirler (bu proteinler genel olarak "istemci" proteinler olarak adlandırılır) (Ciocca ve diğerleri, 2015). Heat shock proteinleri kimyasal ve fiziksel streslerle, ısı şokuyla uyarılabilen proteinler olarak keşfedilmişlerdir (Ciocca ve diğerleri, 2015). Daha sonra bu proteinler diğer proteinler ile etkileşimde olan ve diğer proteinlerin moleküler yapılarını modifiye edebilen mimar proteinler, moleküler şaperonlar olarak adlandırılmışlardır (Taşkın G. C., 2014).

Heat shock proteinlerin ifadesinin artması sonucu dahil oldukları pek çok fonksiyonel olay Şekil 5’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 5. Heat shock proteinlerin ifadesinin artması sonucu dahil oldukları fonksiyonel olaylar. (Ciocca ve diğerleri, 2015'den uyarlanmıştır)

Heat shock proteinlerinin artan ifadesi, hücrelerdeki stres koşuluyla ve onkogen ve anti-onkogen ürünlerinin düzgün tutulması ve transmembran taşınmasına aracılık etmek gibi çeşitli işlemleri etkilemektedir; protein uyumsuzluğunun bozulmasını düzenlemek ve hücrenin büyümesini desteklemek için tümör hücrelerindeki proteinin hızlı metabolizma dengesini uyumlu hale getirmek ve tümör hücrelerinin apoptoza dirençlerini arttırmaktadır (Yusuf ve diğerleri, 2016).

Son araştırmalar, farklı HSP'lerin farklı kanser türlerinde ifade oranlarının değiştiğini göstermiştir. Aşırı eksprese edilmiş HSP ile kanser davranışı arasındaki ilişki ile ilgili pek çok araştırma yapılmış ve halen araştırmalara devam edilmektedir. Farklı kanser türlerinde yüksek HSP düzeylerinin listesi Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Kanserde yüksek ısı şoku proteinleri. (Önay-Uçar, 2015'den uyarlanmıştır)

HSP	Kanser tipi	Bulgular
HSP105	Kolorektal kanser ve diğer birkaç kanser türleri	HSP105 aşırı eksprese edilir
	Pankreas duktal ve kolon adenokarsinom	HSP105 aşırı eksprese edilir
HSP90	Mesane karsinomu	HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90 aşırı eksprese edilir
	Meme kanseri	HSP90 aşırı eksprese edilir
	Hepatoselüler karsinom	HSP27, HSP70, HSP90, Grp78 ve Grp94 HBV ile ilişkili HCC'de artış
	Lösemi	Yukarı regüle edilmiş HSP90, kanserin saldırganlığını yansıtıyordu
	Akciğer kanseri	HSP90 aşırı eksprese edilir
HSP70	Meme kanseri	HSP70 yukarı regüle edilir
	Servikal skuamöz hücreli karsinom	HSP70 tanısal belirteç olarak kullanılabilir
	Hepatoselüler karsinom	Artmış HSP70, erken HCC'de duyarlı bir belirteçtir
	İntrahepatik kolanjiyokarsinom	HSP70 aşırı eksprese edilir
	Prostat kanseri	HSP70 aşırı eksprese edilir
HSP60	Kolorektal kanser	HSP60 aşırı eksprese edilir
	Akciğer kanseri	HSP60 aşırı eksprese edilir
	Prostat kanseri	HSP60 ve HSP10 aşırı eksprese edilir
HSP27	Meme kanseri	HSP27 yukarı regüle edilir
	Kolorektal kanser	HSP27 aşırı eksprese edilir
	Endometriyal kanser	HSP27 yukarı regüle edilir
	Gastrik kanser	HSP27 aşırı eksprese edilir

Gastrik kanserlerde HSP70 proteininin aşırı eksprese edildiğinin bildirildiği ve HSP70 inhibisyonu ile gastrik kanser tedavisinin mümkün olabileceği doğrultusunda verilere sahip yayınlar bulunmaktadır (Sessa ve diğerleri, 2013; Sharma ve Verma, 2018; Tu ve diğerleri, 2018).

2.2.1. Heat Shock Protein 70

Heat şok proteinlerinin HSP70 ailesi, protein homeostazında kritik rolleri olan yaklaşık 70 kDa boyutundaki moleküler şaperonlardan oluşmaktadırlar. Bu adenosin trifosfatlar

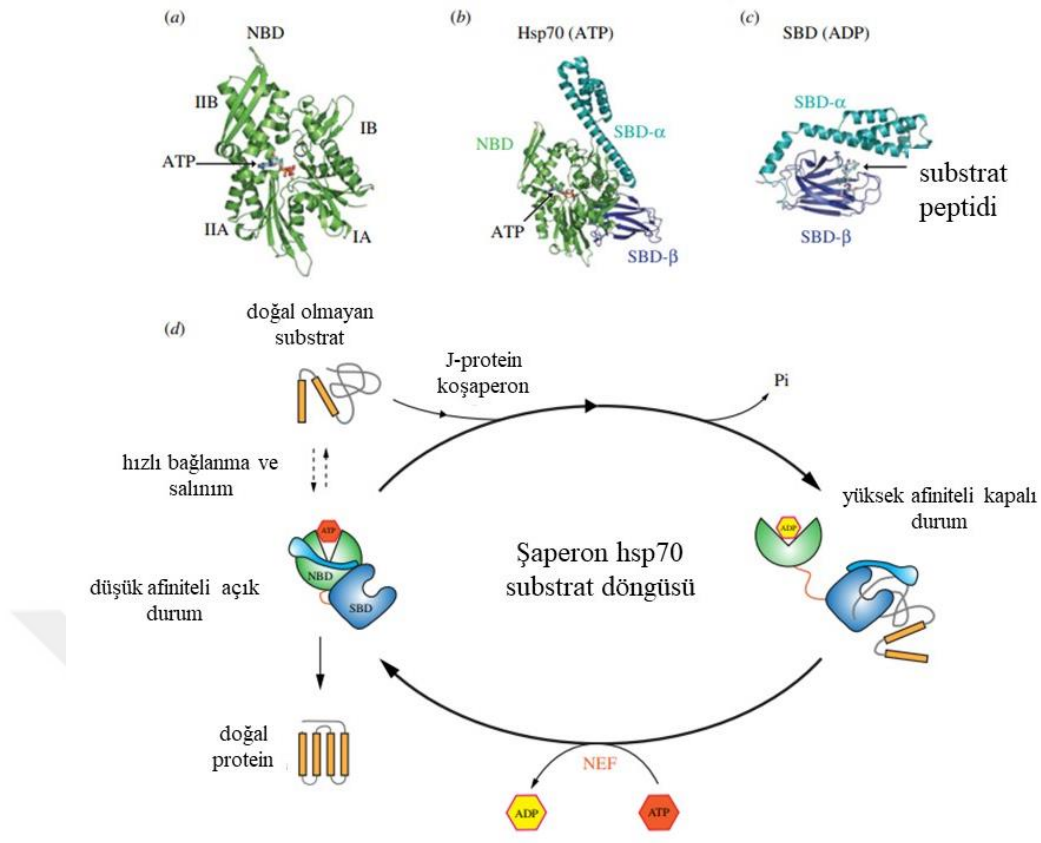
yanlış dizilmiş veya denatüre proteinleri açar ve bu proteinleri katlanmamış, katlanmaya elverişli bir durumda tutabilmektedir. Aynı zamanda, proteinlerin translasyonunu, proteinin hücresel veya organellerin taşınmasını teşvik eder, proteotoksik protein agregalarını azaltır ve protein homeostazı muhafaza etmede genel temizlik rollerine hizmet etmektedirler. HSP70 ailesi evrim içinde en çok korunan gruptur ve tüm ökaryotlar birden fazla üyeye sahiptir. Bu ailenin bazı üyeleri belirli organellar veya dokuya özgü işlevleri yerine getirmektedir. Ancak, çoğu durumda, bu üyeler gereğinden fazla çalışabilir. Genel olarak, HSP70 ailesi proteinler ya dışsal (fizyolojik, viral ve çevresel) ya da içsel (replikatif ya da onkojenik) uyaranlardan hücresel stres için güçlü bir tamponlama sistemi olarak düşünülebilir. Bu nedenle, bu aile hücrede kritik sağkalım işlevine hizmet etmektedir (Murphy, 2013).

Heat shock protein 70 ailesinin uyarılması hücresel sistemleri dengeleyen potansiyel bir güç olarak düşünülebilir. Bu aile, hücredeki hayatta kalma görevine hizmet etmektedirler (Demirbakan, 2015).

Hücrelerde yapısal olarak eksprese edilen HSP70 polipeptitleri, birçok tümör hücresinde yüksek oranda aşırı eksprese edilir ve tümör gelişiminde önemli bir role sahiptir. Ayrıca, birçok rapor, bunların susturulmasının tümör için sitotoksik olabileceği, ancak normal hücreler için geçerli olmadığı gerçeğine işaret etmektedir (Ciocca ve diğerleri, 2015; Murphy, 2013; Nylandsted ve diğerleri, 2000).

Heat şok protein 70'in yapısı ve substrat bağlanma, taşınma döngüsü Şekil 6'da gösterildiği gibidir.

Hsp70, birden fazla hücre yeri ve ifade profili olan bir şaperon protein ailesini belirtir. Tüm proteinler homolojiyi paylaşır ve 2 büyük alan, bir nükleotid bağlanma alanı (NBD) (Şekil 6a) ve bir substrat bağlanma alanı (SBD) (Şekil 6c) içerir (McConnell ve McAlpine, 2013).



Şekil 6. Heat şok protein yapısı ve substrat döngüsü. (Larburu ve diğerleri, 2020'den uyarlanmıştır)

2.2.2. Heat Shock Protein 70'in Kanserlerde Rolü ve İnhibitörler

Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, kanser hücreleri hayatta kalmak için HSP70'in tamponlama sistemine güvenmektedirler. İnsan tümörlerinin ezici çoğunluğu heat shock protein 70 aile üyelerini aşırı ifade etmekte ve bu proteinlerin ekspresyonu genellikle kötü prognoz için bir belirteç olmaktadır. Örneğin, heat shock protein 70'in aşırı ekspresyonu, erken hepatoselüler ve prostat kanserinin bir göstergesidir. Bu proteinin aşırı ekspresyonu, kolorektal karsinomda ve meme kanserinde ileri hastalık ve lenf nodu metastazı için bir belirteçtir. Akciğer, oral, kolon, prostat, karaciğer ve beyin kanseri hücre dizilerinde antisense aracılı heat shock protein 70 inhibisyonunun apoptoza neden olduğunu gösteren benzer bulgular bildirilmiştir (Murphy, 2013).

Heat şok protein aile üyelerinin intrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolağındaki görevlerine bakacak olursak;

İntrinsik apoptotik yol

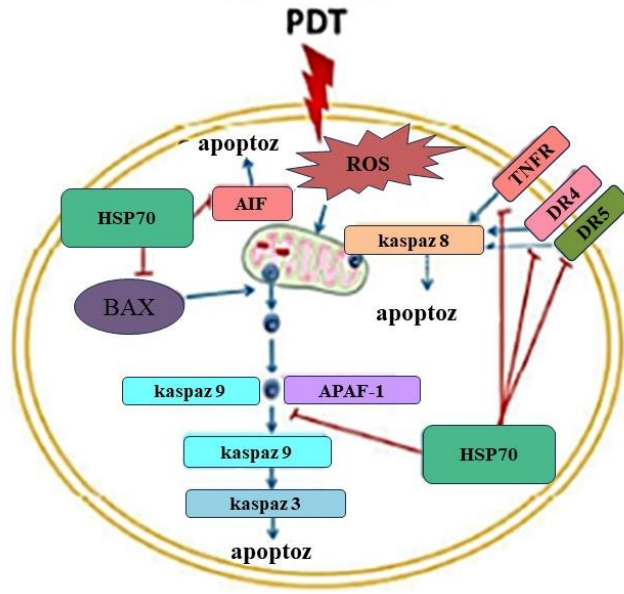
Apoptotik sinyallemeyle ilgili evrimsel olarak korunmuş bir protein olan HSP70'in ekspresyonu, stres altındaki hücrelerin hayatta kalabilirliğini arttırmaktadır. HSP70 knockdown'lu hücreler apoptoza duyarlıdır; HSP70'in aşırı ekspresyonu, mitokondri üzerinden hareket ederek apoptozu inhibe etmektedir (Kumar ve diğerleri, 2016).

HSP70, Bcl2 ailesinin proteinleri ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu etkiler. Bcl2 ve Bax, tümör süpresör protein p53 hedefleridir (Kumar ve ark., 2016). DNA hasarına tepki olarak, Bcl2'nin transkripsiyonu bastırılır ve Bax indüklenir (Kumar ve ark., 2016). Tümör hücreleri genellikle HSP70 ile kararlı bir kompleks oluşturan, mutasyona uğramış bir p53'e sahiptir. HSP70'in stres aracılığı ile ekspresyonu, p53'ün nükleer içeriğini inhibe eder. İnhibitör büyüme (ING) proteinleri tümör süpresörleri gibi davranır; insan kanserlerinde apoptoz sinyali ileten ve histonlara bağlanan ve dolayısıyla kromatinin yeniden modellenmesini ve p53 aktivitesini kontrol eden ifadeleri aşağı regüle eder. Bu proteinler, HSP70'in işlevini arttırmaktadır; bu da sağkalım yollarını bloke ederek tümör nekrozis faktörü- α (TNF- α) reseptör aracılı apoptozu indüklemektedir (Kumar ve diğerleri, 2016).

Ekstrinsik apoptotik yol

HSP70, TNF- α aracılı apoptozu bloke etmektedir (Kumar ve diğerleri, 2016).

Şekil 7 incelendiğinde HSP70'in, doğrudan proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi BAX'a bağlanabildiği ve bunun mitokondriye translokasyonunu önleyebildiği görülmektedir. Ek olarak HSP70, APAF-1 ve procaspase-9'un apoptozoma alınmasını engellemektedir. HSP70, ölüm reseptörleri DR4 ve DR5'e bağlanarak ölüme neden olan sinyal kompleksinin birleşmesini engellemekte ve ayrıca TNF- α yolunu da baskılamaktadır. HSP70, doğrudan apoptozu indükleyen faktöre (AIF) bağlanarak kaspazdan bağımsız hücre ölümünü inhibe etmektedir (Rodriguez ve diğerleri, 2016).



Şekil 7. FDT kaynaklı apoptozda heat shock proteinler. (Rodriguez ve diğerleri, 2016'dan uyarlanmıştır)

Günümüzde, kanser terapisi üzerinde çalışan araştırmacılar birçok kanser tipinde HSP düzeylerinin yükseldiğini iyi bildiği için HSP'nin bastırılmasına odaklanmıştır. Aşırı ifade edilen HSP, programlanmış hücre ölümü inhibisyonuna neden olur ve kemoterapötik ilaçlara direnci artırır. Bu nedenle, HSP'nin inhibisyonu kanser terapisinde ilginç bir strateji haline gelmiştir. Bir çok araştırma, kanser terapisinde HSP inhibisyonunun önem kazanmakta olduğunu da vurgulamıştır (Önay-Uçar, 2015).

Tüm bu araştırmalar göz önüne alındığında, kanser hücrelerinde HSP seviyesinin azaltılması, kanser terapisinde ve HSP'yi hedef alan yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde yararlı olacaktır (Önay-Uçar, 2015).

Mevcut hsp70 inhibitörleri ve gelişme evreleri Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. HSP70 inhibitörleri. (McConnell ve McAlpine, 2013'den uyarlanmıştır)

Ajan	Hedef Bölge	Gelişim Durumu	Hastalık Hedefi
Pifithrin- μ	SBD	in vivo fare modeli	kanser
Aptamerler	NBD/SBD	in vivo fare modeli	kanser
ADD70	SBD	in vivo fare modeli	kanser
15-DSG	NBD	klirik faz II/III (etkisiz)	kanser/bağıışıklığı baskılayıcı
MAL-3 101	UND	in vivo fare modeli	kanser
VER155008	NBD	in vitro	kanser
Apoptozol	UND	in vitro	UND
MKT-077	NBD	klirik faz I (toksik)	kanser/alzheimer
115-7 c	NBD	in vitro	UND
Sulfogalaktilipitler	NBD	in vitro	kanser
cmHsp70.1 mAb	TKD	klirik faz I/II (devam ediyor)	kanser
Azure C	UND	in vitro	UND
Metilen mavisi	UND	in vitro/klirik faz III	kanser/alzheimer
Mirisetin	UND	in vitro	UND
MAL2-11B	UND	in vitro	SV40

Üç yeni umut verici hsp70 inhibitörü MAL3-101, pifithrin- μ (Pi- μ) ve VER-155008'dir. Bu inhibitörler, çeşitli kanser hücre çizgilerine karşı tek ajanlar olarak minimal düzeyde etkilidirler, ancak ikili terapi ajanları olarak kullanıldığında muazzam bir sonuç göstermektedirler (McConnell ve McAlpine, 2013). Bir diğer hsp70 inhibitörü ise quercetindir. Quercetin, heat shock faktör 1'in trans-aktive edici potansiyelini inhibe ederek hücre içi Hsp70 seviyelerini etkili bir şekilde azalttığı gösterilen, doğal olarak oluşan bir flavonoiddir (Koishi ve diğerleri, 1992).

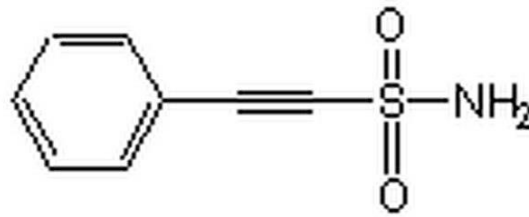
Heat shock protein 70'in üretiminin artması hücrede tümör oluşumuna sebep olabilirken heat shock protein 70'in üretiminin azalışı bazı tümör hücrelerini apoptoza sürüklemektedir (Demirbakan, 2015). Normal hücrelerde ise heat shock protein 70'in azalışıyla hayati davranışlarında değişiklik olmadığı, yaşama yeteneklerini yitirmedikleri gözlenmiştir (Demirbakan, 2015). Bu nedenle heat shock protein 70'i doğrudan inhibe eden moleküller üzerinde araştırmalar yapılmış ve seçici küçük bir molekül olan pifithrin- μ (2-phenylethynesulfonamide, PES) tasarlanmıştır (McKeon ve diğerleri, 2016). Bu molekül heat shock protein 70'in doğrudan inhibitörüdür (McKeon ve diğerleri, 2016). Pifithrin- μ heat shock protein 70'in C-terminal alt-tabakasına (peptit) bağlanma alanı ile etkileşime geçmektedir (McKeon ve diğerleri, 2016). Pifithrin- μ artmış protein agregasyonunu içeren

kaspazdan bağımsız bir mekanizmayla kanser hücrelerinde apoptoza neden olmaktadır (McKeon ve diğerleri, 2016).

Küçük bir molekül olan Pifithrin- μ , bilinen kemoterapötik ajanların etkililiğini arttırmaktadır (McConnell ve McAlpine, 2013).

2.3. Pifithrin

Pifithrinler, p53 proteininin apoptozu indükleyen fonksiyonlarını engelleyebilen küçük sentetik moleküllerdir (Şekil 8). Pifithrinler, büyük ölçüde p53'ün aracılık ettiği kanser terapisi bağlamında radyasyon ve kemoterapi ile ilişkili toksisiteyi azaltmak için oluşturulmuştur. Pifithrin- α , p53'ün transkripsiyonel aktivitesinin bir inhibitörü olarak tanımlanan ve karakterize edilen ilk bileşiktir. Bununla birlikte bu bileşik, p53 transkripsiyondan bağımsız mekanizmalar yoluyla apoptotik hücre ölümüne neden olabilir. Örneğin, p53 mitokondriye yer değiştirebilir, Bcl-2 protein ailesinin antiapoptotik üyeleri ile etkileşebilir, onları nötralize edebilir ve apoptoza neden olabilir. Bu gerçek, kimyasal yeni analizleri ve sonucunda pifithrin- μ 'nün keşfini teşvik etmiştir. Pifithrin- μ , p53'ün transkripsiyonel aktivitesini değiştirmeden p53 ve Bcl-2 proteinleri arasındaki etkileşimleri bozabilmektedir. Tutarlı bir şekilde, γ -radyasyonuna maruz kalan farelere kısmi bir koruma sağladığı da gösterilmiştir (Mattiolo ve diğerleri, 2014).

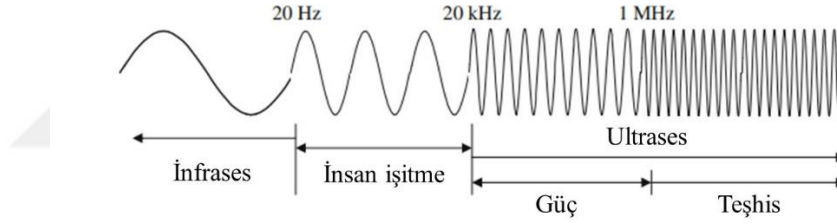


Şekil 8. Pifithrin- μ yapısı.

Yapısal analizler, PFT- μ 'nn HSP70'in substrat bağlama alanı (SBD) ile etkileşime girdiğini ortaya çıkarmaktadır (Ciocca ve diğerleri, 2015).

2.4. Ultrases

Ses, farklı iletim ortamlarında (gaz, sıvı veya katı gibi) akustik dalga olarak yayılan bir titreşimdir. Tüm ses dalgaları basitçe bir ortamdan geçen uzunlamasına basınç dalgalarıdır. Ses dalgasının türü, frekansı ile belirlenir. “İnfrases”, insan kulağı tarafından algılanabilenin altındaki frekanstaki ses dalgalarını ifade eder. Bu, balinalar ve denizaltı sonar cihazları tarafından kullanılan bölgedir. İnsan işitme aralığı yaklaşık 20 Hz ile ~20 kHz arasındadır (Şekil 9). “Ultrases” kelimesi, bu aralığın üzerinde bir frekansta olan ses dalgalarını ifade eder. Bu ultrases spektrumunun kendisi iki bölgeye ayrılabilir. Güç ultrasesi 20 kHz ile yaklaşık 1 MHz arasındaki frekans aralığını ifade eder. Teşhis ultrasesinin frekansı 1 MHz'i aşar ve çoğunlukla tıbbi ve endüstriyel görüntüleme amaçları için kullanılır (Kentish ve Ashokkumar, 2010).



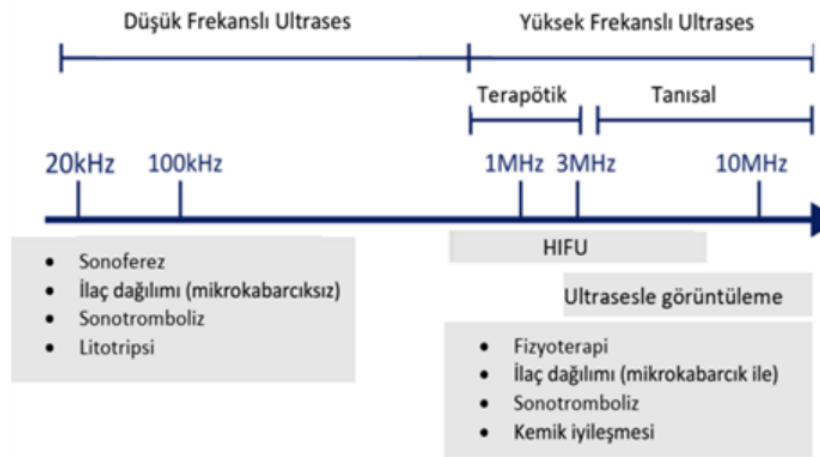
Şekil 9. Ses spektrumu. (Kentish ve Ashokkumar, 2010'dan uyarlanmıştır)

Ultrasesin tıpta terapi amaçlı uygulamaları, uzun yıllardır ultrasesin biyolojik etkilerin kabul edilmiş ve faydalı bir kullanımı olmuştur. Yaklaşık 1 MHz frekansındaki düşük güçlü ultrases, 1950'lerden beri tendinit veya bursit gibi durumlarda fizik terapi için yaygın olarak uygulanmaktadır. 1980'lerde, böbrek taşlarını mekanik olarak çözmek için yüksek basınç genlikli şok dalgaları kullanılmaya başlanmıştır ve “litotripsi” en sık terapi seçeneği olarak hızla cerrahinin yerini almıştır. Terapi için ultrases enerjisinin kullanımı genişlemeye devam etmektedir ve artık onaylanmış uygulamalar arasında uterin fibroid ablasyonu, katarakt giderme (fakoemülsifikasyon), cerrahi doku kesme ve hemostaz, transdermal ilaç verme ve kemik kırığı iyileşmesi yer almaktadır (Miller ve diğerleri, 2012).

Ultrases, gelişimi yalnızca tanısal bir görüntüleme yöntemi olarak değil, çeşitli biyolojik etkileri indüklemek için enerjinin dokuda biriktirildiği terapötik bir modalite olarak görülmektedir. Terapi için ultrasesin tıbbi kullanımları 1930'larda keşfedilmeye başlanmıştır. Takip eden on yıllar boyunca, bilimsel ilerlemeler, vestibüler sinirin tahrip edilmesiyle Meniere hastalığının ve beyinde lokalize doku harabiyeti için odaklanmış ultrases kullanılarak Parkinson hastalığının etkili terapisi için geliştirilmiş yöntemler kullanıldığı görülmektedir. 1970'lere gelindiğinde, fizyoterapi için terapötik ultrases kullanımı yerleşmiş ve beyin cerrahisinde ve kanser terapisinde daha zor uygulamalar üzerine araştırmalar devam etmiştir. Daha sonra, terapötik ultrasesin gelişimi, şu anda kullanımda olan çok çeşitli yöntemlerle hızlanmıştır (Miller ve diğerleri, 2012).

Ultrasesin tıbbi uygulama alanlarına bakılacak olursa pekçok alanda, hem tedavide hem de teşhiste kullanıldığı görülmektedir. Düşük frekanslı ultrases ile sonoferez, mikrokabarcıksız ilaç dağılımı, sonotromboliz ve litotripsi yöntemleri öne çıkmaktadır. Yüksek frekanslı ultrases kullanımı ise genel olarak 3MHz frekansa kadar terapötik olarak kullanılmakta iken 3MHz'den daha büyük frekanslarda daha çok tanısal/teşhis amaçlı kullanılmaktadır. 3MHz'e kadar olan yüksek frekanslı ultrases fizyoterapide, mikrokabarcıklı ilaç dağılımında, sonotrombolizde ve kemik iyileşmesinde kullanılmaktadır.

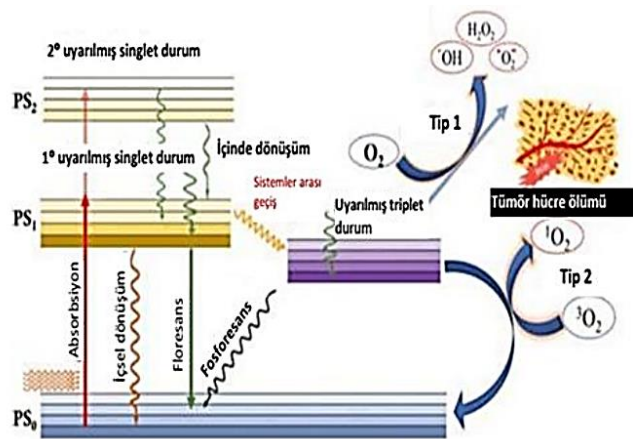
Ultrasesin tıbbi uygulama alanları Şekil 10'da özetlenmiştir.



Şekil 10. Tıbbi uygulamalarda kullanılan farklı ultrases frekanslarına genel bakış.
(Köken, E. C. 2020)

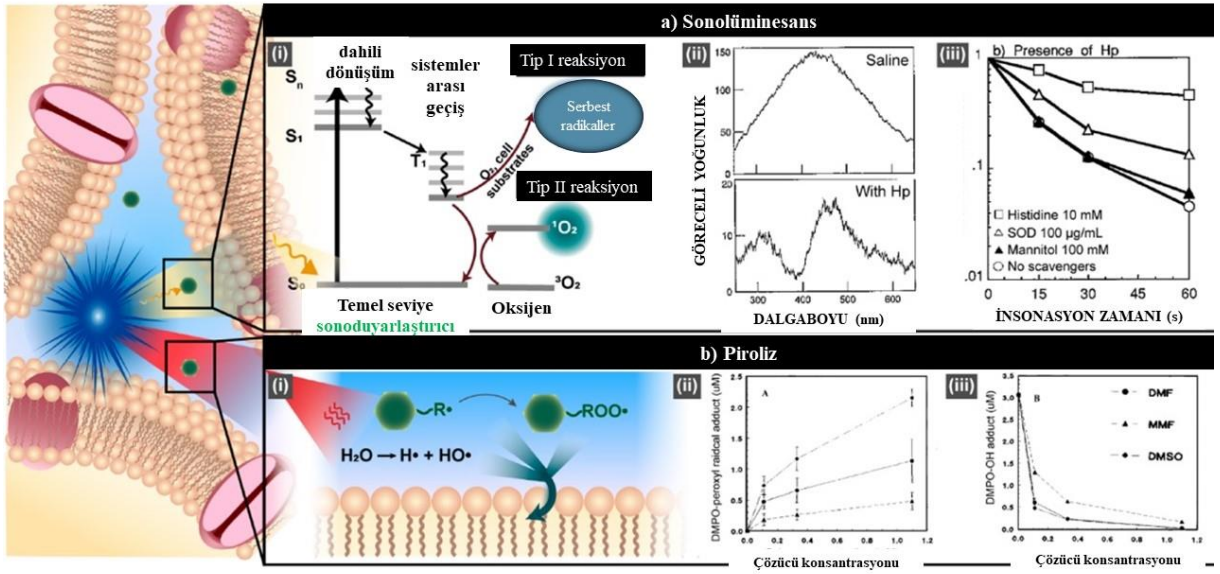
2.5. Sonodinamik Terapi

Sonodinamik terapi (SDT), kanser terapi araştırmalarında yer alan bir kavramdır. Bu kavram, fotoduyarlaştırıcı ajanların ışıkla etkileşmesi sonucunda hücree ölümü ve/veya apoptozise yol ačan fotodinamik terapi (FDT) prensibi temel alınarak geliştirilmiştir (Umemura ve diğerleri, 1990; Yumita ve diğerleri, 1989). FDT'de uygulanan ışık etkileri, SDT'de ultrases dalgaları kullanılarak sonolüminesans sağlanır (Köken, E. C. 2014). SDT, özellikle kavitasyon oluşumuyla ilişkili olan ultrasesin non-termal etkilerinden kaynaklanır ve ultrasonik kavitasyon su moleküllerinin parçalanmasıyla serbest radikallerin (H , OH , H_2O_2 , süperoksit) oluşumuna neden olur (Köken, E. C. 2014). 1989 yılından bu yana sonodinamik terapi, umut vaadeden yeni bir yaklaşımdır (Umemura ve diğerleri, 1990; Yumita ve diğerleri, 1989). Sonodinamik terapi, düşük yoğunluklu ultrases ve sonikasyonla aktive edilebilen bir kimyasalın (sonoduyarlaştırıcı ajan veya kemoterapötik bir ilaç) kullanımını iğeren bir ultrases tabanlı terapi yaklaşımıdır (Rosenthal ve diğerleri, 2004). Birçok in vitro ve in vivo araştırma, tek başına ultrases veya tek başına sonoduyarlaştırıcı ajanın tümör hücrelerinde sitotoksik etkisi olmadığını veya çok az olduğunu göstermiştir, ancak ultrases ve sonoduyarlaştırıcı ajanın birlikte kullanıldığında yani sonodinamik terapide tümör hücrelerinin etkili bir şekilde yok edildiğini göstermiştir (Tachibana ve diğerleri, 2008).



şekil 11. Jablonski diyagramı üzerinde tip 1 ve tip 2 fotoduyarlaştırıcı mekanizmalarının şematik gösterimi. (Köken, E. C. 2020)

SDT, tümörü hedefleyebilme ve derin dokulara nüfuz edebilme özelliği sayesinde terapi seçeneklerini artırmaktadır. Ayrıca, dokuya özgü antikorlarla birlikte verilen ajanlar sayesinde dokuya özgü terapi uygulanabilme olanağı da bulunmaktadır. Umemura ve arkadaşları, sonoduyarlastırıcı ajan ile ultrasesin kombinasyonunun etkisinden bahsederek bu alternatif terapi yöntemine "Sonodinamik Terapi" adını vermiştir (Umemura ve diğerleri, 1999; Yumita ve diğerleri, 1990). Fotodinamik terapiye benzer özelliklere sahip olan SDT'nin en önemli avantajı, ultrasesin biyolojik dokulara ışıktan daha iyi nüfuz etmesidir. SDT'nin temel etkisi, ultrasonik kavitasyon oluşturmaktır. Kavitasyon, ultrases ile ısıtılmış bir ortamda baloncukların üretilmesi, genişletilmesi ve çökmesi ile karakterize edilir. Sonolüminesans, yerel şok dalgaları ile oluşturulan kabarcık çökmesi sonucunda serbest radikallerin oluşumuna yol açar. Su ultrases dalgalarıyla ısıtıldığında hidrojen peroksit oluşur (Köken, E. C. 2014). Ultrases ışıma etkisi altında bazı ilaçlar, aktif süperoksit radikalleri ve singlet oksijen gibi oksijen türleri oluştururlar ve bu türlerin kanserli dokulara zarar verdiği belirlenmiştir (Miyoshi ve diğerleri, 1997). Yapılan araştırmalar, ultrasonik kavitasyon etkisiyle porfirin gibi bazı fotosensitif ajanların aktive edildiğini ve bu aktivasyon sonucunda önemli hücre hasarlarının gözlemlendiğini göstermiştir (Köken, E. C. 2014). Fotosensitif bir ajan, ultrases ile uyarıldığında sonoduyarlastırıcı ajan olarak etki eder ve bu etkinin uygulanabilirliği oldukça yüksektir. Bu sonoduyarlastırıcı ajanlar, tümör dokusu etrafında seçici olarak biriktirilebilir ve ultrases maruziyetiyle aktive edilebilirler. Kullanılan ajanların tek başına anti-tümör aktivitesi olmadığı durumlarda, ultrases ışıma ile aktiviteleri artmaktadır (Tachibana ve diğerleri, 2008). SDT'nin temel araştırma alanları arasında kemoterapi geliştirme, gen terapisi ve apoptoz terapileri yer almaktadır. Ultrasonik enerjinin dokulara daha az zarar vermesi ve daha iyi nüfuz etmesi, radyoterapi ve ışık (lazer ışını) kullanılan terapilere göre daha üstün olduğunu göstermektedir (Tachibana ve diğerleri, 2008). SDT'nin sitotoksikite mekanizması teorik olarak FDT ile benzerdir. sonoduyarlastırıcı ajanın ultrases ile uyarılmasıyla elde edilen akustik kavitasyon, aktif oksijen üretimini sağlar (Şekil 12) (Choi ve diğerleri, 2020).



Şekil 12. SDT’de olası hücre hasarı mekanizması. (Choi ve diğerleri, 2020’den uyarlanmıştır)

Atalet kaviteyonunun başlattığı ROS'a bağlı SDT mekanizmasında ortaya çıkan sonoluminesans ve ısı (4000–25,000 K), (Şekil 12a) PDT benzeri mekanizma veya (Şekil 12b) piroliz yoluyla yakındaki sonoduyarlastırıcıları (yeşil renkle gösterilmiştir) aktive eder. Sonoluminesans ışığın, fotoaktif sonoduyarlastırıcıları temel durumdan kısa ömürlü uyarılmış singlet duruma (a-i) uyardığı düşünülmektedir. Sistemler arası geçişi takiben, ortaya çıkan triplet durum, Tip I PDT reaksiyonu yoluyla serbest radikaller oluşturmak için hücre substratları ve oksijen ile etkileşime girebilir veya Tip II PDT reaksiyonu yoluyla sitotoksik singlet oksijen ($^1O_2$) oluşturmak için doğrudan moleküler oksijen ile etkileşime girebilir. Atalet kaviteyonundan üretilen yüksek odak sıcaklıkları, suyun termolizine neden olarak, daha uzun ömürlü sitotoksik peroksil radikalleri üretmek için sonoduyarlastırıcılarla etkileşime girebilen serbest radikaller üretebilir. Sonoduyarlastırıcılar ayrıca sonokimyasal sıcak noktanın yakınında doğrudan radikal türlere ayrışabilirler (Choi ve diğerleri, 2020).

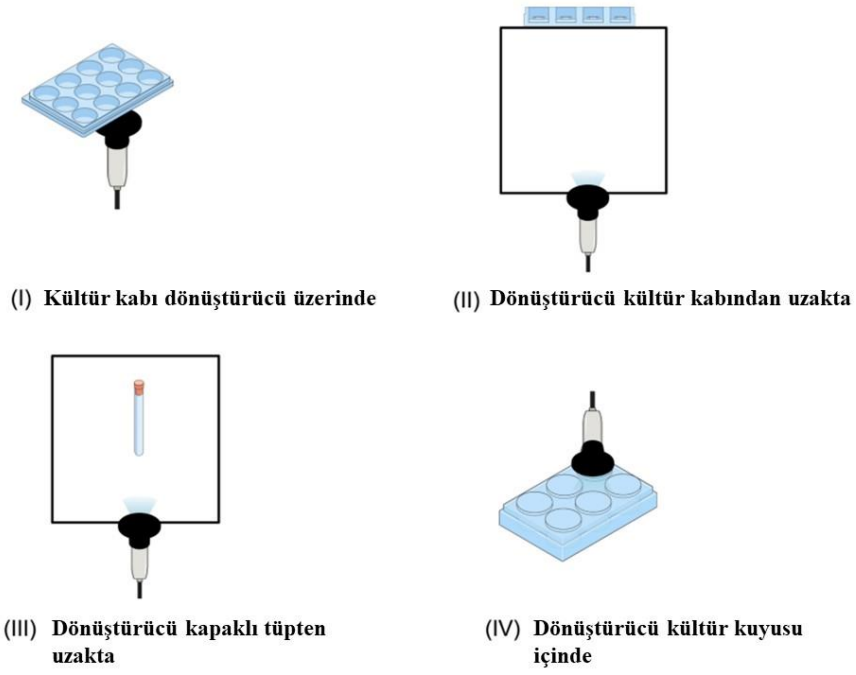
Özetle tümör hücresinin yüzeyine tutunan sonoduyarlastırıcı ajan uyarıldığında, temel seviyeden uyarılmış seviyeye geçmektedir ve aktifleşmiş ajan temel seviyeye geri dönerken

enerji salarak hücrel toksisiteye sebep olan singlet oksijen, serbest radikaller gibi reaktif oksijen türleri oluşturmaktadırlar.

