



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**ELEKTROPORASYON YÖNTEMİYLE
MELANOMA TEDAVİSİNDE KULLANILAN
DAKARBAZİNİN SİTOTOKSİSİTESİNİN
ARTTIRILMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

ALAADDİN COŞKUN

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

KASIM 2017



**ELEKTROPORASYON YÖNTEMİYLE MELANOMA TEDAVİSİNDE
KULLANILAN DAKARBAZİNİN SİTOTOKSİSİTESİNİN ARTTIRILMASI
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Alaaddin COŞKUN

**DOKTORA TEZİ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2017

Alaaddin COŞKUN tarafından hazırlanan “Elektroporasyon yöntemiyle melanoma tedavisinde kullanılan dakarbazinin sitotoksitesinin artırılması üzerine çalışmalar” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman/ Başkan: Prof. Dr. Ayşe CANSEVEN KURŞUN

Biyofizik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye: Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT

Fizyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

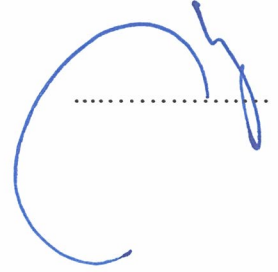
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Saadettin KILIÇKAP

Medikal Onkoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Serdar DEMİRTAŞ

Biyofizik Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Ü.Tıp Fakültesi

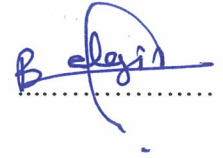
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI

Biyofizik Anabilim Dalı, Mersin Ü.Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 20/11/2017

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN


Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,

Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Alaaddin COŞKUN

20/11/2017



ELEKTROPORASYON YÖNTEMİYLE MELANOMA TEDAVİSİNDE KULLANILAN DAKARBAZİNİN SİTOTOKSİSİTESİNİN ARTTIRILMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

(Doktora Tezi)

Alaaddin COŞKUN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2017

ÖZET

Melanoma cilde rengini veren melanositlerden kaynaklı bir cilt kanseri türü olup halk sağlığı açısından ölümcül riskler barındıran bir hastalıktır. Tedavisinde; cerrahi olarak tümörün çıkarılması, kemoterapi, radyoterapi veya bu terapilerin kombinasyonları yer almaktadır. Erken teşhiste cerrahi müdahale etkili olabilirken, vücuda yayılım gösteren tümörlerin tedavisinde cerrahi yöntem yetersiz kalabilmekte ve radyoterapi gibi iyonlaştırıcı radyasyonun kullanıldığı tedavi yöntemi tercih edilmektedir. Ancak radyoterapinin çoğu zaman kullanımının sınırlı kalması hastaların kemoterapiye yönlendirilmesine neden olmaktadır. Bununla birlikte yüksek dozlarda kemoterapik ilaç kullanılması tedavi etkinliğini arttırsa da yan etkileri düşünüldüğünde tercih edilmemektedir. Tedavi yöntemlerinin bu şekilde kısıtlı olması yeni tedavi yöntemlerine acil olarak ihtiyaç doğurmaktadır. Elektroporasyon: yüksek şiddete ve kısa süreli elektrik pulsları uygulanan hücrelerin membranlarının geri dönüşümlü geçirgen hale getirilmesi ile DNA, RNA, ilaç vb. moleküllerin hücre içine alınmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu tez çalışması kapsamında elektroporasyonla birlikte insan melanoma ve sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerine uygulanan dakarbazinin sitotoksitesinin değişimi incelenmiştir. İnsan melanoma ve sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerine 1 Hz tekrarlama frekansında 100 mikro saniye (μ s) puls süresinde 0-2000 V/cm elektrik alan (E alan) uygulandı. Elektrik alan uygulanan gruplarda membran geçirgenliği (permeabilizasyon) propidyum iyodür (PI) ile akım sitometri cihazında, hücre canlılık değişimleri MTT yöntemi kullanılarak Elisa okuyucuda ve floresan görüntüleri PI kullanılarak floresan mikroskopta incelendi. Yalnız elektroporasyon uygulanan gruplarda permeabilizasyonun ve hücre canlılığının en yüksek olduğu E alan değeri etkin alan değeri olarak belirlendi. Her iki hücre hattı için yalnız dakarbazin uygulanan gruplar için hücrelerin %50' sinin proliferasyonunu inhibe edebilecek konsantrasyon değerleri (IC_{50}) ve belirlenen etkin alan ile birlikte dakarbazin uygulanan grupların IC_{50} değerleri kıyaslandı. Deney sonuçlarından elektroporasyonla birlikte dakarbazin uygulanmasının sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinde yalnız ilaca kıyasla sitotoksitesiyi 2,43 kat, melanoma hücre hattında da ise 1,41 kat arttırdığı tespit edildi. Her iki hücre grubunda da elektroporasyonun ilaç sitotoksitesisi üzerinde istatistiki açıdan önemli artışa sebep olduğu belirlendi.

Bilim Kodu : 1008
Anahtar Kelimeler : Melanoma, elektroporasyon, hücre canlılığı, sitotoksitesite
Sayfa Adedi : 85
Danışman : Prof. Dr. Ayşe CANSEVEN KURŞUN

STUDIES ON THE ENHANCING OF CYTOTOXICIDES OF DACARBAZINE USED
TREATMENT OF MELANOMA BY ELECTROPORATION METHOD

(Ph. D. Thesis)

Alaaddin COŞKUN

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

November 2017

ABSTRACT

Melanoma is a type of skin cancer originating from melanocytes that color the skin and is a disease that carries fatal risks in terms of public health. In treatment; taking place surgical removal of tumor, combinations of therapies including chemotherapy and radiotherapy. Surgical intervention may be effective in early diagnosis, however, surgical treatment may be inadequate for the treatment of tumors spreading to the body and such as radiotherapy used treatment with ionizing radiation is preferred. However, the limited use of radiotherapy often leads to the administration of chemotherapy in patients. Moreover, the use of chemotherapeutic drugs at high doses increases the effectiveness of the treatment, but is not preferred due to their side effects. Despite these limited treatment methods, new treatment methods are urgently needed. Electroporation is a method that allows transition of DNA, RNA, drugs and so on. molecules through permeabilization temporary membranes of the cells with high high strength and short term electric pulses. In this thesis study, the change of cytotoxicity of dacarbazine applied to human melanoma SKMEL-30 and healthy skin fibroblast cells with electroporation was investigated. Human melanoma SK-MEL-30 cells and healthy human skin fibroblast cells were exposed to electric field that is between 0-2000 V / cm, 1 Hz frequency of repetition and 100 microsecond (μ s) pulse duration. Permeabilization of cells applied electric field were analyzed by using propidium iodide (PI) in flow cytometry, cell viability were analyzed by MTT assay analyzed in ELISA reader and by using propidium iodide (PI) fluorescence imaging with fluorescence microscopy. The effective electric field value was determined by measure of the highest level of permeability and cell viability in only electroporated group. IC_{50} values of groups of the only dacarbazine treated and IC_{50} of groups treated values of determined effective electric field with dacarbazine were compared for both cell lines. The results of the experiment showed that application of dacarbazine together with electroporation increased cytotoxicity by 2.43 fold in healthy human skin fibroblast cells and 1.41 fold in melanoma cell line. Electroporation was found to cause a increase of significant statistically in drug cytotoxicity in both groups of cells.

Science Code : 1008

Key Words : Melanom, electroporation, cell viability, cytotoxicity

Page Number : 85

Advisor : Prof. Ayşe CANSEVEN KURŞUN

TEŞEKKÜR

Özveri, emek ve büyük hassasiyetler göstererek özenle tamamlanan bu tez çalışmasında maddi manevi desteklerini esirgemeyen herkese teşekkürlerimi belirtmek isterim.

Başta eğitimim süresince ve bu tezin hazırlanması aşamasına kadar bilimsel katkı ve desteğini esirgemeyen danışman Hocam ve tez yöneticim Prof. Dr. Ayşe CANSEVEN KURŞUN'a,

Biyolojik deneyler sırasında büyük katkı ve desteklerini gördüğüm, değerli arkadaşım Handan KAYHAN' a, çalışmalarım boyunca, öneri ve yardımları nedeniyle Meriç Arda EŞMEKAYA' ya, Mehmet Zahit TÜYSÜZ' e, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Anabilim Dalından Prof. Dr. Ogun ONARAN'a

Elbette bu zorlu yolda ve hayatımın her aşamasında maddi, manevi her türlü desteğini esirgemeyen çok değerli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından, 01/2015-03 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| TEŞEKKÜR..... | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ..... | ix |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ..... | x |
| RESİMLERİN LİSTESİ | xi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | xii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 5 |
| 2.1. Elektroporasyon | 6 |
| 2.1.1. Elektroporasyon teorisi..... | 6 |
| 2.1.2. Elektrik alan parametreleri | 9 |
| 2.1.3. Geri dönüşümlü (reversible) elektroporasyon | 16 |
| 2.1.4. Geri dönüşümsüz (irreversible) elektroporasyon | 17 |
| 2.2. Elektrokemoterapi | 18 |
| 2.3. Melanom | 19 |
| 2.3.1. Risk faktörleri | 20 |
| 2.3.2. Melanom tedavisi | 22 |
| 2.4. Dakarbazin | 25 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 27 |
| 3.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar | 28 |
| 3.1.1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücreler, kimyasallar ve kitler.. | 28 |
| 3.1.2. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar | 29 |

Sayfa

| | |
|--|----|
| 3.2. Kullanılan Yöntemler..... | 36 |
| 3.2.1. Hücre kültürü, çoğaltma ve hücre sayımı..... | 36 |
| 3.2.2. Deney çalışma grupları ve uygulamaları..... | 38 |
| 3.2.3. Elektroporasyon uygulaması ve etkin elektrik alan değerinin belirlenmesi..... | 39 |
| 3.2.4. Kemoterapik ilaç uygulama..... | 41 |
| 3.2.5. Elektroporasyonla birlikte ilaç uygulama..... | 42 |
| 3.2.6. Sitotoksosite ve inhibitör konsantrasyon (IC50) analizi:..... | 43 |
| 3.2.7. Floresan mikroskop görüntüleri..... | 44 |
| 3.2.8. Kullanılan istatistiksel yöntemler..... | 45 |
| 4. BULGULAR..... | 47 |
| 4.1. Etkin Elektrik Alan Değerinin Belirlenmesi Bulguları..... | 48 |
| 4.2. Elektrik Alan Uygulaması Sonucu Floresan Mikroskop Görüntüleri Bulguları..... | 54 |
| 4.3. İlaç Dozu Belirlenmesi Bulguları..... | 56 |
| 4.4. Elektroporasyonla Birlikte İlaç Uygulaması Bulguları..... | 59 |
| 5. TARTIŞMA..... | 63 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 71 |
| KAYNAKLAR..... | 75 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 83 |

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge | Sayfa |
|---|--------------|
| Çizelge 2.1. Melanom tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçlar ve hastalığa genel cevap oranları | 24 |
| Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan hücre hatları | 28 |
| Çizelge 3.2. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar | 28 |
| Çizelge 3.3. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kitler | 29 |
| Çizelge 3.4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar | 29 |



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil | Sayfa |
|---|--------------|
| Şekil 2.1. Elektropemeabilizasyon oluşumunu gösteren model | 8 |
| Şekil 2.2. Elektroporasyon pulslarının genlik ve zaman parametreleri | 10 |
| Şekil 2.3. Elektropemeabilizasyon için teorik hücre modeli | 14 |
| Şekil 2.4. Elektroporasyonun şematik gösterimi..... | 15 |
| Şekil 2.5. Elektroporasyon uygulamaları ve hücrenin olası cevapları | 16 |
| Şekil 2.6. Elektrokemoterapinin mekanizması | 18 |
| Şekil 2.7. Dakarbazin'in moleküler yapısı | 25 |
| Şekil 3.1. Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücre hatları için çalışma grupları ve uygulamalar | 39 |
| Şekil 4.1. Deri fibroblast hücrelerinde 0-1750V/cm (100 µs) puls süresinde elektrik alan artışına bağlı olarak % permeabilizasyon değişimi..... | 49 |
| Şekil 4.2. İnsan melanoma hücrelerinde 0-1750V/cm (100 µs) puls süresinde elektrik alan artışına bağlı olarak % permeabilizasyon değişimi..... | 50 |
| Şekil 4.3. Deri fibroblast 0-2000V/cm (100 µs) puls süresinde elektrik alan artışına bağlı olarak hücre canlılığı grafiği..... | 51 |
| Şekil 4.4. İnsan melanom hücrelerinde 0-2000 V/cm (100 µs) puls süresinde elektrik alan artışına bağlı olarak hücre canlılığı grafiği | 52 |
| Şekil 4.5. Deri fibroblast 0-1750V/cm (100 µs) puls süresinde elektrik alan artışına bağlı olarak permeabilizasyon ve hücre canlılığı grafiği kesişimi..... | 53 |
| Şekil 4.6. İnsan melanom hücrelerinde elektrik alan artışına bağlı olarak permeabilizasyon ve hücre canlılığı grafiği kesişimi..... | 54 |
| Şekil 4.7. Sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinde dakarbazin dozuna karşı hücre canlılığı değişimi..... | 57 |
| Şekil 4.8. İnsan melanom hücrelerinde ilaç dozuna karşı hücre canlılığı değişimi | 58 |
| Şekil 4.9. Deri fibroblast hücreleri için 1000V/cm elektrik alan altında ilaç dozuna karşı hücre canlılığı değişimi | 60 |
| Şekil 4.10. SK-MEL-30 insan melanom hücrelerinde 1500V/cm elektrik alan altında ilaç dozuna karşı hücre canlılığı değişimi..... | 61 |

RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim | Sayfa |
|--|--------------|
| Resim 3.1. Hücre sayım cihazı (İnvitrogen)..... | 30 |
| Resim 3.2. İnvverted Mikroskop (Zeiss Axiocam ICC3)..... | 31 |
| Resim 3.3. İnkübatör (Nüve EC 160)..... | 32 |
| Resim 3.4. BTX ECM 830 Elektroporasyon sistemi..... | 32 |
| Resim 3.5. a) BTX ECM Elektroporasyon Küveti önden görünüm b) BTX ECM Elektroporasyon küveti yandan görünüm c) Elektroporasyon küvetleri ile yapılan çalışmalar..... | 33 |
| Resim 3.6. Hettich Mikro 20 Santrifüj cihazı..... | 34 |
| Resim 3.7. ELISA okuyucu (TECAN Mikrolaka Elisa)..... | 34 |
| Resim 3.8. Akım sitometri cihazı (Beckman Coulter)..... | 35 |
| Resim 3.9. Floresans mikroskop (Leica DMI 4000B)..... | 35 |
| Resim 3.10. Hücrelerin optik mikroskop görüntüsü (x10) a) Sağlıklı insan deri fibroblast b) İnsan melanom (SK-MEL-30)..... | 38 |
| Resim 4.1. Elektrik alan uygulanan sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri (x10)..... | 55 |
| Resim 4.2. Elektrik alan uygulanan insan melanom hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri (x10)..... | 56 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| Simgeler | Açıklamalar |
|--------------------|---|
| A_{max} | Maksimum genlik |
| A_{min} | Minumum genlik |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BAP | Bilimsel Araştırma Projeleri |
| CDDP | Cis-diamminedichloroplatinum (II) |
| C_m | Birim alan başına membran kapasitansı |
| cm | Santimetre |
| CO_2 | Karbon dioksit |
| COST | European Cooperation in Science and Technology |
| d | Hücre zarı kalınlığı |
| IC_{50} | Hücrelerin %50' sinin proliferasyonunu inhibe edebilecek konsantrasyon değeri |
| f | Şekil faktörü |
| g | Gram |
| Hz | Hertz |
| Kısaltmalar | Açıklamalar |
| ABD | Amerika Birleşik Devletleri |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's medium |
| DMSO | Dimetil Sülfoksit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| DTIC | Dakarbazin |
| E Alan | Elektrik Alan |
| EDTA | Etilendiamintetraasetikasit |
| EP | Elektroporasyon |

Kısaltmalar**Açıklamalar**

| | |
|-------------------------|--|
| FBS | Fetal Sığır Serumu |
| FDA | Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanate |
| IARC | Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı |
| kV | Kilovolt |
| m² | Metrekare |
| m³ | Metreküp |
| MC | Management committee |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| MTT | (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) |
| mV | Milivolt |
| NB | Neuroblastoma |
| nm | Nanometre |
| °C | Santigrat derece |
| p53 | Protein 53 |
| PBS | Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi |
| pH | Hidrojenin gücü |
| PI | Propidyum iyodür |
| P_n | Puls sayısı |
| P_s | Puls şekli |
| PS | Fosfatidilserin (Phosphatidyl Serine) |
| r | Yarıçap |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| RPM | Dakika Başına Dönme Sayısı |
| sn | Saniye |
| SPSS | Statistics Program for Social and Science |
| t | Puls süresi |
| t_{FWHM} | Yarı maksimumda puls süresi |

Kısaltmalar**Açıklamalar****UV**

Ultraviyole

V

Volt

WHO

Dünya Sağlık Örgütü

 $\Delta\Psi_E$

Transmembran potansiyeli

 λ_e

Hücre dış ortamı iletkenliği

 λ_{em}

Salınan ışığın dalga boyu

 λ_{ex}

Uyarı ışığının dalga boyu

 λ_i

Sitoplazmanın iletkenliği

 λ_m

Hücre membranının iletkenliği

 μL

Mikrolitre

 μM

Mikromolar

 μs

Mikrosaniye

 τ

Zaman sabiti

1. GİRİŞ

Ülkemizde ve dünyada kanser, ölüm nedeni olarak kardiyovasküler sistem hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Kanser tipleri arasında yer alan en önemli cilt kanserinden birisi melanomdur. Melanom, cilde rengini veren melanosit hücrelerinin farklılaşmasından kaynaklanan malign bir cilt kanseridir. Dünya Sağlık örgütü (WHO) verilerine göre son 10 yıldır melanom ve diğer cilt kanserlerinde önemli bir artış görülmektedir. Bu artış nedeniyle halk sağlığını ciddi şekilde tehdit etmekte olan melanom için birçok tedavi seçeneği mevcuttur. Tedavi seçenekleri; tümörün cerrahi olarak çıkartılması, kemoterapi, radyoterapi yada bu terapilerin kombinasyonlarından oluşmaktadır.