Hücre kültüründe SDT'yi değerlendirmek için kullanılan deneysel konfigürasyonlar Şekil 13'te özetlenmiştir. SDT sonuçlarını etkileyebilecek in vitro deneysel faktörler ve değişkenleri Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. SDT sonuçlarını etkileyen in vitro deneysel faktörler ve değişkenleri. (Martins ve diğerleri, 2021'den uyarlanmıştır)

Faktör	Değişkenler
Ultrases parametresi	Frekans Yoğunluk Görev döngüsü Uygulama süresi
Uzamsal konfigürasyon	Hücreden transdusere mesafe Ultrases ile kültür kuyusu oranı
Kaplama ortamı	Hacim Kompozisyon Yoğunluk Sıcaklık Akustik özellikler
Kültür kuyuları/örnek tutucular	Geometri Materyal tipi ve akustik özellikler Emiciler
Kültür besi ortamı	Kompozisyon Hacim Akustik özellikler
Uygulama yapılan örnek tipi	Yapışan hücreler Süspansiyondaki hücreler Hücrelerin hareketi

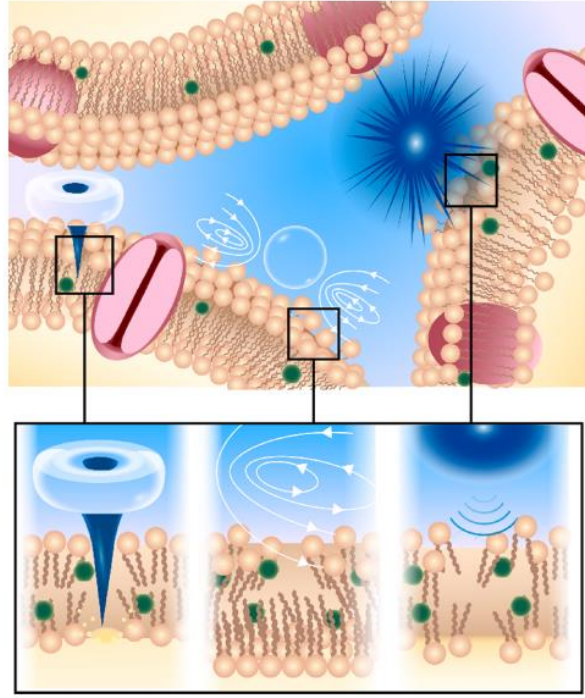


Şekil 13. Hücre kültüründe SDT'yi değerlendirmek için kullanılan deneysel konfigürasyonlar. (Martins ve diğerleri, 2021'den uyarlanmıştır)

2.5.1. Sonodinamik Terapinin Etki Mekanizmaları

Sonodinamik terapi (SDT) ilk olarak 1990'larda kanseri terapi etmek için Umemura tarafından tanıtılmıştır. SDT, sitotoksik etkiler uygulamak üzere sese duyarlı ajanları tetiklemek için ultrases kullanmaktadır. Bu nedenle, fotodinamik terapi (PDT) ile karşılaştırıldığında, SDT sadece üstün hedefleme ve invaziv olmayan özelliklere sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda daha derin tümörler için daha uygundur. SDT'nin mekanizmaları henüz net olarak keşfedilmemiştir. Kabul edilen açıklamalar, membran lipid bileşenlerinin oksidasyonunu başlatan sonoduyarlaştırıcı kaynaklı reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu arttırdığı düşünülmektedir. Tipik olarak ışığa duyarlılaştırıcı olarak kullanılan porfirinler, klorinler ve ftalosiyanınler gibi sonoduyarlaştırıcılar, SDT yoluyla kanser terapisi için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Günümüzde, kemoterapi, hormon terapisine ek olarak sadece birkaç ileri evre kanser hastası SDT almaktadır. Hem prelinik hem de klinik araştırmalar SDT'nin malign tümörlere karşı etkili olduğunu doğrulasa da, kanser terapisinde tek başına kullanılmamaktadır (Xu ve diğerleri, 2020). SDT'nin antikanser

aktivitesini arttırmak için yeni sonoduyarlastırıcılar, ilaç verme stratejileri ve diğer terapilerle kombinasyonlar yoluyla SDT aktivitesindeki potansiyel iyileştirmeler araştırılmaktadır (Xu ve diğerleri, 2020).



Şekil 14. SDT'nin ROS bağımsız mekanizması. (Choi ve diğerleri, 2020'den uyarlanmıştır)

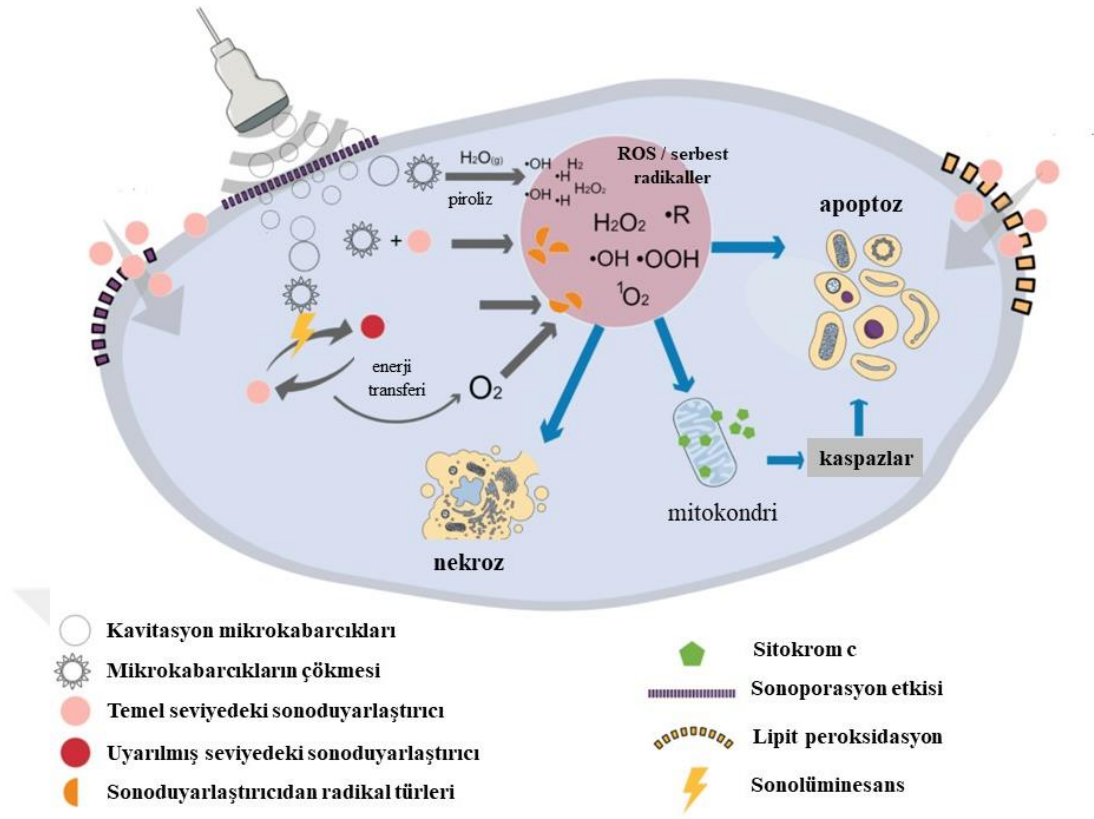
Akustik kavitasyonun mekanik etkileri tek başına geniş çapta çalışılmış olmasına rağmen, bir sonoduyarlastırıcı ilavesinin sinerjistik bir sitolitik cevaba nasıl aracılık edeceği veya edip etmeyeceği belirsizliğini korumaktadır. Mevcut teoriler, membran istikrarsızlaştırıcı bir bileşiğin eklenmesinin, sinerjistik bir etkiye aracılık etmek için ultrases tarafından indüklenen fiziksel stresleri artırabileceğini önermektedir (Şekil 14). Sonoduyarlastırıcıların hücre zarlarına dahil edilmesinin, bunların istikrarsızlaşmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bunun da hücre zarını mikrojet, mikro akış ve ataletsel kavitasyondan kaynaklanan şok dalgaları gibi kavitasyon mekanik olaylarına karşı daha savunmasız hale getirdiği düşünülmektedir. Bu nedenle, sonoduyarlastırıcılar, sonomekanik hücre hasarı ve bu

durumu takiben ölüm için gereken basınç eşiğini düşürerek sinerjistik SDT etkilerini harekete geçirebilmektedir (Şekil 14) (Choi ve diğerleri, 2020).

Tablo 4. Sdt'nin etkilerinin altında yatan önerilen mekanizmaların özeti. (Choi ve diğerleri, 2020'den uyarlanmıştır)

Mekanizması	Destekleyen Kanıt	Çelişen Kanıt	Bilinmeyenler
Sonolüminesans	Porfirin sonoduyarlastırıcılarının pik absorbansı ile sonolüminesans arasında örtüşme Elektron paramanyetik rezonans spin yakalama, problemler, söndürücüler yoluyla gözlemlenen $^1O_2$ üretmek için triplet durum	Düşük singlet oksijen verimine sahip metalloporfirin ve diğer bileşikler (ör. piroksikam), kısa triplet durum ömrüne rağmen sitotoksik ve terapötik etkinlik sağlar.	Sonolüminesansın yayılan ışığın yoğunluğu, gücü, süresi, dalga boyu Kullanılan sonoduyarlastırıcıların sınıfı ve yapısı ile ilgili olarak yayılan ışığın karakterizasyonu
Piroliz	OH, H$\cdot$, elektron paramanyetik rezonans spin yakalama, problemler, söndürücüler aracılığıyla tespit edilen uzun ömürlü peroksil ve alkoksil türleri, sonoduyarlastırıcıların ayrışmasını gösterir ROS'un kısa yarı ömrü, hücresel bölgeler içindeki göçü sınırlar - gözlemlenen terapötik cevaba aracılık etmek için daha uzun ömürlü radikaller gerektirmelidir	Hücre zarı geçirgen bir serbest radikal temizleyici olan sisteamin tarafından gözlemlenen koruyucu etki ve bir zar geçirimsiz temizleyici olan sisteminin eksikliği, hücre zarı içinde ROS aktivitesini düşündürür	Farklı sonosensitör sınıflarından üretilen ürünler pirolizin hem yapısında hem de mekanizmasında büyük farklılıklar gösterebilir.
Mekanik	Ultrasesin bilinen fiziksel hasara neden olma yeteneği Membran istikrarsızlaştırıcı bileşikler, ultrases kaynaklı hemolizi artırır	Çoğu araştırmada ROS üretimi, muhtemelen bunun oyundaki tek mekanizma olmadığını gösterir.	Ataletsel kaviteasyon sırasında ROS oluşumundan fiziksel stres faktörlerini izole etmek imkansızdır.

SDT'nin hücrelerdeki ana etki mekanizmaları Şekil 15'te şematize edilmiştir.

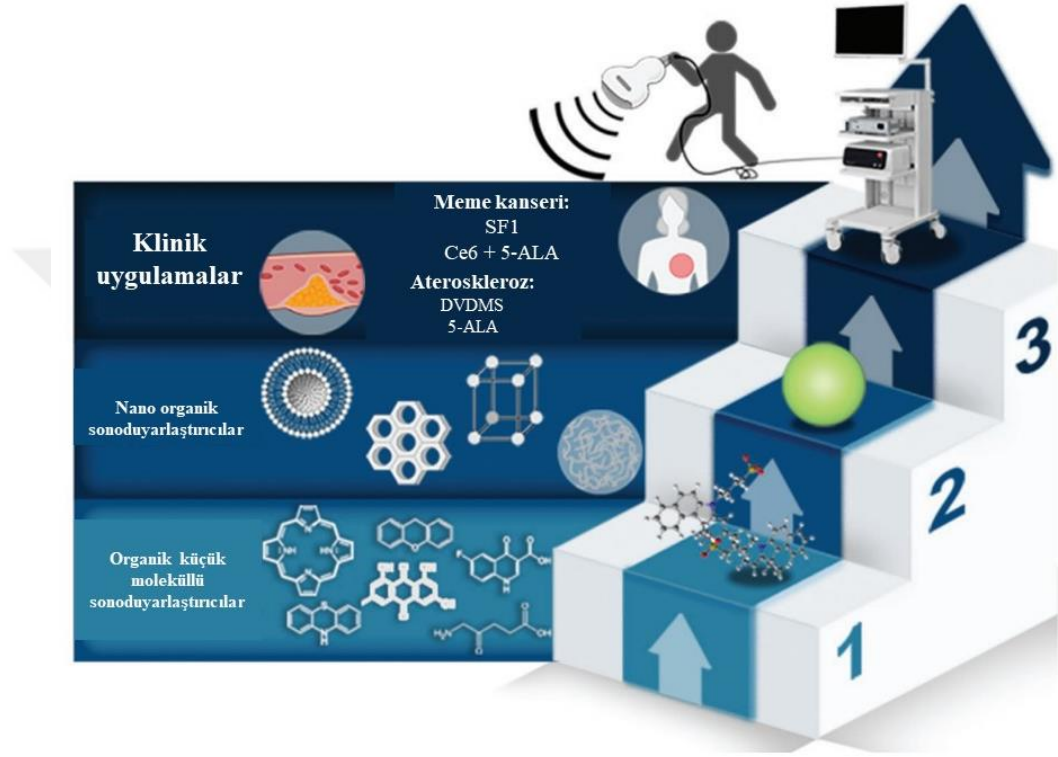


Şekil 15. SDT'nin hücrelerdeki ana etki mekanizmalarının temsili hali. (Martins ve diğerleri, 2021'den uyarlanmıştır)

2.6. Sonoduyarlaştırıcılar

Geleneksel olarak, SDT moleküler sonoduyarlaştırıcıları kullanmıştır. Şimdiye kadar, literatürde porfirinler, ksanten boyaları, kemoterapötik antrasiklin türevleri, azo bileşikleri, heptametin boyaları, nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID'ler) ve daha fazlasını içeren çok sayıda moleküler sonoduyarlaştırıcı sınıfı kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu ilaç sınıflarının bazılarında sitotoksitede gözlenen artışların, SDT için beklendiği gibi bu ilaçların sonodinamik aktivasyonundan mı yoksa yalnızca artan ilaç dağıtımının bir sonucu mu olduğu tartışmalıdır. Buna göre, doğal toksisitesi olmayan sonoduyarlaştırıcılar, esas olarak, SDT sinerjistik etkilerini ilacın kendisinden daha iyi ayırt etmek için araştırılmıştır. Özellikle, porfirin bazlı ışığa duyarlılaştırıcılar, fotoaktivasyon üzerine ROS üretme eğilimleri nedeniyle büyük bir odak noktasıdır. Bununla birlikte, bunların her yerde kullanımları,

SDT'deki sonolüminesansın rolüne, fotoinaktif sonoduyarlastırıcıların kullanımına göre daha fazla vurgu yapmaktadır. Bu amaçla, özellikle nanopartiküller formundaki supramoleküler sonoduyarlastırıcı düzenekleri, kanser terapisi stratejisi olarak SDT'nin terapötik etkinliğini ve uygulanabilirliğini yakın zamanda ilerletmiştir (Choi ve diğerleri, 2020).



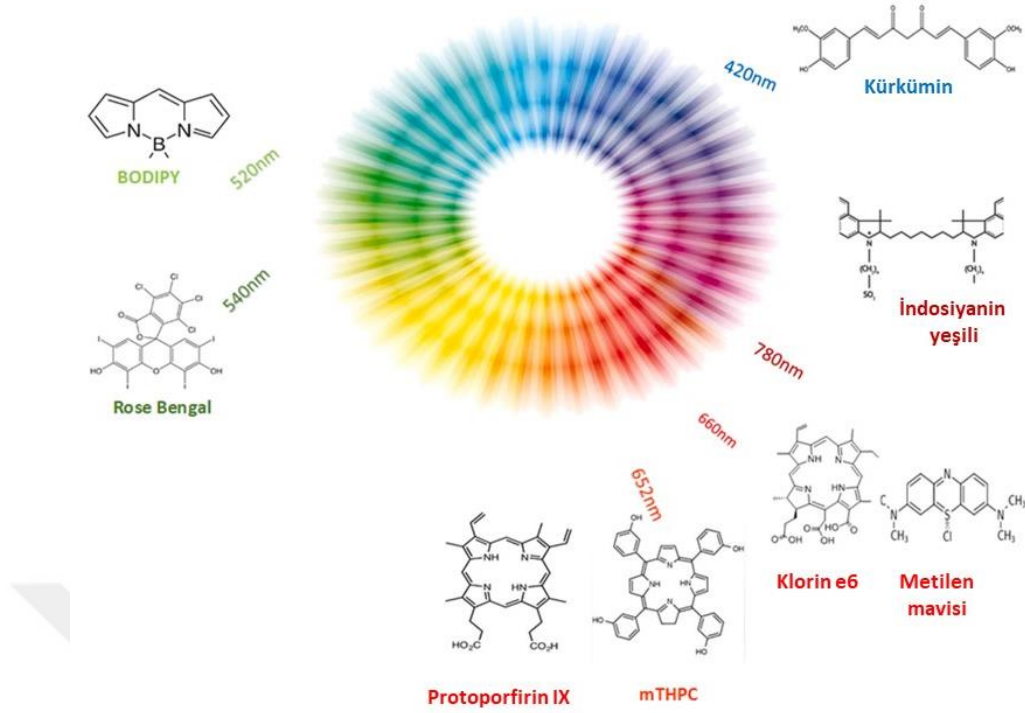
Şekil 16. Organik sonoduyarlastırıcıların şematik gösterimi. (Li ve diğerleri, 2021'den uyarlanmıştır)

Tablo 5. Organik küçük sonoduyarlaştırıcı moleküller ve bu moleküllerin muhtemel sonodinamik etki mekanizması. (Li ve diğerleri, 2021'den uyarlanmıştır)

Kategori	Adı	Tahmini mekanizması
Porfirinler ve ftalosiyanınlar	HMME	ROS
	PpIX	ROS, apoptoz
	Ce6	ROS
	DVDMS	ROS, p53/kaspaz 3 yolağı aktivasyonu
Ksanten bileşikler	RB türevleri	ROS
Fenotiyazin bileşikler	MB	ROS, hidroksil radikalleri
Florokinolon antibiyotikler	Kürkümün	henüz mevcut değil
Doğal ürünler	HSYA	ROS, otofaji
Diğer organik küçük moleköl sonoduyarlaştırıcılar	5-ALA	kaspaz 3 ve paspaz 8 yolağı aktivasyonu

2.6.1. Klorin e6

Klorin e6 (Ce6), normal dokulardan hızla temizlenme avantajına sahip yeni bir ışığa duyarlılaştırıcıdır. Ayrıca, Ce6'nın SDT'de anti-tümör aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Ce6 ile kombine edilmiş ultrasesin tümör hücrelerinin büyümesini etkili bir şekilde engelleyebildiğini, terapiden sonra tümör dokusunun süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin farklı oranlarda azaldığı bulunmuştur. Oksidatif hasarı indüklemek için Ce6 aktive edilip ardından tümör hücreleri öldürülebilir. Ce6'nın 4T1 meme tümörü üzerindeki anti-tümör etkisini incelemek için SDT'yi kullanmış ve sonuç olarak SDT grubunun kontrol grubuna kıyasla tümör büyümesini etkili bir şekilde engellediği gösterilmiştir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), tümör anjiyogenezinin değerlendirilmesinde önemli bir göstergedir. Zhu ve arkadaşları araştırmalarında SDT grubunda VEGF seviyesinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığını bulmuştur. Ce6'nın tümör hücrelerinde lokal ilaç konsantrasyonunu arttırmak için çeşitli ilaç dağıtım sistemleri kurulmuştur (Zhu ve diğerleri, 2020).



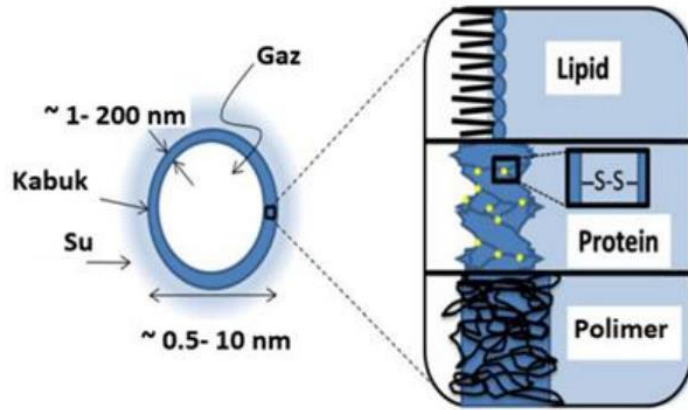
Şekil 17. Fotoduyarlastırıcılar, kimyasal yapıları ve maksimum absorpsiyon dalgaboyları. (Czarnecka-Czapczyńska ve diğerleri, 2021'den uyarlanmıştır)

Klorin e6, üç iyonlaşabilir karboksilik kalıntı taşıyan hidrofilik bir duyarlastırıcıdır ve dört pirol halkasından birinin kısmi doygunluğu ile porfirinden türetilir. Ce6'nın tümörlerde daha etkili bir şekilde biriktiği, daha uzun dalga boylarında (650 ve 670 nm) daha güçlü emildiği ve organizmadan daha hızlı temizlendiği gösterilmiştir. Ce6 veya türevleri PDT'de çalışılmış ve ROS'un önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Ek olarak, önceki araştırmalar Ce6'nın ultrases ile etkin bir şekilde aktive edilebileceğini ve hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak ultrases kaynaklı tümör hücresi hasarını önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Wang ve diğerleri, 2013).

2.7. Mikrokabarcıklar

Mikrokabarcıklar, merkezi gazla doldurulmuş ve stabil bir kabukla çevrelenmiş yapıları ifade eder (Şekil 18). Mikrokabarcıkların ilk nesli, merkezlerini doldurmak için hava kullanılarak yapılmıştır. Ancak, havanın su içinde yüksek çözünürlüğü nedeniyle bu

mikrokabarcıklar kan dolaşımında hızla çözünmüş ve etkilerini kaybetmiştir. Bu nedenle, ikinci nesil mikrokabarcıklar perflorokarbon gazları (C_nF_{n+2}) veya kükürt heksaflorür (SF_6) kullanılarak hazırlanmıştır. Bu iki gaz hidrofobik olduğundan, mikrokabarcıkların gaz kaçırma ve suda çözünme problemleri çözülmüştür (Price ve diğerleri, 1998; Riess, 2003; Schutt ve diğerleri, 2003). Biyomedikal amaçlar için kullanılan mikrokabarcıklar genellikle 0,5 ila 10 μm arasında değişmektedir (akciğer kılcal damarlarından geçiş için üst sınırdır). Toplam mikrokabarcık hacminin büyük bir kısmı, gaz çekirdek olarak adlandırılan tek ve bütün bir bölümden oluşmaktadır. Kabuk, kapsüllenmiş gaz ve mikrokabarcığı çevreleyen sulu ortam arasında bir bariyer görevi görmektedir. Kabuk bileşeni olarak lipid (yaklaşık 3 nm kalınlığında), protein (15-20 nm kalınlığında) ve polimer (100-200 nm kalınlığında) gibi farklı malzemeler kullanılabilir. Lipid molekülleri, hidrofobik etkileşim ve van der Waals kuvveti gibi fiziksel çekimler sayesinde bir arada tutulmaktadır. Proteinler birbirine kovalent disülfür bağlarıyla bağlanırken, polimer zincirleri kovalent olarak çapraz bağlanır ve/veya birbirine dolanarak yığın benzeri bir malzeme oluşturur (Köken, E. C. 2020).

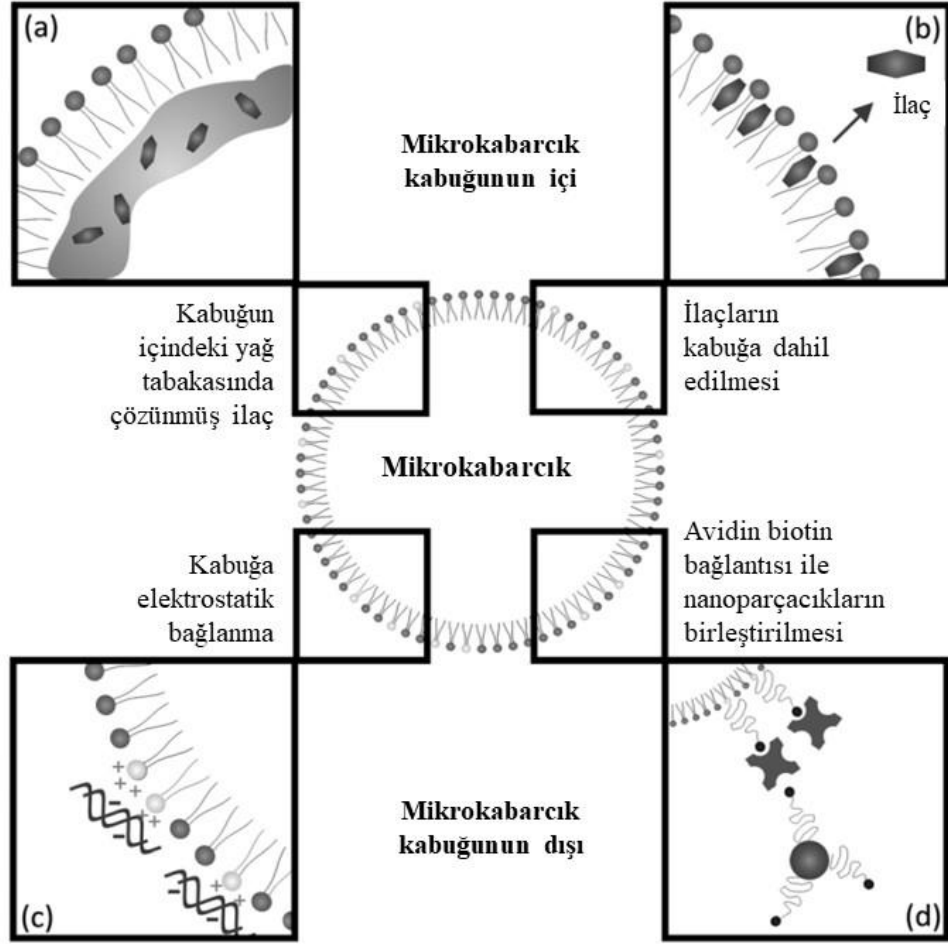


Şekil 18. Mikrokabarcık yapısının şematik gösterimi. (Sirsi ve Borden, 2009'dan uyarlanmıştır)

Mikrokabarcıklar, genellikle 0,5 ile 10 μm arasında değişen çaplara sahip gaz dolu mikro kabarcıklardan oluşan ultrases kontrast ajanları uzun yıllardır klinikte kullanılmaktadırlar. Bu ajanlar, ultrases görüntüleme sırasında hedeflenen hedef bölgeler için

hassasiyeti ve görüntü kontrastını arttırabilmektedirler. Mikrokabarcıklar kontrast ajanı olmalarının dışında ilaç ve nükleik asit (mRNA, siRNA vs) taşınması için de kullanılmaktadırlar. Mikrokabarcıklara hapsedilen ilaç ve benzeri ajanlar, mikrokabarcıkların ultrases uygulanmasıyla patlatılması sonucunda istenilen bölgede serbestleşmektedirler. Bu sayede hem ilaçlar hedeflenen bölgede salınmış olur (hedefli terapi) hem de varsa ilacın yan etkileri (kemoterapi ilaçları vb.) sınırlandırılabilir. Mikrokabarcıklarla birlikte kullanılan ultrases uygulamasının, hedef ilaçların tümörlere ulaştırılması için yeni ve umut verici bir strateji olduğu gösterilmiştir (Chowdhury ve diğerleri, 2017; Kooiman ve diğerleri, 2014).

Mikrokabarcıkların kabukları, mikrokabarcığın fizyolojik ortamda çözünmesini önlemek ve gaz difüzyonunu engellemek amacıyla gereklidir. Kabuklarının özelliklerine bağlı olarak, mikrokabarcıklar yumuşak kabuklu ve sert kabuklu mikrokabarcıklar olarak sınıflandırılabilir. Yumuşak kabuklu mikrokabarcıkların kabuğu genellikle fosfolipitlerden oluşur ve birkaç nanometre kalınlığındadır. Esnek fosfolipit yapısı, mikrokabarcıkların ultrases dalgalarının sıkıştırma ve seyrekleşme aşamalarına kolayca cevap vermesine olanak tanır. Öte yandan, sert kabuklu mikrokabarcıklar daha kalın ve daha sert polimer veya protein kaplamalara sahiptir ve salınımı daha zor ama daha dengelidir. Fosfolipit kabuklu mikrokabarcıkların kullanımı çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Fosfolipitlerden oluşan kabuk, uzun ve doymuş yağ asidi zincirleri kullanılarak yapışkan bir tek tabaka oluşturur, bu da stabiliteyi korurken ultrasesle oluşan salınımların uyumlu olmasını sağlamaktadır. Ayrıca, fosfolipitler kolayca işlevlendirilebilir ve hedefe yönelik ve ilaç yüklü mikrokabarcık üretimini mümkün kılmaktadır. Mikrokabarcıkların kan dolaşımında daha uzun süre kalmasını sağlamak için genellikle polietilen glikol (PEG) zincirleri mikrokabarcık kabuğuna dahil edilir. Bu PEG zincirleri, sterik engel sağlayarak mikrokabarcıkların birleşmesini önler ve retikülo-endotel sistemi (RES) tarafından temizlenmelerine neden olan kan bileşenleriyle etkileşimlerden korur. Mikrokabarcıklar genellikle 0,5 ila 10 µm arasında değişen boyutlara sahiptir. Bu boyut, dolaşım için uygun ajanlar haline gelmelerini sağlayacak kadar büyük olup damar dışına çıkmalarını (ekstravazasyon) engeller. Küçük mikrokabarcıkların stabilitesi daha düşüktür, çünkü daha yüksek bir Laplace basıncına sahiptirler. Ayrıca, bu boyut aralığındaki mikrokabarcıklar, tıbbi ultrases görüntülemesi için kullanılan transdüserlerin rezonans frekansı olan 1-10 MHz aralığında bir rezonans frekansına sahiptirler. Rezonans frekansı, mikrokabarcık salınımlarının maksimum olduğu frekansı ifade etmektedir (Köken, E. C. 2020).



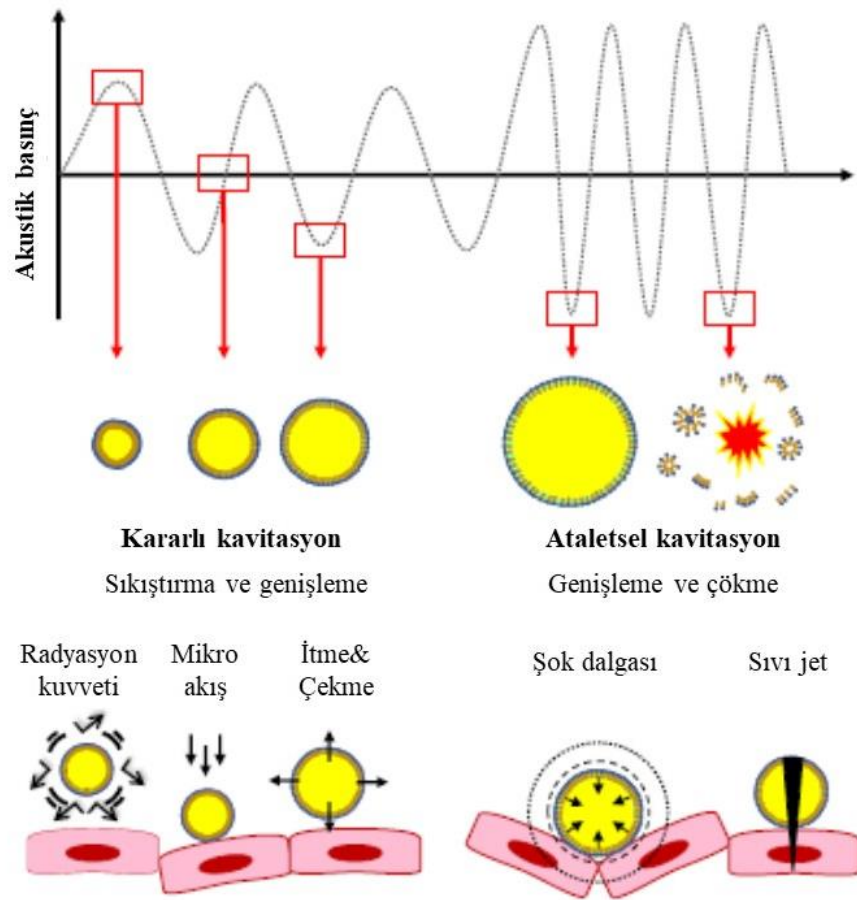
Şekil 19. Mikrokabarcıklarda olası ilaç kargo alanlarının şematik gösterimi. (Lentacker ve diğerleri, 2009'dan uyarlanmıştır)

Distearoylphosphatidylcholine (DSPC), transfeksiyon ve ilaç verme uygulamaları için lipozomların hazırlanmasında kullanılan bir zwitteriyonik fosfolipittir. DSPC, bioproseslerde daha fazla etkinlik sağlayan kapsülleme verimliliğini ve lipozom stabilitesini artırma işlevi görmektedir. DSPC içeren lipopoliplekslerin, diğer fosfolipid bazlı sistemlere kıyasla daha az sitotoksisiteye ve dolayısıyla daha fazla hücre canlılığına sahip olduğu bulunmuştur.

Uygun ilaç dağıtım teknolojisinin geliştirilmesi, hastalık yönetiminde önem kazanmaktadır. Her ilaç, kontrollü salım ve optimal olarak hedefleme yoluyla etkinliği optimize eden ve yan etkileri (örn., antikanser ajanları) en aza indiren kendine özgü dağıtım sistemine ihtiyaç duymaktadır. Miseller, dendrimerler, veziküller, mikrokabarcıklar,

emülsiyonlar ve diğer moleküler veya kendi kendine bir araya gelen sistemler dahil olmak üzere birçok dağıtım sistemi, kırılğan biyopolimerlerin (örneğin peptitler, proteinler ve plazmitler) verilmesini sağlamaya yardımcı olmak için tasarlanmıştır (Krafft ve Riess, 2007).

2.7.1. Mikrokabarcık ve Ultrases Etkileşimi



Şekil 20. Ultrasesin mikrokabarcıklar üzerindeki fiziksel etkileri ve mikrokabarcıkların endotel üzerindeki biyofiziksel etkileri. (Wischhusen ve Padilla, 2019'dan uyarlanmıştır)

Şekil 20 incelendiğinde düşük akustik basınçlarda, mikrokabarcıklar (MB) doğrusal olarak salınır ve basınç dalgasıyla orantılı olarak sıkıştırma ve genişlemeye maruz kalmaktadırlar. Yüksek akustik basınçlarda, MB'ler doğrusal olmayan bir şekilde salınmaktadırlar: sıkıştırdıklarından daha hızlı genişlemektedirler ve çökene kadar büyümeye

devam ederler. Kararlı bir şekilde kavitasyona uğrayan MB'ler bitişik endotele kuvvet uygulamaktadırlar: MB'ler akustik radyasyon kuvveti tarafından hücre bariyerine itilebilmekte, MB'lerin etrafındaki mikro akış etkileri hücre zarlarına çarpmakta ve MB salınımı hücreleri itmekte ve çekmektedir. Ataletsel olarak kavitasyon yapan MB'lerin hücreler üzerinde daha da güçlü etkileri vardır: şok dalgaları hücre bağlantılarını bozmakta ve sıvı jetleri hücreleri delmektedir (Wischhusen ve Padilla, 2019).

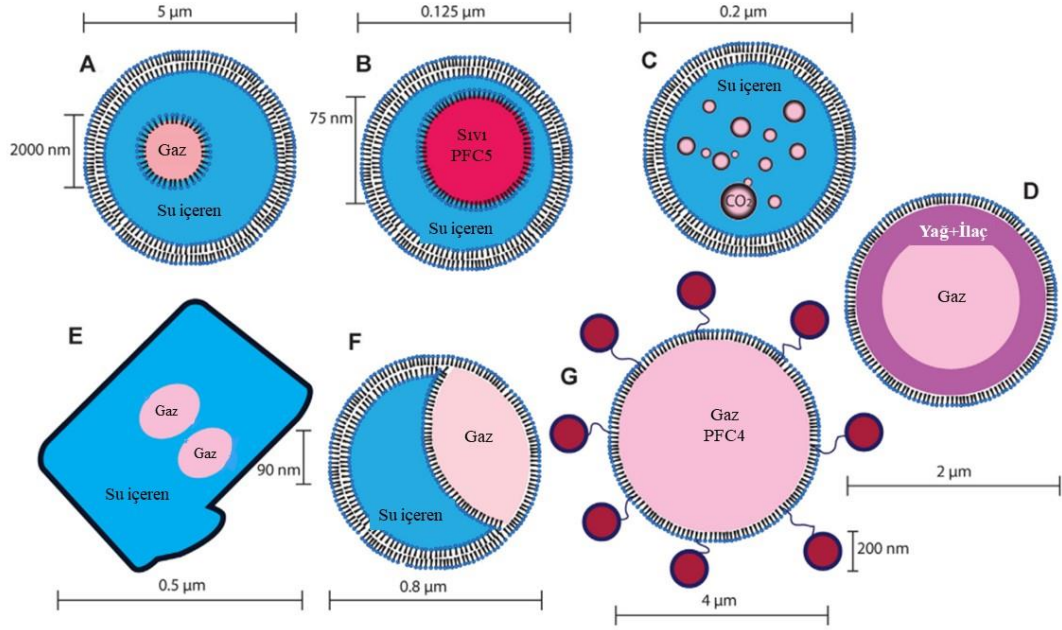
Yüksek yoğunluklu ultrasese maruz kalma altında, MB'lerin salınım genliği her döngüde artmakta ve sonuçta MB'nin çökmesine neden olmaktadır. Çökme üzerine, MB'ler birkaç küçük MB'ye parçalanmakta ve bu da ataletsel kavitasyon oluşturmaktadır. Çöken MB'ler, yüzeyleri parçalayan ve gözeneklere neden olan yüksek kesme gerilimleri ve şok dalgaları uygulamaktadır. Hücre zarları ile temas halindeki MB'ler, sıvı jet oluşumuyla sonuçlanan asimetrik çökmeye maruz kalmaktadırlar. Şok dalgaları ve sıvı jetleri sadece bitişik hücre zarlarını delmekle kalmamakta, aynı zamanda kan damarlarını geçecek enerjiye de sahip olmaktadır. Basınç, maruz kalma süresi ve darbe tekrarlamaya sıklığı gibi ultrases ayarları, daha büyük ilaçların veya ilaç taşıyıcılarının verilmesini etkileyen indüklenmiş gözeneklerin boyutunu belirlemektedir. Ultrases hedefli mikrokabarcık imhası (UTMD) aracılı zar gözenek oluşumu, DNA endositik alım yolunda bozunabileceği için gen terapisi için önemli olan sitosolik dağıtımına izin vermektedir. Kararlı kavitasyon için açıklanan biyofiziksel etkilere ek olarak, ataletsel kavitasyon, membran perforasyonuna ve damar geçirgenliğine neden olan sert mekanik ve kimyasal saldırıları tetiklemektedir. Ataletsel kavitasyon, etkileri daha uzun mesafelerde etki ettiğinden, MB'ler hücre yüzeyleriyle doğrudan etkileşime girmediğinde bile ilaç dağıtımını arttırmaktadırlar. Kararlı kavitasyona kıyasla, ataletsel kavitasyon, yüzlerce nanometreden birkaç mikrometreye kadar değişen daha büyük boyutlarda zar gözeneklerini indüklemektedir (Wischhusen ve Padilla, 2019).

Hem kararlı hem de eylemsiz kavitasyonun, daha büyük ilaçların (150-500 kDa) endositoz aracılı alımını tetiklediği, daha küçük ilaçların (4-70 kDa) ise gözenekler yoluyla hücrelere girdiği gösterilmiştir. Kavitasyon sonrası endositozu tetikleyen mekanizma tam olarak anlaşılamamış olsa da, mikro akış ve akustik akışın plazma zarını deforme ettiği, hücre iskeletini yeniden düzenlediği ve mekanik sensörleri etkinleştirdiği ve tüm bu süreçlerin katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (Wischhusen ve Padilla, 2019).

Ultrases hedefli mikrokabarcık imhası, nükleik asitlerden proteinlere ve kemoterapilere kadar değişen ilaçların verilmesi için uygulanmaktadır. Kan-beyin bariyerinin aşılması ve sistemik uygulama yoluyla tedaviyi engelleyen dış etkenlere karşı doğal olarak iyi korunan

merkezi sinir sisteminde hedeflenen ilaç dağıtımı için yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Ultrases hedefli mikrokabarcık imhası ile tetiklenen ilaç dağıtımı, beyin, karaciğer, pankreas, meme ve yumurtalık kanserleri dahil olmak üzere farklı kanser türlerinin klinik öncesi modellerinde daha fazla incelenmiştir. Sonokemoterapi, kemoterapinin ultrases aracılı olarak verilmesini tanımlar ve klinik öncesi araştırmalar, ultrases hedefli mikrokabarcık imhasının tümör içi ilaç konsantrasyonlarında artışa yol açtığı zaman pozitif tedavi sonuçları göstermiştir. Ultrases hedefli mikrokabarcık imhası aracılı ilaç salımının ayrıca kalp, dalak, karaciğer, akciğer ve böbrek gibi sağlıklı dokularda ilaç birikimini azalttığı kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, ultrases hedefli mikrokabarcık imhası tümör perfüzyonunu etkileyebilir, çünkü güçlü kavitasyon sadece kan damarı geçirgenliğine değil, aynı zamanda hasara da neden olur ve bu ultrases hedefli mikrokabarcık imhası ilaç dağıtımını engelleyen vasküler kapanmaya neden olabilmektedir. Bu nedenle, optimum ilaç verme etkinliği elde etmek için kavitasyon lokalizasyonunun ve dozunun kontrolü gereklidir (Wischhusen ve Padilla, 2019).

Ultrases ayrıca, kanser immünoterapisini etkinleştirmek için tümör antijeni kodlayan ve dendritik hücre uyarıcı mRNA gibi immünomodülatör ajanların in vitro iletimi için kullanılmaktadır. Dahası, ultrases aracılı kavitasyonun, hücre altı seviyede doku hasarını tetiklediği ve böylece bağışıklık tepkilerini ortaya çıkaran farklı tehlike sinyalleri saldıgı gösterilmiştir. Farklı araştırmalar, kavitasyonun dendritik hücrelerin, aktive sitotoksik T hücrelerinin ve Natural Killer hücrelerinin tümör dokusuna penetrasyonunu sağladığını göstermiştir. Ayrıca, tümör antijenlerini ve yardımcı uyarıcı faktörleri kodlayan immünomodülatör moleküllerin veya genlerin iletimini kolaylaştırmak için ultrases hedefli mikrokabarcık imhası uygulanan araştırmalar mevcuttur. İlaçsız mekanik ultrasesin, tümör büyümesini azalttığı ve deri altı katı tümörlere ve kan beyin bariyerini geçerek immün hücre infiltrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ultrases ayarlarına ve doku özelliklerine bağlı olan doku yıkım derecesinin, ortaya çıkan biyolojik yanıtlara katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Wischhusen ve Padilla, 2019).



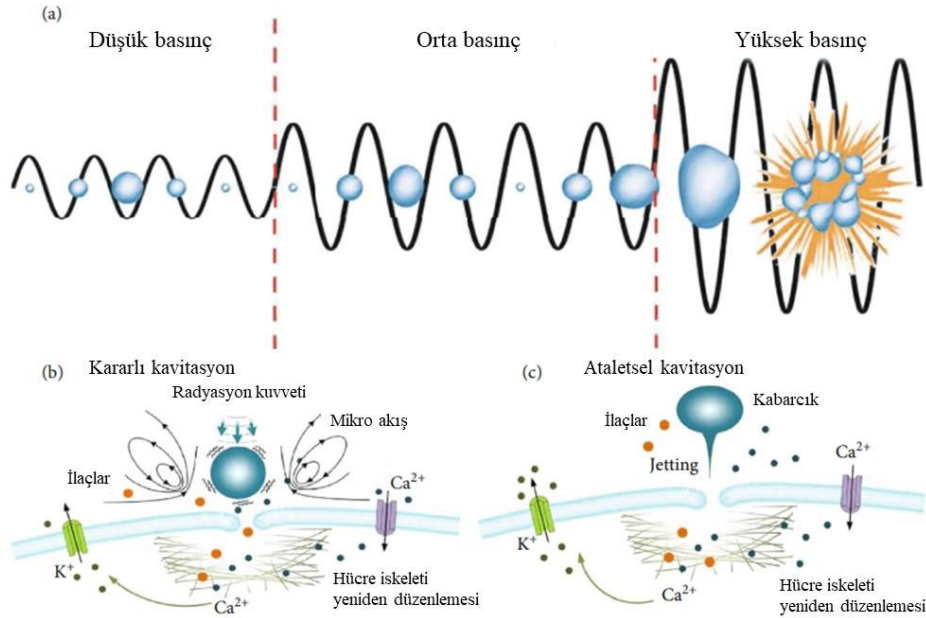
Şekil 21. Literatürde bildirilen akustik açıdan hassas lipozomların bazılarını göstermektedir. (Husseini ve diğerleri, 2014'den uyarlanmıştır)

Şekil 21 incelendiğinde ise farklı içerik ve kabuk formuna sahip lipozomlar ve bu lipozomların boyutları görülmektedir.

2.7.2. Sonoporasyon

Geçtiğimiz birkaç on yılda bilim topluluğu, kontrollü dozaj salınımı, artırılmış dağıtım verimliliği, gelişmiş biyouyumluluk ve kolay erişilebilirlik ile gen veya ilaçları hastaların vücudunun belirli bölgelerine iletmek için gelişmiş bir yaklaşım olarak “akıllı ilaç dağıtımının” gerçekleştirilmesinde büyük ilerlemeye tanık olmuştur. Bu konuda, ultrasesle aktive olan mekanik kuvvet, seçilen bölgelere uzaysal-zamansal olarak kontrol edilebilir ilaç dağıtımını gerçekleştirmek için en umut verici stratejilerden biri olarak kabul edilmiştir. Bu yaklaşım genellikle, gaz kütlelerinin dinamik aktivitesine atfedilen akustik kavitasyonu indüklemek için terapi hedefine vücut dışından ultrases göndererek çalışmaktadır. Buna karşılık, kavitasyon kabarcıkları ve canlı hücreler arasındaki etkileşimler, ekzojen gen/ilaç

moleküllerinin hücrelere alınmasını kolaylaştırmak için hücre zarı bütünlüğünün geçici olarak bozulması ile karakterize edilen "sonoporasyon" denilen olayı tetiklemektedir. Sonoporasyonun normal biyolojik dokularda ve kan damarlarında nadiren meydana geldiğine dikkat çekmek gerekir, çünkü gazlı kaviteasyon çekirdekleri insan vücudunda nadiren doğal olarak bulunur. Sonoporasyonun başlatılmasını kolaylaştırmak için, sentetik mikrokabarcıklar (yani, ultrases görüntülemeye kontrast ajanları olarak kullanılanlarla aynı olanlar) genellikle insan vücuduna intravenöz enjeksiyon yoluyla dolaşıma verilmektedir. Bu mikrokabarcıklar genellikle ince bir stabilizasyon kaplaması (örneğin lipid, albümin veya polimer) ile kapsüllenmiş gazla doldurulmuş bir çekirdek (örneğin perflorokarbon) içermektedir, bu sayede pulmoner kılcal damardan geçebilmeleri için ortalama boyutu 1 ile 8 μm arasındadır. Sentetik mikrokabarcıkların mevcudiyetinin akustik enerji emilimini etkili bir şekilde artıracak ve kaviteasyon eşiğini düşürecek, böylece kaviteasyonun neden olduğu biyolojik etkilerin büyüklüğünü artıracak kabul edilmiştir. Buna göre, hem in vitro hem de in vivo gen/ilaç dağıtım araştırmalarına, biyobelirteç ekstraksiyonuna, kanser terapisine dayalı olarak çeşitli terapötik uygulamalar geliştirilmiştir (Tu ve Yu, 2022).



Şekil 22. Mikrokabarcıklar tarafından üretilen sonoporasyon sırasında meydana gelen başlıca biyofiziksel etkilerin şematik genel görünümü. (Tu ve Yu, 2022'den uyarlanmıştır)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Hassas terazi (Denver Instruments, SI-234, Germany), +4⁰C Buz dolabı (Bosch, KDN56NW20N, Germany) ve -80⁰C Buz dolabı (MELING, China), Buz makinesi (Scotsman AF80, Italy), Distile su cihazı (Nuve, ND12, Turkey), Otoklav (HMC Hirayama, Japan), pH metre (HANNA Instruments, USA), Sonikatör (Bandelin Ultrasonic HD2200, Germany), Soğutmalı santrifüj (Hettich zentrifugen MIKRO 200r, Germany), Masaüstü santrifüj (Isolab, MCZ001267, Germany), Vorteks (Yellowline IKA TTS2, USA), Isı bloğu (Thermo Mixer, TS100, Turkey), Spektrofotometre (Epoch, Biotek, USA), Çalkalayıcı-Shaker (Shaker, Hangzhou miu instruments TS-300, China), Manyetik karıştırıcı (Nüve, MK 318, Turkey), Western Blot Seti (Biorad Mini PROTEAN Tetra Cell, 552BR, USA), Mikropipet seti (Clever Scientific, UK), Görüntüleme cihazı (G:Box Syngene, DR4V/1309, UK), Sıcak Su Banyosu, İnvert mikroskop, Termocuple, Steril Kabin, Karbondioksit İnkübatör, Plate Reader, Muse Cell Analyzer, Opcav, DLS, Olympus BX-50 Floresan Mikroskop (Olympus BX-50, Olympus Optical Co., Tokyo, Japonya), Amalgamator, Rotary Evaporator, BTL 5710 Ultrases Cihazı (BTL, CZ)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

RIPA Lizis Tamponu 10X (EMD Millipore, 20-188, Germany), Proteaz İnhibitör Kokteyli (BioVision, USA, K297), Bca Assay KIT (ABY Bioscience, P010A, USA), Tris-Base (Sigma Life Science, T1503, USA), Glisin (Sigma-Aldrich, 15527, China), Metanol (Merck), Sodyum Klorür (Sigma Life Science, S3014, Germany), Sodyum Dodesil Sülfat (Multicell, 800-100-EG, USA), Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379, France), 2-Merkaptoetanol (Biotech, UN2966, USA), Amonyum persülfat (Sigma Life Science, A3678, Japan),

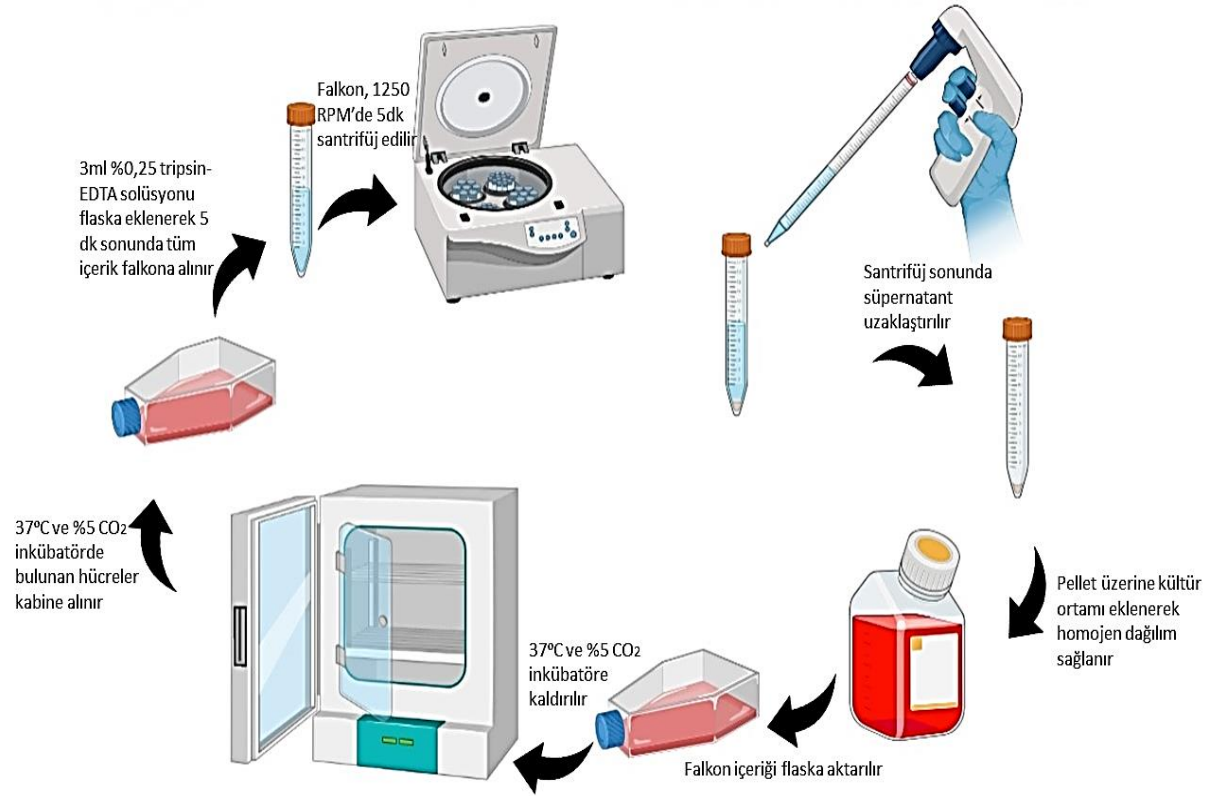
Akrilamid (Sigma Life Science, A3553, China), Bisakrilamid, TEMED (Sigma Life Science, T9281, China), Loading Dye-SDS-Page (Pagesta, 5x SDS-PAGE sample buffer, 751-00, Korea), Yağsız Süt Tozu (Evka), Filtre Kağıdı-Whatman Kağıdı (Cytiva, 1001-125, China), PVDF-Nitroselüloz promixed membran (Merck Millipore,), Protein Marker (GeneDirex-BLUeye Prestained Protein Ladder, PM007-0500, USA), Bcl-2 mouse monoklonal antikor (Santa Cruz, bsm-3304M, USA), Bax mouse monoklonal antikor (Santa Cruz, bsm-33283M, USA), Parkin mouse monoklonal antikor (Santa Cruz, 4211S, Netherlands), Beta-Tubulin mouse monoklonal antikor (Bioss, sc-47778, USA), Anti-mouse IgG HRP-linked antikor (Cell Signaling, 7076S, Netherlands), Hsp70 mouse monoklonal antikor (ddddd), ECL (Clarity Western ECL Substrate Biorad, 170-5060, USA), Chlorin e6 trisodium salt (Scientific, Logan, UT, ABD), Pifithrin- μ , Quercetine, Crystal Violet, 18:0 PC (DSPC) (Avanti Lipids Inc, Alabaster, AL, ABD), C₃F₈ (Meran Tıp Ürünleri Ltd. Şti., İstanbul, TR), Glycerol (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, ABD), Propylene Glycol (Sigma-Aldrich, Diegem, Belçika), Kloroform (Sigma-Aldrich, Diegem, Belçika), RPMI 1640 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD), FBS (Sigma-Aldrich, Diegem, Belçika), Penisilin- Streptozosin (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD), Trypsin –% 0,5 EDTA (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD), PBS-10X, w/o Ca⁺⁺,Mg⁺⁺(Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD), L- Glutamine (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD), Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit (Millipore; Merck KgaA., Burlington, MA, ABD), Muse® Caspase 3/7 Assay Kit (Millipore; Merck KgaA., Burlington, MA, ABD), Muse® Oxidative Stress Kit (Millipore; Merck KgaA., Burlington, MA, ABD), Muse® Mitopotential Assay Kit (Millipore; Merck KgaA., Burlington, MA, ABD), MTT (Sigma-Aldrich, Diegem, Belçika), Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Hattının Temini, Ekimi, Çoğaltılması ve Deney Protokolüne Uygun Hazırlanılması

%10 (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), %1 (v/v) Penisilin Streptomisin ve %1 L- glutamin içeren Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) kültür ortamı

hazırlanmıştır ve +4°C’de saklanmıştır. -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiş olan, Litvanya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sinir Bilimleri Enstitüsü Biyofizik ve Biyoinformatik Laboratuvarından temin edilmiş MKN28 mide kanseri hücre hattı araştırmada kullanılmak üzere 37°C su banyosunda 1-2 dakika bekletilmiştir. Ardından kriyotüp içeriği 15ml’lik falkon tüpe 6ml 37°C ısıya ulaşmış kültür ortamıyla birlikte aktarılmıştır. Falkon tüp 1250 rpm’de oda sıcaklığında 5dk santrifüj edilmiştir. Falkon tüp içerisindeki süpernatant uzaklaştırılıp pellet 37°C ısıya ulaşmış 14ml kültür ortamı ile resüspanse edilerek 75cm²’lik kültür flaskına ekimi yapılmıştır. Hücreler, 37°C sıcaklıkta nemlendirilmiş ve %5 CO₂ içeren inkübatörlerde tutulmuştur. Bu koşullar altında çoğalması ve tutunması beklenen adherent hücrelerin kültür ortamı haftada 2-3 kez değiştirilmiştir. Hücreler %80 konfluent duruma ulaştıkça pasajlanmıştır ve deney düzeneği kurmak için hücrelerin en az 4 kez pasajlanması beklenmiştir. Deney düzeneğini oluşturmak için %80 konfluent duruma ulaşan flask kültür ortamı uzaklaştırılıp 3ml %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu flaska eklenerek 5 dk 37°C sıcaklıkta nemlendirilmiş ve %5 CO₂ içeren inkübatörde adherent hücrelerin plastik yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. 5dk inkübasyon sonunda 3ml flask içeriği tripsini inaktif hale getirmek için 12ml phosphate buffered saline (PBS) ile birlikte 15ml’lik falkon tüpe aktarılmış ve 1250 rpm’de oda sıcaklığında 5dk santrifüj edilmiştir. Falkon tüp içerisindeki süpernatant uzaklaştırılıp pellet 37°C ısıya ulaşmış 10ml RPMI 1640 ile resüspanse edilerek Thoma lamında sayılmıştır. 35mm’lik petrilerde 100000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 4 günlük deney düzeneği sonunda analizlerin protokolleri uygulanmıştır. Hücre kültürü aşamaları Şekil 23’te özetlenmiştir.



Şekil 23. Hücre kültürü aşamaları şematize hali

3.2.2. Kimyasalların Hazırlanması

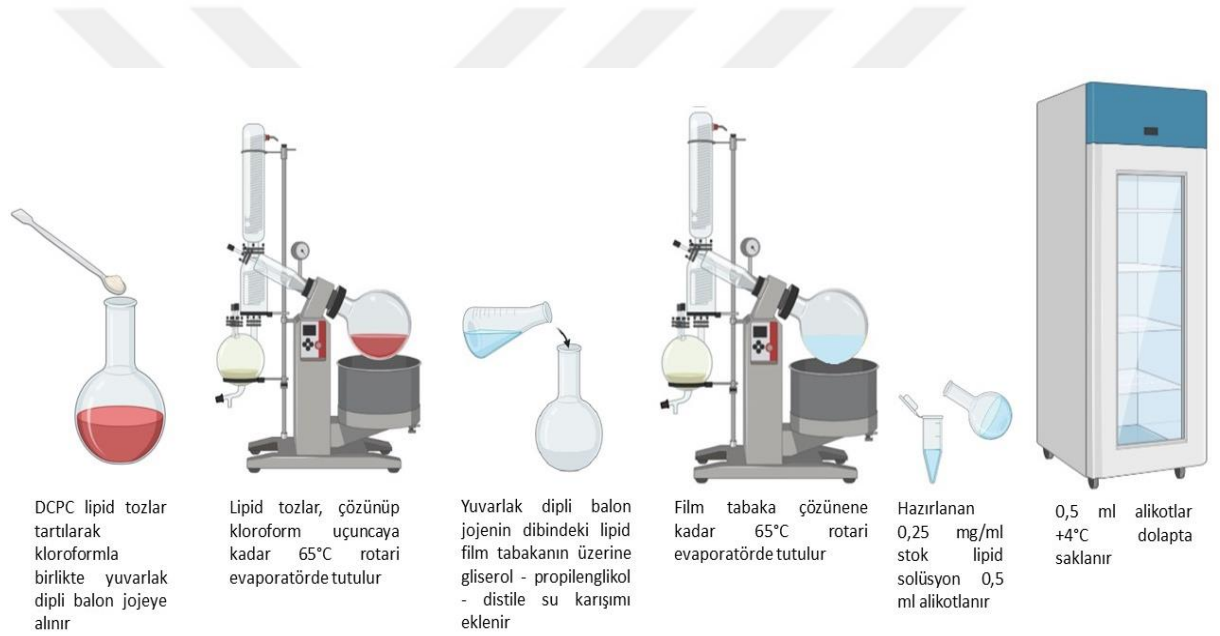
5mg pifithrin- μ 2,76ml dimethyl sulfoxide (DMSO) ile çözündürülerek 10mM ana stok elde edilmiştir. Ana stok 10mM pifithrin- μ , 500 μ l alikotlar halinde -20°C derin dondurucuya kaldırılmıştır. Doz belirlemede kullanılacak olan pifithrin- μ hazırlamak için ana stok PBS ile seyreltilmiştir. (5 μ M Pi- μ = 0,9ng/ml Pi- μ)

3,3mg chlorin e6 trisodyum salt 10ml fosfat tamponu (PBS) ile çözündürülerek 500 μ M ana stok elde edilmiştir. Ana stok 500 μ M chlorin e6 trisodyum salt, 1500 μ l alikotlar halinde -20°C derin dondurucuya kaldırılmıştır. Doz belirlemede kullanılacak olan chlorin e6 trisodyum salt hazırlamak için ana stok PBS ile seyreltilmiştir. (5 μ M Ce6 = 3,3ng/ml Ce6)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) ile çözündürülerek 10mM ana stok olarak elde edilmiş quercetin, 500 μ l alikotlar halinde -20°C derin dondurucuya kaldırılmıştır. Doz belirlemede kullanılacak olan quercetin hazırlamak için ana stok PBS ile seyreltilmiştir.

3.2.3. Mikrokabarcık Üretimi

1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DCPC) içeren mikrokabarcıklar üretmek için uygun miktarda lipid tartılarak yuvarlak dipli balon jojede kloroform yardımıyla çözündürülmüştür. Kloroformda çözünmüş halde bulunan DCPC lipidlerin yuvarlak dipli balon jojenin dibinde bir film tabakası haline dönüşmesi için 65°C'ye getirilmiş rotari evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yuvarlak dipli balon jojenin dibindeki lipid film tabakanın 1:2:7 oranında gliserol-propilenglikol-distile su karışımında 65°C rotari evaporatörde barak görünüm elde edilinceye kadar çözünmesi sağlanmıştır. Tüm işlemler sonunda 0,25 mg/ml lipid konsantrasyonuna sahip stok solüsyon elde edilmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. Mikrokabarcık üretim aşamaları şematize hali

Hazırlanan stok lipid solüsyon 0,5 ml'lik alikotlar halinde +4°C dolapta saklanmıştır. 1,5 ml kapaklı ependorf tüplerde bulunan lipid stok solüsyon alikotlarına, son molarite 200µM olacak şekilde klorin e6 stok solüsyondan eklenmiştir ve ependorfun kalan boş kısmı C₃F₈ gazı ve atmosfer karışımıyla doldurulmuştur. Tüm bu aşamalardan sonra tüpler orbital olarak çalkalayan karıştırıcıda 4000 devir/dk'da 20 saniye çalkalanarak mikrokabarcıkların elde edilmesi sağlanmıştır.

3.2.4. Dinamik Işık Saçılımı Cihazı ile Mikrokabarcık Boyut Analizi

Boş mikrokabarcıklar ve klorin e6 yüklenmiş mikrokabarcıklardan 50µl alınıp 1ml PBS içerisinde seyreltilerek ölçüm numuneleri hazırlanmıştır. Ve hazırlanan nihai konsantrasyondan en az üçer kez ölçümler alınarak analizler yapılmıştır.

3.2.5. Görüntü İşleme Yöntemi ile Mikrokabarcık Boyut Analizi

Orbital olarak çalkalayan karıştırıcıda 4000 devir/dk'da 20 saniye çalkalanarak elde edilmiş mikrokabarcıklardan 50µl alınıp 1ml PBS içerisinde seyreltilerek Thoma lamına alınmış ve mililitredeki mikrokabarcık miktarları tespit edilmiştir.

Mikrokabarcıkların boyut dağılımlarının belirlenebilmesi için Thoma lamına alınan mikrokabarcıkların görüntüleri ImageJ programı yardımıyla parçacık boyut analizi hesaplama yöntemi kullanılarak analiz edilmiş ve mikrokabarcık boyut dağılımları belirlenmiştir.

3.2.6. Ultrases Kaviteasyon Analizi

Ultrases kaviteasyon analizi için OPCAV Ultrasonic Cavitation Meter Ver 1.1 cihazı kullanılmıştır. Hücreler ile probe arası kontak; 8cm uzunlukta bir tüp içerisine konan distile su ile sağlanmış olduğundan kaviteasyon ölçümleri distile su bitim noktasından, distile su bitim noktasına yerleştirilmiş içerisinde kültür ortamı bulunan 35mm petri tabanından ve kültür ortamına boş mikrokabarcık ile klorin taşıyan mikrokabarcık ayrı zamanlarda eklenerek yapılmıştır. Kaviteasyon ölçümü boyunca BTL 5710 ultrases cihazı %20 pulse, 3W/cm² güç yoğunluğu ve 1MHz taşıyıcı frekansa ayarlanmıştır.

3.2.7. Ultrases Aracılı Mikrokabarcık Yıkımı

Ultrases cihazı olarak BTL 5710 Sono çift frekanslı ultrases terapi cihazı (BTL CZ) kullanılmıştır. 1MHz taşıyıcı frekans ve 3 W/cm² güç yoğunluğu sabit olmak şartıyla farklı

Çalışma dlerinde farklı sürelerle hücreler ultrasese maruz bırakılmışlardır (şekil 25). Ultrases probu, ekimi 35mm petrilere yapılmış hücrelere uygulanmıştır. Hücreler ile probe arası kontak; 8cm uzunlukta bir tp içerisine konan distile su ile sağlanmıştır. Ultrases uygulaması boyunca petrillerdeki kültür ortamlarının sıcaklık değişimi termokupl ile ölçülmüştür.



şekil 25. Ultrases uygulama düzeneğinin şematize hali

3.2.8. Spektroskopik Yöntemler ile Mikrokabarcık İi Klorin Tayini

Farklı molaritelerde hazırlanan klorin e6 zelteleri UV-Visible Spektroskopisinde 295nm-895nm aralığında dalgaboyuna karşılık optik yoğunluğu verisi olarak okutulmuş ve her bir ölçüm yapılan küvetin fotoğrafı çekilmiştir.

İnvert floresan mikroskopta klorin e6 yüklü mikrokabarcıkların önce ışıktaki görüntüleri alınmıştır daha sonra rhod filtresindeki görüntüleri alınmıştır ve bu iki görüntü Image-J programı ile birleştirilmiştir.

3.2.9. Deney Grupları ve Şematize Hali

Gruplar oluşturulurken 35mm'lik petrilere ekilecek hücre sayısını belirlemek için ön denemeler yapılmıştır ve 100.000 hücre ekilmesinin uygun olduğuna karar verilmiştir. - 80°C'den çıkarılıp ekimi yapılan MKN28 hücre hattından deney düzeneği kurmak için hücrelerin en az 4 kez pasajlanması beklenmiştir. Uygun düzeyde çoğalma evresine girmiş hücreler 35mm petri kaplara 100.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ekimi takip eden ilk gün pifithrin- μ (pi- μ) uygulanacak gruplara daha önceden denemeleri yapıp uygun olduğu belirlenmiş molar konsantrasyon olan 5 μ M olacak şekilde DMSO'da çözünmüş ve PBS ile seyreltilmiş pi- μ eklenmiştir. Ekimi takip eden 3.günde tüm grupların besiyerleri yenilenmiştir ve ardından ultrases (ult) uygulanacak gruplara daha önceden denemeleri yapıp uygun olduğu belirlenmiş süre ve puls olan 3W/cm², %20 puls ve 30saniye us uygulanmıştır. Ayrıca ekimi takip eden 3.günde klorin e6 yüklü mikrokabarcık ((ce6)mb) uygulanacak gruplara her bir hücreye en az 1 (ce6)mb denk gelecek şekilde hesapları yapılmış miktarda (ce6)mb ve bu miktar (ce6)mb içerisinde 5 μ M klorin e6 yüklenmiş olması sağlanmıştır. Özetle;

Kontrol (Kntrl) grubu: 100.000 hücre 35mm petriye ekilmiştir. Ekimi takip eden 1. ve 3. günde besiyeri değiştirilmiştir. Ekimi takip eden 4. Günde uygulanacak analiz yönteminin prosedürü uygulanmıştır.

Pifithrin- μ (Pi- μ) uygulanan grup: 100.000 hücre 35mm petriye ekilmiştir. Ekimi takip eden 1. günde besiyeri değiştirilmiştir ve yeni besiyerine 5 μ M pifithrin- μ eklenmiştir. Ekimi takip eden 3. günde besiyeri değiştirilmiştir. Ekimi takip eden 4. günde uygulanacak analiz yönteminin prosedürü uygulanmıştır.

Klorin e6 yüklü mikrokabarcık ((Ce6)Mb) uygulanan grup: 100.000 hücre 35mm petriye ekilmiştir. Ekimi takip eden 1. günde besiyeri değiştirilmiştir. Ekimi takip eden 3. günde besiyeri değiştirilmiş ve yeni besiyerine 5 μ M klorin e6 yüklü mikrokabarcık eklenmiştir. Ekimi takip eden 4. günde uygulanacak analiz yönteminin prosedürü uygulanmıştır.

Ultrases (Ult) uygulanan grup: 100.000 hücre 35mm petriye ekilmiştir. Ekimi takip eden 1. ve 3. günde besiyeri değiştirilmiştir. Yeni besiyeri eklenmiş petrilere 3W/cm², %20 puls ve 30saniye ultrases uygulanmıştır. Ekimi takip eden 4. günde uygulanacak analiz yönteminin prosedürü uygulanmıştır.

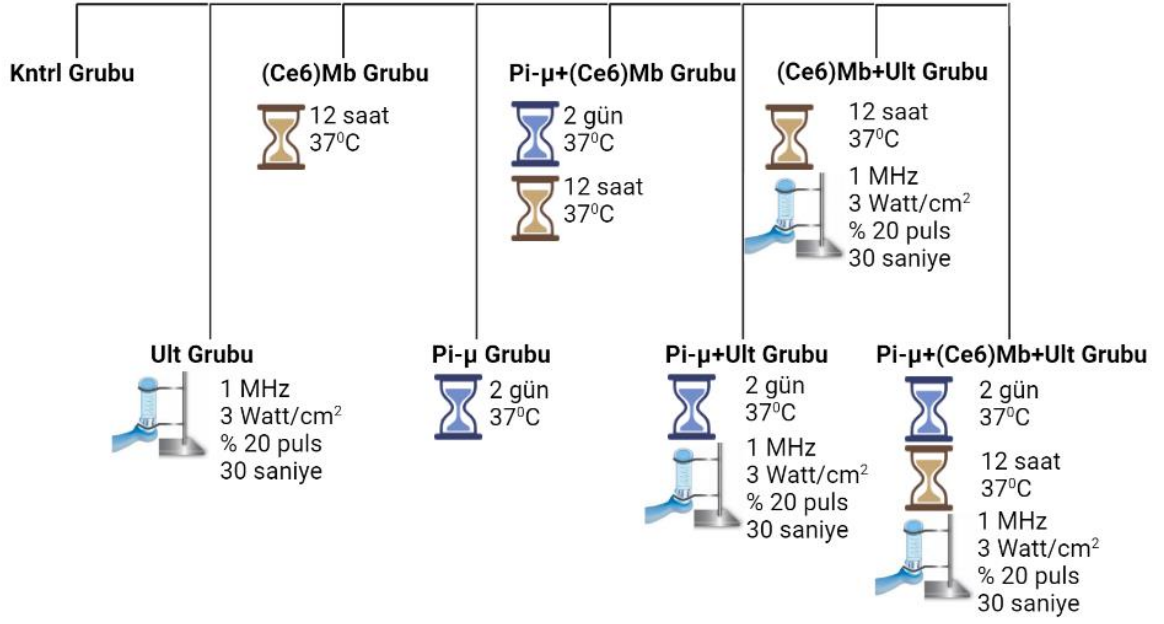
Pifithrin- μ ve klorin e6 yüklü mikrokabarcık (Pi- μ +(Ce6)Mb) uygulanan grup: 100.000 hücre 35mm petriye ekilmiştir. Ekimi takip eden 1. günde besi yeri değiştirilmiştir ve yeni besi yerine 5 μ M pifithrin- μ eklenmiştir. Ekimi takip eden 3. günde besi yeri değiştirilmiştir ve yeni besi yerine 5 μ M klorin e6 yüklü mikrokabarcık eklenmiştir. Ekimi takip eden 4. günde uygulanacak analiz yönteminin prosedürü uygulanmıştır.

Pifithrin- μ ve ultrases (Pi- μ +Ult) uygulanan grup: 100.000 hücre 35mm petriye ekilmiştir. Ekimi takip eden 1. günde besi yeri değiştirilmiştir ve yeni besi yerine 5 μ M pifithrin- μ eklenmiştir. Ekimi takip eden 3. günde besi yeri değiştirilmiştir ve yeni besi yeri eklenmiş petrilere 3W/cm², %20 puls ve 30saniye ultrases uygulanmıştır. Ekimi takip eden 4. günde uygulanacak analiz yönteminin prosedürü uygulanmıştır.

Klorin e6 yüklü mikrokabarcık ve ultrases ((Ce6)Mb+Ult) uygulanan grup: 100.000 hücre 35mm petriye ekilmiştir. Ekimi takip eden 1. günde besi yeri değiştirilmiştir. Ekimi takip eden 3. günde besi yeri değiştirilmiş ve yeni besi yerine 5 μ M klorin e6 yüklü mikrokabarcık eklenmiştir. Klorin e6 yüklü mikrokabarcık bulunan petrilere 3W/cm², %20 puls ve 30saniye ultrases uygulanmıştır. Ekimi takip eden 4. Günde uygulanacak analiz yönteminin prosedürü uygulanmıştır.

Pifithrin- μ , klorin e6 yüklü mikrokabarcık ve ultrases (Pi- μ +(Ce6)Mb+Ult) uygulanan grup: 100.000 hücre 35mm petriye ekilmiştir. Ekimi takip eden 1. günde besi yeri değiştirilmiştir ve yeni besi yerine 5 μ M pifithrin- μ eklenmiştir. Ekimi takip eden 3. günde besi yeri değiştirilmiş ve yeni besi yerine 5 μ M klorin e6 yüklü mikrokabarcık eklenmiştir. Klorin e6 yüklü mikrokabarcık bulunan petrilere 3W/cm², %20 puls ve 30saniye ultrases uygulanmıştır. Ekimi takip eden 4. Günde uygulanacak analiz yönteminin prosedürü uygulanmıştır.

Deney gruplarının şematize hali Şekil 26'de verilmiştir.



Şekil 26. Deney gruplarının şematize hali

3.2.10. Hücre Canlılığı Analizi

Deney grupları arasındaki hücre canlılığı farklılıklarının belirlenmesi için iki yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerden birisi ile canlı hücreler boyanıp tek tek sayılarak istatistiksel analiz yapılırken diğer yöntem ile hücre metabolik aktiviteleri kolorimetrik olarak elde edilen nicel veriler karşılaştırılarak istatistiksel analiz yapılmıştır.

Kristal viyole boyaması; Uygulamaların ardından, MKN28 hücrelerinin canlılığını değerlendirmek için hücrelere kristal viyole boyaması protokolü uygulanmıştır. Deney protokolünü takiben 35mm petriler buz üzerine yerleştirilmiştir. Soğuk 1X PBS ile iki kez yıkanmıştır. Hücreleri sabitlemek için hücrelerin üzerine yüzeyi kaplayana kadar soğuk metanol (-20°C'de saklanmış) eklenmiştir ve 10 dakika beklenmiştir. Petrilerden metanol uzaklaştırılmıştır ve petriler buzdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra sabitlenmiş hücrelerin üzerine yüzeyi kaplayana kadar %0,5 kristal viyole solüsyonu (%25 metanolde yapılmış ve oda sıcaklığında saklanmış) eklenmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kristal viyole solüsyonu bir behere boşaltılmıştır (tekrar kullanılabilir). Petriler, durulamada artık renk çıkmayınca kadar ddH₂O ile dikkatlice durulanmıştır. Petrilerin oda sıcaklığında

kuruması beklenilmiştir (gece boyunca). Her deney grubundaki hücreler ImageJ yardımıyla sayılmış ve kontrol grubu hücre sayısı verisiyle karşılaştırılarak hücre yüzdesi hesaplanmıştır.

Canlı hücre yüzdesi (%) = Deney grubundaki hücre sayısı/Kontrol grubundaki hücre sayısı x %100 (Li ve diğerleri, 2018)

Ölü hücre yüzdesi (%) = 100-(Deney grubundaki hücre sayısı/Kontrol grubundaki hücre sayısı x %100)

Metabolik tetrazolyum tuzu tayini; Kantitatif kolorimetrik bir yöntem olan metabolik tetrazolyum tuzu (MTT) tayini Mosmann tarafından 1983 yılında geliştirilmiştir. Test, ölü hücreleri değil, canlı hücreleri saptamaktadır ve üretilen sinyal hücrelerin aktivasyon derecesine bağlı olmaktadır. Bu nedenle bu yöntem sitotoksiste, proliferasyon veya aktivasyonu ölçmekte kullanılmaktadır (Mosmann, 1983). Bu özellikler göz önünde bulundurularak deney grupları arasında sitotoksik açıdan uygulamaların fark gösterip göstermediğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

MTT ile hücre canlılığının bir göstergesi olarak kullanılabilinen metabolik tetrazolyum tuzu formazan kristallerine indirgenmiştir. Oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO) yardımıyla homojen bir çözelti haline getirilmiştir. Daha sonra bu homojen çözeltilerin absorbansları plate reader yardımıyla 570 nm'de ölçülmüştür. Oluşan renk bağlı olarak, canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olarak daha büyük absorbans değerleri vermiştir.

MTT protokolünü MKN28 hücre hattına uyarlamak adına hücrenin MTT ile farklı inkübasyon süreleri ve formazan kristallerinin DMSO'da çözünmesi için farklı süreler denenerek optimum süreler belirlenmiştir.