Erken teşhis edildiğinde cerrahi yöntem başarılı iken, yayılım gösteren melanomlarda bu yöntem yetersiz kalabilmekte ve sıklıkla diğer bir tedavi yöntemi olan radyoterapi tercih edilmektedir. Radyasyon tedavisi, tümör gelişimini azaltmak veya önlemek için yüksek enerjili ışınları veya diğer iyonlaştırıcı radyasyon türlerini kullanır. Cerrahi olarak çıkarılamayan tümörler ve yaygın olan yüzeysel melanom metastazlarında radyoterapi başarılı bir şekilde kullanılır, ancak nodüler hacimsel lezyonlar için, düşük etkinlik ve lezyonların ikincil ülserasyon oluşturma riski ve yan etkilerinin fazla olması nedeniyle çoğunlukla bu tedavi opsiyonu da sınırlı uygulanabilmektedir.

Kemoterapik ilaçlar, metastatik malign melanom hastalarında yaklaşım olarak en çok kullanılan tedavi yöntemlerinden birisidir. Bu ilaçlar hızla bölünen hücrelere müdahale ederek vücuda yayılmış kanser hücrelerinin yok edilmesinde faydalı olabilmektedir. Ancak çoğu zaman kanserli hücreler üzerinde etkin tedavi sağlayabilmek için kemoterapik ilaçların dozları arttırılmak zorundadır. Damar yoluyla veya oral yolla uygulanan kemoterapik ilacın dozuna bağlı olarak yüksek toksisite ile birlikte bulantı, saç dökülmesi, iştahsızlık, periferal nöropati gibi pek çok yan etki görülebilmektedir. Yan etkilerin fazlaca görülmesi kanser tedavisi sırasında hastanın yaşam kalitesinin önemli ölçüde bozulmasına neden olmakta ve etkinliği sınırlamaktadır. Bu tedavi yöntemlerindeki sınırlamalar nedeniyle hastanın sağ kalım süresini uzatmak ve yaşam kalitesini arttırmak için yeni terapilerin bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda araştırmacılar tarafından, non invaziv tedavi biçimleri üzerinde yoğunlaşılma ile birlikte tedavi süresini ve yan etkileri azaltmaya yönelik çalışmalar

yapılmaktadır. Kemoterapik etkinliğin arttırılarak yan etkilerin azaltıldığı yöntemlerden birisi elektroporasyondur. Elektroporasyon hücre membranında geri dönüşümlü porlar açarak hücre içerisine giremeyecek düzeyde olan moleküllerin (DNA, RNA, kemoterapik ilaç, iyon vb.) elektrik (E) alan etkisiyle geçişini sağlayan yöntemdir. Melanom tedavisindeki sınırlamalar nedeniyle tedavi etkinliğinin arttırılması için kemoterapik ilaçlar ve elektroporasyonun birlikte kullanıldığı elektrokemoterapi çalışmalarına yoğunlaşmıştır. Bu araştırma; melanom tedavisinde kullanılmakta olan kemoterapik bir ilaç olan dakarbazinin elektroporasyonla birlikte kullanılmasının, ilacın sitotoksik etkinliğini arttırıp artmayacağını belirlemek amacıyla planlandı.

Araştırmada hücre hattı olarak, sağlıklı insan deri fibroblast hücre hattı ve SK-MEL-30 insan melanom hücre hattı seçildi. Hücrelere yüksek şiddette kısa süreli E alan uygulanması ve hücre membranında geri dönüşümlü porlar oluşturulabilmesi amaçlandı.

Hücre membranında geri dönüşümlü porların oluşmasını sağlayan E alan değeri belirlendikten sonra, bu E alan ile kemoterapik ajan birlikte uygulandığında hücre içerisine ilacın daha fazla nüfuz edeceği böylelikle kemoterapik ajanın sitotoksitesinin artacağı hipotezlendi.

Bu tez kapsamında deney aşamasında; E alan ve kemoterapik ajan dakarbazinin insan deri fibroblast ve SKMEL-30 insan melanom hücrelerinde, hücre canlılık düzeylerini nasıl etkilediği araştırıldı. E alanın hücre canlılığına etkileri MTT yöntemi ile değerlendirildi.

Bu çalışma sonucunda; eğer elektroporasyon uygulanan hücrelerin canlılıkları devam ederken membranda geçici porlar oluşabilir ve oluşan porlardan kemoterapik ajan girişi mümkün olabilirse, kemoterapik ilaçların hücre içerisindeki etkinliğinin artabileceği ön görülmektedir. Kemoterapik ilaçların düşük dozlarda bile etkin olabileceği tedavi imkanı sunulabilecek ve böylelikle yan etkilerin azaltılabileceği bir tedavi yönteminin temelleri atılmış olacaktır.

Bölüm 2, elektroporasyon teorisi ile başlamakta, E alan parametreleri, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz elektroporasyon tipleri anlatıldıktan sonra melanom ve melanom tedavisinde kullanılan dakarbazin'in yer aldığı temel bilgiler ile devam etmekte ve elektrokemoterapiden bahsedilerek bölüm tamamlanmaktadır.

Bölüm 3'te, tez çalışmasında kullanılan gereç ve yöntemler anlatılmaktadır. Sırası ile çalışmada kullanılan hücre hatları, besiyeri ve solüsyonlar hakkında bilgi verilerek biyolojik deneylerde kullanılan gereçlere değinilmektedir. Elektroporasyon uygulanması sonucu hücre canlılığının E alana göre nasıl değıştiği ve permeabilizasyon parametrelerinden yola çıkarak etkin alan değerin nasıl belirlendiği anlatılmaktadır.

Çalışmada hücrelerin; yalnız elektroporasyon, yalnız ilaç ve ilaç+ elektroporasyon grupları olmak üzere üç farklı grupta çalışıldığı açıklanmakta ve hücre canlılığı düzeylerinin belirlendiği yöntemlerin açıklanması ile bu bölüm son bulmaktadır.

Bölüm 4'te, araştırma bulguları aşağıdaki sıra ile sunulmaktadır:

- Farklı şiddette E alan uygulamaları ile permeabilizasyon değışiminin belirlenmesi çalışması,
- Permeabilizasyona bağlı olarak hücre canlılığında değışimin belirlenmesi çalışması,
- Hücre canlılığındaki değışime bağlı olarak etkin E alan değerin belirlenmesi çalışması,
- Yalnız ilaç uygulanması sonucunda hücre canlılığında meydana gelen değışim ve hücrelerin yarısının proliferasyonunu inhibe eden konsantrasyon değlerinin (IC_{50}) tespiti çalışması;
- Ayrıca yalnız E alan uygulanan gruplar için, floresan mikroskop çalışmaları,
- Önceki aşamada belirlenmiş olan etkin E alan şiddetinde gerçekleştirilen elektroporasyon ve ilaç uygulanmasına ilişkin çalışma bulguları verilmektedir.

Bölüm 5'te, bu çalışmada gerçekleştirilen elektroporasyon uygulaması sonucunda sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücre hattı için permeabilizasyon değışimleri ve buna bağlı olarak hücre canlılığı değışimleri analiz edilmiş, etkin E alan değeri literatür ile kıyaslanarak ve yine her iki hücre hattı için yalnız ilaç uygulaması ve elektroporasyonla birlikte ilaç uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkilerine ilişkin deney sonuçlarının değerlendirilmesi, tartışılması IC_{50} literatür bulgularıyla kıyaslanması yapılmıştır.

Bölüm 6'da ise gerçekleştirilen bu çalışmada sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücreleri için elektroporasyon sonucunda hücre canlılığının ve permeabilizasyonun korunduğu etkin E alan değlerinin yorumlanması, yalnız

kemoterapik ajan uygulanması, IC_{50} konsantrasyon değerlerinin yorumlanması ile tespit edilen etkin E alanla birlikte kemoterapik ilaç uygulanmasının IC_{50} değerlerinde meydana getirdiği değişimin ne anlama geldiği yorumlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

Bu araştırma kapsamında öncelikle sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri ve insan melanom hücrelerinin membranlarında elektroporasyon yöntemi ile geri dönüşümlü (reversible) porların oluşturulması planlandı. Elektroporasyonla birlikte reversible por oluşması hücre membranından geçemeyecek büyüklükteki moleküllerin geçişine izin verirken membran bütünlüğünün korunması ve hücre canlılığının devam ettirmesini sağlamaktır. Böylece hücre membranında reversible porlar açılarak membrandan geçemeyen ilaçların hücre içerisine girmesi ile birlikte etkinlik göstermesi hedeflenmiştir. Aksi takdirde (geri dönüşümsüz) irreversible por oluşur ve hücreler ilaç uygulanmadan canlılığını yitirir. Elektroporasyon yöntemi hücrenin canlılığını devam ettirirken membranı geçemeyecek büyüklükteki moleküllerin geçişine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle elektroporasyon uygulanması ile reversible por oluşturma yapılan çalışma için kritik öneme sahiptir. Elektroporasyon süresince hücre membranında reversible por oluşturulabilmesi, etkin E alan değerine bağlıdır ve bu alan değeri oldukça önemlidir. Bu kapsamda çalışmanın ilk kısmında; reversible porlar oluşturabilecek etkin E alan değeri belirlendi. İkinci aşamada hücrelere uygulanan kemoterapik ilacın etkisi, hücrelerin %50' sinin proliferasyonunu inhibe edebilecek konsantrasyon değeri (IC₅₀) ile belirlenerek ilacın etkinliği tespit edildi. Son aşamada ise tespit edilen etkin E alanla birlikte kemoterapik ajanın birlikte uygulanmasının IC₅₀ değeri üzerinde etkisi incelendi. Böylece yalnız kemoterapik ajan ve elektroporasyonla birlikte kemoterapik ajan uygulanmasının IC₅₀ değerleri üzerindeki etkileri kıyaslanarak elektroporasyonun ilaç sitotoksitesi üzerinde etkisi değerlendirildi.

Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından, 01/2015-03 nolu proje ile desteklendi. Aynı zamanda bu BAP projesi ile COST (European Cooperation in Science and Technology)' de "European network for development of electroporation-based technologies and treatments" TD1104 numaralı aksiyonunda Türkiye MC (Management committee) üyesi düzeyinde katılım sağlanarak ülkemiz bu bilimsel alanda Gazi üniversitesi tarafından temsil edildi.

COST; bilim ve teknoloji alanında Avrupa ülkelerinin birbirleriyle işbirliğini sağlamak amacıyla oluşturulmuş olan ve ulusal kaynaklarla desteklenmiş araştırma projelerinin Avrupa düzeyinde koordinasyonunu ve iş birliğini sağlayan hükümetler arası bir kuruluştur. COST; üyesi olan araştırmacıların ilgili konudaki çalışmalarına kongre, sempozyum ve workshop destekleri ile katkıda bulunmaktadır.

COST üyeliği kapsamında 6 Eylül 2015 tarihinde Slovenya'nın Portoroz kentinde gerçekleştirilen "1st World Congress on Electroporation, Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine, Food and Environmental Technologies" başlıklı toplantıya MC üyesi olarak ülkemizi temsilen Gazi Üniversitesi Biyofizik bölümü olarak katılım gerçekleştirildi. Böylelikle elektroporasyonun kanser tedavisinde uygulanması ile ilgili olarak Avrupalı araştırmacılarla koordinasyon sağlandı.

COST tarafından Slovenya'nın Ljubljana kentinde 15-21 Kasım 2015 tarihleri arasında düzenlenen "Electroporation based technologies and Treatments International SCIENTIFIC WORKSHOP and POSTGRADUATE COURSE" isimli çalışmaya katılım gerçekleştirdi ve bu programda;

- "Change in propidium iodide (PI) fluorescence intensity of MEC- 1 Cells due to treatment with microsecond electric pulses" ve

-"Effect of Applied Voltage on Electroporation of SH-SY5Y Neuroblastoma (NB) and MCF-7 Human breast Carcinoma cells" başlıklı 2 çalışma sözlü olarak sunuldu.

Ayrıca katılım gerçekleştirilen bu çalıştay (workshop) programında sağlanan eğitimle birlikte elektroporasyon ve uygulamaları konusunda Gazi Biyofizik'in bilimsel alt yapısı güçlendirildi.

2.1. Elektroporasyon

2.1.1. Elektroporasyon teorisi

Elektroporasyon ya da elektropermeabilizasyon hücre veya dokulara yüksek şiddette ve kısa süreli dış E alan vererek dielektrik özelliğe sahip hücre membranında geçici porlar oluşturma işlemidir. Elektroporasyon süresince plazma membranının geçirgenliği

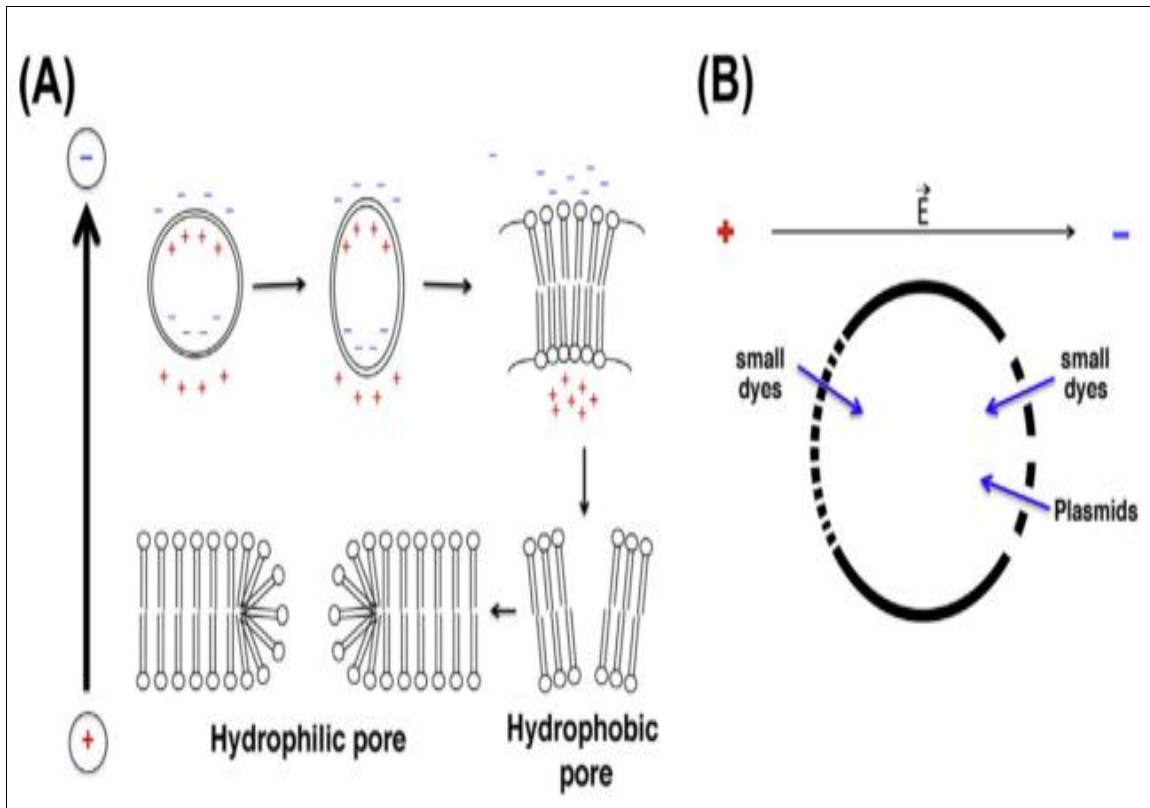
reversible por oluşturulması yoluyla geçici olarak artar. Membranı geçemeyecek kadar büyük moleküllerin (DNA, RNA, ilaç vb.) hücre içerisine geçişine olanak sağlayan elektroporasyon yöntemi, biyoteknoloji tıp ve tarım gibi pek çok alanda kullanılmaktadır [1, 2].

Membran permeabilizasyonu doku veya hücrelere çok güçlü bir dış E alan uygulanması ile elde edilir [3]. Elektroporasyonun etkinliği öncelikle uygulanan dış E alanın parametrelerine yani; gönderilen pulsun şekli ve sayısı, puls süresi ve E alan şiddetine bağlıdır [4]. Hali hazırda kullanılmakta olan ve membran elektroporasyonunu sağlayan uygulamalar oldukça kısa süreli (mikro saniye (μs), milisaniye(ms)) ve E alan şiddeti kV/cm'ler düzeyindedir. [5]. Bu tür bir E alan uygulaması; transmembran potansiyelini 0,5-1,5 V aralığında bir değere yükselterek, membranda geçici porlar oluşturmasına ve membrandan geçişi sınırlı olan moleküllerin geçişine olanak verir [6].

Hücrelerin metabolik faaliyetlerini sürdürmesinde elektriksel olayların rolü çok fazladır. Çoğu hücrenin fizyolojik faaliyetlerini gerçekleştirmesinde hücre membranı boyunca var olan potansiyel fark önemli rol oynar. Membran potansiyeli hücrelerdeki metabolik faaliyetlerin gerçekleşmesini sağlamaktadır [7]. Hücre membranı dış çevreye kontrollü geçirgenlik sağlar ve hücrenin yıkımını önleyen bir bariyer görevi görür. Bu sebeple hücre canlılığı için hücre membranının bütünlüğünü sürdürmesi hayati önem taşımaktadır [8]. Hidrofobik lipid tabakadan oluşan hücre membranı, sitoplazma ile ekstraselüler ortam arasında bir dielektrik tabaka olarak düşünülür ve yük depolayıcı basit bir kapasitör gibi hareket etmektedir. Hücre E alana maruz kaldığı zaman trans membran potansiyeli artar ve hücre içerisinde bulunan pozitif ve negatif yüklü moleküller membran boyunca hareket ederek hidrofilik ve hidrofobik porların oluşmasına yol açarlar. (Resim 2.1 A). Elektroporasyon boyunca por oluşumuna sebep olan etkinin başlıca sebebinin, dışarıdan uygulanan yüksek şiddette E alan ile indüklenmiş transmembran potansiyeli olabileceği düşünülmektedir [9].

Şekil 2.1' de gösterildiği gibi membran boyunca uygulanan bir E alan, pozitif ve negatif yüklerin hücre membranı boyunca birikmesine neden olarak, hücre zarındaki lipid moleküllerin herhangi bir kimyasal değişiklik olmaksızın porları oluşturmak için konumlarını değiştirmelerine sebep olur [10]. Membran yapısında bulunan lipid moleküllerinin herhangi kimyasal değişiklik olmadan gerçekleştirdikleri bu harekete “*flip-*

flop hareketi” denir. Membrandaki iyon taşınımı geçici olan bu kusurlar aracılığıyla artmaktadır. Lipit moleküllerin sıkışmasından kaynaklanan bu flip flop hareketin 5 ns’sürede gerçekleştiği tahmin edilmektedir ve sıkışmış moleküllerin birbirlerini tetikleyerek bu sıkışıklığı çevre moleküllere iletmesi 20-200 μ s’ de gerçekleşir. Bu hızlı olay sonrası, bu yapının yeniden düzenlenmesi milisaniye ve dakikalar arasında sürmektedir. Tek bir lipit molekülünün dönmesi mikrosaniyeler mertebesinde gerçekleşmekteyken, tüm hücre membranı boyunca yer alan lipidlerin tamamının flip-flop hareketi, saatler süren son derece yavaş bir süreçte gerçekleşir [11].



Şekil 2.1. Elektropermeabilizasyon oluşumunu gösteren model [10]

Proteinler, karbonhidratlar ve moleküller E alana göre kendilerini yönlendirmeye çalışırlar. Anot ve katot gibi iki elektrot arasına alınan hücrelerdeki yüklü (+ ve -) moleküller yükünün cinsine bağlı olarak hücrenin katot tarafında veya anot tarafında dağılırlar. E alan uygulanması durumunda plazma membranının anot ve katot tarafında farklı yüklerin birikmesi depolarizasyon ve hiperpolarizasyon durumuna sebep olmaktadır. Yüklerin farklı dağılması nedeniyle, elektrodların katot tarafına bakan hücrelerin yüzeyi depolarize iken, anot yüzeyine bakan tarafı hiperpolarizedir.

Bir dış E alanının indüklediği zar transmembran potansiyeli, membran dielektrik dayanma gerilimini (tipik olarak 500 mV) aştığı zaman, suyun hareketine ve sınırlı iyon akışına izin veren porlar oluşur. Buna bağlı olarak geçirgenlik artar. E alan artışıyla birlikte zamanla, stabilize olmayan membran ve porlar hücre içine ve dışına büyük moleküllerin çıkışı ve girişine izin vererek daha geniş porlar oluşturur. Dışarıdan uygulanan E alan kapatıldığı zaman belirli bir süre (dakikalar) içerisinde porların kapanmasıyla birlikte E Alan kaynaklı iyon dengesizliği ortadan kalkar ve membran potansiyeli dengeye gelir [10].

2.1.2. Elektrik alan parametreleri

Hücre süspansiyonunda hücrelerin geçirgenliği elektroporasyon yöntemi ile artırılabilir. Elektroporasyon işleminde kullanılan cihazlar elektroporator olarak isimlendirilirler. Bu cihazlar in vitro kullanım için dizayn edilmiş elektroporasyon kuvvetleri ile kullanılırlar. Kuvvetler iki elektrot içerir. Elektroporator tarafından uygulanan yüksek voltaj ile elektrotlar arasında kısa süreli yüksek E alan oluşur [12].

Uygulanan alanın büyüklüğü, uygulanan pulsun frekansı, sayısı, süresi ve şekli özellikle hücreye E alan yardımıyla gen aktarımını ve ilaç gönderimini etkileyebilmektedir [13, 14]. Yayınlanan araştırmalar alan şiddeti ve puls genişliğinin farklı kombinasyonlarının iskelet kasında ve tümörlerinde elektroporasyon için kullanılabileceğini göstermiştir [15]

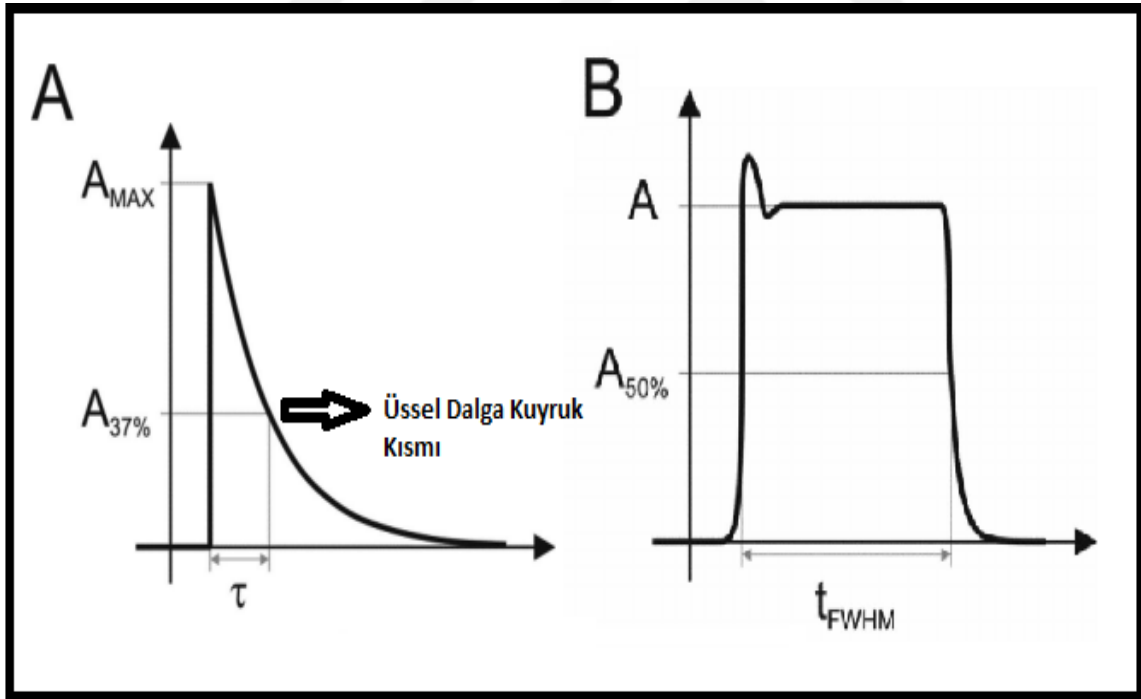
Hücre membranının elektroporasyonu uygulamalarında kullanılmakta olan elektroporator cihazlarının çıkışında iki tip dalga şekli mevcuttur kare ve üssel dalgalar. Şekil 2.2' de kare ve üssel dalgaların zamana bağlı olarak değişimleri gösterilmiştir. A) üssel puls A_{max} (maksimum genlik) ve zaman sabiti (τ)' nun bir fonksiyonu olarak nitelendirilir. Üssel azalma elektroporatorleri başlangıç voltajının yaklaşık %37'sine düşmesi için gereken bir (τ) zaman sabitinde üssel olarak azalan bir enerji gönderir. B) kare pulslar A_{max} (maksimum genlik) ve puls süresi (t_{FWHM}) (yarı maksimumda tam genişlik) ile nitelendirilmektedir. Burada A puls plato genliğidir ve puls plato genliğinin ortalama değeri olarak hesaplanır.

Üssel dalgalar genellikle gen aktarımında kullanılır. Üssel dalgalarda yüksek voltaj bileşeni hücre membranını geçirgen hale getirirken, dalganın kuyruk kısmı DNA'nın elektroforetik sürüklenmesine etki eder. Fakat iki birleşen bağımsız değildir. Kuyruk

sadece geri dönüşümsüz elektroporasyon uygulamalarında arzu edilir, çünkü hücre canlılığını büyük ölçüde etkiler. Üssel pulsların üretilmesi kare pulsların üretilmesine göre daha kolaydır. Fakat kare dalgaların elektriksel parametrelerinin yüke çok daha az bağımlı olmasından ve elektroporasyon süresince daha iyi hayatta kalma oranı sunması nedeniyle elektroporasyon uygulamalarında daha sık kullanılmaktadır [12, 16]

Her iki puls şekli bakteri, memeli ve bitki hücresi kültür süspansiyonlarında ve canlı dokularda *in vivo* uygulamalarda iyi çalışırken, kare dalganın daha az zarar verdiği ve daha iyi gen aktarımı ve ifadesi ürettiği gösterilmiştir [10].

Kare dalga elektroporatorlar süresi ayarlanabilen voltajla birlikte hücelere kısa süreli kare dalga pulslar gönderir. Bu pulsların süresi 100 μ s ve 100 ms aralığında değişebilmektedir. 0,4 cm genişliğinde elektroporasyon kuvvetine uygulanan 0-500 V'luk potansiyel fark kuvvet içerisinde 0- 2000V/cm' ye ulaşabilen E alan oluşturabilmektedir.



Şekil 2.2. Elektroporasyon pulslarının genlik ve zaman parametreleri [12]

Fizyolojik şartlar altında, dinlenim durumunda hücre membranı; iyon kanalları, iyonlar ve pompaların neden olduğu elektriksel bir potansiyele sahiptir. Onlarca milivolt şiddetinde olabilen bu potansiyel her hücrede mevcuttur [17]. Elektroporasyon işlemi, sitoplazmanın ve hücre dış ortamın iletkenlikleri zarıncından merteye olarak daha büyük

olduğu için, hücreye kısa ve yoğun elektrik uygulandığında, hücre zarı bir kapasitör gibi davranarak yüklenir.

Hücrelere bir elektriksel alan uygulandığında, kısa bir süre içinde hücre membranında E alan artar. Son derece kısa bir şarj süresinde (mikrosaniyeler zaman ölçeğinde) hücreye bir gerilim uygulandığında, dielektrik özelliğe sahip hücre zarı elektriksel olarak indüklenir. Schwann'ın denkleminde dışarıdan uygulanan bir E alan tarafından indüklenen transmembran potansiyeli ($\Delta\Psi_E$) denklem 2.1 kullanılarak açıklanabilir. [18].

$$\Delta\Psi_E = \Psi_{iç} - \Psi_{dış} = -f \cdot g \cdot r \cdot E \cdot \cos(\theta) (1 - e^{-t/\tau})$$

2.1

Yukarıdaki denklem 2.1 de yer alan terimler;

f , şekil faktörü

g , hücre dış ortamı (λ_e), sitoplazmanın (λ_i) ve hücre membranının (λ_m) iletkenliklerinin karmaşık bir fonksiyonudur

r , hücre yarıçapı

E, uygulanan elektrik alan şiddeti (V/cm)

θ , E alan ve hücre merkezinin normalle yaptığı açının ölçüsüdür.

t , E alan uygulaması başlamasından sonra geçen zaman

τ , membranın dielektrik özellikleri ve sitoplazma ve hücre dışı ortamın iletkenlikleri ile ilişkili membranın yükleme zaman sabitidir.

Denklem 2.1 ' de ifade edilen f şekil faktörü, yarıçap (r) ve uzunluk (l)'nin bir fonksiyonu olarak ifade edilir.(Denklem 2.2)

$$f = \frac{l}{l - 0.67r}$$

2.2

l :çubuk şeklinde hücreler için boyu ifade etmek üzere denklem 2.2' de ifade edilen şekil faktörü;

a) Küresel hücreler için ($l = 2r$) kabul edilip hesaplanırsa f yaklaşık olarak 1.5 olarak elde edilir ve

b) Çubuk şeklindeki hücreler için ($l \gg 2r$) kabul edilip şekil faktörü hesaplanırsa $f = 1$ olarak elde edilir.

Denklem 2.1' de ifade edilen hücre dış ortamı (λ_e), sitoplazmanın (λ_i) ve hücre membranının (λ_m) iletkenliklerinin karmaşık bir fonksiyonu olan g iletkenlik terimi olup denklem 2.3. ile aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$g(\lambda) = \lambda_i \lambda_e / [\lambda_m (\lambda_i + 2\lambda_e)(r/2dm) + (\lambda_i - \lambda_m)(\lambda_e - \lambda_m)]$$

2.3

Membranın yüklenme zaman sabiti olan τ ' nun açık formülü aşağıda verilmiştir (denklem 2.4.)

τ membranın dielektrik özellikleri ve sitoplazma ve hücre dışı ortamın iletkenlikleri ile ilişkilidir.

$$\tau = rC_m(\lambda_i + 2\lambda_e) / [2\lambda_i \lambda_e + r\lambda_m (\lambda_i + 2\lambda_e)/dm]$$

2.4.

C_m , birim alan başına membran kapasitansıdır.

Eğer membran saf bir dielektrik olarak düşünülürse, $\lambda_m = 0$ olur ve denklem 2.3' de ifade edilen $g = 1$ olur.

Bu durumda denklem 2.4 aşağıdaki gibi ifade edilir. (denklem 2.5) ;

$$\tau = rCm(\lambda i + 2\lambda e) / [2\lambda i. \lambda e]$$

2.5.

Hücrenin bir küre olduğunu ve şarj süresinin puls süresinden çok daha kısa olduğunu varsayarsak,

Denklem 2.1' de eksponansiyel ifade $((1 - e(-t/\tau)))$ 1'e eşit olur ve bu ifade denklem 2.6' daki gibi basitleştirilebilir (kararlı durumda):

$$\Delta\Psi_E = -1,5. g(\lambda). r. E. \cos(\theta)$$

2.6.

Membran dışarıdan herhangi bir elektrik alanla inüklenmese bile, doğal olarak iletim sinyali veya hücrelere güç sağlamak için canlı hücre membranları dinlenim membran potansiyeline ($\Delta\Psi_{\text{dinlenim}}$) sahiptirler. Hücrenin dışına göre iç voltajı görel olarak tanımlanır ve yaklaşık olarak -40 mV ile -60 mV arasındadır. Ancak dışarıdan uygulanan bir E alan etkisinde hücre membranı boyunca toplam potansiyel fark denklem 2.7 ile aşağıdaki gibi tanımlanır.

$$\Delta\Psi = \Delta\Psi_E + \Delta\Psi_{\text{dinlenim}}$$

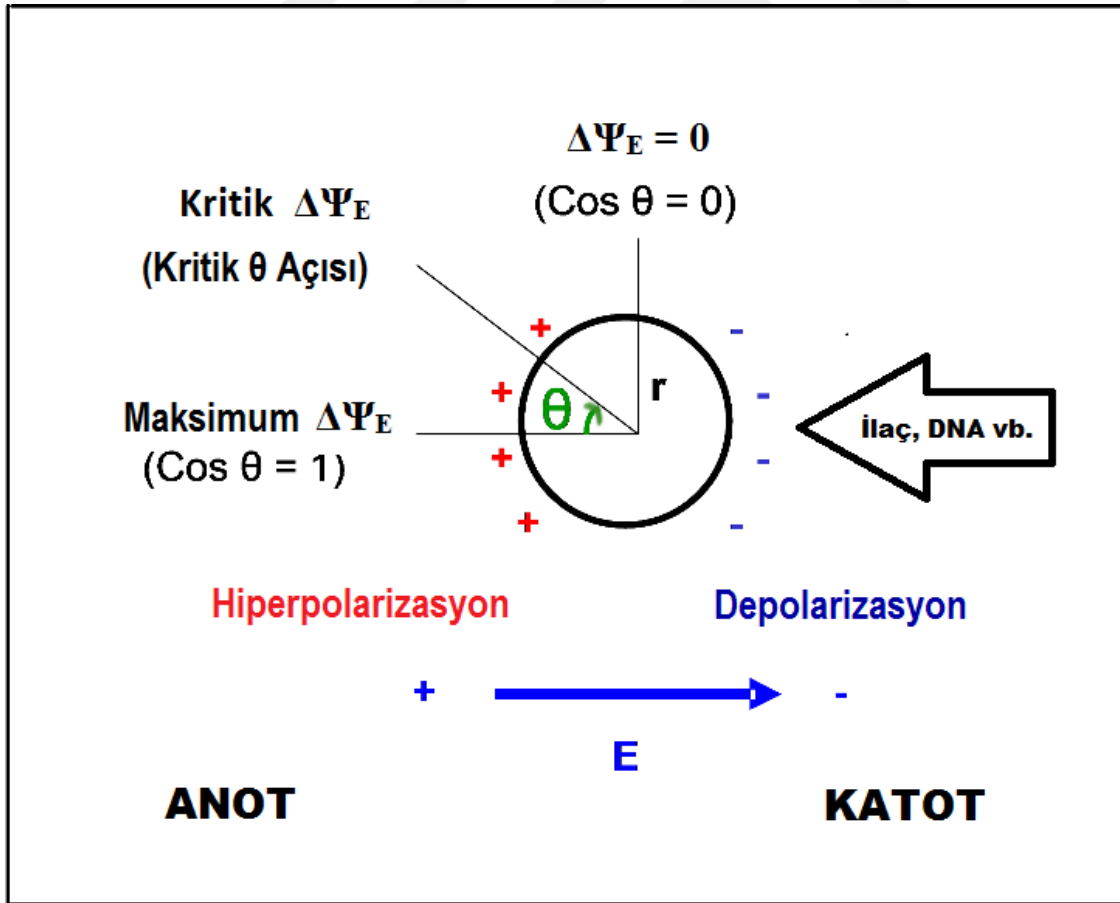
2.7.

Denklem 2.1.' e göre, indüklenen transmembran potansiyeli, hücre membranının konumuna bağlıdır.