3.2.11. Hoechst Boyama ile Apoptotik Yapıların İncelenmesi

Hücre çekirdeğindeki DNA'ya bağlanan floresan bir boya olan Hoechst 33258 ile boyanan hücrelerde erken apoptozdaki hücre çekirdekleri kontrollerden daha parlak görünmektedirler (Archana ve diğerleri, 2013). Bu ayırım göz önünde bulundurularak Hoechst boyama ile preapoptotik hücrelerin deney grupları arasında fark gösterip göstermediğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Deney protokolü sonunda hücreler PBS ile yıkanmış ve tüm gruplarda apoptotik hücreler değerlendirilmek için Hoechst 33258 boyası ile 10 mg/ml konsantrasyondaki stok

Çözeltiden 5  g/ml son konsantrasyon olacak şekilde 35mm petrilere eklenerek 37 C inkübatörde 15 dakika inkübe edilmiştir. Boyanın hücreyle inkübasyonunu takiben hücreler invert floresan mikroskobu kullanılarak gözlemlenmiştir ve elde edilen floresan mikroskop görüntüleri kaydedilmiştir. Hoechst boyama sonucu kaydedilen görüntülerde homojen olarak mavi boyanan hücreler canlı, içerisinde apoptotik cisimlerin varlığından kaynaklı parlak mavi odaklar görünen hücreler preapoptotik hücreler olarak değerlendirilmek üzere ImageJ programı yardımıyla analiz edilmiştir.

3.2.12. Western Blot Yöntemi ile Apoptotik Belirteçlerin İncelenmesi

Western blot yöntemi ilk olarak 1979 yılında, Towbin ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Bu yöntem, hücre ve doku protein ekstraktlarının elektroforez yöntemi ile ayrılmasını ve ardından membranlara transfer edilmesini içermektedir. Daha sonra, membranlar özgül antikörler kullanılarak hedef proteinlerin tespit edilmesi için işlenmektedir. Sonucunda elde edilen veriler özgül antikörler kullanılarak işaretlenen hedef protein ekspresyon miktarlarının karşılaştırmalı olarak incelenebildiği bir yöntemdir (Towbin ve diğerleri, 1979). Bu yöntem ile deney grupları arasında işaretlenen protein miktarları açısından farklılık gösterip göstermediğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

3.2.12.1. Hücrelerden Protein İzolasyonu

- Deney protokolü sonunda 35mm petrilerdeki kültür ortamları 15ml'lik falkonlara aktarılmıştır.
- Her bir petriye 1ml %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 5 dakika 37 C sıcaklıkta nemlendirilmiş ve %5 CO₂ içeren inkübatörde adherent hücrelerin plastik yüzeyden ayrılması sağlanmıştır.
- 5dk inkübasyon sonunda 1ml petri içeriği tripsini inaktif hale getirmek için 2ml phosphate buffered saline (PBS) ile birlikte 15ml'lik falkon tüpe aktarılmış.

- 4000 rpm’de oda sıcaklığında 5dk santrifüj edilen falkon tüp içerisindeki süpernatant uzaklaştırılıp pellet 37⁰C ısıya ulaşmış 1ml PBS ile resüspanse edilerek falkon tüp içeriği 1,5ml eppendorf tüplere aktarılmıştır.
- Eppendorflar 4000 rpm +4⁰C’de tekrar santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmış ve her bir eppendorftaki pellet üzerine % 1 proteaz inhibitör kokteyli içeren RIPA tampon stoğundan 200 µl (5 x 10⁶ hücre başına 1 ml) eklenen pelletler pipetaj yapılarak homojenliği sağlanmıştır.
- Elde edilen hücre lizatları -80⁰C’ 20 dakika dondurulduktan sonra buz üzerinde 10 saniye ultrasonikatöre maruz bırakılmıştır (Resim 1) ve bu işlem 4 kez tekrarlanmıştır.
- Hücre lizatları +4⁰C’ de, 14000 rpm’ de 25 dk. boyunca santrifüj edilmiş ve supernatantlar temiz eppendorf tüplere aktarılmıştır.
- Örnekler dondurma-çözme işlemine maruz kalmaması için eşit hacimlerde olacak şekilde tüplere paylaştırılmış ve -80⁰C’de muhafaza edilmiştir.



Resim 1. Ultrasonikatör cihazı ile hücre lizatı elde edilmesi

3.2.12.2. Bikinkoninik Asit (BCA) ile Protein Miktarı Tayini

Kolorimetrik protein tayin yöntemlerinden biri olan bikinkoninik asit (BCA) yöntemi, ilk olarak Smith ve arkadaşları tarafından 1985 yılında keşfedilmiştir (Smith ve diğerleri, 1985). Bu yöntem, proteinlerin bakır iyonlarıyla kompleks oluşturarak renk değişimi göstermesi prensibine dayanmaktadır. Spektrofotometre kullanılarak 562nm dalgaboyundaki absorbansları ölçülen örneklerin protein miktarları, standartlardan alınan absorbanslar yardımıyla çizdirilen grafikler kullanılarak tayin edilmektedir.

Protein tayininin yapılabilmesi için belirli miktarlarda artan konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır (Tablo 6). Ardından örnekler 1:5 oranında distile su ile (dH₂O) seyreltilmiştir (Tablo 7).

Tablo 6. BCA protein miktarı tayini yöntemi için hazırlanan standart tablosu

Sıra	dH ₂ O (µl)	BSA miktarı (µl)	Final BSA Konsantrasyonu (µg/µl)
A	0	300 Stok	2000
B	125	375 Stok	1500
C	325	325 Stok	1000
D	175	B'den 175	750
E	325	C'den 325	500
F	325	E'den 325	250
G	325	F'den 325	125
H	400	G'den 100	25
I	400	0	0 = Blank

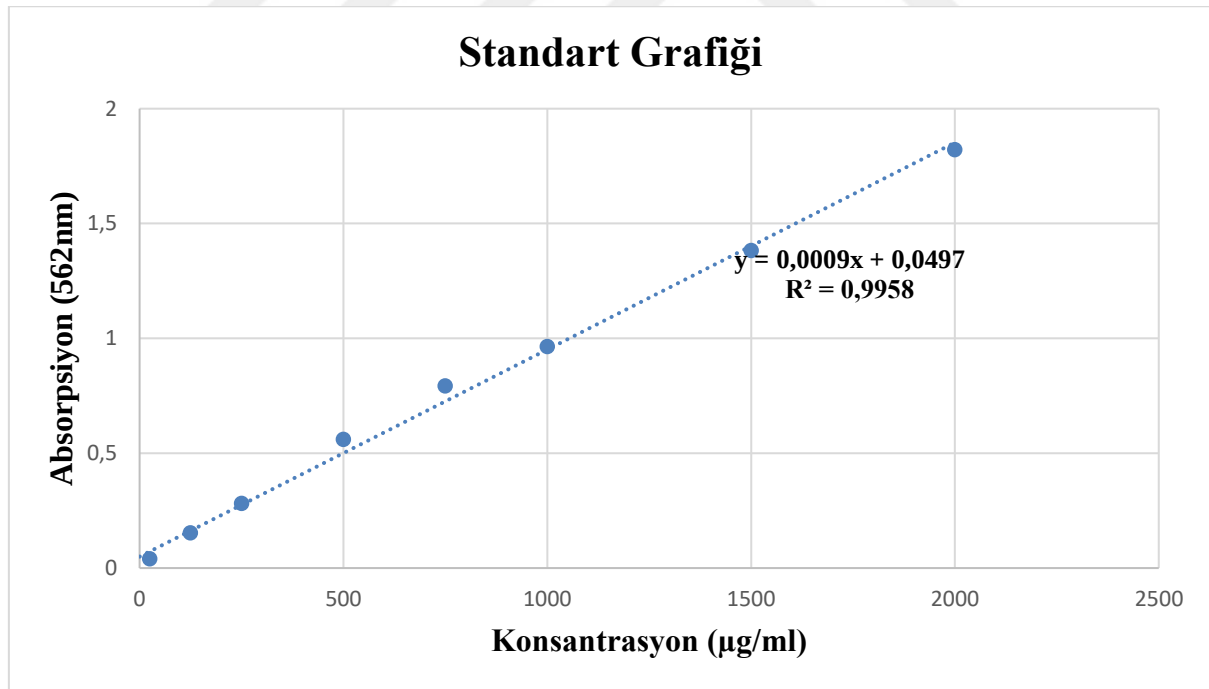
Tablo 7. BCA protein miktarı tayini yöntemi için 1:5 oranında örneklerin seyreltilmesi

Gruplar	Protein (µl)	dH₂O (µl)
Kntrl	5	20
Pi-µ	5	20
(Ce6)Mb	5	20
Ult	5	20
Pi-µ+(Ce6)Mb	5	20
Pi-µ+Ult	5	20
(Ce6)Mb+Ult	5	20
Pi-µ+(Ce6)Mb+Ult	5	20

Spektrofotometrede yapılacak ölçümler için hazırlanan örnek ve standartlar 96'lık well plate kuyucuklarına well plate yükleme planına uyarak (Tablo 8) iki tekrarlı olacak şekilde 10 µl hacimde yüklenmiştir ve her bir kuyucuğa 200 µl çalışma solüsyonundan eklenmiştir. Well plate'in kapağı kapatılıp alüminyum folyo ile sarılarak karanlık ortamda 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda ölçümler alınmış ve okunan değerler için hesaplamalar yapılmıştır. Alınan ortalama değerlerden blank verisi çıkarılmıştır. Excel programında standart değerleri ve konsantrasyon değerleri için dağılım grafiği çizdirilmiştir (Şekil 27). Grafikte elde edilen denklemde örneklerin ortalama absorbans değerleri “y” bilinmeyenine yazılarak, her bir örnek için “x” konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen “x” konsantrasyon değerleri her bir örneğin 1ml'de ne kadar protein içerdiğini gösteren bir veri olduğu için doğru orantı kullanılarak her bir kuyuya örneklerden kaç µl yüklenirse konsantrasyonu 50µg/ml protein içermiş olur şekilde tekrar hesaplanmıştır ve örnekler 1:5 oranında seyreltildiği için elde edilen hacim verisi 5'e bölünmüştür. Elde edilen son hacimler örneklerden alınıp kuyulara yüklendiğinde her bir örnek 50µg/ml protein içermiş olacaktır.

Tablo 8. BCA protein miktarı tayini yöntemi ile hazırlanan örnekler ve standartların well plate'e yükleme planı.

A	Kntrl	Pi-μ	(Ce6)Mb	Ult	Pi-μ+(Ce6)Mb	Pi-μ+Ult	(Ce6)Mb+Ult	Pi-μ+(Ce6)Mb+Ult	
	1	1	1	1	1	1	1	1	
B	Kntrl	Pi-μ	(Ce6)Mb	Ult	Pi-μ+(Ce6)Mb	Pi-μ+Ult	(Ce6)Mb+Ult	Pi-μ+(Ce6)Mb+Ult	
	1	1	1	1	1	1	1	1	
C	Kntrl	Pi-μ	(Ce6)Mb	Ult	Pi-μ+(Ce6)Mb	Pi-μ+Ult	(Ce6)Mb+Ult	Pi-μ+(Ce6)Mb+Ult	
	2	2	2	2	2	2	2	2	
D	Kntrl	Pi-μ	(Ce6)Mb	Ult	Pi-μ+(Ce6)Mb	Pi-μ+Ult	(Ce6)Mb+Ult	Pi-μ+(Ce6)Mb+Ult	
	2	2	2	2	2	2	2	2	
E	Std A	Std B	Std C	Std D	Std E	Std F	Std G	Std H	Blank
F	Std A	Std B	Std C	Std D	Std E	Std F	Std G	Std H	Blank



Şekil 27. Protein tayini sonucunda elde edilen standart grafiği.

3.2.12.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

SDS-PAGE jel elektroforezi için kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışı şu şekildedir:

TBS (Tris-Buffered Salline)

1 LT için : 6.05 gr Tris-HCl }
 8.76 gr NaCl } 500 ml dH₂O ile çözülmüştür ve 1 lt'ye tamamlanmıştır.

- Elde edilen çözelti son pH değeri asidik olduğunda NaOH ile bazik olduğunda HCl ile **pH: 7,6** olacak şekilde ayarlanmıştır.

YIKAMA TAMPONU

TBS+0,1% Tween 20

100 ml TBS +100 ul Tween 20

1000 ml TBS +1 ml Tween 20

TRANSFER TAMPONU

3.03 gr Tris-Base

14.4 gr Glycine

200 ml Methanol

2 ml 10% SDS

500 ml dH₂O ile çözülmüştür ve 1 lt'ye tamamlanmıştır.

%10 SDS

100 ml içine 10 gr SDS

10X YÜRÜTME TAMPONU

30.3 gr Tris-Base

144 gr Glycine

10 gr SDS

500 ml dH₂O ile çözülmüştür ve 1 lt'ye tamamlanmıştır.

1X YÜRÜTME TAMPONU

900 ml dH₂O + 100 ml 10X Running Buffer

BLOKLAMA SOLÜSYONU

5% Skim Milk (Süt Tozu) + TBS

100 ml ye 5 gr Süt Tozu

STRİP TAMPONU

%2 SDS

62.5 mM Tris pH:6.7

100 mM β -merkaptoethanol

- 200 ml (%10 SDS), 62.5 ml (1 M Tris pH:6.7) (β -merkaptoethanolsüz) dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanmıştır.
- Her strip aşamasında 50 ml stripping buffer içerisine 350 μ l β -merkaptoethanol eklenerek kullanılmıştır.

3.2.12.4. SDS-PAGE Jel Elektroforezinde Kullanılan Ayırıcı ve Toplayıcı Jelin Hazırlanışı

SDS-PAGE jel elektroforezinde kullanılan ayırıcı ve toplayıcı jelin içerikleri şöyledir:

Toplayıcı Jel (%4): a) 5,4 dH₂O

b) 1 ml Akrilamid/Bis

c) 0,945 ml 1M Tris, pH:6,8

d) 180 μ l SDS

e) 75 μ l APS

f) 9 μ l TEMED

Ayırıcı Jel (%12):

a) 3 ml dH₂O

b) 4 ml Akrilamid/Bis

c) 3 ml 1,5M Tris, pH:8,8

d) 120 μ l SDS

e) 50 μ l APS

f) 6 μ l TEMED

Ayırıcı jel, elektroforez düzeneğindeki cam levhalar arasına döküldükten sonra jelin yüzeyinin pürüzsüz olması için üzerine 300 µl isopropanol uygulanmıştır. İsoopropanol, ayırıcı jel donduktan sonra filtre kağıdıyla uzaklaştırılmış ve ardından toplayıcı jel eklenmiştir. Toplayıcı jelin dökülmesinin ardından 10 kuyucuklu 1 mm'lik elektroforez targaı toplayıcı jele yerleştirilerek donması beklenmiştir (Resim 2). Donma işlemi tamamlandıktan sonra, jeller cam levhalarla birlikte yürütme tankına yerleştirilmiş ve tanka yeterli miktarda running buffer (1X) eklenerek bir gece boyunca +4°C'de bekletilmiştir. Örneklerin yürümesine hazır hale gelen jellerdeki taraklar dikkatlice çıkarılmış ve sistem örneklerin yüklenmesine hazır hale getirilmiştir.

Bütün işlemler eldiven giyilerek yapılmıştır. Kullanılacak cam ve diğer malzemeler işlemler öncesinde steril edilmiştir. TEMED ve amonyum persülfat polimerizasyonu başlattıkları için en son eklenmiştir.



Resim 2. SDS-PAGE jellerinin cam levhalar arasında dondurulması.

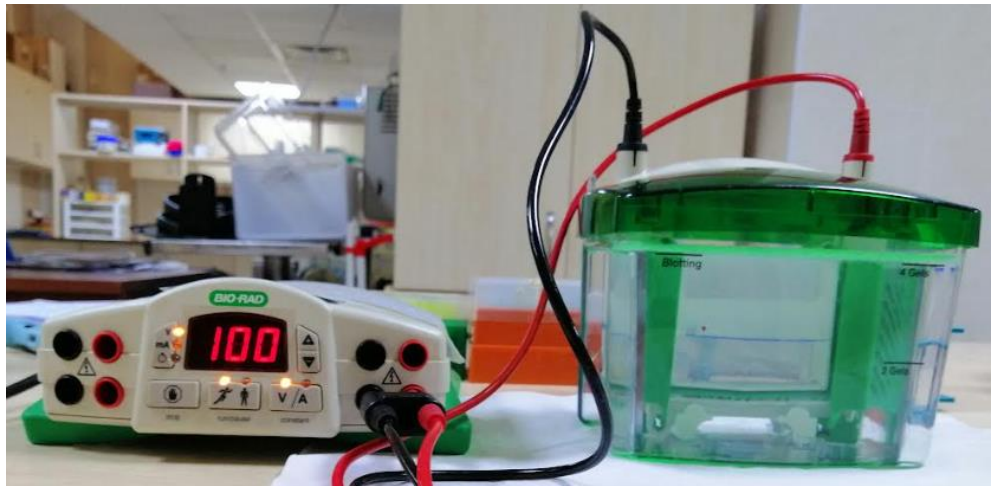
3.2.12.5. SDS-PAGE Jel Elektroforezinde Örneklerin Hazırlanması ve Jele Yüklmesi

Önceden BCA protein miktarı tayini yöntemi ile jele yüklenecek miktarları hesaplanan örnekler -80°C'den çıkarılmıştır ve yükleme öncesinde her bir örneğe 6 µl yükleme tamponu (Pagesta, 5x SDS-PAGE sample buffer, 751-00, Korea) eklenerek 10 sn vortekslenmiş ve

95°C'de 5 dk süreyle proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır (Resim 3). Denatürasyon sonrası örnekler tekrar vortekslenerek jele yüklenecek hale getirilmiştir. İlk kuyucuğa 5 µl protein marker (Blueye Prestained Protein Ladder, PM007-0500, USA) ve diğer kuyucuklara örnekler, grup sırasıyla yüklenmiştir. Elektroforez güç kaynağı 90 V'da çalışmaya başlatılmış ve yükleme tamponu alt sınıra gelene kadar (1,5-2 saat) örnekler yürütülmüştür (Resim 4).



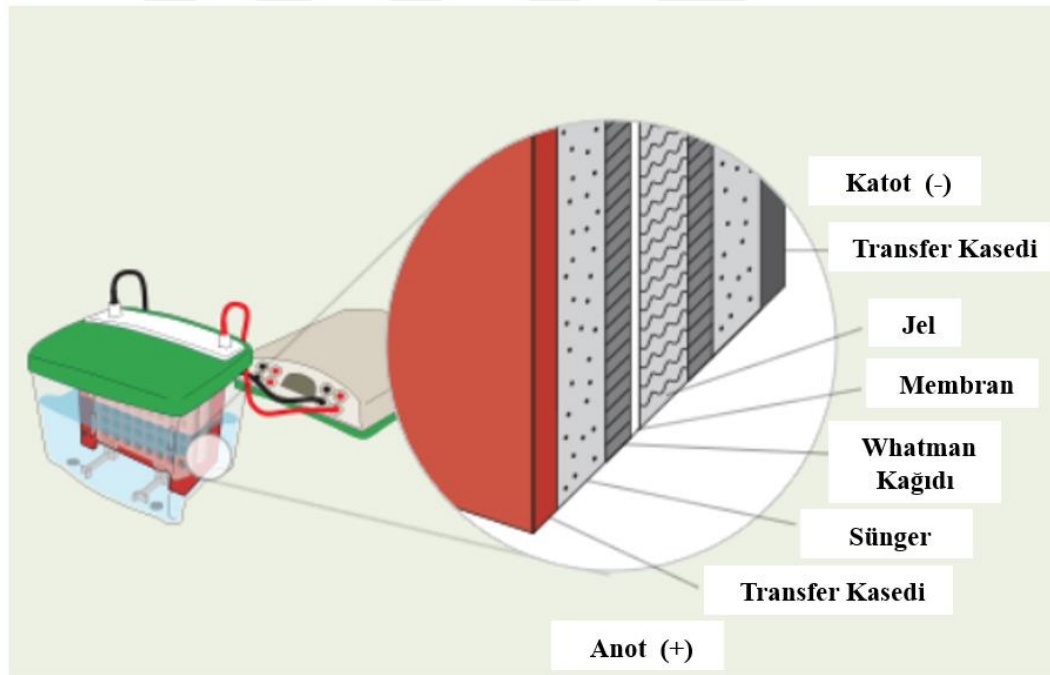
Resim 3. Protein denatürasyonunda kullanılan ısı bloğu.



Resim 4. SDS-PAGE Elektroforez sisteminde örneklerin yürütülmesi.

3.2.12.6. SDS-PAGE Jelin Membrana Transfer Edilmesi, Blotlama

Jelde ayrıştıran proteinlerin PVDF-nitroselüloz membrana transferinin gerçekleştirilebilmesi için transfer sandviçi hazırlanmıştır. Transfer tamponu içerisinde transfer sandviçinin hazırlanması için transfer kasedinin siyah yüzü altta kalacak şekilde yerleştirilmiştir ve sırasıyla üzerine sünger, whatman kağıdı (filtre kağıdı), jel, %100 metanolde 5 dk bekletilerek aktifleşmesi sağlanan PVDF-nitroselüloz membran, whatman kağıdı (Cytiva 1001-125, China) ve sünger yerleştirilmiştir (Şekil 28) ve bu aşamaların her birinde rulo aparatı kullanılarak hava kabarcığı oluşumu engellenmiştir. İçerisinde transfer sanviçi bulunan transfer kaseti “+” ve “-” kontakları kontrol edilerek tank içerisine yerleştirilmiştir. Tankın içerisine transfer tamponu ve buz aküsü eklenmiştir, +4°C’de, 70V’da, 2 saat transfer işlemi gerçekleştirilmiştir (Resim 5).



Şekil 28. Bloklama için transfer sandviçinin hazırlanması (Bio-rad).



Resim 5. Jelden membrana bloklama aşaması.

3.2.12.7. Membranın Primer ve Sekonder Antikor ile Muamele Edilmesi ve Görüntüleme

Jelden PVDF-nitroselüloz membrana transfer işlemi gerçekleştirildikten sonra (Resim 6) bloklama kabına alınan membran taze hazırlanmış 10 ml bloklama solüsyonu ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloklanmıştır. Bloklama süresinin ardından membran, 1:1000 konsantrasyonda primer antikor ile gece boyunca çalkalayıcı üzerinde 4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında membran yıkama tamponu (TBST) ile 5 dakika boyunca 3 kez çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Ardından membran üzerine taze bloklama solüsyonu hazırlanarak anti-mouse IgG, HRP-linked sekonder antikor (1:5000) ilave edilmiştir ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda membran tekrar yıkama tamponu ile 10 dakika boyunca 3 kez çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra membran 2 dakika boyunca 500 µl ECL solüsyonunda bekletilmiş ve western blot görüntüleme cihazı (G:Box Syngene, DR4V/1309, UK) kullanılarak görüntülenmiştir (Resim 7). Görüntüleme işleminden sonrası membran, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında strip solüsyonu içinde inkübe edilmiştir. Strip işleminden sonra membran, üç kez 5 dakika boyunca yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Tekrar bloklama solüsyonu içinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilen membran, β -Tubulin (1:5000) ya da başka bir primer antikor (1:1000) ile gece boyunca inkübe edilerek adımlar tekrarlanmıştır. Elde edilen bant görüntüleri, ImageJ (NIH, USA) programı ile analiz edilmiş ve miktarları

belirlenmiştir. Bantlar, her grup için β -Tubulin' e göre normalize edilmiş ve kat değışiklikleri hesaplanmıştır.



Resim 6. Transfer sonrası membran görüntüsü



Resim 7. G:Box görüntüleme cihazı.

Western Blot protokolü özetle aşağıdaki adımlarla gerçekleştirilmiştir:

- Örnekler, 50 μ g protein içeren toplam 30 μ l hacimde olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için 5x yükleme tamponundan 6 μ l ve örnek+lizat tamponundan (protein konsantrasyonuna göre 24 μ l) alınmıştır. Tüm malzemeler dondurucudan çıkarıldıktan sonra kısa bir süre santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Örnekler, her bir kuyuda 50 μ g protein ve toplamda 30

µl hacimde olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için 5x yükleme tamponundan 6 µl ve örnek + lizat tamponundan protein konsantrasyonlarına göre 24 µl örnek, 0.2 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. Tüm malzemeler dondurucudan çıkarıldıktan sonra kısa bir süre santrifüjlenmiştir.

- Tüpler, 5 dakika boyunca 95°C'de inkübe edilmiştir.
- Ardından jel kuyucuklarına marker (5 µl) ve örnekler (30 µl) yüklenerek, 1.5 saat boyunca 90 V'de elektroforez yapılmıştır.
- Örneklerin elektroforezi tamamlandıktan sonra, transfer tamponu içinde transfer sandviçi hazırlanmıştır (sünger, Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger) ve transfer tankında +4°C'de 2 saat boyunca 70 V'de transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Transfer işleminden sonra membran, bloklama solüsyonunda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Bloklama süresinin ardından membran, 1:1000 konsantrasyonda primer antikor ile gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir.
- Daha sonra membran, yıkama tamponu ile 3 kez 5 dakika boyunca yıkanmıştır.
- Yıkama işleminden sonra membran, bloklama solüsyonu içinde 1:5000 konsantrasyonda sekonder antikor ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında muamele edilmiştir.
- Tekrar yıkama tamponu ile 3 kez 10 dakika boyunca yıkanan membran, 1 ml ECL ile 2 dakika boyunca işlem görmüş ve görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.
- Görüntüleme sonrasında membran, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında strip solüsyonu içinde inkübe edilmiştir.
- Strip işleminden sonra membran, üç kez 5 dakika boyunca yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
- Tekrar bloklama solüsyonu içinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilen membran, β-Tubulin (1:5000) ya da başka bir primer antikor (1:1000) ile gece boyunca muamele edilerek adımlar tekrarlanmıştır.

- Elde edilen bant görüntüleri, ImageJ (NIH, USA) programı ile analiz edilmiş ve miktarları belirlenmiştir. Bantlar, her grup için β -Tubulin' e göre normalize edilmiş ve kat değişiklikleri hesaplanmıştır.

3.2.13. Caspase 3-7 Analizi

Kaspazlar, proapoptotik sinyallere yanıt olarak programlanmış hücre ölümü (apoptoz) sürecini ilerletmede merkezi bir rol oynayan sistein proteazlardır. Bazı kaspazlar birincil olarak hücre içi olay kaskadını başlatmak için hareket ederken, efektör kaspazlar olarak adlandırılan diğer kaspazlar, yapısal proteinlerin (Kaspaz-3 ve Kaspaz-7) bölünmesi yoluyla ve doğrudan hücresel parçalanmayı etkiler. Kaspaz-3/7'nin aktivasyonu bu nedenle apoptozun bir belirteci olarak nitelendirilebilir. Muse® Caspase-3/7 Kiti (Millipore; Merck KGaA., Burlington, MA, ABD), kaspazların aktivitesine, yani ölü hücre boyasıyla (7AAD) kombinasyon halindeki Kaspaz-3/7 aktivitesine dayalı olarak apoptozun çeşitli aşamalarındaki hücrelerin sayısını ve yüzdesini aynı anda belirlemektedir. Bu işaretleyiciler göz önünde bulundurulduğunda dört hücre popülasyonu ayırt edilmiştir:

- (LL) Canlı hücreler: Kaspaz-3/7(–) ve 7-AAD(–)
- (LR) Kaspaz-3/7 aktivitesi sergileyen apoptotik hücreler: Kaspaz-3/7 (+) ve 7-AAD(–)
- (UR) Geç Apoptotik/Ölü hücreler: Kaspaz-3/7(+) ve 7-AAD(+)
- (UL) Nekrotik hücreler: Kaspaz-3/7(–) ve 7-AAD(+)

Muse® Caspase-3/7 Kiti deney gruplarına uygulanırken kit içeriğindeki protokole tabi kalınmıştır. Hazırlanan örnekler Muse Cell Analyzer (Muse™ Cell Analyzer; Millipore, Burlington, MA, ABD) cihazı ile analiz edilmiştir.

3.2.14. Annexin V ve Ölü Hücre Analizi

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, hücre büyümesinin ve çoğalmasının önemli ve aktif düzenleyici bir yolağı olarak bilinmektedir. Hücreler, karakteristik fizyolojik değişikliklerle sonuçlanan hücre içi süreçleri başlatarak belirli indüksiyon sinyallerine yanıt vermektedir. Bunlar arasında, fosfatidilserinin (PS) hücre yüzeyine dışsallaştırılması, spesifik hücresel proteinlerin parçalanması ve zar bütünlüğünün kaybı (geç aşamalarda) yer

almaktadır. Annexin V, normalde hücre zarının iç yüzeyine lokalize olan bir zar bileşeni olan PS için yüksek afiniteye sahip, kalsiyuma bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı proteindir. Apoptotik yolun başlarında PS molekülleri, Annexin V'in onları kolayca bağlayabildiği hücre zarının dış yüzeyine yer değiştirmektedir. Muse® Annexin V ve Ölü Hücre Analizi Kiti (Millipore; Merck KgaA., Burlington, MA, ABD), apoptotik hücrelerin dış zarındaki PS'yi saptamak için Annexin V'i kullanmaktadır. Test hücre zarı yapısal bütünlüğünün bir göstergesi olarak da ölü hücreleri işaretlemek için 7- Aminoaktinomisin (7-AAD) boyasını kullanılmıştır. Bu işaretleyiciler göz önünde bulundurulduğunda dört hücre popülasyonu ayırt edilmiştir:

- saptanabilir apoptoz olmayan canlı hücreler: Annexin V (-) ve 7-AAD (-)
- erken apoptotik hücreler: Annexin V (+) ve 7-AAD (-)
- geç evre apoptotik ve ölü hücreler: Annexin V (+) ve 7-AAD (+)
- apoptotik olmayan bir yolla ölen ölü hücreler: Annexin V (-) ve 7-AAD (+)

Muse® Annexin V ve Ölü Hücre Analizi Kiti deney gruplarına uygulanırken kit içeriğindeki protokole tabi kalınmıştır. Hazırlanan örnekler Muse Cell Analyzer (Muse™ Cell Analyzer; Millipore, Burlington, MA, ABD) cihazı ile analiz edilmiştir.

3.2.15. Oksidatif Stress Analizi

Reaktif Oksijen Türleri (ROS); süperoksit, singlet oksijen ve peroksit gibi moleküler oksijenden türetilen kimyasal olarak reaktif radikalleri ve radikal olmayan molekülleri tanımlayan toplu bir terimdir. Memeli hücrelerinde, ana ROS kaynakları arasında hücre solunum ve metabolik süreçler bulunmaktadır. ROS hücre içinde, aerobik solunumun mitokondri elektron taşımasının yan ürünleri olarak veya hücre içi oksidoredüktaz enzimleri ve metal katalizli oksidasyonlar tarafından üretilmektedir. Ayrıca ROS, hücre regülasyonda temel biyomoleküller veya aerobik metabolizmanın toksik yan ürünleri olarak üretilmektedir. ROS'un fagositik hücrelerde savunma mekanizmalarının bir parçası olarak önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir, ancak aynı zamanda hücre sinyalleşmesi ve düzenlenmesi, sinyal kaskadlarının aktivasyonu ve apoptoz gibi işlevlerde tüm hücre tiplerinde daha geniş bir role sahip olduğu bilinmektedir. Süperoksit ve ROS bu nedenle kanser, Alzheimer, sepsis, diyabet ve kardiyovasküler hastalık gibi çok sayıda hastalığın patofizyolojisinde yer almaktadır. Muse® Oksidatif Stres Kiti (Millipore; Merck KgaA.,

Burlington, MA, ABD), süperoksit radikallerinin hücre içi tespitine dayalı olarak oksidatif strese maruz kalan hücrelerin sayısını ve yüzdesini aynı anda belirlemektedir. Kit, hücrelerde ROS tespiti için Muse Oksidatif Stres Reaktifini kullanmaktadır. Muse Oksidatif Stres Reaktifi, hücresel popülasyonlarda reaktif oksidatif türleri saptamak için yaygın olarak kullanılan, iyi karakterize edilmiş bir reaktif olan dihidroetidyuma (DHE) dayanmaktadır. Reaktif hücre geçirgendir ve DHE'nin süperoksit anyonları ile reaksiyona girmesi üzerine oksidasyona uğrayarak DNA bağlayıcı florofores etidyum bromürü veya DNA ile birleşerek kırmızı floresan veren yapısal olarak benzer bir ürünü oluşturduğu uzun süredir kabul edilmektedir.

Testte iki hücre popülasyonu ayırt edilmiştir:

- ROS(-): canlı hücreler
- ROS(+): ROS sergileyen hücreler

Muse® Oksidatif Stres Analizi Kiti deney gruplarına uygulanırken kit içeriğindeki protokole tabi kalınmıştır. Hazırlanan örnekler Muse Cell Analyzer (Muse™ Cell Analyzer; Millipore, Burlington, MA, ABD) cihazı ile analiz edilmiştir.

3.2.16. İstatistiksel Değerlendirme

Alınan verilerin istatistiksel değerlendirmeleri IBM SPSS 26 (IBM SPSS Statistic, Armonk, NY, USA) ve GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programları kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen verilere Kolmogorov-Smirnov veya Shapiro-Wilk normallik testi uygulanmıştır. Normal dağılım gösteren veri grupları karşılaştırılırken istatistiksel anlamlılık için one-way ANOVA ve posthoc test olarak Tukey's uygulanmıştır. Normal dağılım göstermeyen veri grupları karşılaştırılırken ise anlamlılık için Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar *, †, §, ¶ : $p \leq 0,05$; **, ††, §§, ¶¶ : $p \leq 0,01$; ***, †††, §§§, ¶¶¶ : $p \leq 0,001$ şeklinde ifade edilerek istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte eklenmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Mikrokabarcık Üretimi

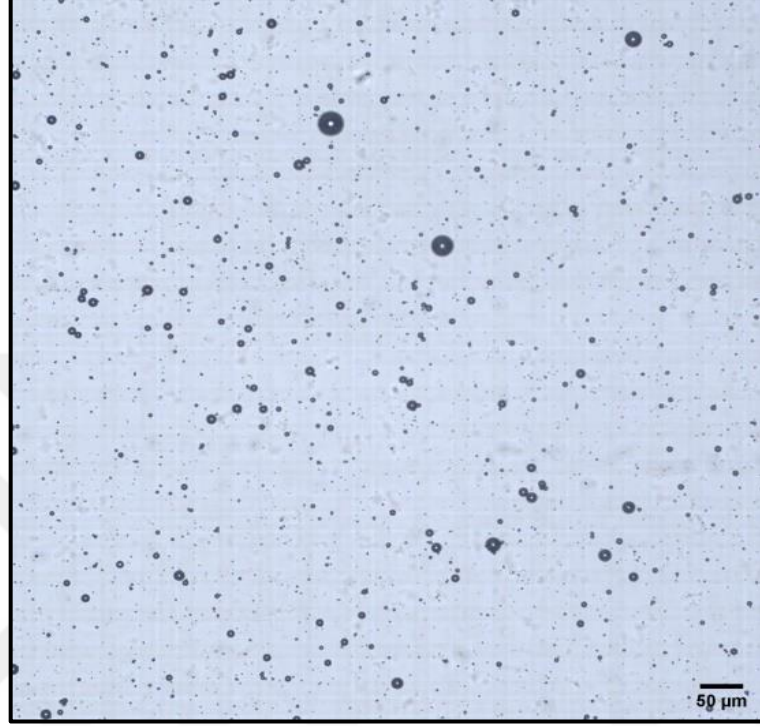
1:2:7 oranında gliserol-propilenglikol-distile su karışımında 65°C rotari evaporatörde berrak görünüm elde edilinceye kadar çözünmesi sağlanan ve sonunda 0,25 mg/ml lipid konsantrasyonuna sahip olan DSPC lipid solüsyonu üzerine C₃F₈ gazı-atmosfer karışımı sıkılmasının ardından mekanik aktivasyon sağlanmıştır ve elde edilen DSPC mikrokabarcıklar beyaz köpükler şeklinde gözlenmiştir.

Mekanik aktivasyon 4000 devir/dk'da çalışan karıştırıcı cihazda 20 saniye çalkalanarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilmiş mikrokabarcıkların tüp içerisindeki görüntüsü (Resim 8) ve Thoma lamında 10x büyütmede alınan görüntüleri (Şekil 29) eklenmiştir.



Resim 8. Mekanik aktivasyonun ardından DSPC mikrokabarcık içeren tüpler.

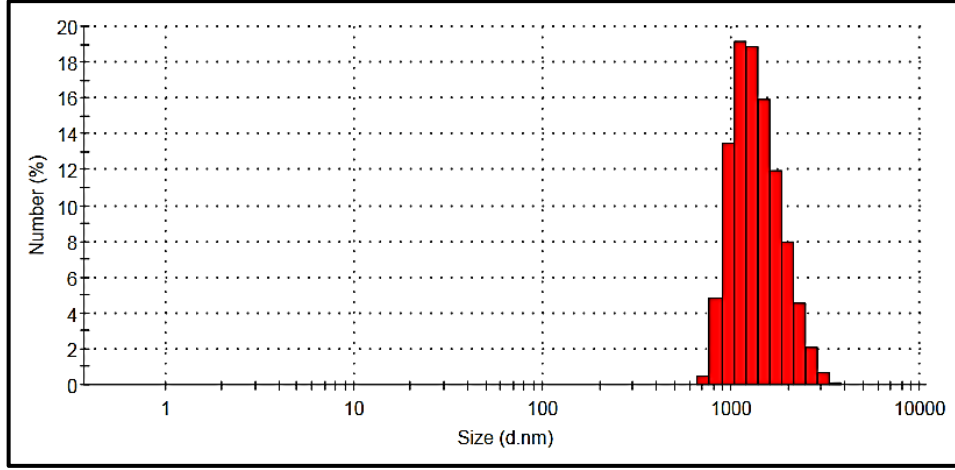
Thoma lamındaki DSPC mikrokabarcık görüntülerine ayrıntılı bakılacak olursa, her bir DSPC mikrokabarcığının küresel formunu koruduğu, sahip oldukları gaz merkezinden anlaşılmaktadır (Şekil 29).



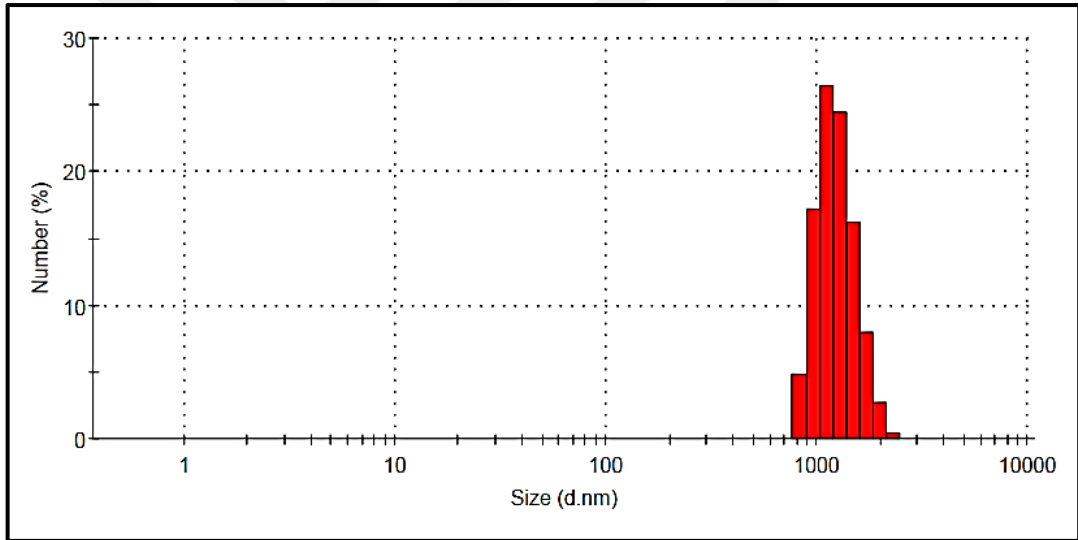
Şekil 29. İnvirt ışık mikroskobu 10x büyütmede DSPC mikro kabarcıklarının görüntüsü.

4.2. DLS cihazı ile Mikrokabarcık Boyut Analizi

Dinamik ışık saçılımı cihazı ile analiz edilmiş boş ve klorin e6 yüklü DSPC mikrokabarcıklarının cihazdan elde edilen boyut analizi grafikleri eklenmiştir (Şekil 30, Şekil 31).



Şekil 30. Boş DSPC mikrokabarcıkların DLS cihazı ile elde edilen boyut analizi grafiği.



Şekil 31. Klorin e6 yüklü DSPC mikrokabarcıkların DLS cihazı ile elde edilen boyut analizi grafiği.

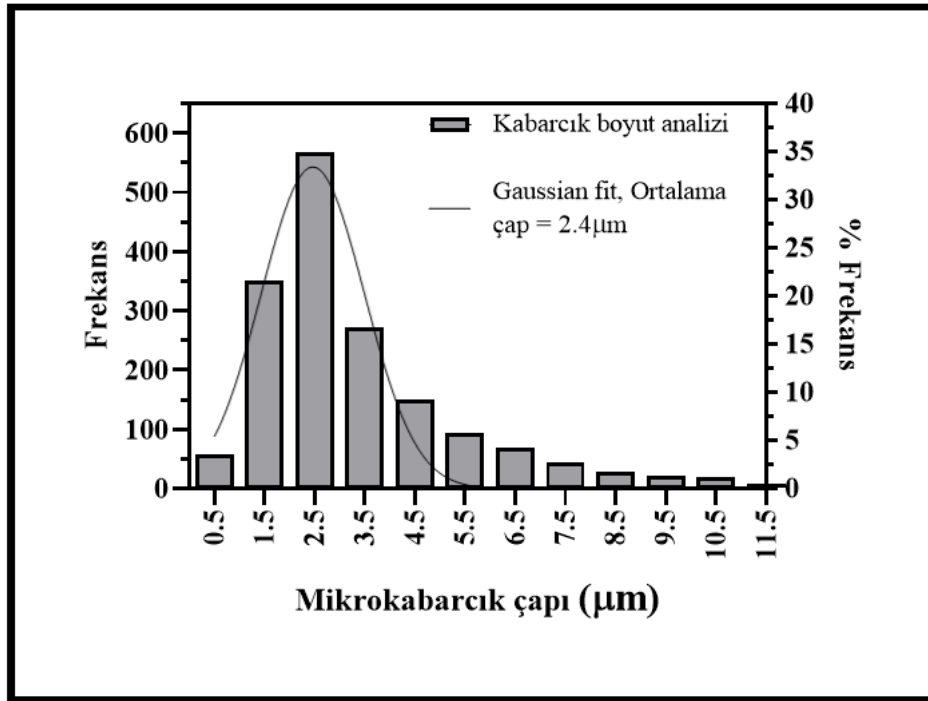
Grafikler incelendiğinde hem klorin içeren hem de boş DSPC mikrokabarcıkların yoğun olarak sayıldığı kabarcık boyutunun değişmediği ama sayılan kabarcık miktarı açısından irdelendiğinde klorin içeren kabarcıklarda rakamsal olarak azalma olduğu gözlemlenmiştir.

4.3. Görüntü işleme yöntemi ile Mikrokabarcık Boyut Analizi

Thoma lamı ile hesaplamalar sonucunda 1ml stok solüsyonda 3×10^9 tane mikrokabarcık bulunduğu tespit edilmiştir.

Mikrokabarcıkların boyutlarının belirlenmesi için mikrokabarcıklar Thoma lamı üzerindeyken fotoğrafları çekilmiştir. Daha sonra bu görseller ImageJ programında parçacık boyut analizi eklentisi kullanılarak analiz edilmiş ve mikrokabarcık çaplarının dağılımı belirlenmiştir.

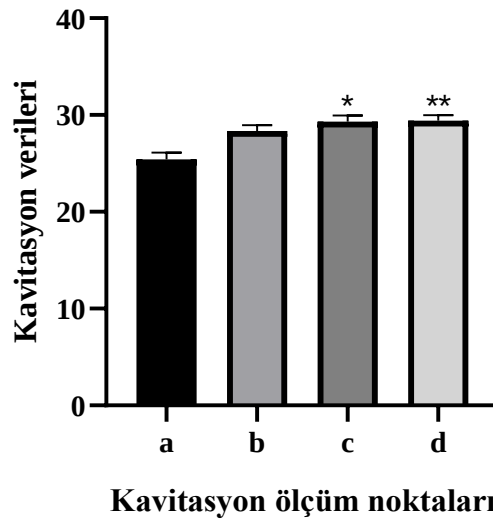
Analiz sonucunda ortaya çıkan verilerin histogram grafiğine bakıldığında mikrokabarcıkların %80'den fazlasının 1-5 μm aralığında boyuta sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 32).



Şekil 32. DSPC mikrokabarcıkların çaplarının ImageJ programında parçacık boyut analizi eklentisi kullanılarak analizi sonucunda elde edilen verilerle GraphPAD programından elde edilen histogram dağılım grafiği ve gaussian eğrisi.

4.4. Ultrases kavitasyon analizi

Ölçüm alınması planlanan farklı lokasyonlarda ortama bağlı olarak ultrasesin kavitasyon etkisi gözlemlenmek istenmiştir. Bu bağlamda deney düzeneğindeki su ortamını taşıyan falkon tüpün tepe noktasından (a), falkon tüpün üzerine yerleştirilen petri içindeki medyumun dip noktasından (b), falkon tüpün üzerine yerleştirilen petri içindeki medyuma boş DSPC mikrokabarcıklar eklenerek medyumun dip noktasından (c) ve falkon tüpün üzerine yerleştirilen petri içindeki medyuma klorin e6 yüklü DSPC mikrokabarcıklar eklenerek medyumun dip noktasından (d) OPCAV cihazı ile $3\text{W}/\text{cm}^2$ ultrases uygulanırken kavitasyon ölçümleri alınmıştır.



Şekil 33. Kavitasyon verisi toplanan lokasyonlar. Data toplanan noktalar deney düzeneğindeki su ortamını taşıyan falkon tüpün tepe noktası (a), falkon tüpün üzerine yerleştirilen petri içindeki medyumun dip noktası (b), falkon tüpün üzerine yerleştirilen petri içindeki medyuma boş DSPC mikrokabarcıklar eklenerek medyumun dip noktası (c) ve falkon tüpün üzerine yerleştirilen petri içindeki medyuma klorin e6 yüklü DSPC mikrokabarcıklar eklenerek medyumun dip noktası (d) olarak harflendirilmiştir. Elde edilen verilere Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$ şeklinde ifade edilerek istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte eklenmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

Elde edilen veriler ve istatistik analizler sonucunda ölçüm alınan a noktası ile c ve d noktaları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Kruskal-Wallis testi sonucunda c noktası a noktasına göre $p=0,024$; d noktası a noktasına göre $p= 0,0024$ anlamlı bulunmuştur (Şekil 33).

Ultrases kavitasyon analizi betimleyici istatistiksel verileri eklenmiştir (Tablo 9).

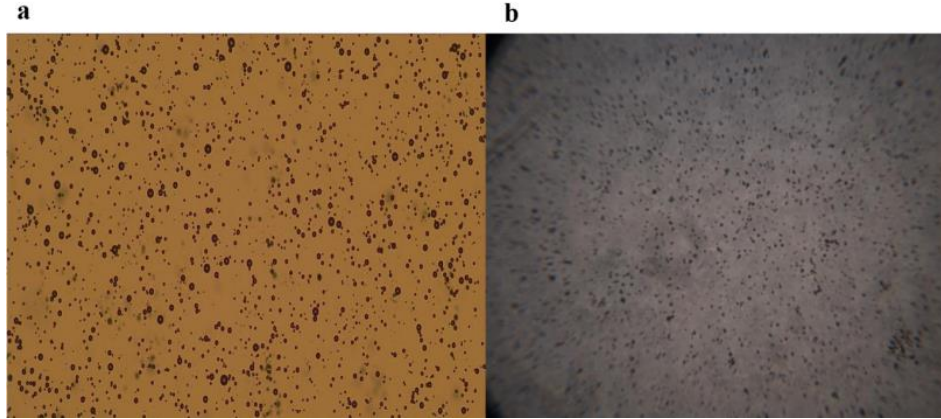
Tablo 9. Ultrases kavitasyon analizi betimleyici istatistiksel verileri.

Kavitasyon ölçümü alınan lokasyonlar	a	b	c	d
Kavitasyon verisi	25,43±0,70	28,34±0,61	29,32±0,62*	29,40±0,58**

Elde edilen verilere Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$ şeklinde ifade edilerek istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte eklenmiştir. Tüm veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

4.5. Ultrases Aracılı Mikrokabarcık Yıkımı

Elde edilen DSPC mikrokabarcıklara uygulanan $3W/cm^2$ ultrases gücünün mikrokabarcıkları patlattığının gösterilmesi adına mikrokabarcıkların invert ışık mikroskopunda görüntüleri ultrases uygulaması öncesi ve sonrası olacak şekilde alınmıştır (Şekil 34).

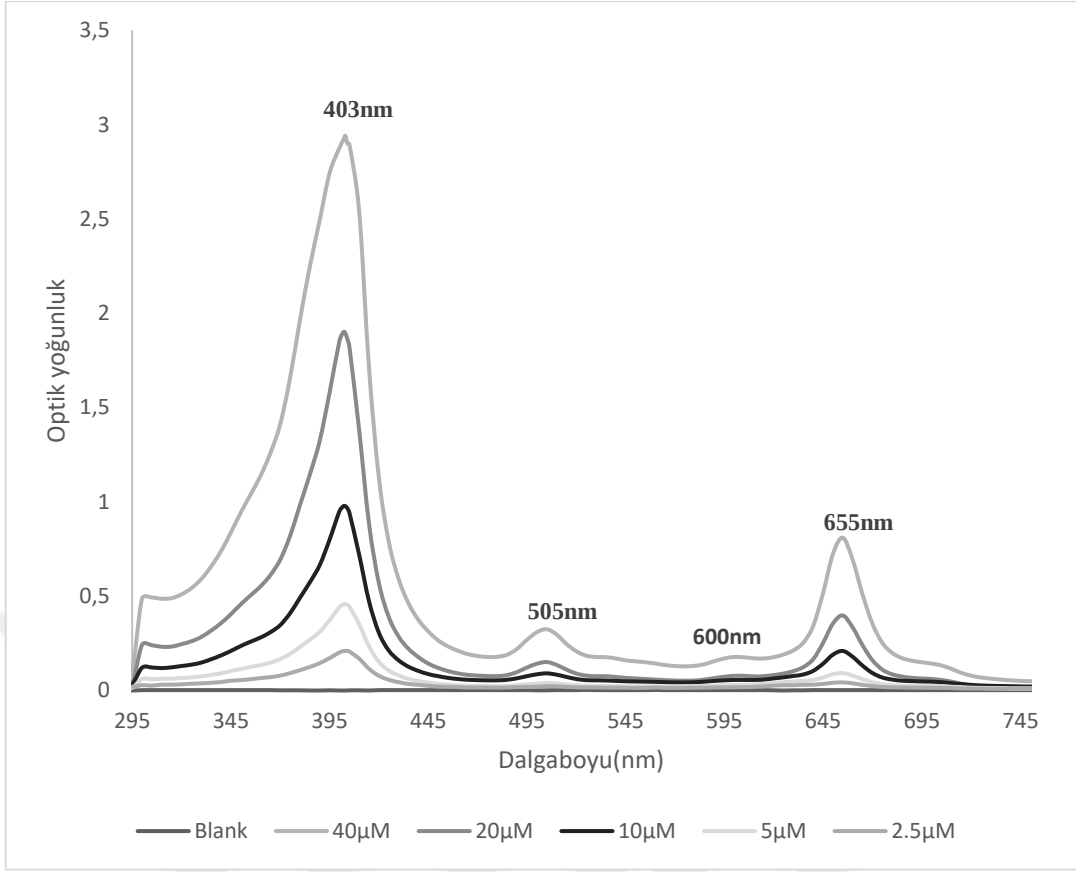


Şekil 34. Klorin e6 yüklü DSPC mikrokabarcıklar (a) ve $3\text{W}/\text{cm}^2$ ultrases uygulaması sonrası gaz merkezlerini kaybetmiş lipid damlacıklar (b).

Şekil 34'ten de gözlemleneceği üzere ultrases uygulanmayan DSPC mikrokabarcıklar gaz merkezlerini korumaktayken, ultrases uygulanmış olan DSPC mikrokabarcıkların gaz merkezlerini kaybetmiş (patlamış) lipid damlacıklar haline dönüştüğü gözlenmiştir.

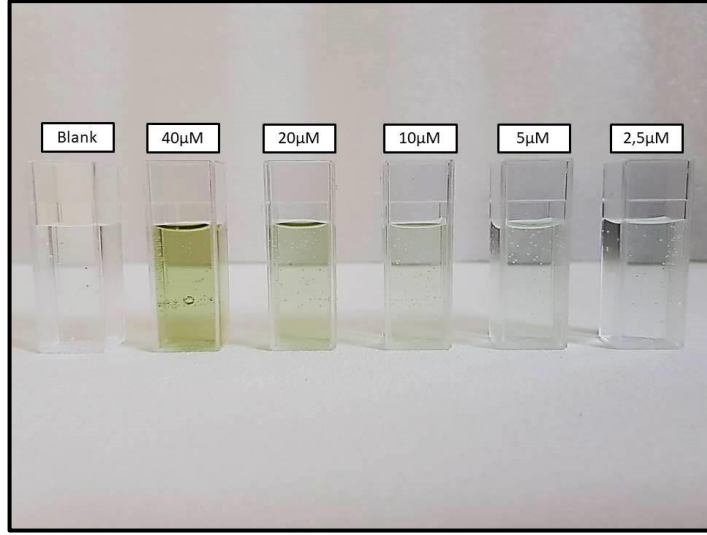
4.6. Spektroskopik Yöntemler ile Klorin Analizi

Klorin e6 kimyasalının PBS içinde çözünmüş formu UV-visable cihazı ile analiz edilmiştir ve veriler Şekil 35'te özetlenmiştir.



Şekil 35. UV-Vis Spektrometresinde ölçümü yapılan PBS’de çözünmüş klorin e6 trisodyum tuzunun farklı molaritelerdeki optik yoğunluk grafiği.

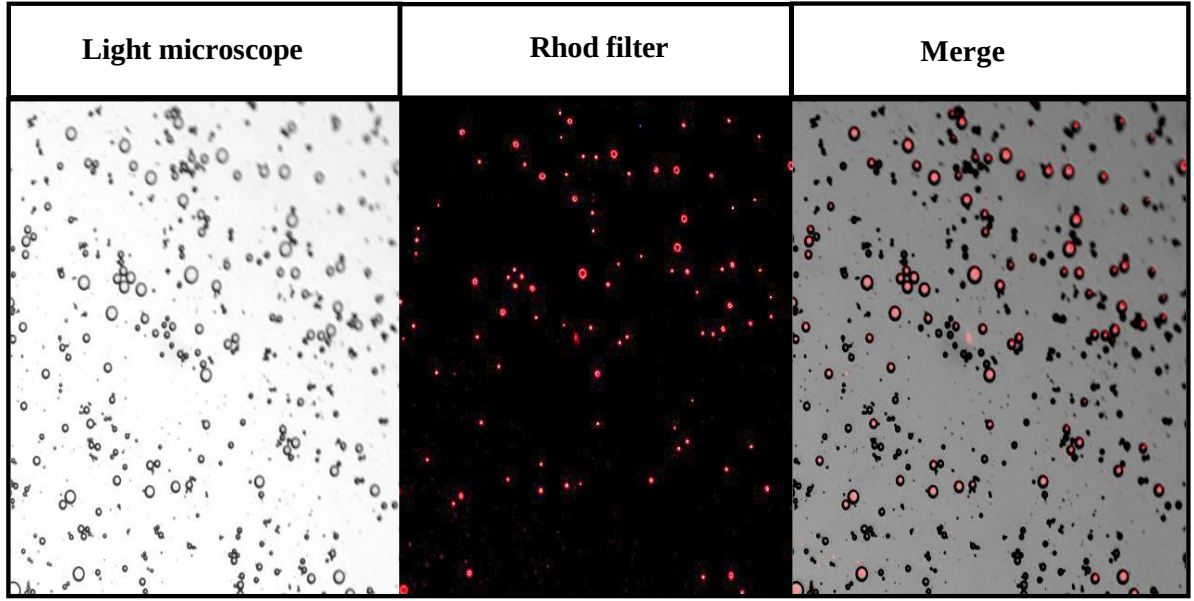
Şekil 35 incelendiğinde artan klorin e6 molaritelerine rağmen optik yoğunluğun pik yaptığı dalgaboyu değerlerinde kayma gözlenmemiştir ve artan klorin e6 molaritesiyle orantılı olarak artan bir optik yoğunluk ölçümü gözlenmiştir.



Resim 9. Blank olarak PBS ve PBS’de çözünmüş klorin e6 trisodyum tuzunun farklı molaritelerde UV-Vis Spektrometresinde ölçüm sonrası görüntüleri.

Ölçümü alınmış farklı molaritelerdeki klorin e6 çözeltilerini içeren küvetlerin ve blank olarak kullanılan küvetin yanyana bulunduğu görsel (Resim 9) incelendiğinde molarite artmasına rağmen berrak görüntünün kaybolmadığı gözlenmiştir.

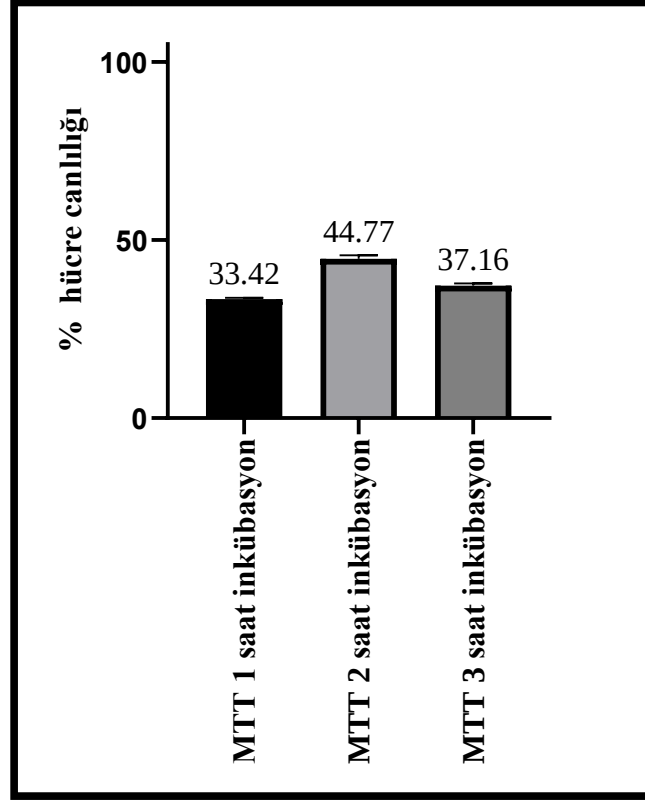
Klorin e6 yüklü DSPC mikrokabarcıkların içerisindeki klorin e6 varlığını tespit etmek adına alınan floresan invert mikroskop görüntüleri Şekil 36’da verilmiştir. Burada odaklanılan bölge sabit kalacak şekilde hem aydınlık alandan hem de rhod filtreli floresan alandan alınan görüntüler ImageJ yardımıyla birleştirilmiş ve gaz merkezleri kırmızı parlayan DSPC mikrokabarcıklar tespit edilmiştir.



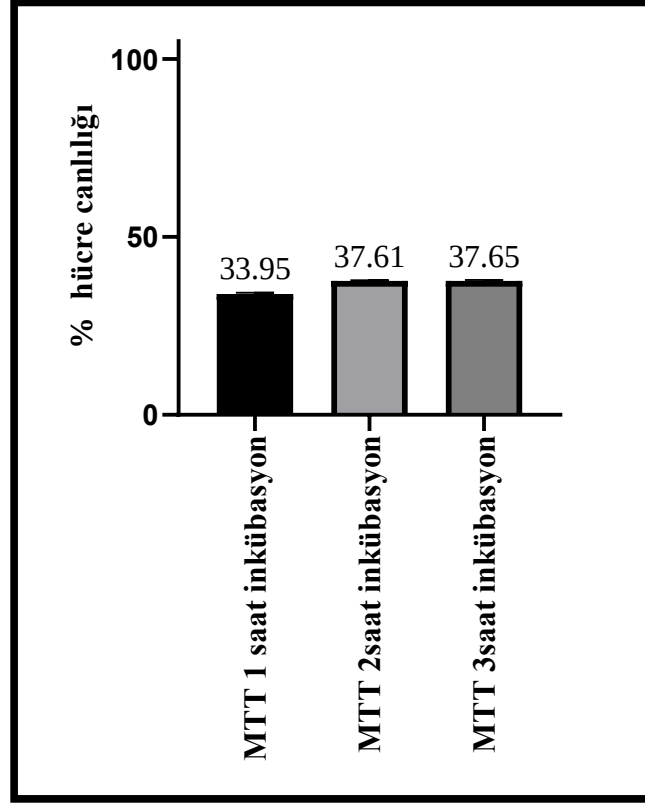
Şekil 36. Floresan invert mikroskop ışık ve rhod filtre altında 10x büyütmede Ce6 yüklü DSPC mikro kabarcıklarının görüntüsü ve bunların ImageJ ile birleştirilmiş görüntüleri.

4.8. Hücre Canlılığı Analizi

MKN28 hücre hattı üzerinde uygulanacak olan farklı ilaç ve ultrases dozlarına karar vermek için MTT testi uygulaması öncesinde testin standardize hale getirilmesi adına farklı sürelerde MTT inkübasyonları ile bu inkübasyonu takip eden sürede uygulanan DMSO'da bekleme süreleri karşılaştırılmıştır (Şekil 37, Şekil 38).



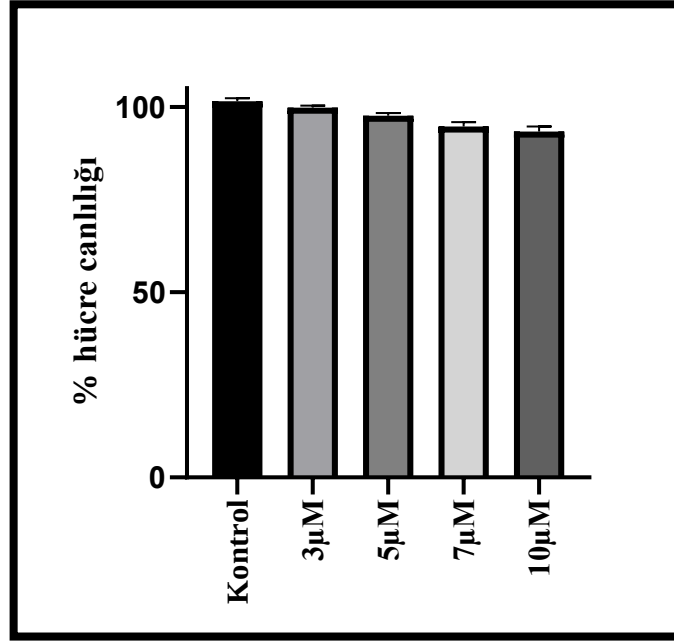
Şekil 37. Farklı MTT inkübasyonları ile bu inkübasyonu takip eden sürede uygulanan 15dk DMSO’da bekletme protokolüne bağlı elde edilen % hücre canlılığı değişimi.



Şekil 38. Farklı MTT inkübasyonları ile bu inkübasyonu takip eden sürede uygulanan gece boyunca DMSO’da bekletme protokolüne bağlı elde edilen % hücre canlılığı değişimi.

Yapılan ölçümler sonucunda MTT yöntemi uygulanırken inkübasyon süresinin 2 saat ve DMSO’da bekleme süresinin geceboyunca olduğu gruplarda sonuçların istikrarlı çıktığı gözlenmiştir ve MTT protokolü belirlenmiştir.

MKN28 hücre hattına uygulanacak klorin e6 dozunun belirlenmesinden önce klorin e6’nın çözücüsü olarak kullanılan PBS’nin hücre canlılığına etkisinin gözlemlenebilmesi için artan PBS miktarları MTT yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 39).



Şekil 39. Farklı molaritelerde doz denemesi yapılacak olan klorin e6'nın çözündüğü PBS miktarlarının hücreye etkisi.

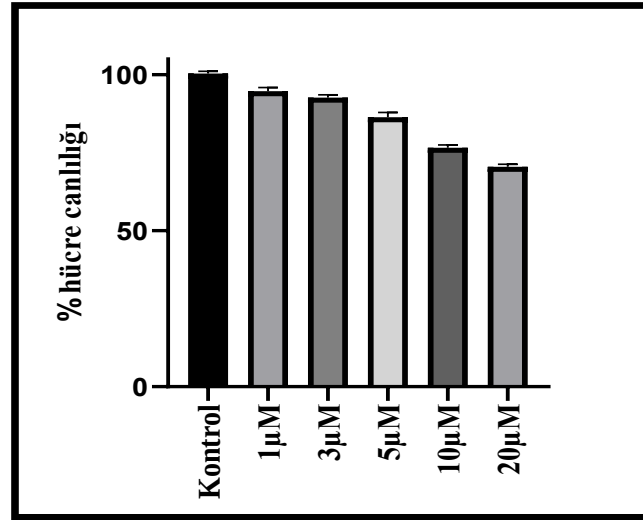
Bu sonuçlara göre Tablo 10'da görüleceği gibi etkisi denenecek olan klorin e6 dozlarının hiçbirinde PBS'nin hücre canlılığına etkisi %7'den fazla gözlenmemiştir.

Tablo 10. Farklı molaritelerde doz denemesi yapılacak olan klorin e6'nın çözündüğü PBS miktarlarının hücreye etkisinin betimleyici istatistiksel verileri.

Ce6					
Çözücüsünün Molar Konsantrasyonu	Kontrol	3µM	5µM	7µM	10µM
Hücre Canlılığı (%)	101,5±0,81	99,77±0,52	97,58±0,78	94,69±1,2	93,31±1,35

Tüm veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

MKN28 hücre hattına uygulanacak klorin e6 dozuna karar vermek için hücrelere artan dozlarda (1; 3; 5; 10 ve 20 μ M) ilaç uygulaması yapılmıştır. İlaç uygulamalarından 12 saat sonra hücre canlılıkları MTT testi sonrası elde edilen absorbans değerleri ile hesaplanmıştır (Şekil 40).



Şekil 40. Klorin e6 farklı dozlarının hücre canlılığına etkisi.

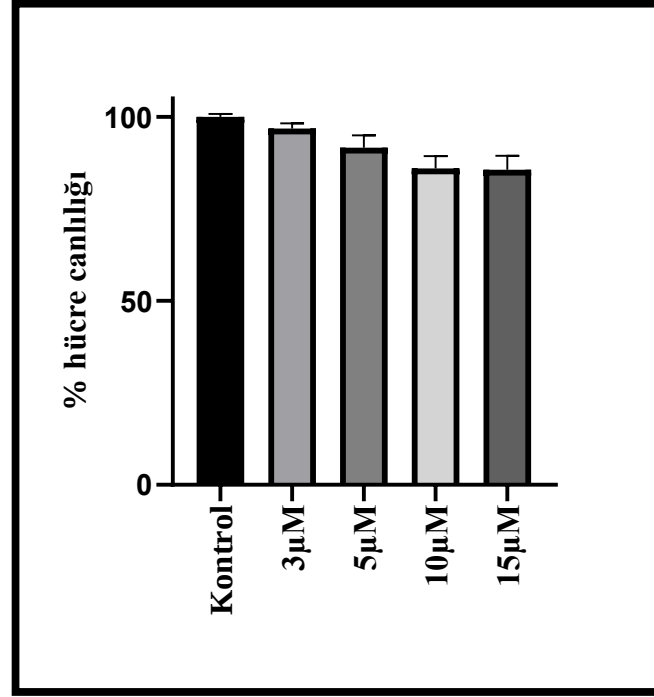
Buna göre Tablo 11’de görüleceği gibi 5 μ M üzerindeki dozlarda hücre canlılığının %20’den daha fazla azaldığı hesaplanmıştır. Bu nedenle tedavi gruplarında uygulanacak klorin e6 dozu olarak 5 μ M seçilmiştir (Şekil 40).

Tablo 11. Klorin e6 farklı dozlarının hücre canlılığına etkisinin betimleyici istatistiksel verileri.

Ce6 Molar Konsantrasyonu	Kontrol	1 μ M	3 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M
Hücre Canlılığı (%)	100,39±0,74	94,71±1,18	92,70±0,84	86,34±1,6	76,62±0,88	70,45±0,83

Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

MKN28 hücre hattına uygulanacak pifithrin- μ dozunun belirlenmesinden önce pifithrin- μ 'nün çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun hücre canlılığına etkisinin gözlemlenebilmesi için artan DMSO miktarları MTT yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 41).



Şekil 41. Farklı molaritelerde doz denemesi yapılacak olan pifithrin- μ 'nün çözündüğü DMSO miktarlarının hücreye etkisi.

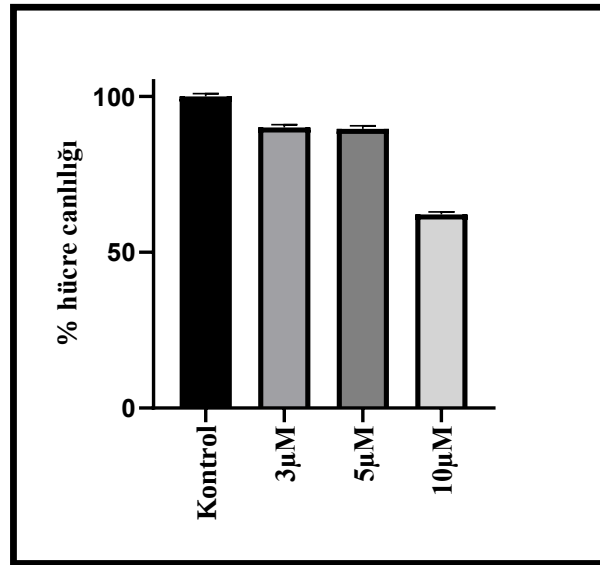
Bu sonuçlara göre Tablo 12'de görüleceği gibi etkisi denenecek olan pifithrin- μ dozlarına DMSO'nun artan molaritelerde etkisi gözlemlenmiştir ve pifithrin- μ dozu belirlenirken Tablo 12'deki değerler de göz önünde bulundurulmuştur.

Tablo 12. Farklı molaritelerde doz denemesi yapılacak olan pifithrin- μ 'nün DMSO miktarlarının hücreye etkisinin betimleyici istatistiksel verileri.

Pi- μ					
Çözücüsünün					
Molar					
Konsantrasyonu					
Hücre Canlılığı (%)	100,00 $\pm$ 0,85	96,83 $\pm$ 1,46	91,60 $\pm$ 0,91	86,00 $\pm$ 0,75	85,64 $\pm$ 1,34

Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

MKN28 hücre hattına uygulanacak pifithrin- μ dozuna karar vermek için hücrelere artan dozlarda (3; 5 ve 10 μM) ilaç uygulaması yapılmıştır. İlaç uygulamalarından 48 saat sonra hücre canlılıkları MTT testi sonrası elde edilen absorbans değerleri ile hesaplanmıştır.



Şekil 42. Pifithrin- μ farklı dozlarının hücre canlılığına etkisi.

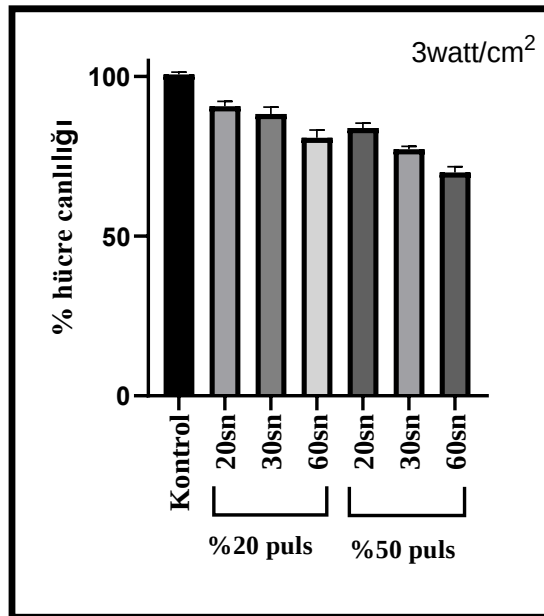
Buna göre Tablo 13'te görüleceği gibi 5 μM üzerindeki dozlarda hücre canlılığı %30'dan daha fazla azaldığı hesaplanmıştır. Bu nedenle tedavi gruplarında uygulanacak pifithrin- μ dozu olarak 5 μM seçilmiştir (Şekil 42).

Tablo 13. Pifithrin- μ farklı dozlarının hücre canlılığına etkisinin betimleyici istatistiksel verileri.

Pi- μ Dozları	Kontrol	3 μ M	5 μ M	10 μ M
Hücre Canlılığı (%)	100,00 $\pm$ 0,90	90,08 $\pm$ 0,90	89,61 $\pm$ 0,96	62,14 $\pm$ 0,83

Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

MKN28 hücre hattına uygulanacak ultrases süresine ve pulsuna karar vermek için hücrelere artan sürelerde (20; 30 ve 60 saniye) ve 2 farklı pulsta (%20 ve %50) ultrases uygulaması yapılmıştır. Ultrases uygulamalarından 12 saat sonra hücre canlılıkları MTT testi sonrası elde edilen absorbens değerleri ile hesaplanmıştır.



Şekil 43. Ultrases dozlarının hücre canlılığına etkisi.

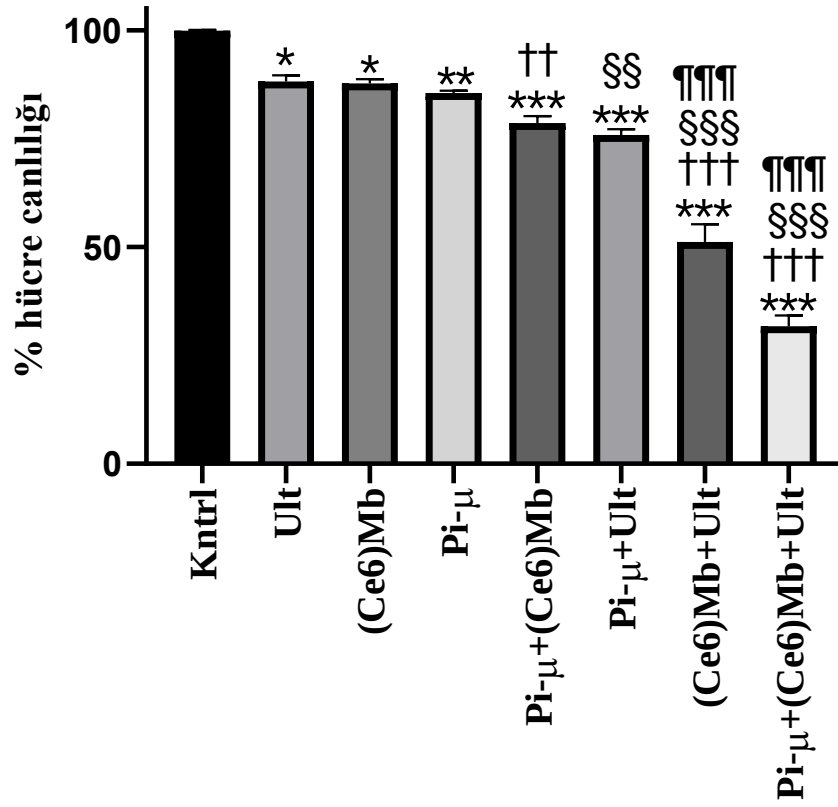
Buna göre Tablo 14’de görüleceği gibi ultrases uygulamasında artan puls ve artan süre MKN28 hücre canlılığını azaltıcı etki göstermiştir. 30 saniye ve %20 puls ultrases uygulamasından daha fazla ultrases uygulanan gruplarda hücre canlılığının %15’den daha fazla azaldığı hesaplanmıştır. Bu nedenle tedavi gruplarında ultrases süresi ve puls düzeyi olarak 30 saniye %20 puls uygulaması seçilmiştir (Şekil 43).

Tablo 14. Ultrases dozlarının hücre canlılığına etkisinin betimleyici istatistiksel verileri.

Ultrases Dozları	20sn,	30sn,	60sn,	20sn,	30sn,	60sn,
	%20puls,	%20puls,	%20puls,	%50puls,	%50puls,	%50puls,
	3W/cm ²	3W/cm ²	3W/cm ²	3W/cm ²	3W/cm ²	3W/cm ²
Hücre Canlılığı (%)	90,66±1,51	88,26±2,13	80,83±2,39	83,86±1,50	77,21±0,88	66,35±1,78

Tüm veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

Tüm değişkenler için elde edilmiş optimum dozlar ile oluşturulmuş tüm gruplarda uygulamaların hücre canlılığına etkisi MTT yöntemi ile incelenmiştir. Tedavi uygulamalarından 12 saat sonra MTT testi yapılarak gruplar arasındaki hücre canlılığı yüzdeleri karşılaştırılmıştır (Tablo 15). Buna göre bütün tedavi grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Tedavi grupları arasında hücre canlılığı yüzdesinin en düşük bulunduğu grup Pifithrin- μ + (Ce6)Mikrokabarcık + Ultrases grubu olmuştur (Şekil 44).



Şekil 44. Belirlenen etkin dozlar ile oluşturulmuş deney düzeneğinde tüm gruplarda hücre canlılığı. Elde edilen verilere Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar *, †, §, ¶ : $p \leq 0,05$; **, ††, §§, ¶¶ : $p \leq 0,01$; ***, †††, §§§, ¶¶¶ : $p \leq 0,001$ şeklinde ifade edilerek istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte eklenmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir. Kontrol ile karşılaştırmada *, ultrases ile karşılaştırmada †, (ce6)mikrokabarcık ile karşılaştırmada § ve pifithrin- μ ile karşılaştırmada ise ¶ sembolleri yukarıda belirtilen anlamlılık düzeylerini gösteren semboller olarak kullanılmıştır.