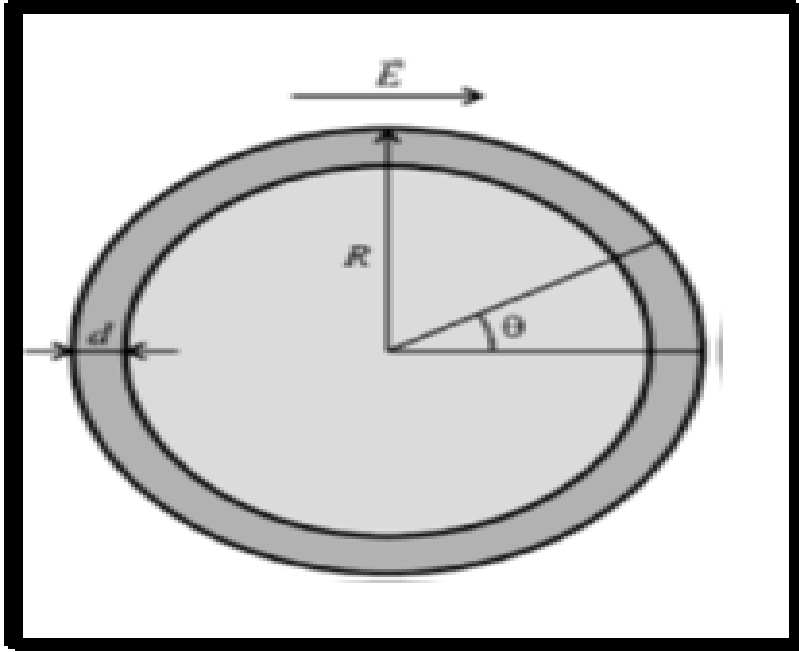
Şekil 2.3' den görüleceği gibi membranın yüklenmesi aşamasında, hücre içindeki negatif ve pozitif yükler, elektrodların katoda ve anoda dönük bölgelerinde birikir. Buna paralel olarak katoda en yakın kutup ($\theta = \pi$) depolarize olurken anoda en yakın kutup ($\theta = 0$) hiperpolarize olur. Hiperpolarize kutuptaki $\Delta\Psi$ potansiyeli daha yüksektir. Bu nedenle, por oluşumu başlangıçta hücrenin anoda en yakın kutbunda gerçekleşirken daha sonra katoda en yakın kutbu bu süreci takip eder.

$\Delta\Psi$ kritik bir eşik değere ulaşırsa, lipit moleküllerinin yapısal olarak yeniden düzenlenmesi yoluyla membranda nano ölçekli porlar oluşur ve membran iletkenliğinde hızlı bir artışla birlikte hızlı bir membran deşarjı ortaya çıkar, buna bağlı olarak membran potansiyelinde bir azalma meydana gelir.

Hücrenin büyüklüğüne göre değişmekle birlikte, toplam potansiyel fark kritik $\Delta\Psi$ (yaklaşık olarak 200mV ile 1V) civarında bir eşik değere ulaştığı zaman membran dengesizliği meydana gelir ve iyon, molekül geçişlerine sebep olur. Bu yüzden, eşik değer ile dışarıdan uygulanan E alan değeri arasındaki fark ne kadar büyük olursa, o kadar büyük membran yüzey alanı geçirgen hale getirilir. Permeabilizasyon dışarıdan uygulanan E alanının açısına bağlı olarak değişmektedir, açının 90° olduğu durumda denklem 2.6' ya göre $\Delta\Psi_E$ sıfır olmakta ve permeabilizasyon eşik değerinin altına düşmektedir (şekil 2.3). Permeabilizasyonun en yüksek olduğu açı değerlerinde hücre içerisine giren moleküllerin (DNA, ilaç vb.) sayısı artmaktadır [19, 20].



Şekil 2.3. Elektropermabilizasyon için teorik hücre modeli



Şekil 2.4. Elektroporasyonun şematik gösterimi

Elektroporator tarafından dışarıdan uygulanan bir V potansiyeli, R hücre yarıçapı ve d membran kalınlığı olmak üzere hücre membranında Denklem 2.8' de gösterildiği gibi bir E alan meydana getirir (Şekil 2.4)

$$E = V/d$$

2.8.

E, V/cm cinsinden E alanı,

V, elektrik darbesinin genliği ve

d, hücre zarı kalınlığıdır.

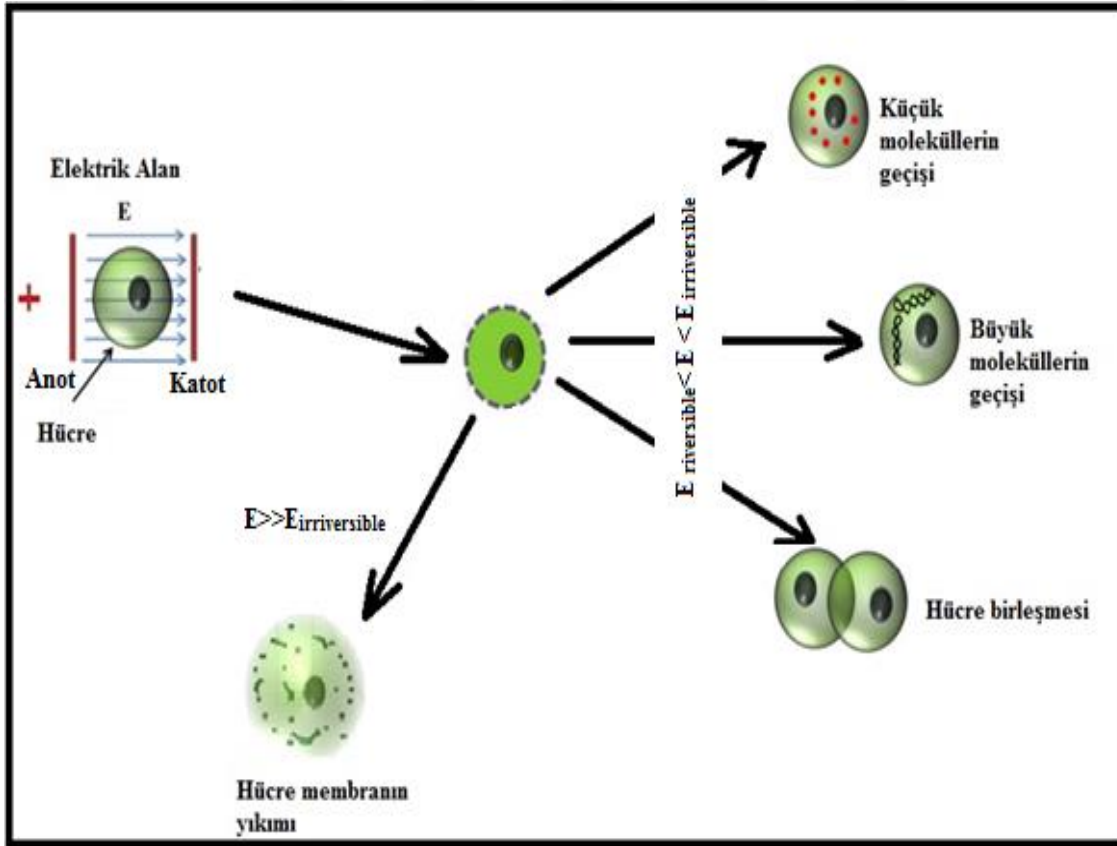
Buraya kadar elektroporasyon konusunda verilen formüllerden görüleceği gibi elektroporasyona etki eden parametreler;

Hüresel şekil faktörü (f) faktörü ve hücrenin yarıçapı (r), iletkenlik, permeabilizasyon sonrası gönderilen moleküllerin büyüklükleri ve dışarıdan uygulanan elektriksel gerilimin şiddeti, puls şekli, puls sayısı, puls süresi' dir [21, 22].

2.1.3. Geri dönüşümlü (reversible) elektroporasyon

Hücreye ve dokuya güçlü bir dış E alanı uygulandığında, hücre membranının kutuplaşmasına bağlı olarak membranın iletkenliği ve geçirgenliği önemli ölçüde artabilir ve sonuçta membranda nano ölçekli porlar oluşabilir. Ancak dışarıdan uygulanan bu alan kapatıldığında, membranda oluşan porlar kapanabilir ve zar, iletken durumundan normal durumuna dönebilir [23]. Bu olay, geri dönüşümlü elektriksel bozulma ya da geri dönüşümlü elektroporasyon olarak adlandırılır [24].

Geri dönüşümlü elektroporasyon geçici yüksek iletkenlik durumudur ve genellikle tersine çevrilebilir. Normal olarak plazma membranı tarafından dışlanan, membranı geçemeyen makro moleküller, oluşan porlar yoluyla hücelere girebilirler [23, 25]. Böylece elektroporasyon genellikle hücrelerin canlılığını koruduğu koşullarda, gen transferi ve elektrokemoterapi gibi uygulamalarda kullanılabilir [26].



Şekil 2.5. Elektroporasyon uygulamaları ve hücrenin olası cevapları (şekil Ref. [27]' den kaynaktan uyarlanmıştır)

Anot katot arasındaki hücreye dışardan uygulanan bir E alan hücre zarının eşik değerlerine ulaştığında, membran küçük veya büyük molekülleri hücre içerisine iletmek üzere geçirgen hale gelir. İki tek hücrenin birbirine yakın olması durumunda ise hücre füzyonu meydana gelebilir. Belirli kritik değeri aştığında elektroporasyon geri dönüşümsüz oluşabilir ve hücre zarının yıkımına ve nihayetinde hücre ölümüne neden olabilir (Şekil 2.5) [28].

2.1.4. Geri dönüşümsüz (irreversible) elektroporasyon

Geri dönüşümlü elektroporasyonda, dışardan uygulanan E alan geçici olarak hücre zarını geçirgen hale getirebilir, bu hücre hayatta kalabilirken eğer daha güçlü dış E alan uygulanırsa hücre zarının kalıcı olarak permeabilizasyonu gerçekleşebilir, hücre ölür ve süreç "geri dönüşümsüz elektroporasyon" olarak adlandırılır.

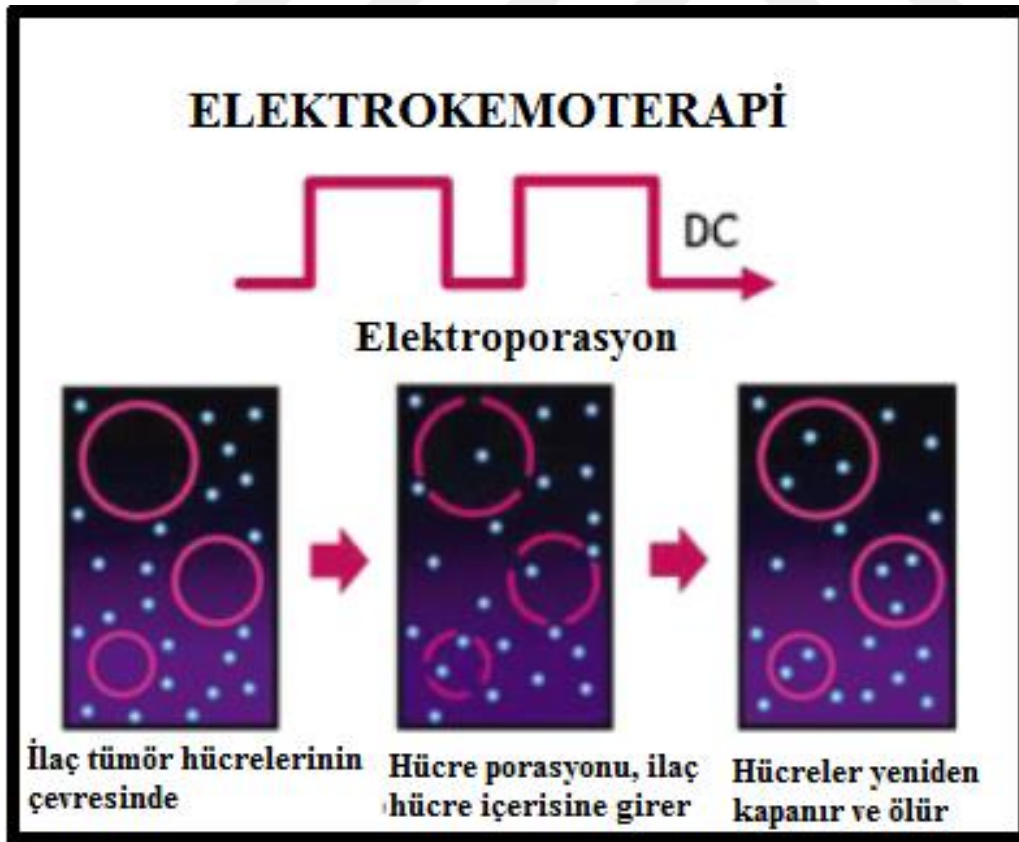
Bir süspansiyon sıvısındaki hücre için, hem sitoplazma hem de hücrenin içinde bulunduğu sıvı iyonlar içermektedir ve iletkendir. Pratikte yalıtkan olan hücre membranının lipit çift tabakası pulslu bir E alanı uygulandığında bir kapasitörün dielektrik tabakası gibi davranır. Membran kapasitörünün her iki tarafında oluşan yük birikmesi membran potansiyelini arttırabilir ve hücre membranının yapısının bozulmasına neden olabilir [29]. Bu bozulma ile birlikte membran lipit tabakasında hidrofobik veya hidrofilik porlar oluşabilir [30].

Hidrofobik durumlarda, porlar hidrokarbon lipid kuyruklar ile şekillenebilir. Su ile dolabilen hidrofobik porlar enerjisi bakımından elverişsizdir ve bu yüzden kısa ömürlüdür. Geri dönüşümlü elektroporasyon sırasında oluşan porlar, hidrofilik olmaları nedeniyle daha uzun süre yaşayabilir. Geri dönüşümlü elektroporasyon boyunca porların birikmesi, hidrofilik porların gerilimini azaltabilen lizolesitin içeren membrandan kaynaklanmaktadır. Hidrofilik porlar ya lipit zarının yeniden ilk duruma gelmesini sağlayabilir ya da bu durum lipid yapısında geri döndürülemez bozulmaya neden olabilir. Transmembran potansiyeli kritik değerin üzerinde çıkarsa, zar üzerinde geri dönüşümsüz hasar oluşur ve uygulama hücre ölümüyle sonuçlanır [27]. Bu nedenle mikro saniye süreyle E alan uygulanması yoluyla membranda geri dönüşümsüz por oluşturma yöntemi, tümör ablasyonunda kullanılmaktadır [31-33].

2.2. Elektrokemoterapi

Elektrokemoterapi kemoterapik ajanın elektroporasyon ile uygulanmasıdır. Elektrokemoterapi, kontrollü ve yüksek E alan uygulanması yoluyla hücre membran geçirgenliğini (permeabilizasyonu) artırarak sitotoksik ilaçların hücreler tarafından alınmasını arttıran bir antikanser tedavisi olarak da tanımlanabilmektedir [34, 35]. Yüksek E alan uygulanmasıyla geçirgenliğin artması, membran boyunca moleküllerin geçişine geçici olarak izin vermesine yol açar.

Şekil 2.6' dan görüldüğü gibi tümöre yüksek şiddette ve kısa süreli kare dalga E alan uygulandıktan sonra hücre membranında geçici porlar oluşur, kemoterapik ilaç hücre içerisine girer ve daha sonra porlar kapanır. Porların kapanması ile birlikte hücre içerisine giren kemoterapik ilaç etkinlik gösterir ve kanserli hücrelerin ölmelerini sağlar. Elektrokemoterapinin avantajları, bir kerelik tedavi, düşük yan etki ve tedaviyi tekrarlama fırsatı vermesidir [35].



Şekil 2.6. Elektrokemoterapinin mekanizması [35]

2.3. Melanom

Melanositler koyu kahverenkli bir pigment üreterek cilde rengini verir ve epiderminin stratum basale olarak adlandırılan en alt bölümünde yer alırlar. Melanom, cilde rengini veren bu melanositlerden kaynaklı malign bir cilt kanseri türüdür. Melanomlar diğer cilt kanserlerine göre daha az görülmesine rağmen, saldırgan seyirinden dolayı cilt kanseri nedeniyle gerçekleşen ölümlerin çoğunluğunu oluşturmaktadır. Genel olarak melanom, mavi göz rengi, kızıl veya sarı saç rengi, açık ten rengi gibi genetik faktörler ile ultraviyole (UV) ışığa maruziyet gibi pek çok faktör ile yakından ilişkili bulunmuştur [36, 37].

Melanomlar, melanosit kaynaklı olarak temelde deride ortaya çıktığı gibi melanositleri içeren tüm dokularda da meydana gelebilir. Dünyada nadir görülen bir hastalık olmaktan çıkan melanomun görülme sıklığı son yıllarda hızla artmaktadır [38]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre, her yıl dünya genelinde 232.000 yeni melanom vakası teşhisi konulmaktadır. 2017'de Amerika Birleşik Devletleri'nde 87.110 yeni melanom vakası ve hastalığa bağlı 9.730 ölüm gerçekleşebileceği tahmin edilmektedir. Dünyanın en yüksek melanom insidansı Kuzey Amerika'da görülen insidansın iki katından fazla olan Avustralya ve Yeni Zelanda'dadır. Bu durumun, bu ülkelerin, büyük ölçüde güneş ışını maruziyetinden kaynaklı veya çoğunlukla açık tenli insanlardan oluşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [39, 40].

Deri kanserlerinden ölümlerin yüzde yetmiş beşini oluşturan, kötü seyir ve hızlı ilerleme gösteren melanomlar önemli bir halk sağlığı sorunudur. 2006 yılında ülkemizde; İzmir, Edirne, Eskişehir, Trabzon, Antalya, Erzurum, Bursa ve Samsun şehirlerinde yapılan çalışmalarda melanom insidansı 1,4/100.000 olarak rapor edilmiştir. Sağlık Bakanlığı verilerinde, 2004 yılı melanom insidansı; erkeklerde 1,5/100.000 ve kadınlarda 1,2/100.000 olarak bildirilmiştir. 2009 yılında erkeklerde 2,1/100.000 ve kadınlarda 1,6/100.000 olarak rapor edilmiş olan melanom insidansının son 6 yılda gözle görülür derecede arttığı görülmektedir [41, 42].

2.3.1. Risk faktörleri

Melanom gelişmesinde ve ilerlemesinde pek çok faktör etkilidir. Bu faktörler;

1- UV güneş maruziyeti;

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC); güneş ışığına maruziyet ile melanom arasındaki ilişkinin detaylı olarak incelenmesi sonucunda, UV maruziyeti insanlarda deri melanomlarının temel sebebi olarak kabul etmektedir. Güneş ışığı, maruz kalan herkes için kanserojen etki gösterebilecek risk faktörleri arasında gösterilmektedir [43]. Risk faktörleri arasında yer alan güneş ışınlarının UV bileşeni; DNA hasarı oluşumu, hasar onarımının baskılanması ve immünoşüpresyon (immün sistemin baskılanması) yoluyla insanlarda deri kanserine neden olan etiyolojik bir ajan olarak kabul edilmektedir.

Uzun süreli UV' ye maruz kalma sonucu ortaya çıkan fotokimyasal ürünler, DNA hasarı, mutasyon olasılığı gibi pek çok parametreyi arttırmakta ve melanositlerin kontrolsüz proliferasyonuna yol açarak cilt kanserine neden olmaktadır [43, 44] Güneşe maruz kalma ile melanom arasında doğrudan ilişki olması şaşırtıcı değildir, çünkü güneş vücudumuzu kaplayan deri üzerinde etkilidir.