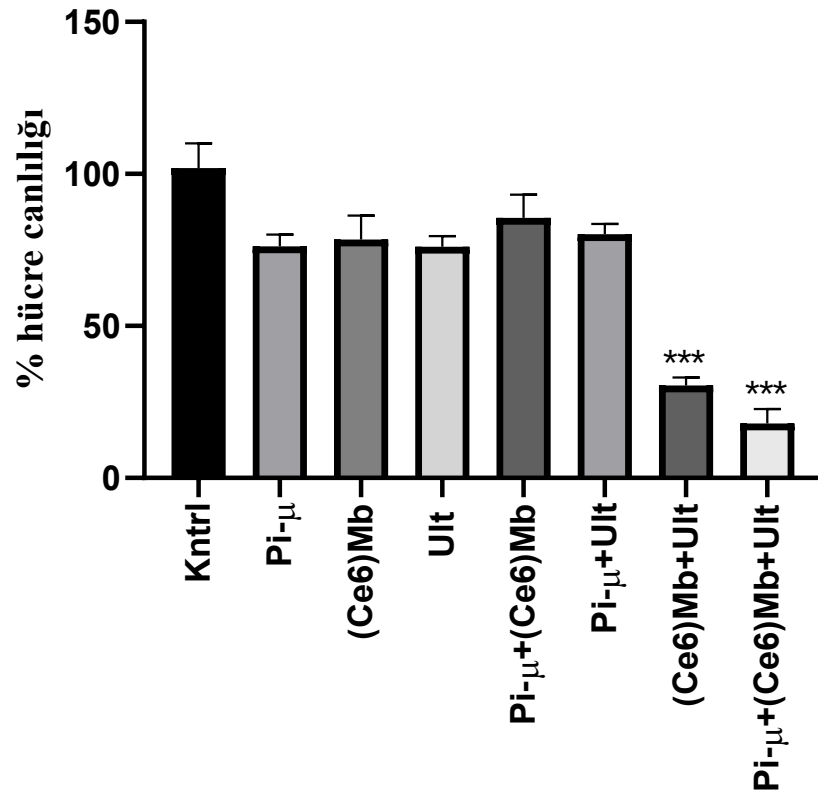
Tablo 15. Belirlenen etkin dozlar ile oluşturulmuş deney düzeneğinde tüm gruplarda hücre canlılığının betimleyici istatistiksel verileri.

Deney Grupları	Kntrl	Ult	(Ce6)Mb	Pi-μ	Pi-μ+(Ce6)Mb	Pi-μ+Ult	(Ce6)Mb+Ult	Pi-μ+(Ce6)Mb+Ult
Hücre Canlılığı (%)	99,87±0,2	88,16±1,5	87,74±1,0	85,55±0,5	78,60±1,6	75,85±1,3	51,18±4,1	31,77±2,5
		*	*	**	***	***	***	***
					††		†††	†††
						§§	§§§	§§§
							¶¶¶	¶¶¶

İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar *, †, §, ¶ : $p \leq 0,05$; **, ††, §§, ¶¶ : $p \leq 0,01$; ***, †††, §§§, ¶¶¶ : $p \leq 0,001$ şeklinde ifade edilerek istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte eklenmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir. Kontrol ile karşılaştırmada *, ultrases ile karşılaştırmada †, (ce6)mikrokabarcık ile karşılaştırmada § ve pifithrin-μ ile karşılaştırmada ise ¶ sembolleri yukarıda belirtilen anlamlılık düzeylerini gösteren semboller olarak kullanılmıştır.

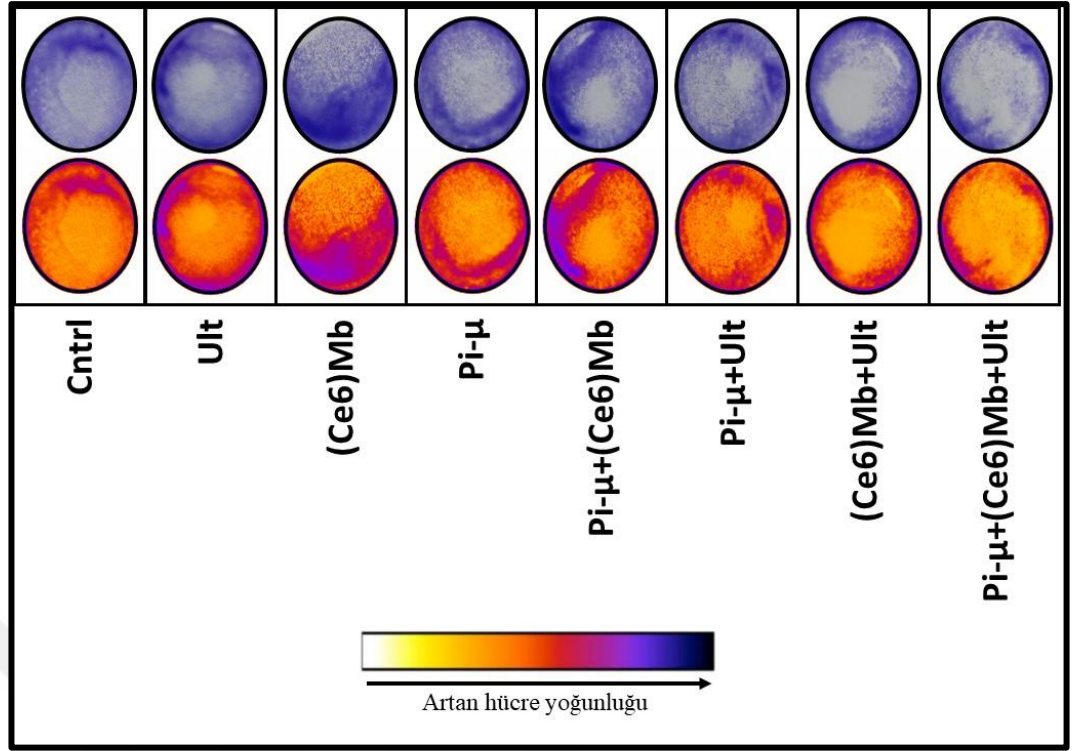
Deney Grupları Cristal Viole Boyaması Sonuçları

Cristal viyole boyaması sonrasında alınan görüntülerin ImageJ programı ile analizi sonucunda elde edilen verilerin GraphPad ile istatistiksel analizi sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Ce6)Mb+Ult grubu ve Pi-μ+(Ce6)Mb+Ult grubu $p < 0.0001$ istatistiksel anlamlı bulunmuştur (Şekil 45).



Şekil 45. Belirlenen etkin dozlar ile oluşturulmuş deney düzeneğinde tüm gruplarda Cristal viyole boyaması sonrasında alınan görüntülerinin ImageJ analizi sonucunda hücre canlılığı verileri. Elde edilen verilere Shapiro-Wilk normallik testi uygulanmıştır. Normal dağılım gösteren gruplar için one-way ANOVA uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar ***: $p \leq 0,001$ şeklinde ifade edilerek istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte eklenmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir. Kontrol ile karşılaştırmada * sembolü yukarıda belirtilen anlamlılık düzeylerini gösteren sembol olarak kullanılmıştır.

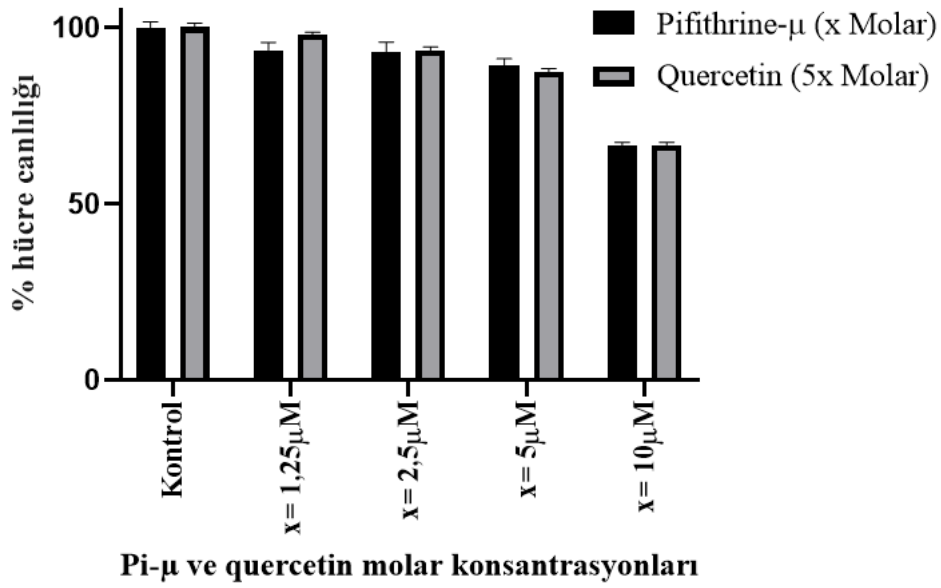
Tüm grupların Cristal viyole boyaması sonrasında alınan görüntüleri ImageJ programı kullanılarak, hücre canlılığı verilerinin kolorimetrik gösterimi sağlanmıştır (Şekil 46).



Şekil 46. Tüm grupların Cristal viyole boyaması sonrasında alınan görüntülerinin ImageJ analizi sonucunda hücre canlılığı verilerinin kolorimetrik gösterimi.

Literatürde pifithrin-μ gibi HSP70 inhibitörü olarak kullanılabilinen quercetin (que) molekülünün MKN28 hücre canlılığında sitotoksik etkisinin gözlemlenebilmesi için pifithrin-μ ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Sekihara ve diğerleri, 2013; Yang ve diğerleri, 2016). Elde edilen MTT verileri Şekil 47’de gösterilmiştir ve yüzde hücre canlılığı $\pm$ ortalamanın standart hatası şeklinde hesaplanan veriler Tablo 16’da gösterilmiştir.

Pifithrin- μ ve Quercetin MTT verileri



Şekil 47. HSP70 inhibitörü olarak kullanılan pifithrin- μ ve quercetin moleküllerinin karşılaştırmalı olarak elde edilmiş MTT hücre canlılığı verileri.

Şekil 47 ve Tablo 16 incelendiğinde x μ M pifithrin- μ kullanımına, 5x μ M quercetin kullanımının yüzde hücre canlılığı verisi açısından denk veriler verdiği gözlenmektedir.

Tablo 16. HSP70 inhibitörü olarak kullanılan pifithrin- μ ve quercetin moleküllerinin karşılaştırmalı olarak elde edilmiş MTT hücre canlılığının betimleyici istatistiksel verileri.

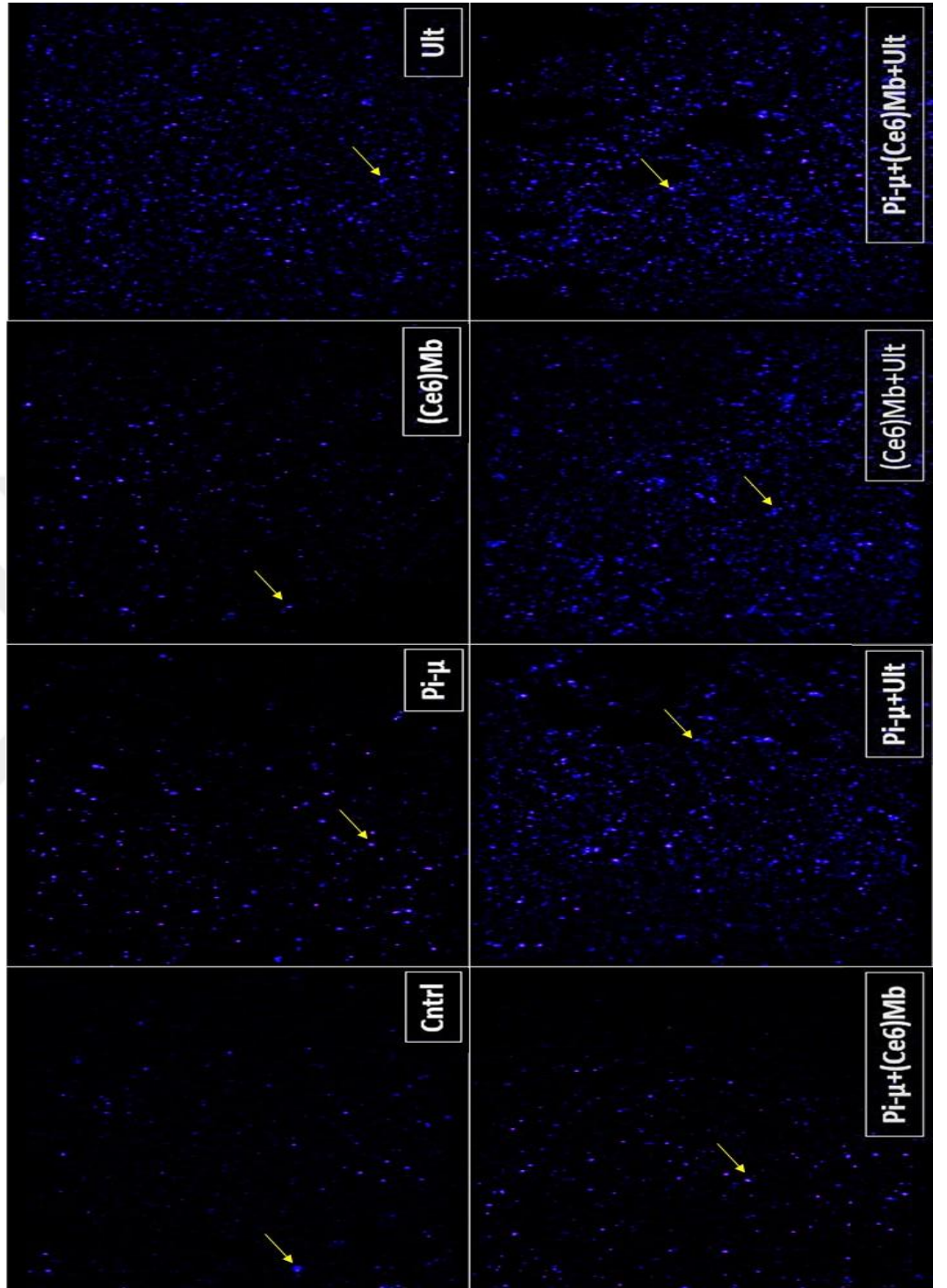
Deney Grupları		Kontrol	Pi- μ =1,25 μ M Que=6,25 μ M	Pi- μ =2,5 μ M Que=12,5 μ M	Pi- μ =5 μ M Que=25 μ M	Pi- μ =10 μ M Que=50 μ M
Hücre Canlılığı (%)	Pi- μ	100,0±1,7	93,71±2,1	93,19±2,7	89,35±1,9	66,75±0,7
	Que	100,2±1,1	98,14±0,7	93,55±1,0	87,40±0,9	66,75±0,8

Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

4.9. Hoechst Boyama ile Apoptotik Yapıların İncelenmesi

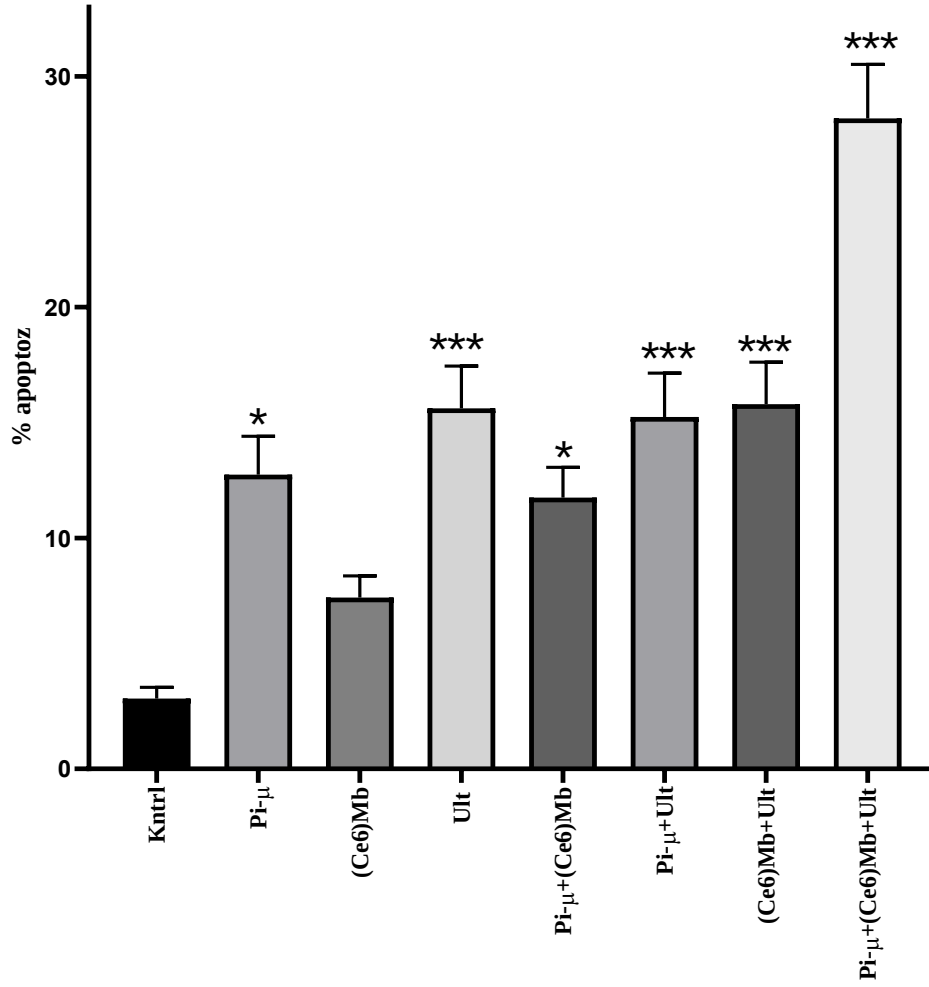
Hoechst boya ile inkübasyonun ardından tüm grupların floresan mikroskop DAPI filtresi görüntülerinde (Şekil 48) gözlenen parlak odaklı hücreler ImageJ programı ile saydırılmış ve elde edilen verilerin istatistiği yapılmıştır (Şekil 49).

Homojen olarak mavi renkle boyanan hücreler, herhangi bir DNA fragmentasyonuna sahip olmadıklarını ve canlı hücreler olduklarını gösterirken, mavi daha yoğun bölgelere sahip olan hücreler, apoptotik DNA yoğunlaşmasını işaret ettiği için bu hücreler apoptotik olarak değerlendirilmiştir. Bu bilgiler ışığında kontrol grubuna ait hücrelerde çok nadir olarak apoptotik hücreler görülmüş, hücrelerin büyük çoğunluğu canlı olarak gözlemlenmiştir. Aynı şekilde klorin yüklü DSPC Mikrokabarcık uygulanan grup hücrelerinin de büyük oranda canlı hücrelerden oluştuğu görülmektedir. Ultrases uygulanan ve pifithrin- μ +klorin yüklü DSPC mikrokabarcık uygulanan gruplarda bulunan hücrelerin apoptotik cisimcikleri $p \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel anlamlı bulunmuştur. Geriye kalan tüm gruplarda apoptotik cisimcikleri $p \leq 0,001$ düzeyinde istatistiksel anlamlı bulunmuştur. Ultrases, pifithrin- μ ve klorin yüklü DSPC mikrokabarcıkların birlikte uygulandığı grupta bulunan hücrelerin apoptotik cisimciklerinin yoğunluklarının ciddi oranda arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 48). Bu veriler değerlendirilirken hoechst boyama sonucunda elde edilen tüm verilerdeki hücrelerin, uygulamalar sonunda sağ kalan hücreler üzerinden hesaplandığı göz önünde bulundurulmalıdır.



Şekil 48. Floresan mikroskopta görüntüleri alınmış deney gruplarına ait apoptotik yapılar.

Hoechst Apoptotik Verileri

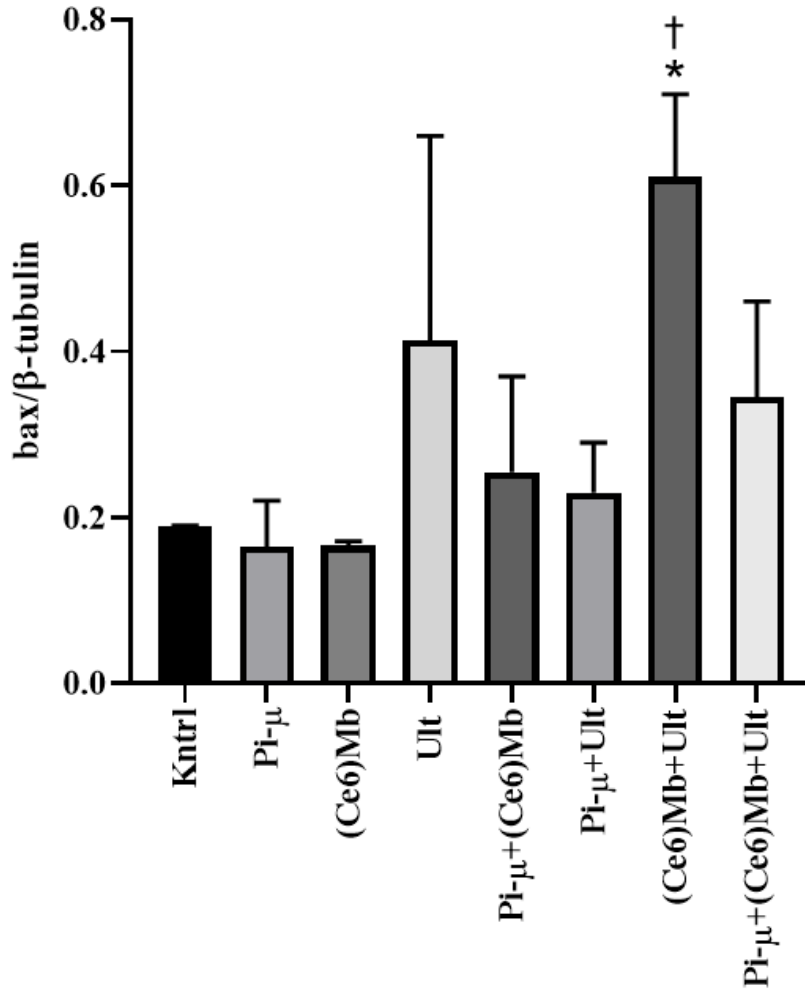


Şekil 49. Floresan mikroskopta görüntüleri alınmış deney gruplarına ait apoptotik yapıların istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte ifade edilişi. Elde edilen verilere Shapiro-Wilk normallik testi uygulanmıştır. Normal dağılım gösteren veri grupları karşılaştırılırken istatistiksel anlamlılık için one-way ANOVA uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$ şeklinde ifade edilerek istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte eklenmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

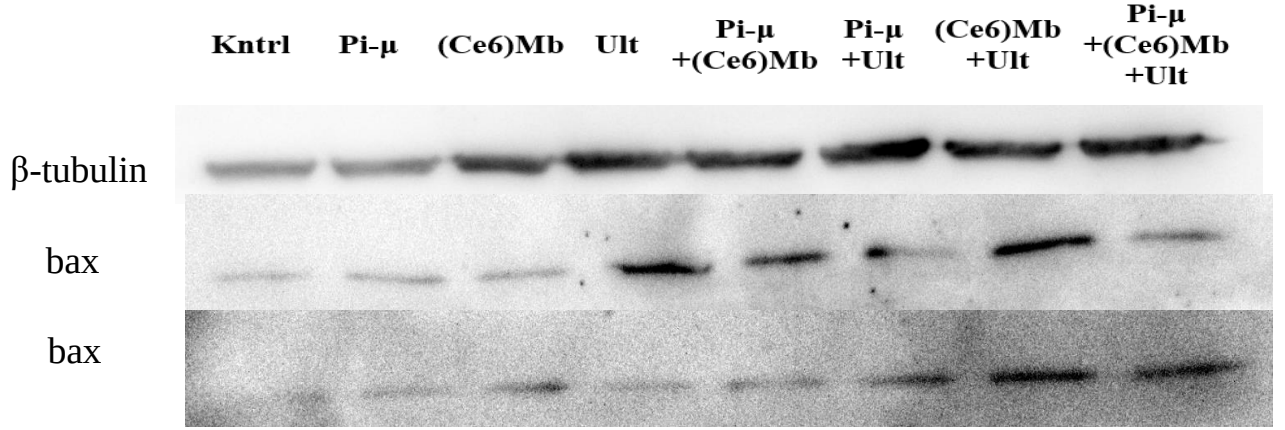
4.10. Western Blot Yöntemi ile Apoptotik Belirteçlerin İncelenmesi

Western blot analizi için hücre kültürü deney gruplarından elde edilen protein ekstratları içerisindeki Bax , hsp70, Bcl-2 ve Parkin protein ekspresyon seviyeleri belirlenmiş, ve bu ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılabilmesi için β -tubulin protein ekspresyonu kontrol (housekeeping) olarak kullanılmıştır. Elde edilen veriler Image J programı kullanılarak değerlendirilmiştir ve ortaya çıkan bant yoğunlukları β -tubulin ile oranlanarak elde edilen değerler bar grafiği şeklinde ifade edilmiştir.

Şekil 51’de hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen Bax ve β -tubulin protein ekspresyon düzeyi örnek jel görüntüsü görülmektedir. Şekil 50’de ise Bax/ β -tubulin protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasındaki değişimini gösteren bar grafiği verilmiştir. (Ce6)Mb+Ult grubu; kntrl ve salt (Ce6)Mb grubu ile karşılaştırıldığında Bax protein ekspresyonunun istatistiksel anlamlı olarak arttığı ($p<0,05$) görülmüştür (Şekil 50, Şekil 51).

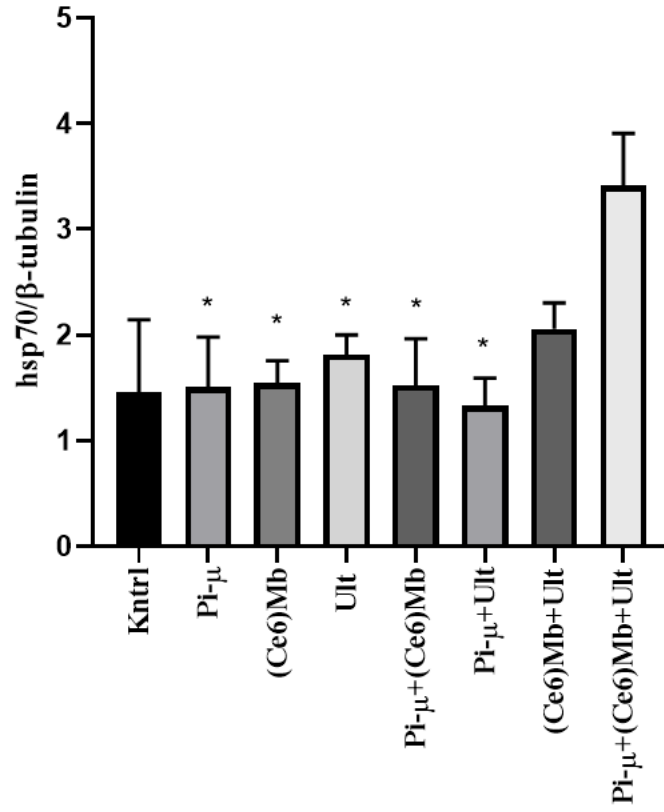


Şekil 50. Hücre kültürü deney gruplarından western blot yöntemiyle elde edilen Bax/ β -tubulin ekspresyon oranını gösteren bar grafiği. Kntrl grubuna göre istatistiksel anlamlılık * sembolü ile (Ce6)Mb grubuna göre istatistiksel anlamlılık † sembolü ile gösterilmiştir. Elde edilen verilere gruplandırılmamış t testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar * : $p \leq 0,05$; † : $p \leq 0,05$ şeklinde ifade edilerek istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte eklenmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

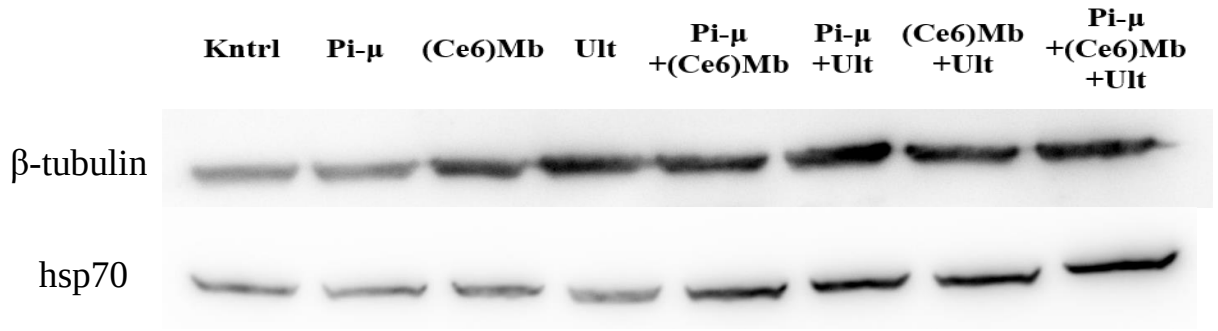


Şekil 51. Hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen Bax ekspresyonunu (23 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β-tubulin ekspresyonu (50 kDa).

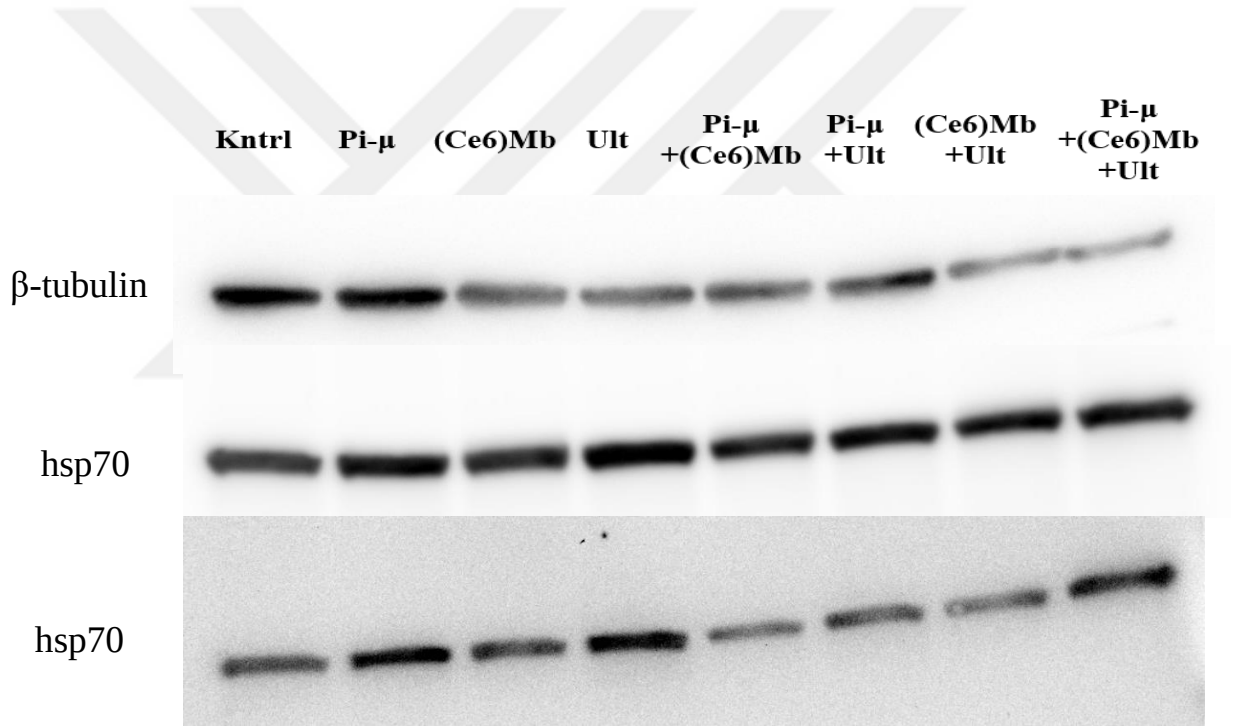
Şekil 53'te hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen hsp70 ve β-tubulin protein ekspresyon düzeyi örnek jel görüntüsü görülmektedir. Şekil 52'de ise hsp70/ β-tubulin protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasındaki değişimini gösteren bar grafiği verilmiştir. Pi-μ, Ult, Pi-μ+(Ce6)Mb ve Pi-μ+Ult grupları Pi-μ+(Ce6)Mb+Ult grubu ile karşılaştırıldığında hsp70 protein ekspresyonunun istatistiksel anlamlı olarak arttığı ($p<0,05$) görülmüştür (Şekil 52, Şekil 53).



Şekil 52. Hücre kültürü deney gruplarından western blot yöntemiyle elde edilen HSP70/ β -tubulin ekspresyon oranını gösteren bar grafiği. Pi- μ +(Ce6)Mb+Ult grubuna göre istatistiksel anlamlılık * sembolü ile gösterilmiştir. Elde edilen verilere gruplandırılmamış t testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar * : $p \leq 0,05$ şeklinde ifade edilerek istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte eklenmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.



Şekil 53. Hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen HSP70 ekspresyonunu (70 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β-tubulin ekspresyonu (50 kDa).

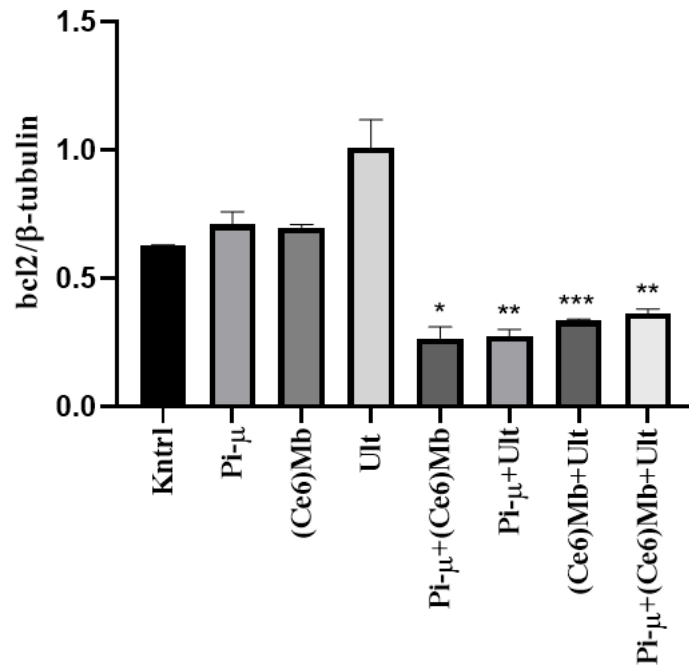


Şekil 54. Hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen HSP70 ekspresyonunu (70 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β-tubulin ekspresyonu (50 kDa).

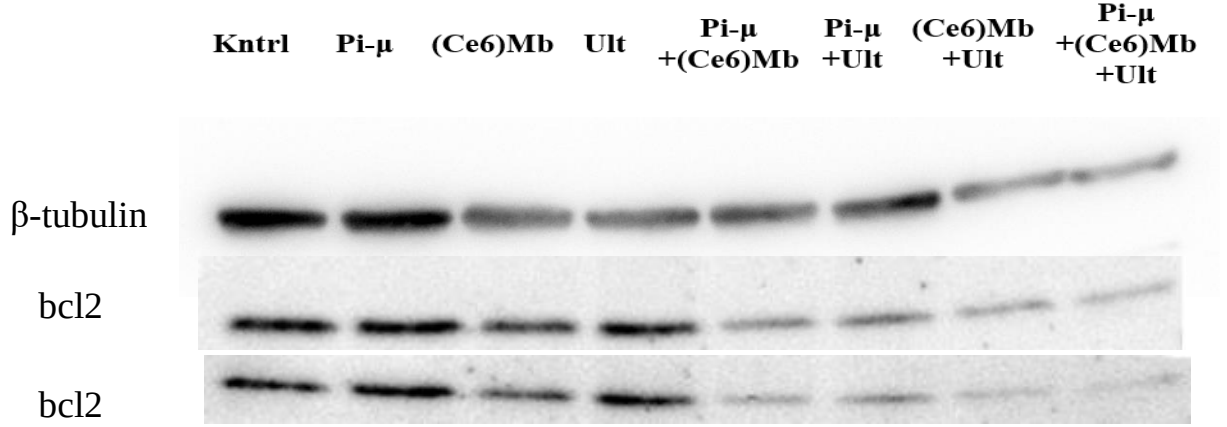
Şekil 56’da hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen Bcl2 ve β-tubulin protein ekspresyon düzeyi örnek jel görüntüsü görülmektedir. Şekil 55’te ise Bcl2/ β-tubulin protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasındaki değişimini gösteren bar grafiği verilmiştir. Pi-μ+(Ce6)Mb, Pi-μ+Ult, (Ce6)Mb+Ult ve Pi-μ+(Ce6)Mb+Ult grupları

Kntrl grubu ile karşılaştırıldığında Bcl2 protein ekspresyonunun istatistiksel anlamlı olarak azaldığı (* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$) görülmüştür (Şekil 55, Şekil 56).

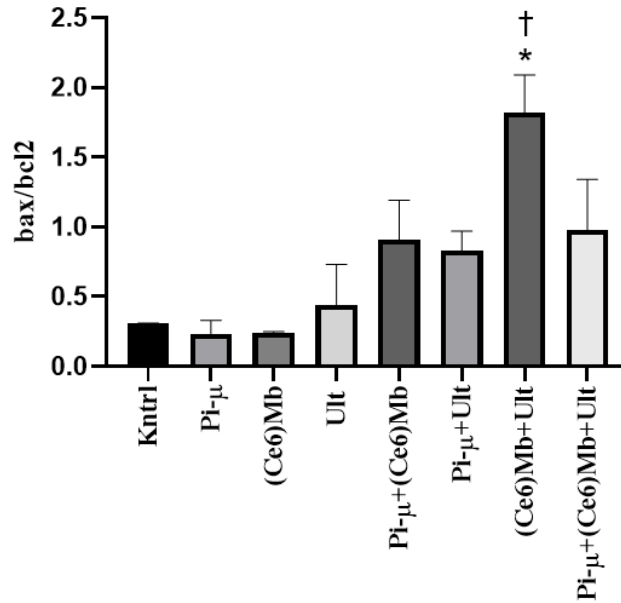
Şekil 57’de Bax/ Bcl2 protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasındaki değişimini gösteren bar grafiği verilmiştir. (Ce6)Mb+Ult grubu; kntrl ve salt (Ce6)Mb grubu ile karşılaştırıldığında Bax/ Bcl2 protein ekspresyonunun istatistiksel anlamlı olarak arttığı (* : $p \leq 0,05$; † : $p \leq 0,05$) görülmüştür (Şekil 57).