UV maruziyetin etkileri, organizmayı korumaya çalışan derinin güneşe maruz kalma süresi ile değişmektedir. Aralıklı da olsa UV maruziyetin melanosit ile etkileşiminin nispeten korumasız ve duyarlılığı yüksek ciltler üzerinde bu tür bir etkiye sebep olabileceği düşünülmektedir [45]. Güneşe yüksek dozda maruz kalma melanositlerde DNA'ya önemli ölçüde zarar vermektedir.

UV radyasyon ile ciddi hasar gören keratinositlerin apoptoz ile yok edilebilmesinin yanı sıra, benzer şekilde hasar gören melanositlerin, mutasyona uğrayarak yaşamını sürdürebilmesi kanser oluşumu riskini arttırabilmektedir. [45]. Memeli hücrelerinde DNA hasarına hücresel yanıtların düzenlenmesinde p53 tümör baskılayıcı gen önemli rol oynamaktadır. Ultraviyole radyasyon DNA hasarının tamirinde önemli bir rol oynayan p53'ün aktivitesini baskılar. Ayrıca proto onkogenlerin mutasyonlarının artmasına sebep olarak antitümör sürveyansı azaltır [46]. Bazı çalışmalar nispeten düşük genetik riski

bulunan ailelerde, kümülatif güneş maruziyetinin melanom riskini arttırmada genetik faktörden daha belirleyici olduğunu göstermiştir [47].

2- Yaş

Melanom, tüm yaş gruplarında görülebilen bir tümördür ancak dünya çapında görülme sıklığı ortalama 40-60 yaş arasındadır [48]. ABD'de ise melanom kadınlarda "25-29 yaş" grubunda en sık görülen kanserdir ve "30-34 yaş" grubunda ise meme kanserinden sonra en sık rastlanan ikinci kanser tipidir [49].

3- Cilt tipi ve rengi

Melanom gelişiminde fenotipik faktörler önemli risk faktörleri arasındadır. Bu fenotipik özellikler (güneşte bronzlaşmadan yanmaya meyilli açık cilt rengi; çiller; mavi, yeşil gözler; sarı veya kırmızı saç rengidir [47]. Melanom gibi kanserlerin görülme sıklığı, beyaz tenli insanlarda tüm yaş gruplarında çarpıcı olarak daha yüksektir [50]. Açık tenli kişilerin ışığa karşı koyu renk saç, iris ve cilt rengine sahip kişilerden daha duyarlı olduğu düşünülür [47].

Epidemiyolojik çalışmalar ile, Avrupa kökenli açık tenli bireylerin; kolayca yanabilen açık tenlilerin, asla bronzlaşmayan açık tenlilerin ve kolaylıkla yanan, hafifçe bronzlaşan açık tenlilerin, deri kanserine yakalanma ihtimalinin diğer cilt tiplerine göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir [48]. Güneşe düzenli olarak maruz kalan bronzlaşmış ve kalınlaşan deride, güneşten kaynaklı etkiler epidermal seviyede daha etkili şekilde bloke edilebilir [45].

4- Aile Öyküsü

Kalıtım melanomda önemli bir rol oynamaktadır. Ailesinde melanom görülen bireylerde melanom görülme olasılığının yüksek olduğu gösterilmiştir [48]. Melanomda aile öyküsü, genellikle birinci dereceden akrabalarında bir veya daha fazla melanomdan etkilenmiş kişilerin varlığı olarak tanımlanmaktadır [51].

5- Düzensiz (atipik) Benler

Epidemiyolojik çalışmalarda atipik benleri tanımlamak ve kaydetmek için IARC' ın belirlediği protokol kullanır: en az bir bölgede beneğe ait bileşen olmalıdır; buna ek olarak a) sınırları iyi tanımlanmamış b) boyutu 5 mm veya daha büyük c) renk değişimi d) şekil düzensizliği e) deride kızarıklık oluşması gibi özelliklerin en az üçünün olması gerekmektedir. Dünya çapında yapılan araştırmalar atipik et benleri (displazi gösteren lekeler) bulunan kişilerin bulunmayanlara göre çok daha yüksek risk altında olduğunu göstermiştir.

Aile üyelerinin en az ikisinde melanom ve displazi gösteren lekeler bulunan bireylerde melanom riskinin 500 kat yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Fakat tüm melanom insidansının % 5'inden daha az olan bu duruma sahip çok az insan vardır. Ayrıca, bu ailelerin çoğunda, et benlerinin yanı sıra çevresel faktörlerin de etkili olduğu gerçeği de hesaba katılmalıdır.

Ben sayısı 15' e kadarsa "çok az beni olan grup" olarak, ben sayısı 101-120 arasında olan grup "çok beni olan grup" olarak tanımlanmaktadır. Bu iki grup karşılaştırıldığında çok beni olan grubun melanom riskinin neredeyse yedi kattan fazla olduğu gösterilmiştir. [52, 53].

2.3.2. Melanom tedavisi

Melanom insidansının son otuz yıl içerisinde artış göstermesi ve buna bağlı olarak melanomdan ölüm oranının çoğu kanser türünden daha hızlı artması halk sağlığı açısından önemli bir tehdit olarak kabul edilmektedir [54, 55]. Melanom, cilt kanserinin en agresif formudur ve kanser tedavisinin mevcut tüm yöntemlerine dirençlidir [56, 57]. Malign melanom, cerrahi olarak çıkartma, kemoterapi ve radyoterapi içeren tedaviler ve bu tedavilerin kombinasyonu gibi birkaç uygulama ile tedavi edilir [50].

Erken evrede teşhisin mümkün olduğu durumlarda cerrahi olarak çıkarma en etkili yöntem iken, yayılım gösteren tümörlerde cerrahi sınırlı kalmaktadır. Bu durumda alternatif tedavi olarak radyoterapi kullanılır. Radyoterapi sıklıkla yaygın yüzeysel melanom metastazlarında başarılı bir şekilde kullanılır, ancak nodüler hacimsel lezyonlar için,

etkinliğinin düşük olması ve lezyonların sekonder ülserasyon riskine sahip olması nedenleriyle radyoterapi tercih edilmez. Yine de, semptomatik deri metastazlarına sahip hastalar için acil tedavilerde sıklıkla kullanılmaktadır [35]. Bununla birlikte malign melanom hastalarının tedavisinde bir başka tedavi yöntemi kemoterapidir. Ancak, melanomlarda kemoterapiye direnç ve hızlı metastaz nedeniyle uzun süreli sağ kalım ümit verici değildir. Bütün bunlarla birlikte, hastalığın bölgesel ve sistemik yayılımı gerçekleştiğinde, tedavi seçenekleri sınırlıdır ve genellikle etkisiz olduğu düşünülür [58].

Melanom tedavisinde genel olarak kullanılan kemoterapik ilaç sınıfları arasında, ilk olarak DNA'yı alkile ederek sitotoksik etkileri tetikleyen, hücre döngüsü ve DNA sentezini etkileyerek hücre çoğalmasının önüne geçen ve hücre ölümüne neden olan dakarbazin (DTIC), temozolomid ve sisplatin gibi kemoterapik ajanlar yer alır.

Bleomisin, tek ve çift sarmal DNA ile etkileşerek DNA kopmalarını tetikleyen ve DNA biyosentezini inhibe ederek anti tümör etkinliği sağlayan kemoterapik ilaçtır. Tübülün polimerizasyonunu, mitotik iğ oluşumunu engelleyen ve mitotik bölünmeyi inhibe ederek hücre yapısını bozan ve hücre ölümüne neden olan alkaloid vinblastin de melanom tedavisinde kullanılmaktadır. İmmünoterapi de kullanılan kemoterapik ajanlar genellikle BRAF inhibitörleridir. Melanom tedavisinde kullanılan ilaçlar ve hastalığa genel cevap oranları Çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

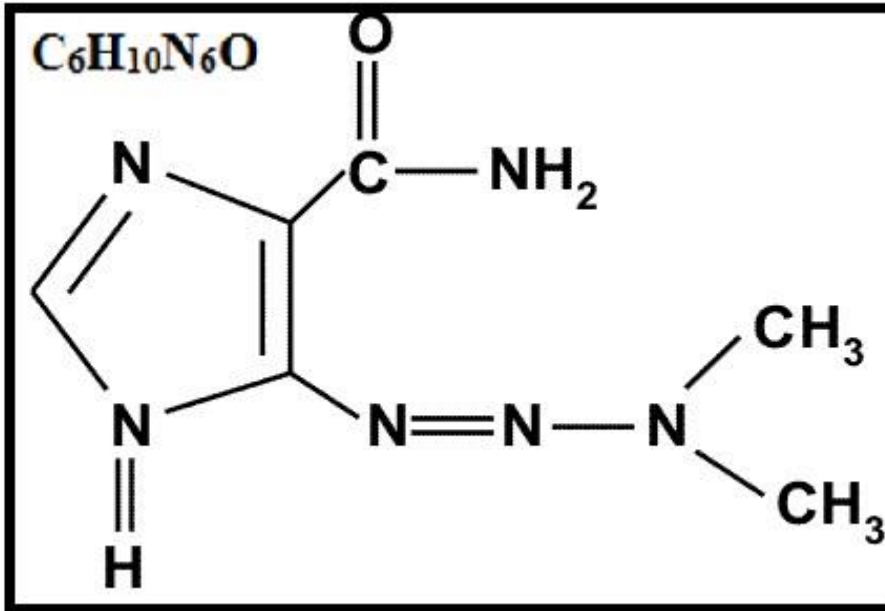
Çizelge 2.1. Melanom tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçlar ve hastalığa genel cevap oranları [59]

| İLAC | DOZ | GENEL CEVAP |
|---------------------|--|-------------|
| Dakarbazin | Her 3-4 haftada 5 gün 250 mg/m ² /gün | 5.3 – 25% |
| Vindezine | Her 14 günde 3 mg/ m ² | 12-26% |
| Interferon α | 9m-18m IU/m ² 3x/hafta sürekli uygulama | 13-25% |
| Fotemustine | Her 3 haftada 100 mg/ m ² /gün | 7.4-25% |
| Interleukin-2 | 1-5 günün üzerinde her 8 saatte i.v 15 dakika kısa infüzyon gibi 600 000 IU/Kg (maksimum 14 doz) | 16-21,6% |
| Temozolomid | Her 4 haftada 5 gün 150-200 mg/ m ² /gün | 13.5-21% |
| Carboplatin | Her 4 haftada 400 mg/ m ² | 19% |
| Carmustine | 75-110 mg/ m ² | 13-18% |
| Cisplatin | 60-150 mg/ m ² | 15% |
| Semustine | 130 mg/m ² | 16% |
| Paclitaxel | 125-275 mg/ m ² | 15% |
| Docetaxel | Her 21 günde 100 mg/ m ² | 14% |
| Vinblastine | Her hafta 6-8 mg/ m ² | 13% |
| Tamoxifen | 20 mg/gün | 4-13% |

Tabloya göre melanom tedavisinde kullanılan ve en etkili tedavi sağlayan ilaçlardan birisi olması nedeniyle çalışmamızda kemoterapik ajan olarak dakarbazin seçilmiştir.

2.4. Dakarbazin

Dakarbazin veya (5-(3,3-dimethyl-1-triazenyl)-imidazole-4-carboxamide, 30 yılı aşkın süredir metastatik melanom kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan standart alkilleyici kabul edilen ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış önemli kemoterapi ajanlarından birisidir [60, 61]. Kimyasal formülü $C_6H_{10}N_6O$ (Şekil 2.7) olan antineoplastik etkinliğe sahip bir ajan olarak, melanom ve hodgkin lenfoma kemoterapisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. [62].



Şekil 2.7. Dakarbazin'in moleküler yapısı

Dakarbazin, nükleik asitleri metilasyona uğratarak DNA hasarına yol açar ve bu yolla DNA, RNA ve protein sentezini inhibisyona uğratarak hücre ölümünü tetikler.

Kanserli hücreler daha hızlı bölündüklerinden ilaç etkinliği kanserli hücreler üzerinde daha fazladır. Ne yazık ki, melanom kemoterapisinde önemli bir ajan olan dakarbazin' in tek başına kullanımı hastaların % 5'inden daha azında beklenen yanıtı verirken, %10-20 arasında tedaviye düşük yanıt görülmesine bağlı hayal kırıklığı yaratmaktadır [63, 64].

Ayrıca dakarbazin, mide bulantısı ve kusma gibi mide ve bağırsaklarla ilgili yan etkilere neden olabilmektedir. Kemik iliğindeki kan hücrelerinin üretimini de baskılayarak anemi

ve nötropeni oluşturabilmekte ve nadiren verildikten 7 ile 14 gün sonra ishal ve grip benzeri bir sendroma neden olabilmektedir. Bu nedenle yan etkileri azaltarak melanom terapötik etkinliğini artırmak için yeni tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır.

Etkinliği arttırmak ve yan etkileri azaltmak üzere dakarbazin'e dayalı kemoterapik ilaç kombinasyon kemoterapisi veya biyokimyasal terapi (İnterferon ve/veya İnterleukin-2 ile ilgili) ile ilgili bir dizi klinik çalışma yürütülmektedir; ancak ilaç kombinasyonu çalışma sonuçlarına göre, tek başına dakarbazin 'e kıyasla yan etkileri arttığı görülürken tek ilaç kullanımına göre sağ kalım yararı sağlamadığını göstermiştir [58].

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının çoğu tipik olarak hücre zarından zor geçen ve hücre içerisine düşük miktarda alınan ilaçlardır. O nedenle çoğu zaman doz artırılması yolu ile tedavide başarı sağlanmaya çalışılmaktadır.

Çoğu kemoterapik ilaç çok düşük dozlarda kullanılsa bile hastalarda ciddi yan etkilere neden olmakta iken, doz arttırımı yan etkileri aşırı şekilde arttırmaktadır. Sonuç olarak, buna benzer pek çok sebep kemoterapik ilaç tedavisinin etkinliğini sınırlamaktadır [65].

Kemoterapik ilaçların hücre içerisine yeterince geçememesinden kaynaklanan bu doğal sınırlamaların üstesinden gelmenin bir yolu, uygulanan yüksek E alan ile geçirgenliği arttırılmış (permeabilize edilmiş) hücrelere, kemoterapi ilaçlarını vererek hücre içerisine giren ilaç miktarını arttırmaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre kültürleri üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalar, *in vivo* ve insan çalışmaları öncesinde temel oluşturarak öngörülerde bulunulmasını sağlayan çok önemli bir bilimsel yöntemdir. İlaç araştırmalarında, hücresel mekanizmaların belirlenmesinde, enfeksiyon hastalıklarının tanısında ve tedavisinde, genetik çalışmalarda, kanser tanı ve tedavisi gibi pek çok amaçla *in vitro* çalışmalar yapılmaktadır.

Bu çalışma; kemoterapi tedavisinde kullanılan dakarbazin'in insan melanom hücre hattı (SK-MEL-30) ve sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri üzerinde elektroporasyonla birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yapılmış *in vitro* deneysel çalışmadır.

Bu araştırmada;

- Elektroporasyon uygulamaları, Elektroporatörde
- Hücre permeabilizasyonu, Akım sitometride
- Hücre proliferasyonu, MTT ile Elisa okuyucu'da,
- Floresans görüntüler Floresan Mikroskopta, analiz edildi.

E alan uygulanması ve tüm *in vitro* biyolojik analizler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hematoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Elektroporasyon uygulamalarında kullanılan Elektroporatör cihazı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Farmakoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Ongun ONARAN' nın desteği ile temin edilmiştir.

3.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

3.1.1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücreler, kimyasallar ve kitler

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan hücre hatları

| Hücreler | Temin Yeri |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> İnsan melanom hücre hattı (SK-MEL-30) | Şap Enstitüsü /Ankara (Ticari olarak satın alındı) |
| <ul style="list-style-type: none"> Sağlıklı İnsan Deri Fibroblast Hücre hattı | Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü |

Çizelge 3.2. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar

| Kimyasallar | Marka |
|--|--------------|
| <ul style="list-style-type: none"> DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) | Sigma-D5546 |
| <ul style="list-style-type: none"> 2 mM L-Glutamine | Sigma- G7513 |
| <ul style="list-style-type: none"> Penicillin-Streptomycin | ThermoFisher |
| <ul style="list-style-type: none"> 0.25% Trypsin-EDTA (1X) | ThermoFisher |
| <ul style="list-style-type: none"> 10% FBS (ısıyla in aktive edilmiş fetal buzağı serumu) | İnvitrogen |
| <ul style="list-style-type: none"> PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi) | Lonza |
| <ul style="list-style-type: none"> DMSO (Dimethyl sulfoxide) | Sigma |

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kitler

Çizelge 3.3. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kitler

| Kitler | Marka |
|----------------------------------|-----------------------|
| • MTT Cell Proliferation Reagent | BioVision, Inc. |
| • Propidyum iyodür (PI) | eBioscience (Amerika) |
| • Tripan mavisi | ThermoFisher |

3.1.2. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar

Çizelge 3.4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar

| Cihazlar | Marka |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| 1- Hemasitometre (hücre sayım cihazı) | İnvitrogen |
| 2- İverted Mikroskop | Zeiss |
| 3- CO2 İnkübatörü | Nüve EC 160 |
| 4- Elektroporator | BTX ECM 830 (BTX, San Diego, CA) |
| 5- Santrifüj | Hettich Mikro 20 Centrifuge |
| 6- Elisa Okuyucu | TECAN (İsviçre) |
| 7- Akım Sitometri | Beckman Coulter |
| 8- Laminar Flow | Esco |
| 9- Floresan Mikroskop | Leica DMI 4000B |

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar ve özellikleri sırasıyla aşağıda açıklanmıştır;

1 - Hücrelerin yeterli konsantrasyona ulaşip ulaşmadığını belirleyebilmek için hücre sayım cihazı ve inverted mikroskop kullanıldı.

Hücre sayım cihazı için invitrogen marka otomatik cihaz kullanıldı. Yaşayabilen hücreler otomatik olarak (30 saniyede bir kolay ve doğru bir biçimde) invitrogen (Countess®) cihazı ile sayıldı.