Şekil 55. Hücre kültürü deney gruplarından western blot yöntemiyle elde edilen Bcl2/β-tubulin ekspresyon oranını gösteren bar grafiği. Kntrl grubuna göre istatistiksel anlamlılık * sembolü ile gösterilmiştir. Elde edilen verilere gruplandırılmamış t testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$ şeklinde ifade edilerek istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte eklenmiştir. Tüm veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

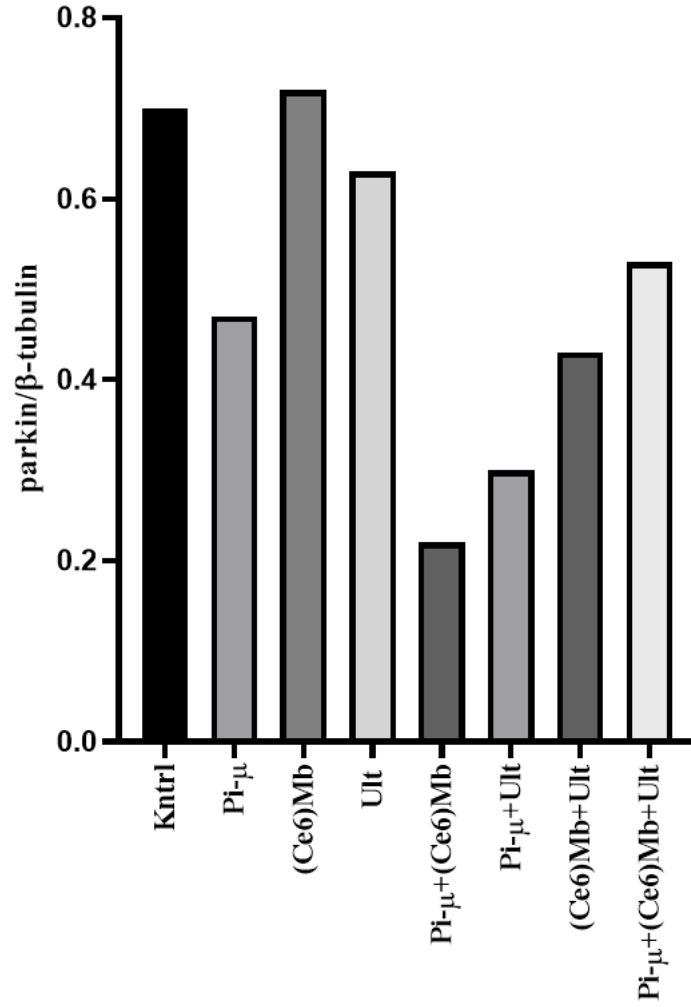


Şekil 56. Hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen Bcl2 ekspresyonunu (26 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β -tubulin ekspresyonu (50 kDa).

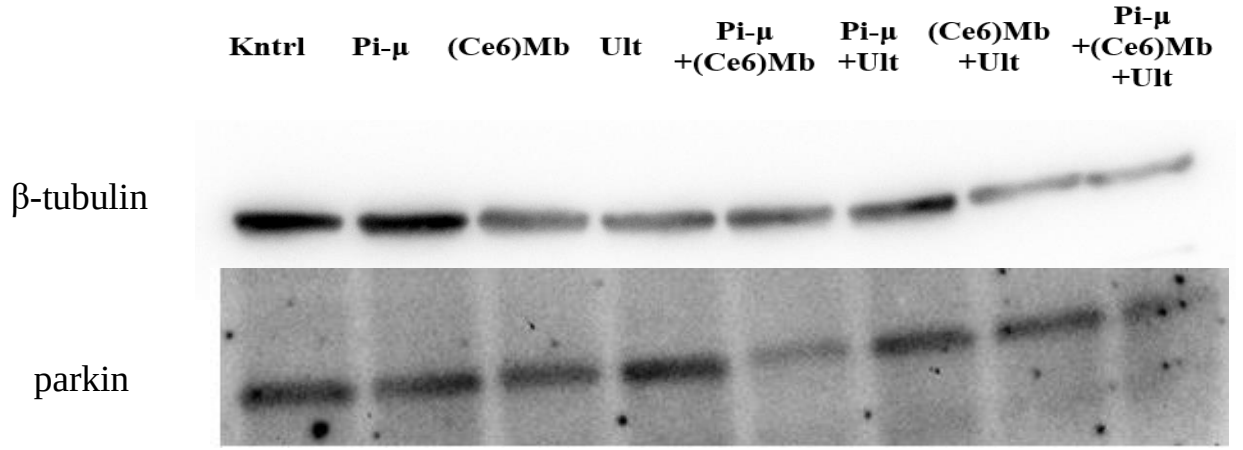


Şekil 57. Hücre kültürü deney gruplarından western blot yöntemiyle elde edilen Bax/Bcl2 ekspresyon oranını gösteren bar grafiği. Kntrl grubuna göre istatistiksel anlamlılık * sembolü ile (Ce6)Mb grubuna göre istatistiksel anlamlılık † sembolü ile gösterilmiştir. Elde edilen verilere gruplandırılmamış t testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlar * : $p \leq 0,05$; † : $p \leq 0,05$ şeklinde ifade edilerek istatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte eklenmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edilmiştir.

Şekil 59’de hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen parkin ve β -tubulin protein ekspresyon düzeyi örnek jel görüntüsü görülmektedir. Şekil 58’de ise parkin/ β -tubulin protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasındaki değişimini gösteren bar grafiği verilmiştir.

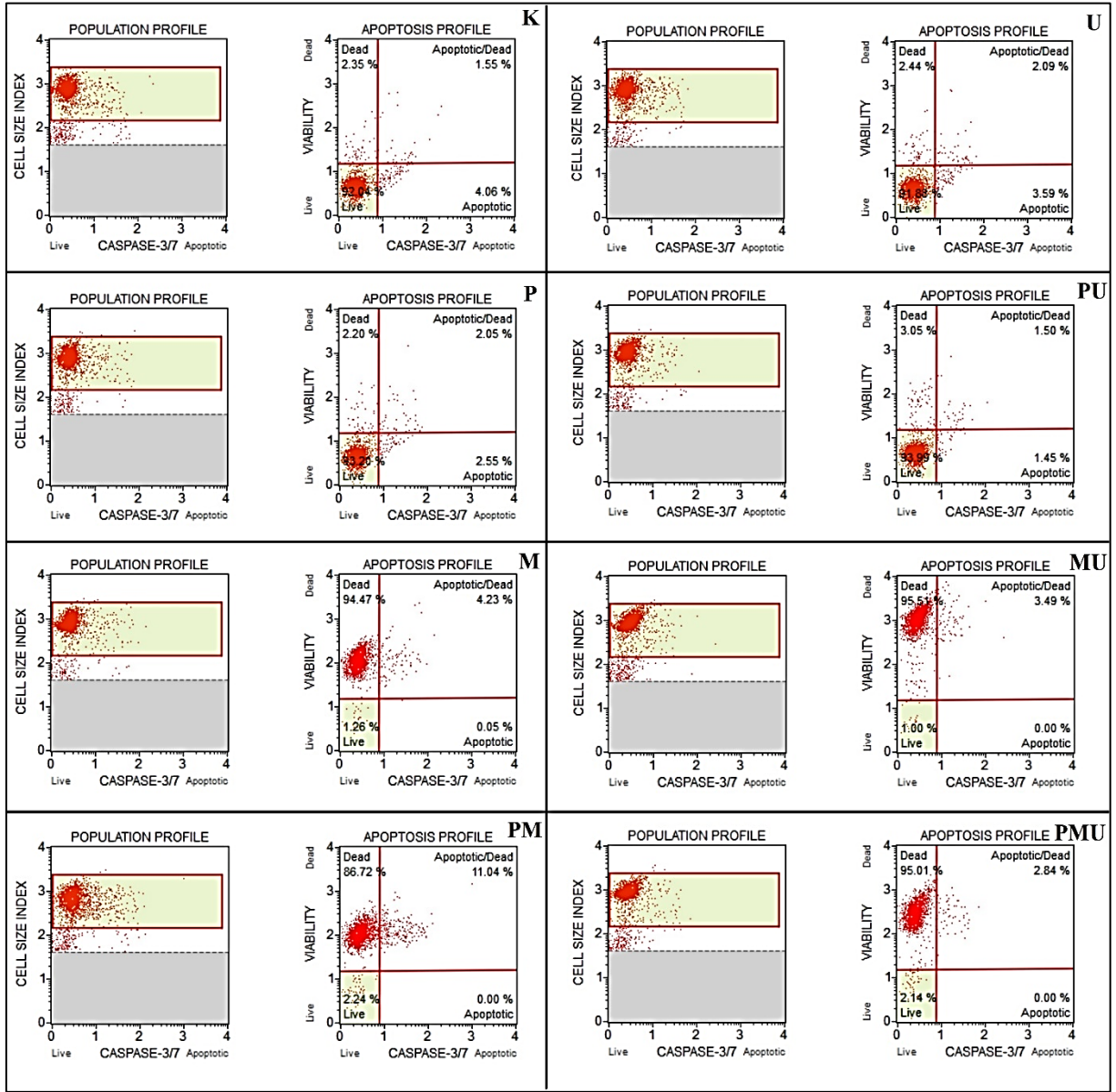


Şekil 58. Hücre kültürü deney gruplarından western blot yöntemiyle elde edilen parkin/ β -tubulin ekspresyon oranını gösteren bar grafiği.



Şekil 59. Hücre kültürü deney gruplarından Western blot yöntemiyle elde edilen parkin ekspresyonunu (55 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β -tubulin ekspresyonu (50 kDa).

4.11. Caspase 3-7 Analizi

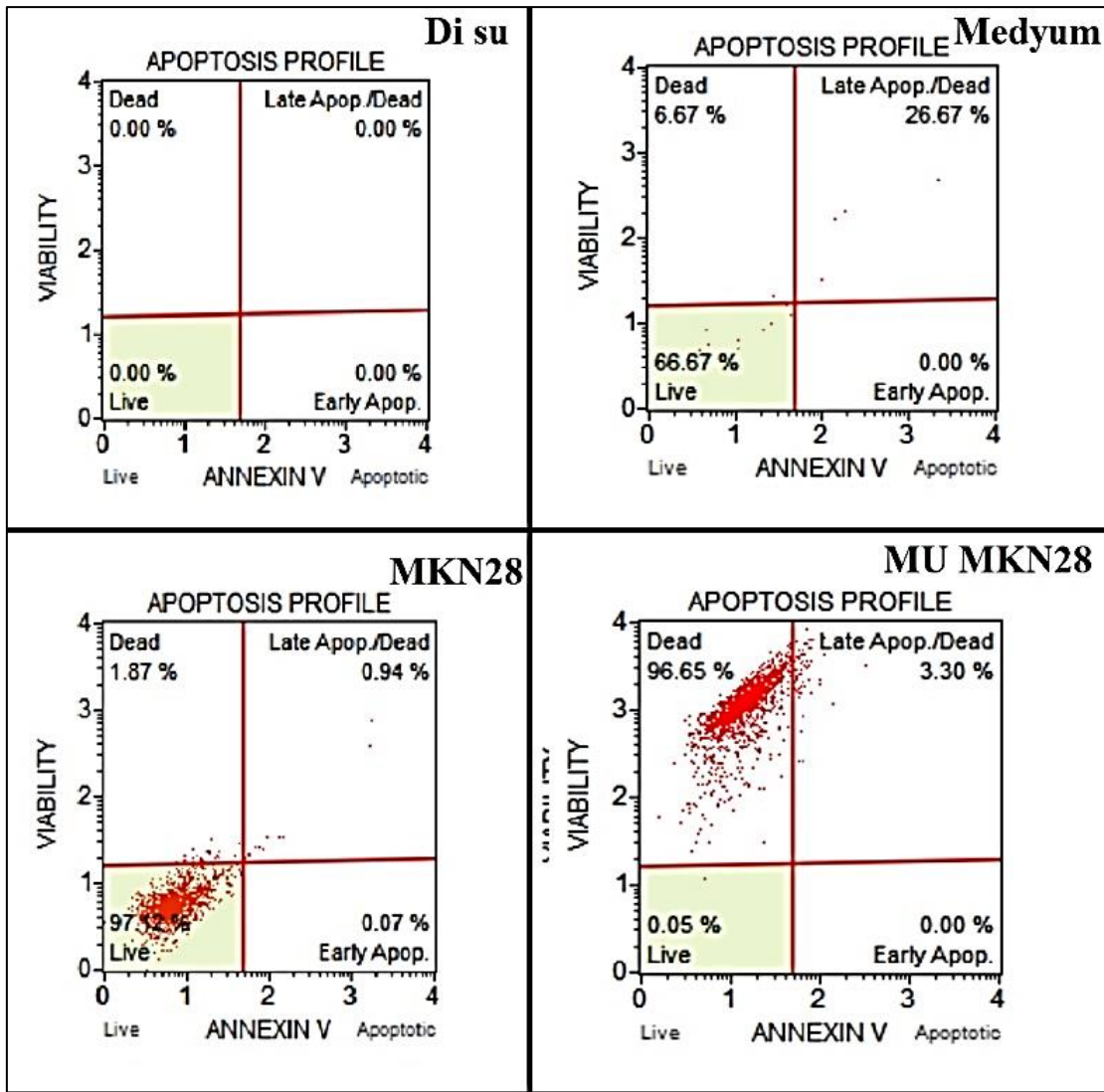


Şekil 60. Deney grupları arasında Caspas 3-7 aktivasyonu değişimleri incelenmiştir.

Elde edilen veriler incelenirken (Ce6)Mb bulunan tüm gruplarda hücre popülasyon profili apoptoza doğru kaymadığı halde bu gruplardaki hücrelerin apoptoz profilleri incelendiğinde %90'dan fazla ölü hücre olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 60). Bu veriler, daha önce yapılan hiçbir analiz (MTT, Crystal violet, Hoescht) ile örtüşmemektedir.

4.12. Annexin V ve Ölü Hücre Analizi

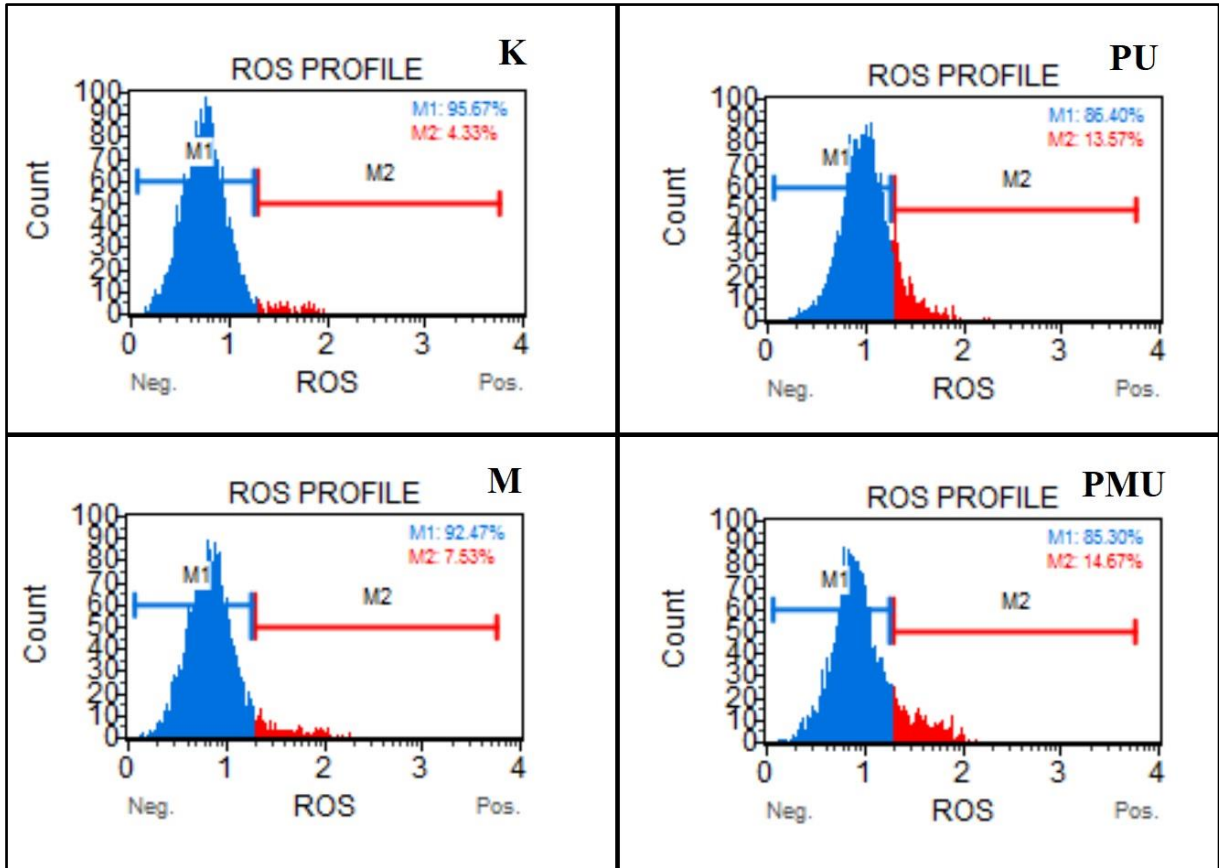
Caspase 3-7 testinde örtüşmeyen verilerin nedeninin belirlenmesi amacıyla yeni bir düzenek tasarlandı. Bu düzenekte gruplara Muse Cell Analyser kit içerikleri uygulanılmadan cihazda Annexin V ve Ölü hücre analizi sekmesinde okuma yaptırıldı. Elde edilen veriler incelendiğinde (Ce6)Mb grubunda %96'dan fazla ölü hücre bulunduğu gözlenmektedir fakat bu grup da dahil olmak üzere hiçbir gruba Annexin V ve Ölü Hücre Analiz kiti uygulanmadan bu veriler elde edilmiştir (Şekil 61).



Şekil 61. Tasarlanan deney gruplarının Muse Cell Analyser cihazındaki Annexin V ve Ölü hücre analizi sekmesinde okutularak elde edilmiş veriler.

Bu veriler değerlendirilirken Ce6'nın UV-Vis cihazından alınan spektrumdaki 600nm pik değeri göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca Muse Cell Analyser cihazının kullanım kitapçığı incelendiğinde ve tüm kitlerin kullanım kitapçıkları incelendiğinde cihazın apoptoz profilinde ölü dağılımında saydığı floresan ışımaya yapan boya 7AAD'dir ve bu boya Ce6 ile yakın dalgaboylarında ışımaya yapmaktadır.

4.13. Oksidatif Stress Analizi



Şekil 62. Gruplar arası ROS profillerinin değişimi incelenmiştir.

Veriler incelendiğinde kontrol grubundaki ROS miktarı %4,33 olarak elde edilirken bu değer (Ce6)Mb grubunda %7,53'e, Pi-μ+Ult grubunda %13,57'ye kadar artmaktadır. Kombine tedavi olarak adlandırdığımız Pi-μ+(Ce6)Mb+Ult grubu incelendiğinde ise ROS miktarının %14,67 olarak ölçüldüğü görülmektedir.

5.TARTIŞMA

Sonodinamik terapi (SDT), bir kanser tedavisi yöntemidir. Ortaya çıkışından bu yana yaklaşık 30 yıldır çalışılmaktadır. Yugo Araújo Martins ve arkadaşlarının 2021’de birçok araştırmayı inceleyerek yayınladıkları derlemede de özetlendiği üzere SDT kanser hücresi ölümü, ultrases dalgalarının fotoduyarlı ilaçla etkileşimi ile indüklenmektedir ve kavramsal olarak fotodinamik terapiye benzer şekilde tümör hücrelerine karşı oldukça toksik reaktif oksijen türleri oluşturmak üzere bir ilacı aktive etmek için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kanser tedavisi için ışık kullanımına kıyasla, ultrases uygulaması, ultrasesin hücreler üzerindeki mekanik etkisinden dolayı ultrases aracılı hücre geçirgenliği (veya sonoporasyon) ve ultrasonik dalgaların daha derine nüfuz etmesi gibi bazı avantajlar sunmaktadır ve bu geçirgenliğin ultrases frekansına bağlı olarak yumuşak dokularda 5 cm'ye kadar çıkabildiği bildirilmiştir (Costley ve diğerleri, 2015; Wan ve diğerleri, 2016).

Ultrases hedefli mikrokabarcık yıkımı, yeni bir tedavi yaklaşımı olarak solid tümör tedavisinde gelecek vaat eden bir araştırma alanı olmaktadır (Mayer ve ark., 2008). Bu yöntemde, mikrokabarcıklar hedeflenen tümör bölgesindeki damarlarda ultrasesle patlatılarak ilaç salınımının sınırlı bir alana odaklanması sağlanılmaktadır. Böylece ilaç ve ilaç taşıyıcı sistemlerin hedef bölgeye geçişi, penetrasyonu ve hücre içine alınması artmaktadır (Kooiman ve diğerleri, 2014; Lentacker ve diğerleri, 2014). Ayrıca ultrases enerjisinin üç boyutlu insan dokusuna odaklanabilme yeteneği, çevre dokuya zarar vermeden ilacın hedef bölgeye taşınması için ultrases aracılığıyla mikrokabarcıkların kullanılabilmesini mümkün kılmaktadır (Stride ve Saffari, 2003). Son yıllarda, mikrokabarcık tabanlı ultrases destekli ilaç salınımı için umut verici araştırmalar yapılmış ve ticari mikrokabarcık formları da geliştirilmiştir (Martin ve Dayton, 2013; Tsutsui ve diğerleri, 2004; Unga ve Hashida, 2014). Araştırmalarda mikrokabarcıkların lipozom vb. ilaç taşıma sistemlerine nazaran daha çok tercih edilmelerinin sebeplerine bakılacak olursa özellikle mikrokabarcıkların lipozomlara kıyasla daha fazla gaz ve ilaç yükleme kapasitesine sahip olduğu görülmektedir (Fix ve diğerleri, 2015). Lipozomların boyutsal olarak mikrokabarcıklara nazaran küçük olması avantaj gibi gözükmemektedir fakat lipozomlara gaz ya da ilaç yüklenmesi durumunda boyutlarının mikrokabarcık boyutlarına ulaştığı gözlenmektedir (Husseini ve diğerleri, 2014).

Heat şok protein 70 aile üyelerinin ise çeşitli tümörlerin ezici çoğunluğunda aşırı ifade edildiği ve bu proteinlerin aşırı ekspresyonun genellikle kötü prognozun bir belirtisi olarak kullanıldığı Murphy ve arkadaşlarının 2013 yılında yayınladığı derlemede çeşitli kaynaklarla birlikte verilmiştir (Murphy, 2013).

Bu üç muhtemel kanser tedavi yöntemi birleştirilerek tasarlanan araştırmamızda elde ettiğimiz veriler literatürdeki benzerleriyle karşılaştırılarak tartışılacak ve araştırmanın güçlü olduğu ya da yetersiz olduğu yönleri irdelenecektir.

Mekanik aktivasyon sonucunda elde edilen mikrokabarcıklar üzerinde farklı yöntemler uygulanarak mikrokabarcıkların hem boyutları hem de rakamsal olarak ml’de ne kadar bulunduğu hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda elde edilen DLS grafikleri incelendiğinde hem klorin içeren hem de boş DSPC mikrokabarcıkların yoğun olarak sayıldığı kabarcık boyutunun değişmediği ama sayılan kabarcık miktarı açısından irdelendiğinde klorin içeren kabarcıklarda rakamsal olarak azalma olduğu gözlenmiştir. Kabarcık boyutlarının hem ilaç içeren hem de boş kabarcıklarda aynı olması bir avantaj olarak bildirilebilir. İlaç içeren kabarcıklarda boyut artışı olmamış olması dolaşıma gönderilme ihtimali olan bir tedavi yöntemi olduğunun kanıtlarından birisi olarak düşünülebilir (Fix ve diğerleri, 2015; Husseini ve diğerleri, 2014). Rakamsal olarak ml’deki kabarcık sayısı açısından ilaç içeren ve içermeyen kabarcıklar yorumlanabilmek için literatür tarandığında bu verilerin kıyaslanabileceği herhangi bir araştırmayla karşılaşılmamıştır. Bu durumun nedenlerinin araştırılabilmesi adına farklı fotoduyarlı kimyasallarla da ölçümler alınarak değerlendirilmesi planlanılmaktadır.

Ayrıca DLS boyut ölçümleri (1-2 μ m) ile ImageJ boyut analizi sonuçları (1-5 μ m) karşılaştırıldığında DLS cihazından elde edilen DSPC mikrokabarcık boyutlarının daha küçük boyutlarda dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun sebebinin DLS ölçümü öncesinde mikrokabarcıkların içinde bulunduğu ortama uygulanan mini santrifüj olduğu düşünülmektedir. Literatür taraması yapıldığında mikrokabarcıkların boyutlarına göre ayrıştırılabilmesi için santrifüjün kullanıldığı görülmüştür. Feshitan ve arkadaşlarının 2009 ve Eric C. Abenojar ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladıkları verilere bakarak elde ettikleri lipid mikrokabarcıkları santrifüj işlemi ile 1-2 μ m ve 4-5 μ m şeklinde ayırdıklarını bildirmişlerdir. Thoma lamı ile hesaplamalar sonucunda ise 1ml stok solüsyonda 3×10^9 tane mikrokabarcık bulunduğu tespit edilmiştir. Bu boyut ve konsantrasyon ölçümleri, mikrokabarcık uygulamalarının yapıldığı daha önceki araştırmalarla uyumluluk

göstermektedir (Abenojar ve diğerleri, 2020; McEwan ve diğerleri, 2015; Omata ve diğerleri, 2019).

Kavitasyon ile ilgili nicel bilgi alabilmek adına deney düzeneğindeki belirli noktalardan belirli koşullarda kavitometre ile alınan veriler incelenmiştir. Ölçüm alınan lokasyonlar; su ortamını taşıyan falkon tüpün tepe noktasından (a), falkon tüpün üzerine yerleştirilen petri içindeki medyumun dip noktasından (b), falkon tüpün üzerine yerleştirilen petri içindeki medyuma boş DSPC mikrokabarcıklar eklenerek medyumun dip noktasından (c) ve falkon tüpün üzerine yerleştirilen petri içindeki medyuma klorin e6 yüklü DSPC mikrokabarcıklar eklenerek medyumun dip noktasından (d) olarak harflendirilmiştir. Alınan verilerin istatistiksel analizleri sonucunda ölçüm alınan belirli noktalarda kavitasyonda istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Kruskal-Wallis testi sonucunda c noktası a noktasına göre $p=0,024$; d noktası a noktasına göre $p=0,0024$ anlamlı bulunmuştur (Şekil 33). Bu durum viskozitenin artmasıyla orantılı artan kavitasyon verisi olarak karşımıza çıkmaktadır ve literatürle örtüşmektedir (Adewuyi, 2001). Ayrıca c ve d noktaları kendi içerisinde kıyaslandığında klorin e6 yüklü mikrokabarcıkların daha fazla kavitasyon etkisi oluşturuyor olması klorin e6 etkinliğini daha da artıran bir parametre olarak görülmelidir. Literatür tarandığında artan kavitasyon artan permeabilite (Chowdhury ve diğerleri, 2020) demek olduğundan daha fazla ilaç geçişi ile daha etkin tedavi sonuçları örtüşmektedir.

DSPC mikrokabarcıklar lipid bazlı kabarcıklardır ve literatüre bakıldığında hızla parçalanabilen lipid bazlı mikrokabarcıkların vektörel ilaç iletimi için tasarlanması açısından diğer lipitlere nazaran daha uygun oldukları ancak ilaç taşıma kapasitelerinin nispeten düşük olduğu belirtilmiştir (Sirsi ve Borden, 2009). Bu durumun önüne geçilen parametre ultrasesin hem kavitasyon etkisiyle hem de sonodinamik terapinin sonolüminesans ve piroliz etkisiyle tedavileri destekleyerek hali hazırda düşük molaritelerle yüksek etki sağlaması olmaktadır (Choi ve diğerleri, 2020). Literatürde ilaç birikiminin çoğunun, öncelikle damar sisteminin endotel lümeninde ve subluminal içzarında meydana geldiği ve bu durumun endotel tabakasının ötesinde yer alan hedefler için ilaç alımına yönelik önemli bir hız sınırlayıcı engel olduğu bildirilmiştir (Sirsi ve Borden, 2009). Fakat düşük frekanslarda rezonans duruma geçerek patlayan mikrokabarcıkların oluşturduğu kavitasyon etkisi sonucu artan membran permeabilitesi ile ilaç birikim lokasyonunun değişmesi, literatürle de desteklenen, tedavinin avantajına dönüştüren bir parametredir (Chowdhury ve diğerleri, 2020). Bizim araştırmamızda da bu literatür bilgileri baz alınarak 1MHz frekansta ultrases uygulanmıştır. DSPC lipid solüsyonun mekanik aktivasyonu sonrasında elde edilen mikrokabarcıklar ışık

mikroskobunda incelendiğinde gaz merkezlerini korumaktayken, 1MHz 3watt/cm² ultrases uygulanmış olan DSPC mikrokabarcıkların gaz merkezlerini kaybetmiş (patlamış) lipid damlacıklar haline dönüştüğü gözlenmiştir. Literatür tarandığında mikrokabarcıkların rezonans frekanslarına yakın olması için ultrases frekansı olarak düşük megahertz (örn. 1–5 MHz) değerler seçildiği görülmektedir (Chen ve Hwang, 2013; Papież ve Krzyściak, 2021).

UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi, agregasyon süreci araştırmaları için en çok kullanılan yöntemlerden biridir ve geleneksel olarak boya agregatları, monomer absorpsiyon pikinin konumuna göre agrega pikindeki değişimi gözlemleyerek H ve J tipi (maviye kayma ve kırmızıya kayma) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu nedenle, çözeltideki agregatlar genellikle monomerlere kıyasla absorpsiyon spektrumlarında önemli değişikliklere sahiptir (Wang ve diğerleri, 2020). Bu bilgiler ışığında elde edilen klorin e6 trisodyum salt çözeltisinin spektroskopik incelemesi yapılmak adına elde edilen UV-Vis spektrometre spekturumu incelendiğinde artan klorin e6 molaritelerine rağmen optik yoğunluğun pik yaptığı dalgaboyu değerlerinde kayma gözlenmemiştir ve artan klorin e6 molaritesiyle orantılı olarak artan bir optik yoğunluk ölçümü gözlenmiştir. Ayrıca ölçümü alınmış farklı molaritelerdeki klorin e6 çözeltilerini içeren küvetlerin ve blank olarak kullanılan küvetin yanyana bulunduğu görsel (Resim 9) incelendiğinde molarite artmasına rağmen berrak görüntünün kaybolmadığı gözlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda klorin e6 trisodyum salt çözeltisinde agregasyon oluşmadığı fakat farklı ölçümlerle de teyit edilmesi gereken bir bulgu olduğu düşünülmektedir.

Rhodamine emisyon filtresi dalgaboyu aralığı 582-595 nm şeklindedir (ZEISS, Filter Set for Fluorescence Microscopy). Daha önce UV-Vis Spektrometresinde ölçümü yapılan PBS'de çözünmüş klorin e6 trisodyum tuzunun 600 nm'de pik verdiğini gözlemlemiştik. Bu bilgiler ışığında DSPC lipid solüsyonuna klorin e6 eklenerek mekanik aktivasyonu gerçekleştirilip elde edilen mikrokabarcıkların gaz merkezinde klorin e6 varlığını tespit etmek adına alınan floresan invert mikroskop görüntüleri (Şekil 36) incelendiğinde Rhodamin filtresi altında elde edilen görüntüler ışık alan altında elde edilen görüntülerle örtüştürüldüğünde gaz merkezlerinde kırmızı floresan ışımaya görülmektedir. Hohyeon Lee ve arkadaşlarının 2018'de gerçekleştirdikleri araştırmada klorin e6 içeren mikrokabarcıkların klorin e6 içeriği benzer şekilde gösterilmiştir (Lee ve diğerleri, 2018).

Deney protokolüne karar verirken seçilen dozlara MTT testi ile karar verilmiştir. Seçilen dozlar literatürle de desteklenmiştir. Mtt canlılık testi ile gözlemlediğimiz klorin e6 doz denemeleri sonucunda literatürde de karşılığı bulunan 5 µM (3,3ng/ml) uygulama dozu

olarak belirlenmiştir (Huang ve diğerleri, 2015; Liu ve diğerleri, 2021; Park ve diğerleri, 2019). Uygulama süresi olarak da gece boyunca inkübasyon seçilmiştir. Pifithrin- μ için 5 μ M (Sekihara ve diğerleri, 2013) ve uygulama süresi olarak 48 saat seçilmiştir (Sekihara ve diğerleri, 2013). Pifithrin- μ uygulama süresi olarak 72 saat olan araştırma (McKeon ve diğerleri, 2016) da mevcuttur fakat pifithrin- μ uygulamasını takiben klorin e6 uygulaması ve ardından analizler yapılacağı için 48 saatlik pifithrin- μ uygulaması tedavi süresi olarak uygun görülmüştür. Pifithrin- μ 'nün doz denemelerinde elde edilen canlılık verilerine tedavi edici gücü açısından bakıldığında antitömür etkideki artışın literatür ile örtüştüğü görülmektedir (McKeon ve diğerleri, 2016; Sekihara ve diğerleri, 2013). Deney gruplarına uygulanan 5 μ M Pi- μ , mililitrede 0,9ng Pi- μ 'ye denk gelmektedir.

Ultrasesin 3-5 cm derinlikteki dokulara penetrasyonunun sağlanabilmesi için yaklaşık 1 MHz frekansında kullanıldığı, daha yüzeysel lezyonlarda ise yaklaşık 3 MHz frekansının daha uygun olduğu belirtilmektedir (Speed, 2001). Ayrıca mikrokabarcık destekli SDT araştırmalarında, genellikle ultrases frekansı 1 MHz olarak ayarlanmaktadır, çünkü bu frekansın standart mikrokabarcık formülasyonlarında ($\pm$ 3 μ m boyutunda) bulunan kabarcıkların rezonans frekansı ile uyumlu olduğu daha önceki araştırmalarda bildirilmiştir (Roovers ve diğerleri, 2019). Bu iki parametre göz önünde bulundurularak bizim araştırmamızda da frekans hem mikrokabarcıkları patlatabilmek için hem de ileride tedavi amaçlı kullanılmak istenirse penetrasyon yeteneğinin daha iyi olduğu frekans olan 1MHz seçilmiştir. Sonodinamik terapide genellikle canlı hücreler üzerinde termal veya mekanik etkiler oluşturmayacak, güvenli kabul edilen düşük yoğunluklu ultrases (0,5-4 W/cm²) kullanılmaktadır (Serpe ve diğerleri, 2012). Bizim araştırmamızda da güç yoğunluğu olarak 3Watt/cm² kullanılmıştır. Güç yoğunluğu ve frekans sabit kalacak şekilde süre ve puls parametreleri değiştirilerek elde edilen canlılık verileri incelendiğinde artan puls ve artan süre MKN28 hücre canlılığını azaltıcı etki göstermiştir. 30 saniye ve %20 puls ultrases uygulamasından daha fazla ultrases uygulanan gruplarda hücre canlılığının %15'den daha fazla azaldığı hesaplanmıştır. Bu nedenle tedavi gruplarında ultrases süresi ve puls düzeyi olarak 30 saniye %20 puls uygulaması seçilmiştir.

Literatürde pifithrin- μ gibi HSP70 inhibitörü olarak kullanılabilinen quercetin molekülünün MKN28 hücre canlılığında sitotoksik etkisinin gözlenebilmesi için pifithrin- μ ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Sekihara ve diğerleri, 2013; Yang ve diğerleri, 2016). Elde edilen MTT verileri (Şekil 47) incelendiğinde x μ M pifithrin- μ kullanımına, 5x μ M quercetin kullanımının yüzde hücre canlılığı verisi açısından denk veriler verdiği gözlenmiştir. Sekihara ve arkadaşlarının 2013 araştırmaları incelendiğinde 3 farklı prostat

kanseri hattında pifithrin- μ 'nün antitümör aktivitesinin quercetine nazaran 10 kat daha etkili olduğu sonucu bulunurken araştırmamızda mide hücre hattında 5 kat daha fazla etkili olduğu bulunmuştur (Sekihara ve diğerleri, 2013).

Tüm tedavi parametreleri belirlendikten sonra deney gruplarında MTT, crystal violet gibi canlılık testleri ile hoestht boyama ve western blot yöntemi ile apoptotik belirteçlerin incelenmesi amaçlanmıştır. MTT canlılık testi verileri incelendiğinde bütün tedavi grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Tedavi grupları arasında hücre canlılığı yüzdesinin en düşük bulunduğu grup pifithrin- μ uygulanan gruba klorin e6 yüklü mikrokabarcıklarla birlikte ultrases uygulandığı grup olmuştur (Şekil 44). Nomikou ve diğer araştırmacıların yaptığı araştırmada da bizim araştırma sonucumuza benzer şekilde, sonoduyarlı bir ajanın mikrokabarcık eşliğinde uygulanmasının, yalnızca sonoduyarlı ajanın kullanılmasına göre daha fazla singlet oksijen oluşumuna yol açtığı ve bu nedenle sitotoksik etkisinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca McEwan ve arkadaşlarının 2016 yılı araştırmaları incelendiğinde, in vitro pankreas kanser hücreleri üzerinde yaptıkları araştırmada SDT'nin, 5-Fluorouracil kemoterapötik ajanı ve oksijen yüklü mikrokabarcık kombinasyonu ile birlikte uygulandığında, yalnızca SDT veya yalnızca 5-Fluorouracil tedavisine kıyasla tümör hücre canlılığında anlamlı bir azalma verisi elde ettikleri görülmektedir. Deney gruplarının cristal viyole boyaması sonrasında alınan görüntülerin istatistiksel analizi sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında klorin e6 yüklü mikrokabarcıklarla birlikte ultrases uygulandığı grup ve pifithrin- μ uygulanan gruba klorin e6 yüklü mikrokabarcıklarla birlikte ultrases uygulandığı grup $p < 0.0001$ istatistiksel anlamlı bulunmuştur (Şekil 45). Bu veriler MTT canlılık testi sonuçlarıyla örtüşmektedir.

Hoescht boyaması ile PI boyaması birlikte uygulanarak canlı ölü hücre ayrımı yapılması planlanmaktaydı fakat PI floresan ışımalarının görüldüğü Rhodamine filtresinde görüntü alınan klorin e6 yüklü mikrokabarcıklar uygulanmış (canlı olduğu MTT ile gösterilmiş) gruplarda hücreler ölü olarak tespit edilmiştir. Bu verilerin MTT ve crystal violet boyama verileri ile örtüşmediği tespit edilmiş ve bu duruma neden olan ışımının klorin e6'dan kaynaklanan ekstra ışımaya olduğu düşünülmüştür. Bu düşüncüyü destekleyen veriler hem UV-Vis klorin e6 spektrumu hem Muse Cell Analyzer cihazından elde edilmiş veriler hem de mikrokabarcık içi klorin e6'nın Rhodamine filtresinde tespitinin sağlanmış olması örnek olarak gösterilebilir. Bu durumun aksi verileri Liang Hong ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladıkları araştırma gösterilebilir fakat bu araştırmada klorin e6 ile hücrelerin inkübasyon süresi 2 saat hücre hattı ise PC-3 ve Hela hücreleri iken bizim araştırmamızda klorin e6 inkübasyonu gece boyunca ve

hücre hattı MKN28'dir. Tüm bu farklılıklar klorin e6'nın floresan mikroskop Rhodamine filtresinde ışımalarının gözlenmesine sebep olmuş olabilir. Archana ve arkadaşlarının birçok literatür tarayarak elde ettikleri verilerle 2013 yılında yayınladıkları derleme incelendiğinde hücre çekirdeğindeki DNA'ya bağlanan floresan bir boya olan Hoechst 33258 ile boyanan hücrelerde erken apoptozdaki hücre çekirdeklerinin kontrollerden daha parlak olduğu görülmüştür. Bu ayrım göz önünde bulundurularak deney gruplarının Hoechst boyama ile preapoptotik hücrelerin Hoescht ışımalarının sonucunda elde edilen veriler incelenecek olursa kontrol grubuna ait hücrelerde çok nadir olarak apoptotik hücreler görülmüş, hücrelerin büyük çoğunluğu canlı olarak gözlenmiştir. Aynı şekilde klorin yüklü DSPC Mikrokabarcık uygulanan grup hücrelerinin de büyük oranda canlı hücrelerden oluştuğu görülmektedir. Ultrases uygulanan ve pifithrin- μ +klorin e6 yüklü DSPC mikrokabarcık uygulanan gruplarda bulunan hücrelerin apoptotik cisimcikleri $p \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel anlamlı bulunmuştur. Geriye kalan tüm gruplarda apoptotik cisimcikleri $p \leq 0,001$ düzeyinde istatistiksel anlamlı bulunmuştur. Ultrases, pifithrin- μ ve klorin e6 yüklü DSPC mikrokabarcıkların birlikte uygulandığı grupta bulunan hücrelerin apoptotik cisimciklerinin yoğunluklarının ciddi oranda arttığı gözlenmiştir (Şekil 48). Bu veriler değerlendirilirken hoechst boyama sonucunda elde edilen tüm verilerdeki hücrelerin, uygulamalar sonunda sağ kalan hücreler üzerinden hesaplandığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Hücre kültürü deney gruplarından apoptotik ve anti-apoptotik yolak aktivasyonu hakkında bilgi edinebilmek için Bax ve Bcl-2 protein ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bcl2 ve Bax, tümör süpresör protein p53 hedefleridir (Kumar ve diğerleri, 2016). DNA hasarına tepki olarak, Bcl2'nin transkripsiyonu bastırılır ve Bax indüklenir (Kumar ve diğerleri, 2016). Mitofajik yolak aktivasyonu hakkında bilgi edinebilmek için ise Parkin protein ekspresyon seviyesi incelenmiştir. Parkin proteini, disfonksiyonel mitokondrilerin ortadan kaldırılmasını sağlayan mitofajik yolak aktivasyonu ile ilgili bilgi veren bir proteindir (Dodson ve Guo, 2007). Pifithrin- μ etkinliği hakkında bilgi alabilmek için ise hsp70 protein ekspresyon seviyesi incelenmiştir. Bax/Bcl-2 ekspresyon oranı literatürde, apoptotik aktivasyon derecesinin belirlenmesinde önemli bir faktör olarak nitelendirildiği için bu oran da incelenmiştir (Ouyang ve Giffard, 2004; Wei ve diğerleri, 2005; Li ve diğerleri, 2019).