Bu cihaz, standart tripan mavisi tekniği kullanılarak hücre sayısını ve canlılığı (canlı, ölü ve toplam hücreleri) doğru ve hassas bir şekilde ölçmek için tasarlanmıştır. Tek kullanımlık Countess ® hazneli slaytlarda sayma yapılır, bu nedenle örnekler arasında temizleme gerekmez. USB portu ile hücre sayımı verilerini ve görüntüsünü bilgisayara aktarmayı kaydetmeyi, yazdırmayı sağlar (Resim 3.1).



Resim 3.1. Hücre sayım cihazı (İnvitrogen)



Resim 3.2. İverted Mikroskop (Zeiss Axiocam ICC3)

2 - Hücreler her uygulama öncesinde ve sonrasında Zeiss marka inverted mikroskop ile görüntüledi (Resim 3.2).

3 - Hücre kültürü çalışmalarında hücelere gerekli olan inkübasyon şartlarının sağlanmasında, ortam sıcaklığının, neminin korunmasında ve her türlü ortam kontaminasyonundan korumak amacıyla Nüve EC 160 CO₂'li inkübatör kullanıldı. Elektroporasyon, yalnız ilaç ve elektroporasyonla birlikte ilaç uygulanan hücre grupları bu inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı (Resim 3.3).

Bu sistem otomatik olarak sıcaklığı 37°C'de ve ortam CO₂ düzeyini % 5'te tutmaktadır. Bu parametrelerden herhangi biri değiştiği takdirde otomatik olarak sesli uyarı vermektedir.



Resim 3.3. İnkübatör (Nüve EC 160)

4 - Hücrelerde permeabilizasyon oluşturabilmek amacıyla mikro saniye skalasında, ayarlanabilir kare dalga yüksek E alan pulsları üretebilen BTX ECM 830 (BTX, San Diego, CA) elektroporasyon sistemi kullanıldı (Resim 3.4).

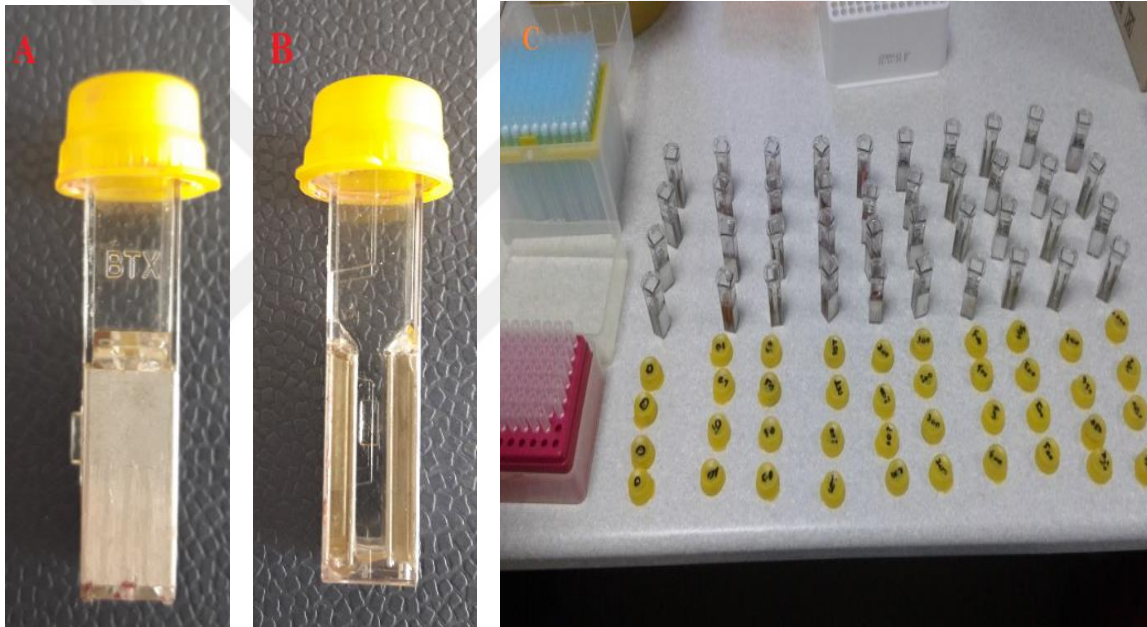


Resim 3.4. BTX ECM 830 Elektroporasyon sistemi

Yüksek şiddette ve kısa süreli E alan pulsları üreterek hücre membranında geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz porlar oluşturabilen bu cihaz aşağıdaki teknik özelliklere sahiptir;

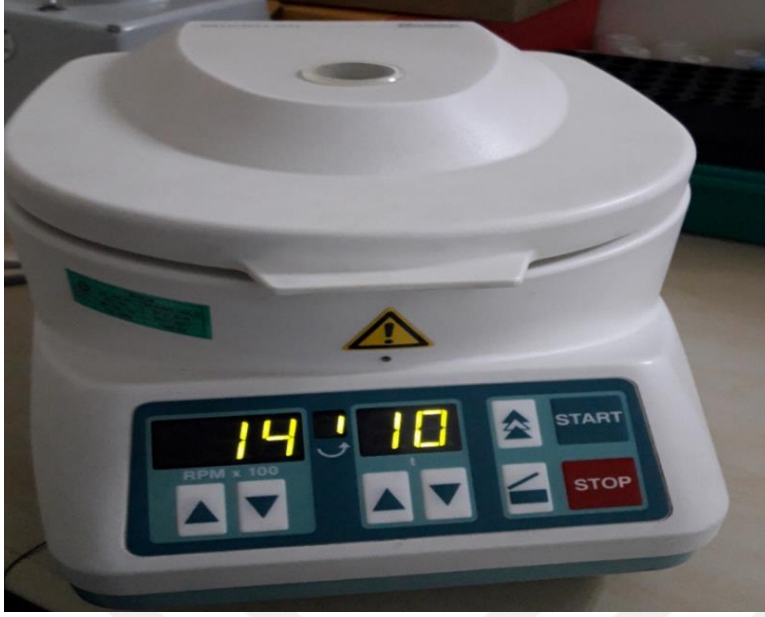
- 5 ila 3 000 V arasında voltaj uygulama aralığına,
- Gerilim ayarlayabilme hassasiyetine,
- 10 μ s' den 10 sn' ye puls uygulama sürelerine,
- Kare dalga verebilme özelliğine sahiptir.

Yüksek şiddete E alan hücrelere 4 mm alüminyum elektrodla sahip, tek kullanımlık BTX elektroporasyon küvetleri içerisinde uygulandı (Resim 3.5).



Resim 3.5. a) BTX ECM Elektroporasyon Küveti önden görünüm b) BTX ECM Elektroporasyon küveti yandan görünüm c) Elektroporasyon küvetleri ile yapılan çalışmalar

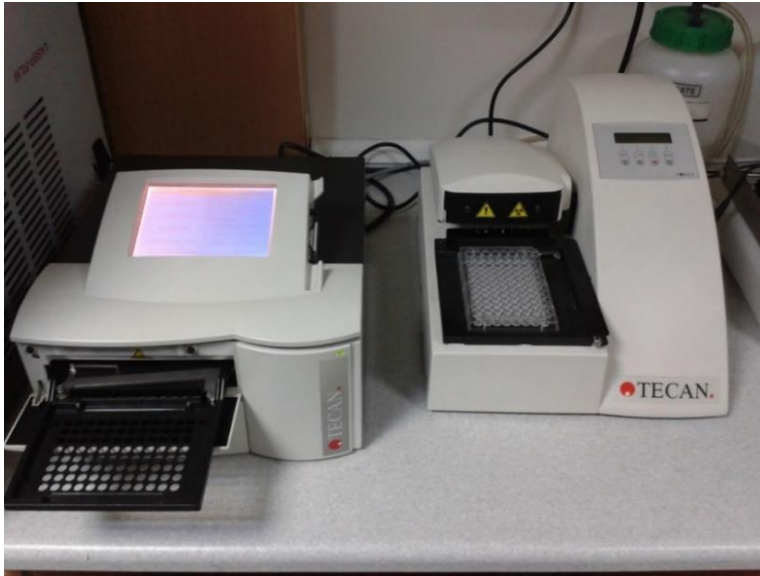
5 - Santrifüj işlemleri yüksek hızlı zaman ayarlı ve alarmlı Hettich Mikro 20 Centrifuge cihazı ile yapıldı (Resim 3.6).



Resim 3.6. Hettich Mikro 20 Santrifüj cihazı

6 - Hücre canlılığı tespitinde 96 kuyucuklu (Falcon Lincoln Park, NJ) elisa plakları kullanıldı.

Hücreler kuyucuklara ekildi ve 24 saat inkübasyonun ardından MTT (BioVision, Inc.) hücre canlılık kiti kullanılarak mikro işlemcili kontrol sistemlerine sahip TECAN Mikroplaka Elisa okuyucu kullanılarak absorbansları belirlendi. (Resim 3.7).



Resim 3.7. ELISA okuyucu (TECAN Mikroplaka Elisa)

7 - Hücre permeabilizasyonunun belirlenmesinde Beckman Coulter marka akım sitometri cihazı kullanıldı (Resim 3.8.).



Resim 3.8. Akım sitometri cihazı (Beckman Coulter)

8 - Hücre görüntülenmesi floresans mikroskop (Leica DMI 4000B) ile yapıldı. Elektroporasyon sonrasında propidyum iyodür boya ile boyanmış hücreler Leica marka floresan mikroskop ile görüntülendi (Resim 3.9.).



Resim 3.9. Floresans mikroskop(Leica DMI 4000B)

3.2. Kullanılan Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü, çoğaltma ve hücre sayımı

İn vitro koşullarda yapılan deneylerde hücrelerin yaşam faaliyetlerini sürdürebilmeleri için gerekli olan besi yeri ve mikro çevrenin oluşturulması hücre kültürü ortamları ile gerçekleştirilir.

Bu çalışmada hücre kültürü ortamında besi yeri olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), Trypsin/EDTA solüsyonu (Biochrom) ile birlikte % 10 fetal sığır serumu (Invitrogen), 2mM glutamine (Sigma- G7513), 100 units/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin kullanıldı.

SK- MEL-30 insan melanom hücre hattı (Şap Enstitüsü) ticari olarak satın alındı. Sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri ise Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünden alındı.

Hücre hatları aşağıda belirtilen protokoller ile çözülerek, pasajlandı, çoğaltıldı, sayıldı ve donduruldu.

Hücrelerin Çözülmesi

- ✓ Hücre çözülmesi çok hızlı şekilde yapıldı: Sıvı azot tankında bulunan hücreler buradan çıkarılarak hızlıca 37°C'lik sıcak su banyosuna konuldu.
- ✓ Hücreler, tamamen eridikten sonra 15 ml.' lik falkon tüpünün içine aktarıldı.
- ✓ Santrifüj (1200 rpm, 5 dak) edildi.
- ✓ Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet üzerine 2 ml hazırlanan besiyeri konuldu.
- ✓ Hücreler T25 flaska aktarıldı.
- ✓ Uygun besiyeri ile 10 ml. ye tamamlandı. İnkübatöre konuldu.
- ✓ Hücreler yeterince çoğaldıktan sonra T75' lik kültür flaskına pasajlandı.

Hücrelerin Pasajlanması (T25'lik kültür flaskından T75'lik flaska aktarılması)

- ✓ Hücreler çalışma yapılacak konsantrasyona ulaştığında tüm hücreler çekildi ve 1300 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Süpernatant atıldı. Pellete 5 ml PBS eklendi ve karıştırıldı.

- ✓ 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Taze olarak hazırlanan besiyerine ekilerek T75'lik kültür flaskına aktarıldı.

Hücrelerin Çoğaltılması, Sayılması ve Dondurulması

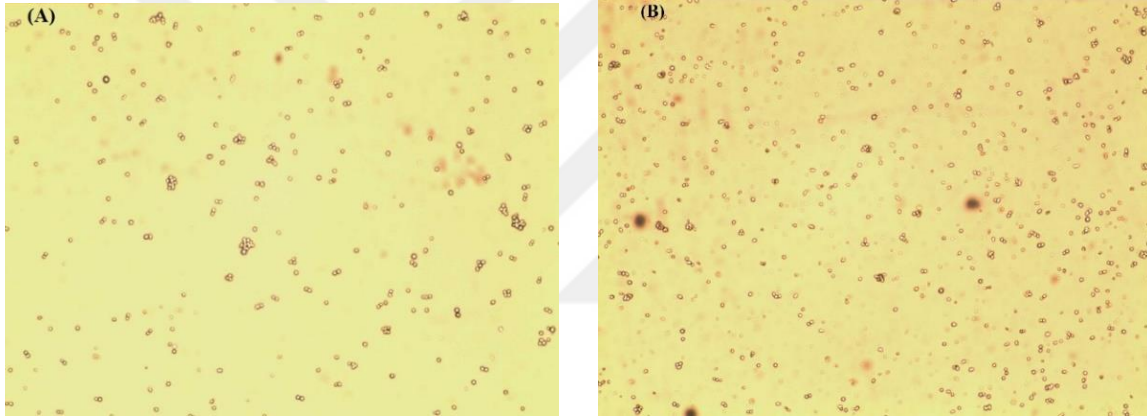
- ✓ Hücreler DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) ile birlikte % 10 fetal sığır serumu (Invitrogen), 2mM glutamine (Sigma- G7513), 100 units/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin kullanılan besi yerinde % 95 nem ve % 5'lik CO₂'li ortamda 37 °C de çoğalmaya bırakıldı (pH:7,2-7,4)
- ✓ İnsan deri fibroblast ve insan melanom hücre hatlarının her ikisi de; 3'er kez mediumda yıkandı, hücre canlılığı ve sayısı % 0,4 tripan mavisini ile hemositometre kullanılarak belirlendi. Tripan mavisini boya, membran bütünlüğü bozulmayan canlı hücreler içerisine giremez ve bu hücreleri boyayamaz. Membran bütünlükleri kaybolan ölü hücreleri ise bu boyayı geçirirler.
- ✓ Süspansiyon hücreler 1 ml olarak alındı ve 1:1 oranında tripan mavisini ile santrifüj edilerek hazırlandı ve bu solüsyondan 1 ml alınarak 1ml hücre süspansiyonuna ilave edildi.
- ✓ 50 µl kadar boyanmış hücre süspansiyonu alınıp, hemosimetrenin lamı üzerine yavaşça damlatıldı ve görüntüde hareketin engellenmesi için lam üzerine hafifçe bastırarak lamel yerleştirildi.
- ✓ Tripan mavisini ile canlı hücre sayısı belirlendi. Canlı olmayan hücreler tripan mavisini boyayı absorbe eder ve ışık mikroskop çekirdekleri maviye boyanmış olarak görünürler böylece canlı olmayan hücreler canlı hücrelerden ayırt edilerek sayılabilmektedir. Işık mikroskobu yardımıyla 10X ve 20X objektifler kullanılarak tripan boya absorbe etmeyen tüm hücreler sayıldı. Thoma lamı üzerinde belirli bölgede tripan mavi boyasını içine almayıp içi boş görünen hücreler canlı ancak içine boya alıp mavi olarak görünen hücreler ölü olarak sayım yapıldı ve bir birine oranlanarak % canlılık belirlendi. Milimetredeki canlı ve ölü hücre sayısı; merkez karede sayılan canlı hücre sayısı ile dilüsyon faktörü ve 10⁶ katsayısının çarpımı ile belirlendi.
- ✓ Tüm deneylerde deneylere başlamadan önce canlı hücre oranı (% olarak) tespit edildi. Canlı hücre oranı (%) = Boya almamış hücrelerin sayısı / Toplam hücre sayısı x 100. Hücre canlılığının %95 olduğu değerlerde deneylere başlandı.
- ✓ Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücre hatlarının her ikisinde, her bir kültür kabında 1x10⁶ hücre olacak şekilde (25 mm'lik kültür kaplarına) ekildi. Ardından Zeiss optik mikroskop ile görüntüleri alındı. Görüntüler sağlıklı insan deri fibroblast

hücreleri için Resim 3.10.A' da, insan melanoma hücreleri için Resim 3.10.B' de verilmiştir.

- ✓ Kullanılmayan hücrelerin dondurulması işlemi cryo solüsyonu ile yapıldı; dondurma işleminin oldukça yavaş yapılması gerektiğinden her bir kriyo tüpün içine 800 µl hücre süspansiyonu ve 100 µl FBS konuldu, üzerine 100 µl DMSO eklendi.

(DMSO toksik olduğundan damla damla ve son konsantrasyon %10 olacak şekilde eklendi). Pipetle karıştırıldı.

Hücreler sırasıyla +4°C de 20 dakika, -20°C' de 1 saat, -80°C' de 1 gece bekletilerek sıvı azot tankına aktarıldı ve tekrar kullanılmak üzere -80 °C' de muhafaza edildi.



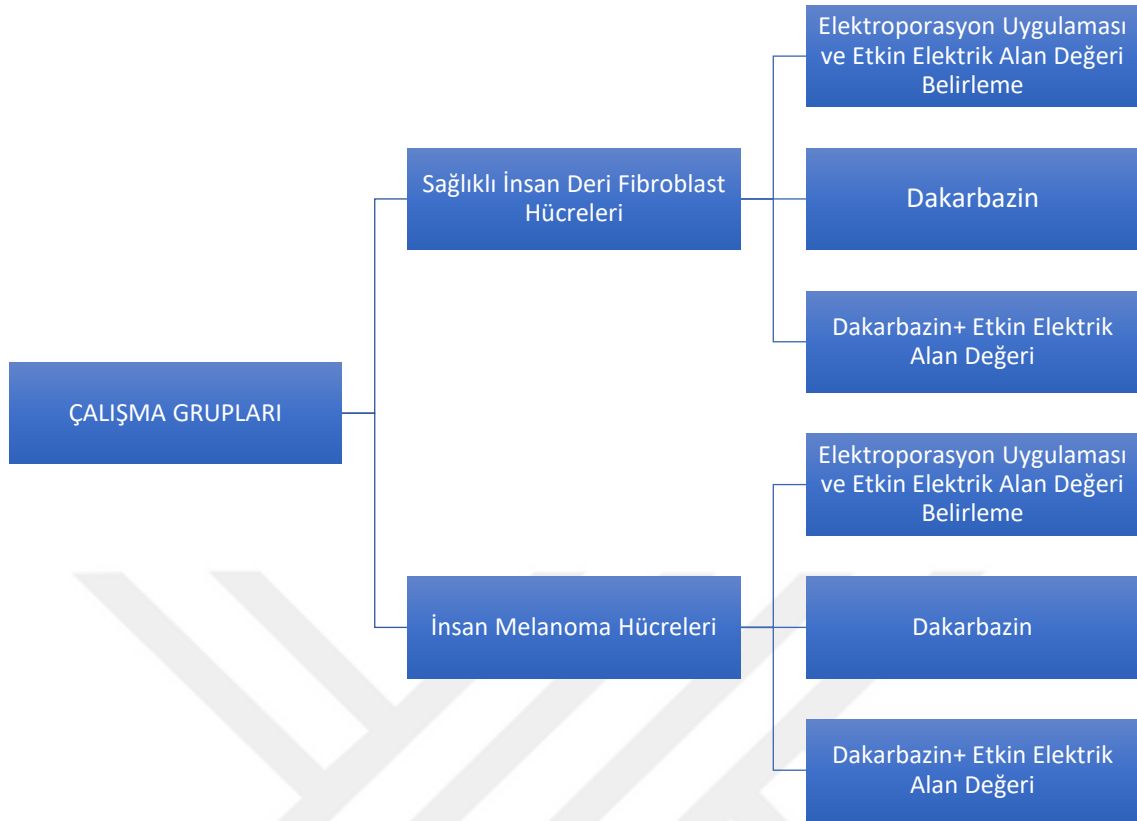
Resim 3.10. Hücrelerin optik mikroskop görüntüsü (x10)

A) Sağlıklı insan deri fibroblast B) İnsan melanom (SK-MEL-30)

3.2.2. Deney çalışma grupları ve uygulamaları

Kemoterapi tedavisinde kullanılan dakarbazin ile elektroporasyonun birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen çalışma iki farklı hücre grubu üzerinde yapıldı.

Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücreleri ile gerçekleştirilen araştırmada çalışma grupları ve uygulamalar Şekil 3. 1' de verilmiştir.



Şekil 3.1. Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücre hatları için çalışma grupları ve uygulamalar

3.2.3. Elektroporasyon uygulaması ve etkin elektrik alan değerinin belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümü iki aşamada gerçekleştirildi;

A-) Sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri ile insan melanom hücrelerinin her ikisine de E alan uygulanması sonucunda hücrelerde meydana gelen permeabilizasyon, PI yöntemi ile belirlendi.

Sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri ile insan melanom hücrelerinin her ikisi için de, membranda geri dönüşümlü por oluşturabilecek E alan değerinin gözlemlenmesi amacıyla çalışmalara başlandı.

- ✓ Membran permeabilizasyonunun gözlemlenmesi için propidyum iyodür (PI) yöntemi seçildi. Elektroporasyon uygulaması hemen öncesinde hücrelerin bulunduğu elektroporasyon kuvvetlerine PI eklendi. Her deney için, hücreler (E alana maruz

kalmayan) negatif bir kontrol ve uygulanan en yüksek alan şiddetine maruz bırakılan pozitif kontrol hücreleri (tamamı permeabilize olan hücreler) olarak hazırlandı.

- ✓ Her iki hücre hattı ayrı ayrı DMEM ile birlikte süspansiyon olarak 1×10^6 hücre (100 μ L) olacak şekilde 4 mm aralığa sahip çelik elektrotlara sahip elektroporasyon kuvvetlerine alındı.
- ✓ Her bir elektroporasyon kuvvetine 5 μ L propidyum iyodür (PI) eklendi ve BTX elektroporatör sistemi 0, 100, 200, 300, 400, 500, ..., 1500 V/cm E alan uygulanacak şekilde ayarlanarak; 100 μ s 8 kare dalga E alan pulsları uygulandı.
- ✓ Yüksek şiddete E alan altında membranda porlar oluşur ve membran permeabilizasyonu arttıkça PI hücre içerisine girer ve çekirdekte bazlar arasında nükleik aside bağlanır ve uyarılma ile bağlanmamış olanlardan 20 kat daha yüksek floresans verir.
- ✓ Akım sitometri sistemi (Beckman Coulter) ile permeabilizasyon belirlendi. Permeabilizasyon; boyalı hücrelerin yüzdesi, E alan uygulanmamış kontrol grubu ile kıyaslanarak belirlendi. E alana maruz kalmayan negatif bir kontrol (E alan uygulanmayan kontrol grubu) ve en yüksek alan şiddetine maruz kalan hücrelerin (% 100 permeabilizasyon) içerisine giren PI' in floresan ışımaya miktarları kıyaslanarak belirlendi.

B-) Sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri ile insan melanom hücreleri her ikisine E alan uygulanması sonucunda hücre canlılıklarında meydana gelen değişim, MTT yöntemiyle ayrı ayrı belirlendi.

- ✓ E alan uygulanması sonucunda hücre canlılıklarında meydana gelen değişimin belirlenmesi için MTT (3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) yöntemi seçildi.
- ✓ Her iki hücre hattı ayrı ayrı DMEM ile birlikte süspansiyon olarak 1×10^6 hücre (100 μ L) olacak şekilde 4 mm aralığa sahip çelik elektrotlara sahip elektroporasyon kuvvetlerine alındı.

- ✓ Her bir elektroporasyon kuvveti için BTX elektroporatör sistemi 0, 100, 200, 300, 400, 500,, 1500 E alan V/cm alan uygulanacak şekilde ayarlanarak; 100 µs 8 kare dalga E alan pulsları uygulandı.
- ✓ Sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri ile insan melanom hücreleri her ikisine E alan uygulandıktan sonra 24 saat inkübe edildi ve bu sürenin sonunda kuvetlere 10 µL MTT eklenerek hücre canlılıkları tespit edildi. E alan uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak ele alındı ve aynı süre için inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Her bir durum için deneyler 3 tekrar ile yapıldı.
- ✓ % Canlılık değerlendirmesi için E alana maruz kalmayan kontrol hücreleri ve E alan uygulanan hücrelerin ELISA okuyucudaki absorbans değerleri kıyaslanarak belirlendi.

E alan değişimine karşı permeabilizasyonun değişimi sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için Şekil 4. 1'de, SKMEL-30 insan melanom hücre hattı için Şekil 4. 2'de verildi.

E alan değişimine karşı hücre canlılık değişimleri sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için Şekil 4.3 'de, insan melanom hücre hattı için Şekil 4. 4'de ayrı ayrı kontrole göre kıyaslanarak verildi.

Etkin E alan değeri, hücre canlılığı ve permeabilizasyonun en yüksek olduğu değerdir. Etkin E alan ve bu değerde hücre hem permeabilize olmakta hem de canlılığı etkin şekilde devam etmektedir. Bu nedenle permeabilizasyon ve hücre canlılığı grafiklerinin kesişiminden etkin E alan değeri bulunmaktadır. Sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için etkin E alan Şekil 4.5 'de, insan melanom hücre hattı için etkin E alan Şekil 4. 6'da verildi.

3.2.4. Kemoterapik ilaç uygulama

Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücre hattının her ikisi için de yalnız kemoterapik ajan uygulanması durumunda hücre canlılığında meydana gelen değişim incelendi.

Kemoterapik ilaç olarak dakarbazin kullanıldı.

- ✓ Elektroporasyon çalışmasına başlamadan öncesinde hücre canlılık değerleri tripan mavisi ile ölçüldü ve canlılık %97 olarak tespit edildikten sonra bu çalışmalara başlandı.
- ✓ Hücre canlılığı testleri için her iki hücre hattı ayrı ayrı 96 kuyucuklu kültür kabına, her kuyucukta hücre konsantrasyonu 1×10^6 hücre / 100 μ L olacak şekilde hücre ekildi.
- ✓ Dakarbazin her çalışma öncesinde, 10 mg / 1000 ml taze stok çözelti olarak hazırlandı. Dakarbazinin in vitro aktivasyonu için 1 saat ışığa maruz bırakıldı [66].
- ✓ Taze olarak hazırlanan stok solüsyon seyreltilerek 0, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 μ M konsantrasyonlarda dakarbazin hazırlandı.
- ✓ Hazırlanan konsantrasyonlardaki dakarbazin solüsyonları 96 kuyucuklu elisa tabaklarında bulunan insan deri fibroblast ve insan melanom hücre hatlarına ayrı ayrı uygulandı ve 24 saat CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.
- ✓ Her bir konsantrasyon değeri için deneyler 3 kez tekrarlandı.
- ✓ 24 saatin sonunda dakarbazin' in her iki hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla kuyucuğa 10 μ L MTT eklenerek hücre canlılığı tespit edildi.

3.2.5. Elektroporasyonla birlikte ilaç uygulama

Elektroporasyon aşamasında sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücre hatları için ayrı ayrı belirlenmiş olan etkin E alan değeri ile birlikte hücrelere 8 farklı konsantrasyonda dakarbazin uygulandı. Dakarbazinin aktivasyonu için kullanımdan önce 1 saat ışığa maruz bırakıldı [66]. Her uygulama öncesi dakarbazin taze olarak hazırlandı ve hücrelere uygulandı.

- ✓ Her iki hücre hattı ayrı ayrı 0, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 μ M olmak üzere 8 farklı dakarbazin konsantrasyonu olacak şekilde BTX elektroporatör kuvvetlerine alındı.
- ✓ Elektroporatör kuvvetlerine alından hücreler, belirlenen etkin alan parametreleri (sağlıklı insan deri fibroblast için; 1000V/cm, SK-MEL 30 insan melanom için;

1500V/cm) BTX elektroporator sistemi ile her bir elektroporasyon kuvvetine ayrı ayrı uygulandı ve daha sonra 24 saat inkübe edildi.

- ✓ Etkin E alan uygulanan hücreler kontrol grubu olarak ele alındı ve aynı süre için inkübasyona bırakıldı. Her bir durum için deneyler 3 kez tekrarlandı.
- ✓ 24 saat inkübasyon sonrasında her bir kuyucuğa 10 µL MTT eklenerek hücre canlılığı tespit edildi.

3.2.6. Sitotoksosite ve inhibitör konsantrasyon (IC50) analizi

Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanoma hücrelerinde, yalnız dakarbazin ve elektroporasyonla birlikte dakarbazin uygulamaları bölüm 3.2.4 ve 3.2.5’de belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen bu çalışmalar sonucunda hücrelerde meydana gelen canlılık değişimi MTT yöntemi ile belirlendi.

MTT yöntemi çoğalmaya devam eden hücrelerde dehidrojenaz enzimi aktivitesinin artışı ile tetrazolyumu indirgemesi sonucu formazan (mor) oluşturması ile ortaya çıkan renk değişiminin ELISA okuyucuda absorbans olarak ölçülmesi prensibine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Mor olarak gözlemlenen renk, daha açık renklere dönüştükçe sitotoksitede artış görülür.

MTT yöntemi ile çalışılan ilaç konsantrasyonuna bağlı hücre % canlılık değişimi sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanoma hücreleri için yalnız dakarbazin uygulanan ve elektroporasyonla birlikte dakarbazin uygulanan gruplar denklem 4.1 ile hesaplandı;

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}} \times 100$$

3.1.

Bu denkleme göre her grup için kendi kontrolüne göre % canlılık değişimleri ayrı ayrı hesaplandı.

İlaç konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığında meydana gelen değişim grafiği

çizildi ve sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için Şekil 4.7 ve insan melanoma hücreleri için Şekil 4.8'deki grafikler ile gösterildi.

Her iki hücre için de dakarbazinin uygulanan dozlarına karşılık gelen % hücre canlılık değişiminden hücrelerin %50' sinin proliferasyonunu inhibe edebilecek konsantrasyon değeri (IC_{50}) hesaplandı. Bu hesaplamada excell nokta dağılım grafik yöntemi kullanıldı. Grafik üzerinde hücre canlılığının % 50' sine karşılık gelen (IC_{50}) dakarbazin konsantrasyonu her iki hücre içinde ayrı ayrı bulundu. Dakarbazin uygulanan hücre grupları ve dakarbazin+ E alan uygulanan gruplar için her iki hücre grubunda ayrı ayrı inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) hesaplandı.

Çalışmada elektroporasyon yönteminin etkinliğini belirlemek için yalnız dakarbazin ile elektroporasyon + dakarbazin uygulanan hücreler için hesaplanan IC_{50} değerlerinin birbirine oranı (IC_{50} elektroporasyon+dakarbazin / IC_{50} dakarbazin) hesaplandı.

3.2.7. Floresan mikroskop görüntüleri

Floresan mikroskopu ile permeabilize hücreleri görüntüleyebilmek için elektrodlar arasında yer alan 100 μ l hücre süspansiyonuna, 5 μ l PI eklendi. Hemen ardından elektroporasyon uygulandı.

Elektroporasyon uygulaması sonrasında hücreler lamellerin üzerine alınarak floresan mikroskopunda görüntüler incelendi. Floresan mikroskopu, temel seviyede bulunan elektronun enerji alarak uyarılması λ_{ex} (uyarma) ve daha sonra uyarılmış halden temel seviyeye dönerken belirli dalga boyunda λ_{em} (salınım) ışımaya yapması yoluyla görüntü elde edilmesi prensibi ile çalışır.

Floresan mikroskop görüntüleme için kullanılan PI için $\lambda_{ex} = 535\text{nm}$, $\lambda_{em} = 617\text{nm}$ olarak seçildi. E alan arttıkça floresan ışık veren hücrelerinin sayısında artış gözlemlendi. Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom SK-MEL-30 hücreleri hücrelerinden alınan floresan mikroskop görüntüleri Resim 4.1. ve Resim 4.2' de verilmiştir.

3.2.8. Kullanılan istatistiksel yöntemler

Bu tez çalışması en az üç tekrarlama deneyle gerçekleştirildi. Karşılaştırmalarda ortalama değer ve standart sapma değerleri kullanıldı. Araştırma bulgularının normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. SPSS (Statistics Program for Social and Science) Windows Ver. 15.0” (SPSS Inc., Chicago, USA) paket programı ile yapılan değerlendirme sonunda verilerin normal dağılıma uymadığı gözlemlendi.

Bu dağılıma uygun olarak istatistiki hesaplama Mann-Whitney u testi ile yapıldı. P değerlerinin 0.05'in altında olduğu değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.





4. BULGULAR

Tez çalışmasında hücre membranında elektroporasyon etkisiyle birlikte geri dönüşümlü porlar oluşturulması yoluyla, melanom kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaç olan dakarbazinin sitotoksitesini arttırıp arttıramayacağını belirlemek amaçlanmıştır. Böylece melanom kemoterapisinde kullanılan etkili ilaçlardan birisi olan dakarbazinin elektroporasyon ile birlikte uygulanması yoluyla, düşük dozlarda yüksek etki oluşturması ve kemoterapiden kaynaklı yan etkilerin azaltılması hedeflendi. Sağlıklı ve kanserli hücreler ayrı ayrı çalışılarak her iki hücre için uygulanan kombine tedavinin etkisinin *in vitro* ortamda araştırılması amaçlandı.

Çalışma; i) hücre membranında geri dönüşümlü porların meydana getirilmesi için gerekli etkin E alan değerinin belirlenmesi, ii) inhibe edici ilaç konsantrasyonlarının belirlenmesi, iii) etkin E alanla birlikte ilaç maruziyetinin inhibe edici konsantrasyonlarının belirlenerek kıyaslanması olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir:

Bu amaçlar doğrultusunda sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri ve insan melanom hücreleri olmak üzere iki hücre hattı kullanıldı.

Her iki hücre hattında da elektroporasyonla birlikte hücre membranında geri dönüşümlü porlar oluşturuldu. Por oluşumu PI yöntemi le takip edildi. Hücre membranında oluşturulan porların hücre canlılığı üzerinde meydana getirdiği değişim MTT yöntemi ile değerlendirildi. E alan uygulanması ile hücre membranında meydana gelen permeabilizasyon ve hücre canlılık grafikleri değerlendirilerek etkin E alan belirlendi.

Ardından her iki hücre hattında da çeşitli konsantrasyonlarda yalnız dakarbazin uygulanmasının konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı üzerinde meydana getirdiği değişim değerlendirildi ve IC_{50} değerleri belirlendi.

Her iki hücre hattında da elektroporasyon uygulanması ile belirlenen etkin E alan değeri ile birlikte ilaç maruziyetinin inhibe edici konsantrasyon değerleri belirlenerek kıyaslandı. Yalnız dakarbazin ve elektroporasyonla birlikte dakarbazin uygulanmasına ait IC_{50} değerleri kıyaslandı. Böylece elektroporasyonla birlikte dakarbazin kombine

uygulanmasının yalnız dakarbazin uygulanmasına göre etkinliği her iki hücre hattı için değerlendirildi.

Tez çalışmasının bu bölümünde; i) sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücre hatlarına uygulanan elektroporasyonla birlikte hücre canlılığının korunduğuna ilişkin bulgular ve hücre membranında geri dönüşümlü porların meydana geldiğine ilişkin etkin E alan bulguları; ii) her iki hücre hattına ait bu alan değerlerinin hücre membranında oluşturdukları etkinin görüntülediği floresan mikroskop bulguları; iii) çeşitli konsantrasyonlarda yalnız dakarbazin uygulanan hücrelerin sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği ilaç konsantrasyonuna bağlı hücre canlılığı değişimini veren IC_{50} bulguları; iv) elektroporasyonla birlikte dakarbazin uygulanmasının hücre canlılıklarında meydana getirdikleri değişimi veren IC_{50} bulguları verildi.