(Ce6)Mb+Ult grubu; kntrl ve (Ce6)Mb grubu ile karşılaştırıldığında Bax protein ekspresyonunun istatistiksel anlamlı olarak arttığı ($p < 0,05$) görülmüştür (Şekil 50, Şekil 51). Pi- μ +(Ce6)Mb, Pi- μ +Ult, (Ce6)Mb+Ult ve Pi- μ +(Ce6)Mb+Ult grupları Kntrl grubu ile karşılaştırıldığında Bcl2 protein ekspresyonunun istatistiksel anlamlı olarak azaldığı (*: $p \leq$

0,05; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$) görülmüştür (Şekil 55, Şekil 56). (Ce6)Mb+Ult grubu; kntrl ve (Ce6)Mb grubu ile karşılaştırıldığında Bax/ Bcl2 protein ekspresyonunun istatistiksel anlamlı olarak arttığı (*: $p \leq 0,05$; †: $p \leq 0,05$) görülmüştür (Şekil 57). Ultrases ile oluşturulan lüminesansla uyarılan klorin e6 yüklü mikrokabarcıkların çökmesi sonucunda mide kanseri hücrelerinde Bax protein ifadesinin artışına, Bcl2 protein ifadesinin azalışına sebep olmuştur. Bu durum kanser hücrelerinin apoptoza yöneldiğinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Sekihara ve arkadaşlarının 2013 araştırması incelendiğinde hsp70 proteinlerinin siRNA ile susturulması ve pifithrin- μ ile inhibisyonu sonucunda hsp70 ifadeleri kontrol grubuyla kıyaslandığında siRNA ile susturulması sonucunda hsp70 ifadesinde azalma gözlenirken pifithrin- μ ile inhibisyonu sonucunda hsp70 ifadesinde azalma gözlenmediği ifade edilmiştir. Benzer şekilde Leu ve arkadaşları 2009 araştırmalarında pifithrin- μ ile inhibisyonu sonucunda hsp70 ifadesinde azalma gözlenmediğini ifade etmişlerdir. Bu durum incelenirken pifithrin- μ 'nün hsp70 proteininin substrat bağlanma domainine bağlandığı ve sonuç olarak hsp70 ifadesini etkilemeyeceği fakat ifade edilen hsp70 proteinlerine substrat bağlanarak başlatılan süreçlerin başlatılamayacağı yani hsp70 proteini ortamda varken bile fonksiyonunun inhibe olduğu düşünülmektedir. Bizim araştırmamızda da pifithrin- μ uygulanan gruplarda hsp70 ekspresyonunda anlamlı azalış gözlenmemiştir. Fakat pifithrin- μ uygulanan gruba klorin e6 yüklü mikrokabarcıklarla birlikte ultrases uygulandığı grup pifithrin- μ uygulanan grup, ultrases uygulanan grup, pifithrin- μ ile birlikte ultrases uygulanan grup ve pifithrin- μ uygulanan gruba klorin e6 yüklü mikrokabarcıkların uygulandığı gruplar ile karşılaştırıldığında hsp70 protein ekspresyonunun istatistiksel anlamlı olarak arttığı ($p < 0,05$) görülmüştür (Şekil 52, Şekil 53). Hsp70 proteini stres ortamında daha fazla ifade edildiğinden bu artışın sebebinin pifithrin- μ , klorin e6 yüklü mikrokabarcıkların ve ultrasesin birlikte oluşturduğu stres olduğu düşünülebilir.

Caspase 3-7 analizinden elde edilen veriler incelenirken klorin e6 yüklü mikrokabarcıklar bulunan tüm gruplarda hücre popülasyon profili apoptoza doğru kaymadığı halde bu gruplardaki hücrelerin apoptoz profilleri incelendiğinde %90'dan fazla ölü hücre olduğu gözlenmiştir (Şekil 60). Bu veriler, daha önce yapılan canlılık analizi verileri (MTT, Crystal violet, Hoescht) ile örtüşmemekte iken floresan invert mikroskopta PI boyama ile ölü hücre tayini sırasında yaşanan durum ile örtüşmektedir. Örtüşmeyen verilerin nedeninin belirlenmesi amacıyla tasarlanan düzenekte gruplara Muse Cell Analyser kit içerikleri uygulanmadan cihazda Annexin V ve Ölü hücre analizi sekmesinde okuma yaptırılmıştır. Elde edilen veriler incelendiğinde klorin e6 yüklü mikrokabarcıklar uygulanan grupta

%96'dan fazla ölü hücre bulunduğu gözlenmektedir fakat bu grup da dahil olmak üzere hiçbir gruba Annexin V ve Ölü Hücre Analiz kiti uyulanmadan bu veriler elde edilmiştir (Şekil 61). Bu veriler değerlendirilirken klorin e6'nın UV-Vis cihazından alınan spektrumdaki 600 nm ve 650nm pik değerleri, Rhodamine filtresinde ışımasının gözlemlendiği ve aynı şekilde rhodamine filtresi altında mikrokabarcık içeriğinde gözlenmiş olması gibi alınan veriler göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca Muse Cell Analyser cihazının kullanım kitapçığı incelendiğinde ve tüm kitlerin kullanım kitapçıkları incelendiğinde cihazın apoptoz profilinde ölü dağılımında saydığı floresan ışıma yapan boya 7AAD'dir ve bu boya klorin e6 ile yakın dalgaboylarında ışıma yapmaktadır. Bu nedenle araştırmamızda Muse Cell Analyser cihazı kullanılarak yapılan incelemelerden elde edilen sonuçlarda güvenilir veri elde edilememiştir.

Gruplar arası ROS miktarı incelendiğinde kontrol grubundaki ROS miktarı %4,33 olarak elde edilirken bu değer klorin e6 yüklü mikrokabarcıklarla birlikte ultrases uygulanan grupta %7,53'e, pifithrin- μ ile birlikte ultrases uygulanan grupta %13,57'ye kadar artmaktadır. Kombine tedavi olarak adlandırdığımız pifithrin- μ uygulanan gruba klorin e6 yüklü mikrokabarcıklarla birlikte ultrases uygulandığı grup incelendiğinde ise ROS miktarının %14,67 olarak ölçüldüğü görülmektedir. Mikrokabarcıkların kavitasyon etkisi sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) ürettiği ve bu mikrokabarcık kaynaklı ROS'un hücre zarının bütünlüğünü bozduğu bildirilmiştir (Juffermans ve diğerleri, 2008; Lariccia ve diğerleri, 2011; VanBavel, 2007). Bu kaynaklardaki veriler düşünüldüğünde pifithrin- μ uygulanan gruba klorin e6 yüklü mikrokabarcıklarla birlikte ultrases uygulandığı gruptan elde edilen ROS yüzdesinde %1'den fazla olmayan artışın sebebinin düzenlenen deney protokolü ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Fanxing Zeng ve arkadaşlarının 2014 araştırması incelendiğinde pifithrin- μ uygulamasını takip eden saatlerde ROS seviyelerinin ölçüldüğü ve en çok ROS seviyesinin uygulamayı takip eden 8. saate denk geldiği görülmektedir. Bizim araştırmamızda ise gruplar arası ROS tayini uygulamalardan 24 saat sonra yapılmıştır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda gruplar arası ROS seviyelerinin incelenebilmesi için öncesinde metodun standardize edilmesi gerekliliğini doğurmaktadır.

Jide He ve arkadaşlarının yayınladığı derleme makale incelendiğinde mikrokabarcıkların oluşturduğu kavitasyon etkisiyle veya patlaması sonucunda hücre zarında ve kan damarı duvarında permeabilitenin oluşan geçici porelar ile arttığı kaynaklar bulunduğu görülmüştür. Bu geçici ve tersine çevrilebilir kanalların maddelerin taşınmasını sağlayacağı ve böylece terapi ajanlarının hücreye pasif olarak girebileceği belirtilmiştir (He ve diğerleri, 2022). Bu araştırmada gözlenen klorin e6 yüklü mikrokabarcıklarla birlikte ultrases

uygulanan gruplarda kontrole kıyasla hücre canlılığındaki istatistiksel anlamlı oranda elde edilen azalma (MTT, crystal viyole boyama), apoptotik belirteçlerin istatistiksel anlamlı oranda artışı (Hoescht boyama), Bax proteininin ifadesindeki istatistiksel anlamlı oranda artışı, Bcl2 proteininin ifadesindeki istatistiksel anlamlı oranda azalış ve Bax/Bcl2 (Western Blot) oranındaki istatistiksel anlamlı oranda artışını ultrases ile mikrokabarcıkların patlaması sonucunda artan permeabilite sonucunda mikrokabarcık içerisinde ulaştırılmış olan klorin e6'nın daha etkin olmuş olması ile açıklanabilir.

Mikrokabarcıklar ve ultrasesin kombinasyonu yakın zamanda hastalar üzerinde dolaylı ilaç iletimi için klinik ortamlarda test edilmiştir. Dimcevski ve ark. 2016 yılında ileri evre pankreas kanserli 10 hastanın tedavisinde sistemik olarak uygulanan gemsitabinin etkisinin lokalize ultrases ve intravenöz mikrokabarcık uygulaması ile arttığı gösterilmiştir. Ksenograft pankreas kanseri olan farelerde yapılan benzer bir preklinik araştırma, gemsitabin mikrokabarcık destekli sonoporasyon ile birleştirildiğinde tümör çapında önemli bir azalma ve ortalama hayatta kalma süresinde %10'luk bir artış gösterilmiştir (Kotopoulos ve diğerleri, 2013). Ayrıca sonoporasyon ile birlikte doksorubisinin etkileri glioblastoma hastalarında ilk kez araştırılmakta ve bu araştırmanın sonuçları merakla beklenmektedir (Carpentier ve diğerleri, 2016).

Özetle araştırmamızda, literatürle uyumlu boyutta ve kararlılıkta mikrokabarcıklar elde edilmiştir ve mikrokabarcıklara klorin e6 yüklendiği gösterilmiştir. Kaviteasyon etkisinin, klorin e6 içeren mikrokabarcıklara ultrases uygulanmasıyla arttığı gösterilmiştir. Artan kaviteasyon ve heat şok proteininin inhibe olmuş olması Bax protein ifadesinin artmasına, Bcl2 protein ifadesinin azalmasına, hücre ölümünün artmasına ve erken apoptoz verilerinin artmasına sebep olmuştur.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde edilen mikrokabarcık boyutlarının hem ilaç içeren hem de boş mikrokabarcıklarda aynı olması, dolaşıma gönderilme ihtimali olan bir tedavi yöntemi olduğunun kanıtlarından birisi olarak düşünülmüştür. Kaviteasyon ölçümleri sonucunda ilaç içeren mikrokabarcıkların ortama gönderilmesini takiben ultrases uygulamasında elde edilen artan kaviteasyon verisi olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu durumun permeabiliteyi ilaç tedavi başarısını artıracak şekilde etkileyeceğini düşündürmüştür. Hazırlanan klorin e6 trisodyum salt çözeltisinde agregasyon oluşmadığı gözlenmiştir. Mikrokabarcıkların gaz merkezinde klorin e6 varlığı tespit edilmiştir. Mide kanseri hücrelerinde pifithrin- μ 'nün antitümör aktivitesinin quercetine nazaran 5 kat daha etkili olduğu sonucu bulunmuştur. Heat şok protein 70 inhibisyonunu takiben klorin e6 yüklü mikrokabarcıklarla birlikte ultrases uygulamasının mide kanseri hücrelerini istatistiksel anlamlı düzeyde öldürdüğü görülmüştür. Heat şok protein 70 inhibisyonunu takiben klorin e6 yüklü mikrokabarcıklarla birlikte ultrases uygulamasının mide kanseri hücrelerinde apoptotik cisimciklerinin yoğunluklarının istatistiksel anlamlı düzeyde arttırdığı yani mide kanseri hücrelerinin programlı hücre ölümü sürecinde oldukları gözlenmiştir. Ultrases ile oluşturulan lüminesansla uyarılan klorin e6 yüklü mikrokabarcıkların çökmesi sonucunda mide kanseri hücrelerinde Bax protein ifadesinin artışı, Bcl2 protein ifadesinin azalışı şeklinde elde edilen veri sonucunda mide kanseri hücrelerinin apoptoza yöneldiği sonucuna varılmıştır. Elde edilen tüm veriler irdelendiğinde artan permeabilite olduğu ve bu oluşan permeabilite sonucunda mikrokabarcık içerisinde ulaştırılmış olan ilacın tedavi etme yeteneğinin artmış olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak tüm bu veriler ışığında klorin e6 yüklü mikrokabarcıklarla birlikte ultrasesin uygulanması sonucunda sonodinamik terapi etkinliğinin arttığı, bu artan etkinin heat şok protein inhibisyonuyla birlikte daha da arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Bu araştırmadan elde edilen veriler ışığında yapılacak yeni araştırmalar planlanırken dikkat edilebilecek ve eklenebilecek öneriler aşağıda sıralanmıştır.

Deney düzeneği kapsamında kullanılan klorin e6 yüklü mikrokabarcıkların teorik hesaplamalar sonucunda istenilen molaritede klorin e6 taşıdığı varsayımıyla yola çıkılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. HPLC yöntemi ile teorikte hesaplanan molarite ile pratikte elde

edilen klorin e6 içeren mikrokabarcıkların içerdiği molarite karşılaştırılarak deney protokolü daha standardize hale getirilebilir.

Diğer floresan ve kemilüminesan singlet oksijen saptama reaktiflerinin aksine, Singlet Oksijen Sensör Green, singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) için oldukça seçicidir; hidroksil radikali ($\text{HO}\bullet$), süperoksit ($\bullet\text{O}_2^-$) ve nitrik oksit (NO) dahil olmak üzere diğer reaktif oksijen türlerine karşı kayda değer bir tespit özelliği göstermekte olan bir tespit molekülüdür. Singlet oksijen ile reaksiyondan önce, bu molekül başlangıçta 372 ve 393 nm'de uyarma tepe noktaları ile 395 ve 416 nm'de emisyon tepe noktaları ile zayıf mavi floresan sergiler. Bununla birlikte, singlet oksijen varlığında yeşil flüoresans yayar (uyarma/emisyon maksimumu $\sim 504/525$ nm). Singlet Oksijen Sensör Green'in bu özellikleri floresan yoğunluk ölçümü ile deney grupları arasındaki singlet oksijen tespitinin nicel boyutta gerçekleştirilmesini sağlayacaktır. Ayrıca Ce6 varlığında elde edilen kırmızı floresandan kaynaklı yaşanan sıkıntılar da floresan yoğunluk ölçümü yeşil alanda yapılacağı için oluşmayacaktır.

UV-Vis ölçümlerinden elde edilen klorin e6 spektrumlarına bakıldığında tepe dalgaboyu değerlerinde kayma söz konusu değildir ve her artan molariteye karşılık tepe değerlerinde elde edilen optik yoğunluk değerleri de orantılı olarak artmaktadır. Bu veriler klorin e6 çözeltisinde agregasyon olmadığını düşündüren göstergelerdir fakat bu bilgiler daha farklı yöntemlerle de desteklenmelidir.

Mekanik aktivasyon ile elde edilen mikrokabarcıkların boyutlarının belirli bir aralıkta dağıldığı gözlenmektedir. Bu durum uygulama esnasında hücrelere verilen mikrokabarcık sayısından, mikrokabarcık içi klorin e6 miktarına kadar birçok durum için standartlaştırılması gereken bir parametredir. Bu nedenle mekanik aktivasyon ile elde edilen mikrokabarcıkların boyutlarının ayrıştırılması için santrifüj cihazından yardım alınabilir. Santrifüjde farklı dönüş açıklıkları ve farklı hızlarda mikrokabarcıkların boyut olarak ayrışacakları düşünülmektedir.

Elde edilen mikrokabarcık boyutu ne kadar küçük olursa venöz dolaşıma verildiğinde okadar avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle 4000devir/sn orbital çalkalayarak mekanik aktivasyonunu sağladığımız mikrokabarcıkların çapları daha küçük değerlere düşürülebilir mi acaba düşüncesiyle yola çıkarak devir/sn parametreleri değiştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abenojar, E. C., Bederman, I., de Leon, A. C., Zhu, J., Hadley, J., Kolios, M. C., & Exner, A. A. (2020). Theoretical and experimental gas volume quantification of micro-and nanobubble ultrasound contrast agents. *Pharmaceutics*, 12(3), 208.
- Adewuyi, Y. G. (2001). Sonochemistry: environmental science and engineering applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(22), 4681-4715.
- Archana, M., Yogesh, T., & Kumaraswamy, K. (2013). Various methods available for detection of apoptotic cells-A review. *Indian journal of cancer*, 50(3), 274-283.
- Bauer, K., Nitsche, U., Slotta-Huspenina, J., Drecol, E., von Weyhern, C. H., Rosenberg, R., Höfler, H., & Langer, R. (2012). High HSP27 and HSP70 expression levels are independent adverse prognostic factors in primary resected colon cancer. *Cellular oncology*, 35, 197-205.
- Bonosi, L., Marino, S., Benigno, U. E., Musso, S., Buscemi, F., Giardina, K., Gerardi, R., Brunasso, L., Costanzo, R., & Iacopino, D. G. (2023). Sonodynamic therapy and magnetic resonance-guided focused ultrasound: new therapeutic strategy in glioblastoma. *Journal of Neuro-oncology*, 1-20.
- Carpentier, A., Canney, M., Vignot, A., Reina, V., Beccaria, K., Horodyckid, C., Karachi, C., Leclercq, D., Lafon, C., & Chapelon, J.-Y. (2016). Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Science translational medicine*, 8(343), 343re342-343re342.
- Chen, H., & Hwang, J. H. (2013). Ultrasound-targeted microbubble destruction for chemotherapeutic drug delivery to solid tumors. *Journal of therapeutic ultrasound*, 1(1), 1-8.
- Choi, V., Rajora, M. A., & Zheng, G. (2020). Activating drugs with sound: mechanisms behind sonodynamic therapy and the role of nanomedicine. *Bioconjugate Chemistry*, 31(4), 967-989.
- Chowdhury, S. M., Abou-Elkacem, L., Lee, T., Dahl, J., & Lutz, A. M. (2020). Ultrasound and microbubble mediated therapeutic delivery: Underlying mechanisms and future outlook. *Journal of Controlled Release*, 326, 75-90.
- Chowdhury, S. M., Lee, T., & Willmann, J. K. (2017). Ultrasound-guided drug delivery in cancer. *Ultrasonography*, 36(3), 171.
- Ciocca, D. R., Cappello, F., Cuello-Carrion, E., & Arrigo, A.-P. (2015). Molecular approaches to target heat shock proteins for cancer treatment. *Frontiers in clinical drug research-anti-cancer agents*, 2, 3-47.
- Clark, A. G., & Vignjevic, D. M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current opinion in cell biology*, 36, 13-22.
- Costley, D., Mc Ewan, C., Fowley, C., McHale, A. P., Atchison, J., Nomikou, N., & Callan, J. F. (2015). Treating cancer with sonodynamic therapy: a review. *International Journal of Hyperthermia*, 31(2), 107-117.

- Czarnecka-Czapczyńska, M., Aebisher, D., Oleś, P., Sosna, B., Krupka-Olek, M., Dynarowicz, K., Latos, W., Cieślak, G., & Kawczyk-Krupka, A. (2021). The role of photodynamic therapy in breast cancer—A review of in vitro research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 144, 112342.
- Demirbakan, B. (2015). *HSP70'in hassas ve ekonomik analizi için fulleren C60 temelli bir biyosensör* [Namık Kemal Üniversitesi].
- Dimcevski, G., Kotopoulis, S., Bjånes, T., Hoem, D., Schjøtt, J., Gjertsen, B. T., Biermann, M., Molven, A., Sorbye, H., & McCormack, E. (2016). A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer. *Journal of Controlled Release*, 243, 172-181.
- Dodson, M. W., & Guo, M. (2007). Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Current opinion in neurobiology*, 17(3), 331-337.
- Fan, Z., Zhuang, C., Wang, S., & Zhang, Y. (2021). Photodynamic and photothermal therapy of hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 11, 5223.
- Feshitan, J. A., Chen, C. C., Kwan, J. J., & Borden, M. A. (2009). Microbubble size isolation by differential centrifugation. *Journal of colloid and interface science*, 329(2), 316-324.
- Fix, S. M., Borden, M. A., & Dayton, P. A. (2015). Therapeutic gas delivery via microbubbles and liposomes. *Journal of Controlled Release*, 209, 139-149.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of cancer research and practice*, 4(4), 127-129.
- He, J., Liu, Z., Zhu, X., Xia, H., Gao, H., & Lu, J. (2022). Ultrasonic Microbubble Cavitation Enhanced Tissue Permeability and Drug Diffusion in Solid Tumor Therapy. *Pharmaceutics*, 14(8), 1642.
- Hong, L., Pliss, A. M., Zhan, Y., Zheng, W., Xia, J., Liu, L., Qu, J., & Prasad, P. N. (2020). Perfluoropolyether nanoemulsion encapsulating chlorin e6 for sonodynamic and photodynamic therapy of hypoxic tumor. *Nanomaterials*, 10(10), 2058.
- Huang, W.-C., Shen, M.-Y., Chen, H.-H., Lin, S.-C., Chiang, W.-H., Wu, P.-H., Chang, C.-W., Chiang, C.-S., & Chiu, H.-C. (2015). Monocytic delivery of therapeutic oxygen bubbles for dual-modality treatment of tumor hypoxia. *Journal of Controlled Release*, 220, 738-750.
- Husseini, G. A., Pitt, W. G., & Martins, A. M. (2014). Ultrasonically triggered drug delivery: breaking the barrier. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 123, 364-386.
- Juffermans, L. J., Kamp, O., Dijkmans, P. A., Visser, C. A., & Musters, R. J. (2008). Low-intensity ultrasound-exposed microbubbles provoke local hyperpolarization of the cell membrane via activation of BKCa channels. *Ultrasound in medicine & biology*, 34(3), 502-508.
- Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2010). The physical and chemical effects of ultrasound. In *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 1-12). Springer.
- Koishi, M., Hosokawa, N., Sato, M., Nakai, A., Hirayoshi, K., Hiraoka, M., Abe, M., & Nagata, K. (1992). Quercetin, an inhibitor of heat shock protein synthesis, inhibits the acquisition of thermotolerance in a human colon carcinoma cell line. *Japanese Journal of Cancer Research*, 83(11), 1216-1222.

- Kooiman, K., Vos, H. J., Versluis, M., & De Jong, N. (2014). Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 72, 28-48.
- Kotopoulos, S., Dimcevski, G., Helge Gilja, O., Hoem, D., & Postema, M. (2013). Treatment of human pancreatic cancer using combined ultrasound, microbubbles, and gemcitabine: a clinical case study. *Medical physics*, 40(7), 072902.
- Köken, E. C. (2014). *Ehrlich Asit Tümör Hücreleri Üzerinde Klortaluminyum Ftalosiyanın ve Dosetakselin Sonodinamik Etkilerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Köken, E. C. (2020). *Sono-Kemoterapi Amaçlı Üretilen Mikrokabarcıkların Kansere Hücreleri ile Etkileşimi*. Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Krafft, M. P., & Riess, J. G. (2007). Perfluorocarbons: Life sciences and biomedical uses Dedicated to the memory of Professor Guy Ourisson, a true RENAISSANCE man. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 45(7), 1185-1198.
- Kumar, S., Stokes III, J., Singh, U. P., Gunn, K. S., Acharya, A., Manne, U., & Mishra, M. (2016). Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer letters*, 374(1), 156-166.
- Larburu, N., Adams, C. J., Chen, C.-S., Nowak, P. R., & Ali, M. M. (2020). Mechanism of Hsp70 specialized interactions in protein translocation and the unfolded protein response. *Open Biology*, 10(8), 200089.
- Lariccia, V., Fine, M., Magi, S., Lin, M.-J., Yaradanakul, A., Llaguno, M. C., & Hilgemann, D. W. (2011). Massive calcium-activated endocytosis without involvement of classical endocytic proteins. *Journal of General Physiology*, 137(1), 111-132.
- Lee, H., Han, J., Shin, H., Han, H., Na, K., & Kim, H. (2018). Combination of chemotherapy and photodynamic therapy for cancer treatment with sonoporation effects. *Journal of Controlled Release*, 283, 190-199.
- Lentacker, I., De Cock, I., Deckers, R., De Smedt, S., & Moonen, C. (2014). Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms. *Advanced drug delivery reviews*, 72, 49-64.
- Lentacker, I., De Smedt, S. C., & Sanders, N. N. (2009). Drug loaded microbubble design for ultrasound triggered delivery. *Soft Matter*, 5(11), 2161-2170.
- Leu, J.-J., Pimkina, J., Frank, A., Murphy, M. E., & George, D. L. (2009). A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Molecular cell*, 36(1), 15-27.
- Li, D., Yang, Y., Li, D., Pan, J., Chu, C., & Liu, G. (2021). Organic sonosensitizers for sonodynamic therapy: from small molecules and nanoparticles toward clinical development. *Small*, 17(42), 2101976.
- Li, Y., An, H., Wang, X., Wang, P., Qu, F., Jiao, Y., Zhang, K., & Liu, Q. (2018). Ultrasound-triggered release of sonoporphyrin sodium from liposome-microbubble complexes and its enhanced sonodynamic toxicity in breast cancer. *Nano Research*, 11, 1038-1056.
- Liu, W., Ma, X., Jin, Y., Zhang, J., Li, Y., Tang, Y., Song, Y., & Wang, S. (2021). Chlorin e6-biotin conjugates for tumor-targeting photodynamic therapy. *Molecules*, 26(23), 7342.

- Malik, D., Mahendiratta, S., Kaur, H., & Medhi, B. (2021). Futuristic approach to cancer treatment. *Gene*, 805, 145906.
- Martin, K. H., & Dayton, P. A. (2013). Current status and prospects for microbubbles in ultrasound theranostics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 5(4), 329-345.
- Martins, Y. A., Pavan, T. Z., & Lopez, R. F. V. (2021). Sonodynamic therapy: Ultrasound parameters and in vitro experimental configurations. *International Journal of Pharmaceutics*, 610, 121243.
- Mattiolo, P., Barbero-Farran, A., Amigó, J., Ripamonti, M., Ribas, J., & Boix, J. (2014). Cell death induced by 2-phenylethynylsulfonamide uncovers a pro-survival function of BAX. *Cancer letters*, 354(1), 115-121.
- McConnell, J. R., & McAlpine, S. R. (2013). Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(7), 1923-1928.
- McEwan, C., Kamila, S., Owen, J., Nesbitt, H., Callan, B., Borden, M., Nomikou, N., Hamoudi, R. A., Taylor, M. A., & Stride, E. (2016). Combined sonodynamic and antimetabolite therapy for the improved treatment of pancreatic cancer using oxygen loaded microbubbles as a delivery vehicle. *Biomaterials*, 80, 20-32.
- McEwan, C., Owen, J., Stride, E., Fowley, C., Nesbitt, H., Cochrane, D., Coussios, C. C., Borden, M., Nomikou, N., & McHale, A. P. (2015). Oxygen carrying microbubbles for enhanced sonodynamic therapy of hypoxic tumours. *Journal of Controlled Release*, 203, 51-56.
- McKeon, A. M., Egan, A., Chandanshive, J., McMahon, H., & Griffith, D. M. (2016). Novel improved synthesis of HSP70 inhibitor, pifithrin- μ . in vitro synergy quantification of pifithrin- μ combined with Pt drugs in prostate and colorectal cancer cells. *Molecules*, 21(7), 949.
- Miller, D. L., Smith, N. B., Bailey, M. R., Czarnota, G. J., Hynynen, K., Makin, I. R. S., & Medicine, B. C. o. t. A. I. o. U. i. (2012). Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *Journal of ultrasound in medicine*, 31(4), 623-634.
- Miyoshi, N., Mišík, V., & Riesz, P. (1997). Sonodynamic toxicity of gallium-porphyrin analogue ATX-70 in human leukemia cells. *Radiation research*, 148(1), 43-47.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 34(6), 1181-1188.
- National Cancer Institute [NCI]. (2021). *What is cancer*. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> adresinden erişildi.
- National Cancer Institute [NCI]. (2021). *Types of Cancer Treatment*. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types> adresinden erişildi.
- Nomikou, N., Fowley, C., Byrne, N. M., McCaughan, B., McHale, A. P., & Callan, J. F. (2012). Microbubble-sonosensitizer conjugates as therapeutics in sonodynamic therapy. *Chemical communications*, 48(67), 8332-8334.

- Nylandsted, J., Rohde, M., Brand, K., Bastholm, L., Elling, F., & Jäättelä, M. (2000). Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 7871-7876.
- Omata, D., Maruyama, T., Unga, J., Hagiwara, F., Munakata, L., Kageyama, S., Shima, T., Suzuki, Y., Maruyama, K., & Suzuki, R. (2019). Effects of encapsulated gas on stability of lipid-based microbubbles and ultrasound-triggered drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 311, 65-73.
- Önay-Uçar, E. (2015). Heat shock proteins and cancer: plant based therapy. *Heat shock protein-based therapies*, 27-48.
- Papież, M. A., & Krzyściak, W. (2021). Biological therapies in the treatment of cancer—Update and new directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11694.
- Park, S., Park, H., Jeong, S., Yi, B. G., Park, K., & Key, J. (2019). Hyaluronic acid-conjugated mesoporous silica nanoparticles loaded with dual anticancer agents for chemophotodynamic cancer therapy. *Journal of Nanomaterials*, 2019.
- Price, R. J., Skyba, D. M., Kaul, S., & Skalak, T. C. (1998). Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *Circulation*, 98(13), 1264-1267.
- Riess, J. G. (2003). Fluorocarbon-based injectable gaseous microbubbles for diagnosis and therapy. *Current opinion in colloid & interface science*, 8(3), 259-266.
- Rodriguez, M. E., Cogno, I. S., Sanabria, L. S. M., Moran, Y. S., & Rivarola, V. A. (2016). Heat shock proteins in the context of photodynamic therapy: autophagy, apoptosis and immunogenic cell death. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 15(9), 1090-1102.
- Roovers, S., Segers, T., Lajoinie, G., Deprez, J., Versluis, M., De Smedt, S. C., & Lentacker, I. (2019). The role of ultrasound-driven microbubble dynamics in drug delivery: From microbubble fundamentals to clinical translation. *Langmuir*, 35(31), 10173-10191.
- Rosenthal, I., Sostaric, J. Z., & Riesz, P. (2004). Sonodynamic therapy—a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 11(6), 349-363.
- Schutt, E. G., Klein, D. H., Mattrey, R. M., & Riess, J. G. (2003). Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: the key role of perfluorochemicals. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(28), 3218-3235.
- Sekihara, K., Harashima, N., Tongu, M., Tamaki, Y., Uchida, N., Inomata, T., & Harada, M. (2013). Pifithrin- μ , an inhibitor of heat-shock protein 70, can increase the antitumor effects of hyperthermia against human prostate cancer cells. *PloS one*, 8(11), e78772.
- Serpe, L., Foglietta, F., & Canaparo, R. (2012). Nanosonotechnology: the next challenge in cancer sonodynamic therapy. *Nanotechnology Reviews*, 1(2), 173-182.
- Sessa, C., Shapiro, G. I., Bhalla, K. N., Britten, C., Jacks, K. S., Mita, M., Papadimitrakopoulou, V., Pluard, T., Samuel, T. A., & Akimov, M. (2013). First-in-human phase I dose-escalation study of the HSP90 inhibitor AUY922 in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 19(13), 3671-3680.

- Sharma, P. C., & Verma, R. (2018). Implication of HSP70 in the Pathogenesis of Gastric Cancer. *HSP70 in Human Diseases and Disorders*, 113-130.
- Sirsi, S., & Borden, M. (2009). Microbubble compositions, properties and biomedical applications. *Bubble Science, Engineering & Technology*, 1(1-2), 3-17.
- Speed, C. (2001). Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology*, 40(12), 1331-1336.
- Stride, E., & Saffari, N. (2003). Microbubble ultrasound contrast agents: a review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 217(6), 429-447.
- Taşkın, G. C. (2014). *Fotodinamik Terapi Uygulamaları için Işığa Duyarlı Yeni Silisyum Ftalosiyaninler*. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- Tachibana, K., Feril Jr, L. B., & Ikeda-Dantsuji, Y. (2008). Sonodynamic therapy. *Ultrasonics*, 48(4), 253-259.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.
- Tsutsui, J. M., Xie, F., & Porter, R. T. (2004). The use of microbubbles to target drug delivery. *Cardiovascular Ultrasound*, 2(1), 1-7.
- Tu, J., & Yu, A. C. (2022). Ultrasound-mediated drug delivery: sonoporation mechanisms, biophysics, and critical factors. *BME Frontiers*, 2022.
- Tu, Y., Tian, Y., Wu, Y., & Cui, S. (2018). Clinical significance of heat shock proteins in gastric cancer following hyperthermia stress: Indications for hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion therapy. *Oncology Letters*, 15(6), 9385-9391.
- Umemura, S.-i., Yumita, N., Umemura, K., & Nishigaki, R. (1999). Sonodynamically induced effect of rose bengal on isolated sarcoma 180 cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 43, 389-393.
- Umemura, S. i., Yumita, N., Nishigaki, R., & Umemura, K. (1990). Mechanism of cell damage by ultrasound in combination with hematoporphyrin. *Japanese Journal of Cancer Research*, 81(9), 962-966.
- Unga, J., & Hashida, M. (2014). Ultrasound induced cancer immunotherapy. *Advanced drug delivery reviews*, 72, 144-153.
- VanBavel, E. (2007). Effects of shear stress on endothelial cells: possible relevance for ultrasound applications. *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1-3), 374-383.
- Verywell. (2017) *Cancer Cells vs. Normal Cells: How Are They Different?* Verywell. <https://www.verywellhealth.com/cancer-cells-vs-normal-cells-2248794> adresinden erişildi.
- Wan, G.-Y., Liu, Y., Chen, B.-W., Liu, Y.-Y., Wang, Y.-S., & Zhang, N. (2016). Recent advances of sonodynamic therapy in cancer treatment. *Cancer biology & medicine*, 13(3), 325.

- Wang, H., Kong, H., Zheng, J., Peng, H., Cao, C., Qi, Y., Fang, K., & Chen, W. (2020). Systematically exploring molecular aggregation and its impact on surface tension and viscosity in high concentration solutions. *Molecules*, 25(7), 1588.
- Wang, H., Wang, X., Wang, P., Zhang, K., Yang, S., & Liu, Q. (2013). Ultrasound enhances the efficacy of chlorin E6-mediated photodynamic therapy in MDA-MB-231 cells. *Ultrasound in medicine & biology*, 39(9), 1713-1724.
- World Health Organization [WHO]. (2020). *WHO Cancer Turkey 2020 Country Profiles*. World Health Organization. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/country-profiles/cancer/tur-2020.pdf?sfvrsn=51c9ad6a_2&download=true adresinden erişildi.
- Wischhusen, J., & Padilla, F. (2019). Ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) for localized drug delivery into tumor tissue. *Irbm*, 40(1), 10-15.
- Xu, P., Yao, J., Li, Z., Wang, M., Zhou, L., Zhong, G., Zheng, Y., Li, N., Zhai, Z., & Yang, S. (2020). Therapeutic effect of doxorubicin-chlorin E6-loaded mesoporous silica nanoparticles combined with ultrasound on triple-negative breast cancer. *International journal of nanomedicine*, 2659-2668.
- Yang, L., Liu, Y., Wang, M., Qian, Y., Dong, X., Gu, H., Wang, H., Guo, S., & Hisamitsu, T. (2016). Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibition of the Akt-CSN6-Myc signaling axis. *Molecular medicine reports*, 14(5), 4559-4566.
- Yang, Y., Huang, J., Liu, M., Qiu, Y., Chen, Q., Zhao, T., Xiao, Z., Yang, Y., Jiang, Y., & Huang, Q. (2023). Emerging Sonodynamic Therapy-Based Nanomedicines for Cancer Immunotherapy. *Advanced Science*, 10(2), 2204365.
- Yumita, N., Nishigaki, R., Umemura, K., & Umemura, S. i. (1989). Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound. *Japanese Journal of Cancer Research*, 80(3), 219-222.
- Yumita, N., Nishigaki, R., Umemura, K., & Umemura, S. i. (1990). Synergistic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180. *Japanese Journal of Cancer Research*, 81(3), 304-308.
- Yusuf, F., Ilyas, S., Damanik, H., & Fatchiyah, F. (2016). Microbiota Composition, HSP70 and Caspase-3 Expression as Marker for Colorectal Cancer Patients in Aceh, Indonesia. *Acta Medica Indonesiana*, 48(4), 289-299.
- Zeng, F., Tee, C., Liu, M., Sherry, J. P., Dixon, B., Duncker, B. P., & Bols, N. C. (2014). The p53/HSP70 inhibitor, 2-phenylethynesulfonamide, causes oxidative stress, unfolded protein response and apoptosis in rainbow trout cells. *Aquatic toxicology*, 146, 45-51.
- Zhu, H.-m., He, Y., Huang, S.-s., Tian, J.-j., Wang, L.-s., Hao, J.-d., Xie, B., & Ling, J.-j. (2020). Chlorin e6-loaded sonosensitive magnetic nanoliposomes conjugated with the magnetic field for enhancing anti-tumor effect of sonodynamic therapy. *Pharmaceutical Development and Technology*, 25(10), 1249-1259.