4.1. Etkin Elektrik Alan Değerinin Belirlenmesi Bulguları

Çalışmanın ilk kısmında etkin E alan değerini belirlemek amacıyla;

A) E alan değişimine bağlı olarak hücre membranındaki geçirgenlik değişimi (permeabilizasyon) bulguları PI yöntemi ile değerlendirildi

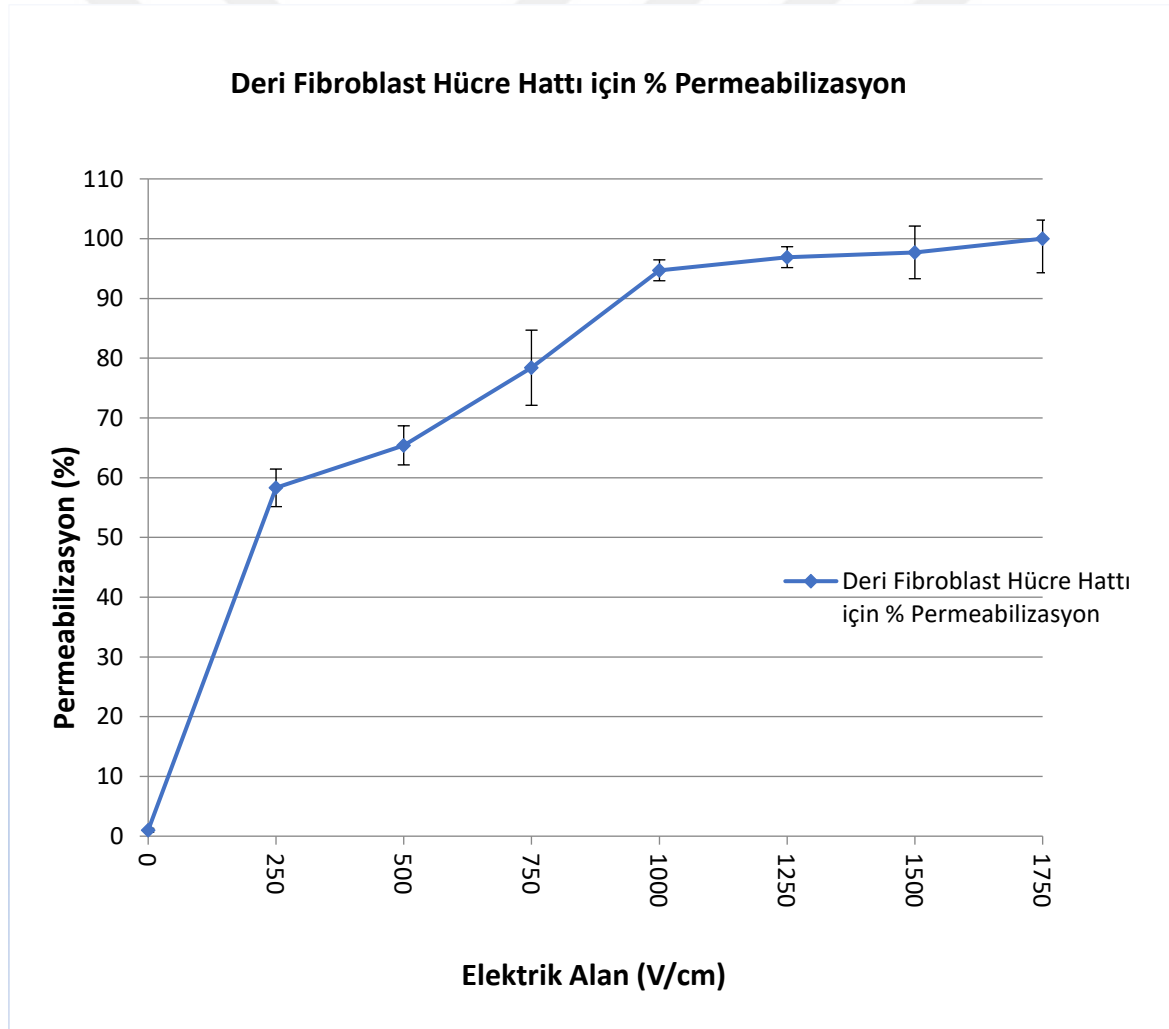
Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücrelerinin her ikisine de 0-2000V/cm aralığında, 1 Hz tekrarlama frekansında 100 mikro saniye süre E alan uygulandı ve E alana bağlı geçirgenlik değişimi belirlendi. Bulgular Şekil 4.1. ve Şekil 4.2' de verildi. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' de verilen sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalama değerini göstermektedir. Dikey çubuklar standart sapma (n=3) olarak ifade edilmektedir.

B) E alan değişimine bağlı olarak hücre canlılığında meydana gelen değişim MTT yöntemi ile değerlendirildi.

Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücrelerinin her ikisine de 0-2000V/cm aralığında, 1 Hz tekrarlama frekansında 100 mikro saniye süre ile E alan uygulandı ve E alana bağlı hücre canlılık değişimleri belirlendi. Bulgular Şekil 4.3. ve Şekil 4.4' de verildi. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4' de verilen sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalama değerini göstermektedir. Dikey çubuklar standart sapma (n=3) olarak ifade edilmektedir.

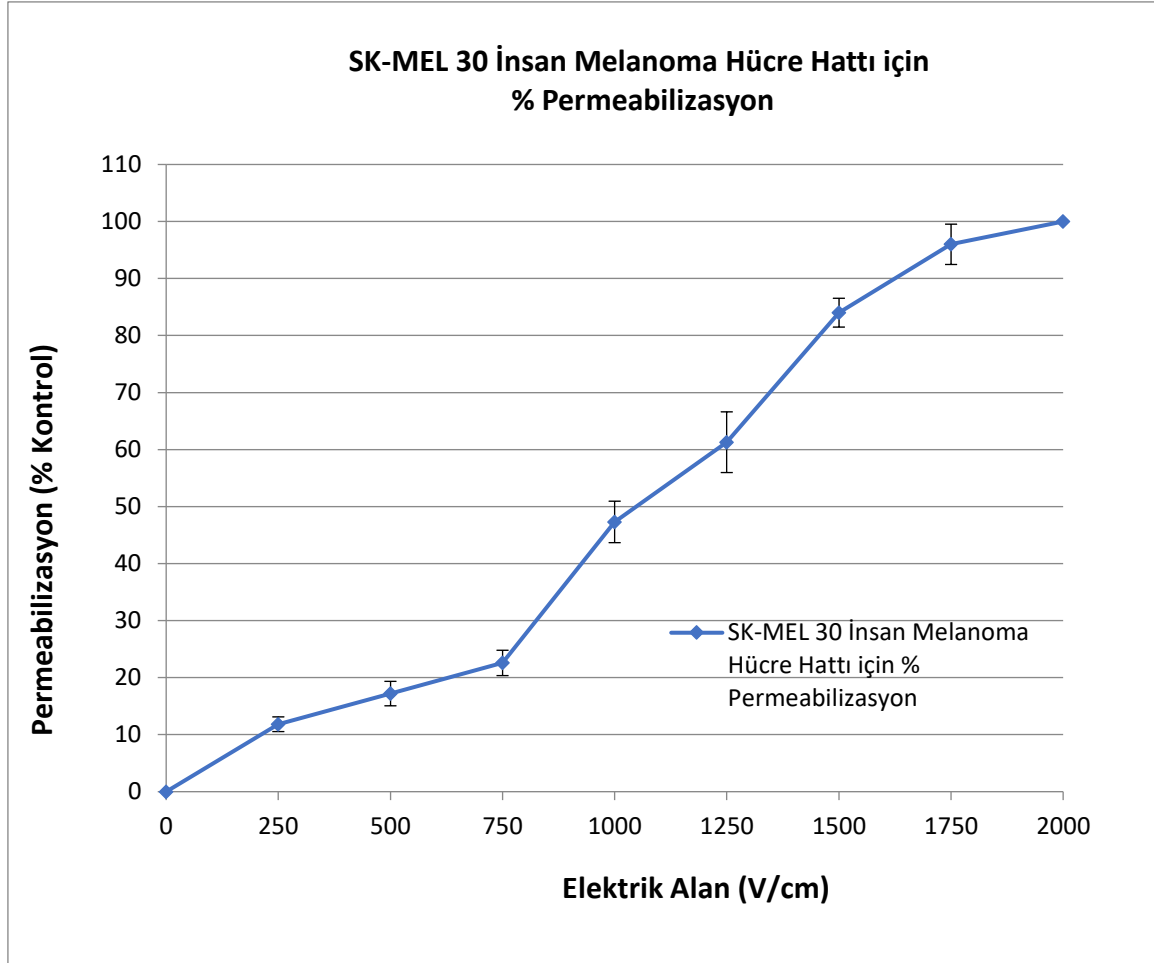
E alanına bağılı olarak permeabilizasyon ve hücre canlılığı değişim grafiklerinin çakıştırılarak permeabilizasyonun ve hücre canlılığının en yüksek olduğu etkin E alan değerinin tespit edildiği bulgular, sağlıklı deri fibroblast hücreleri için Şekil 4.5' de ve insan melanoma hücreleri için ise Şekil 4.6' da verildi.

Sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için E alan arttıkça membran permeabilizasyonunun artmakta olduğu gözlemlendi. Şekil 4.1' de sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinde E alan artışına bağılı permeabilizasyon değişiminin 100 μ s sürede ve 1 Hz tekrarlama frekansında permeabilizasyon E alan 250 V/cm' de iken % 58, 500 V/cm' de iken %64, 750 V/cm' de iken %78 ve 1000 V/cm E alan şiddetinde ise %94 olduğu tespit edildi.



Şekil 4.1. Deri fibroblast hücrelerinde 0-1750V/cm (100 μ s) puls süresinde elektrik alan artışına bağılı olarak % permeabilizasyon değişimi

İnsan melanoma hücreleri için E alan arttıkça membran permeabilizasyonunun artmakta olduğu gözlemlendi. Şekil 4.2’ de insan melanoma hücrelerinde E alan artışına bağlı permeabilizasyon değişimi değerlendirildi. 100 μ s sürede ve 1 Hz tekrarlama frekansında E alan 250 V/cm’ de membran permeabilizasyonu %11 iken, 500 V/cm’de % 17 olarak, 1000 V/cm’ de %47 ve 1500 V/cm’ de ise % 84 olarak bulundu.

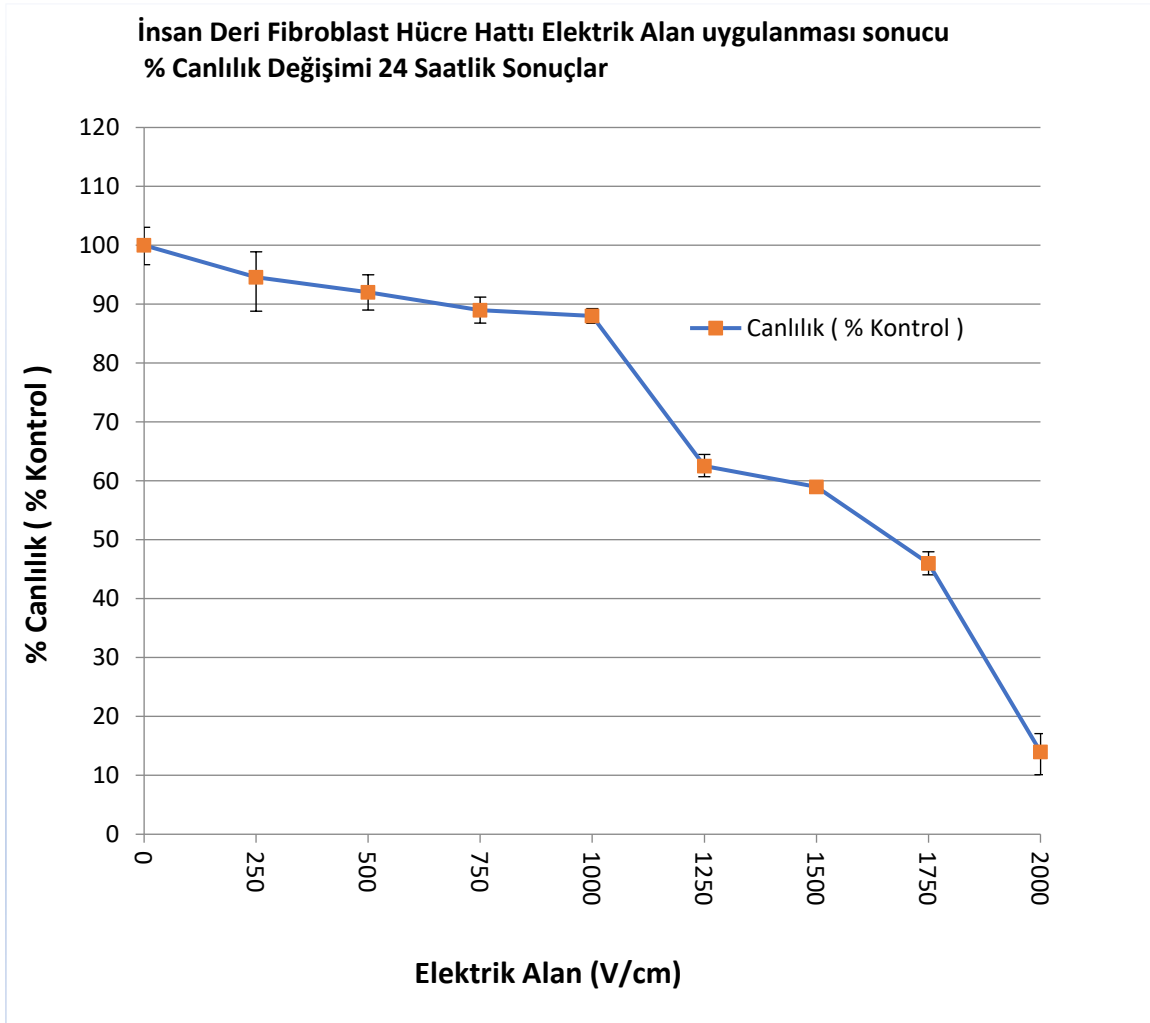


Şekil 4.2. İnsan melanoma hücrelerinde 0-1750V/cm (100 μ s) puls süresinde elektrik alan artışına bağlı olarak % permeabilizasyon değişimi

Her iki hücre hattı için permeabilizasyon sonucunda oluşan hücre canlılıkları MTT yöntemi ile değerlendirildi. E alan maruziyeti sonunda hücre canlılığında meydana gelen değişim sağlıklı insan deri fibroblast için Şekil 4.3’ de ve insan melanom hücre hattı için Şekil 4.4’de verildi.

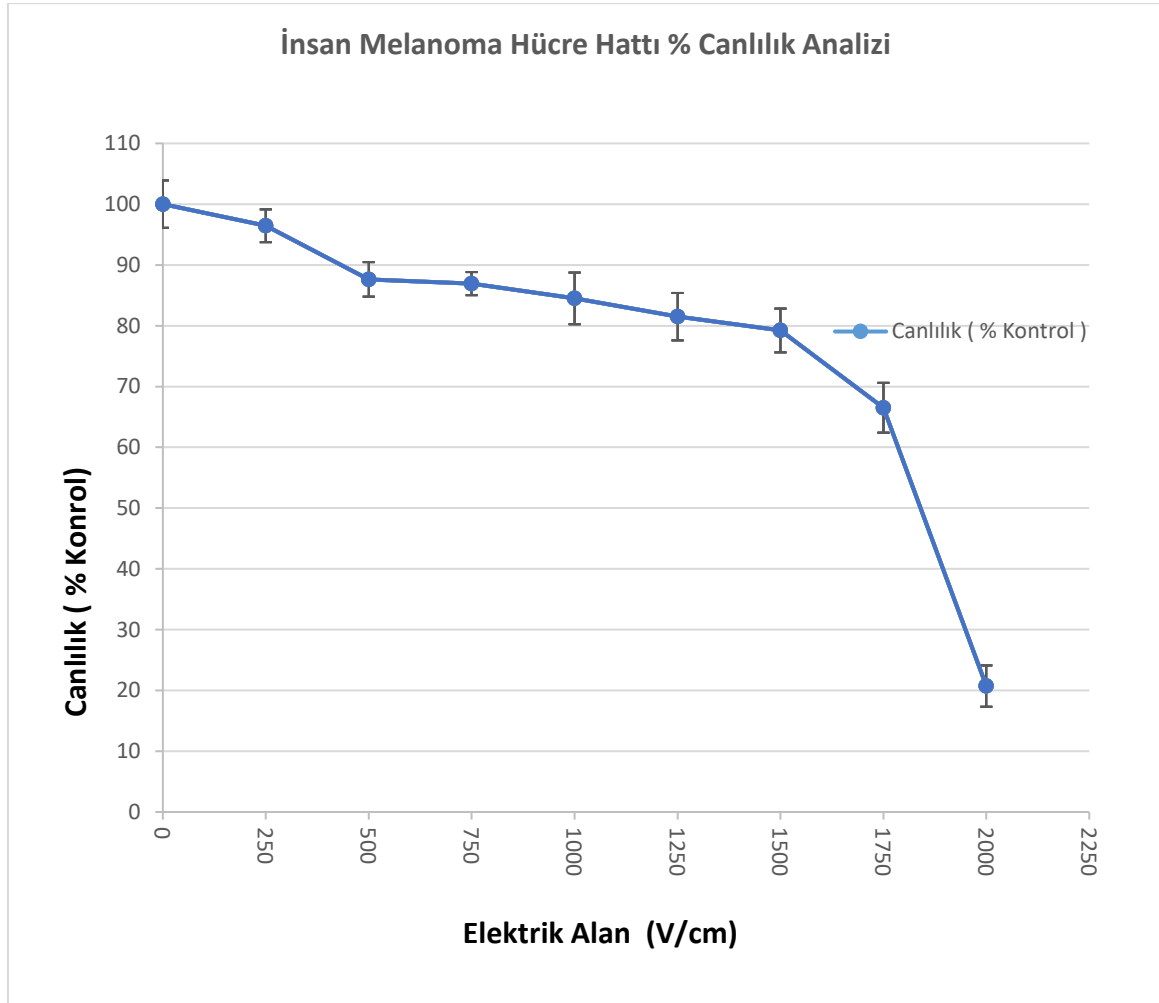
Her iki hücre hattında, uygulanan E alan arttıkça hücre canlılıklarının düştüğü gözlemlendi.

Şekil 4.3’ de sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinde E alan artışına bağlı hücre canlılığı değişimi değerlendirildi. E alan uygulanmayan durumda hücre canlılığında herhangi değişim olmazken 100 μ s sürede ve 1 Hz tekrarlama frekansında hücre canlılığı 250 V/cm’ de E alan uygulanması durumunda %94, 500 V/cm’ de %92, 750 V/cm ‘ de %89, 1000V/cm E alan şiddeti değerinde % 88, 1250V/cm ise %62,5 olarak belirlendi.



Şekil 4.3. Deri fibroblast 0-2000V/cm (100 μ s) puls süresinde elektrik alan artışına bağlı olarak hücre canlılığı grafiği

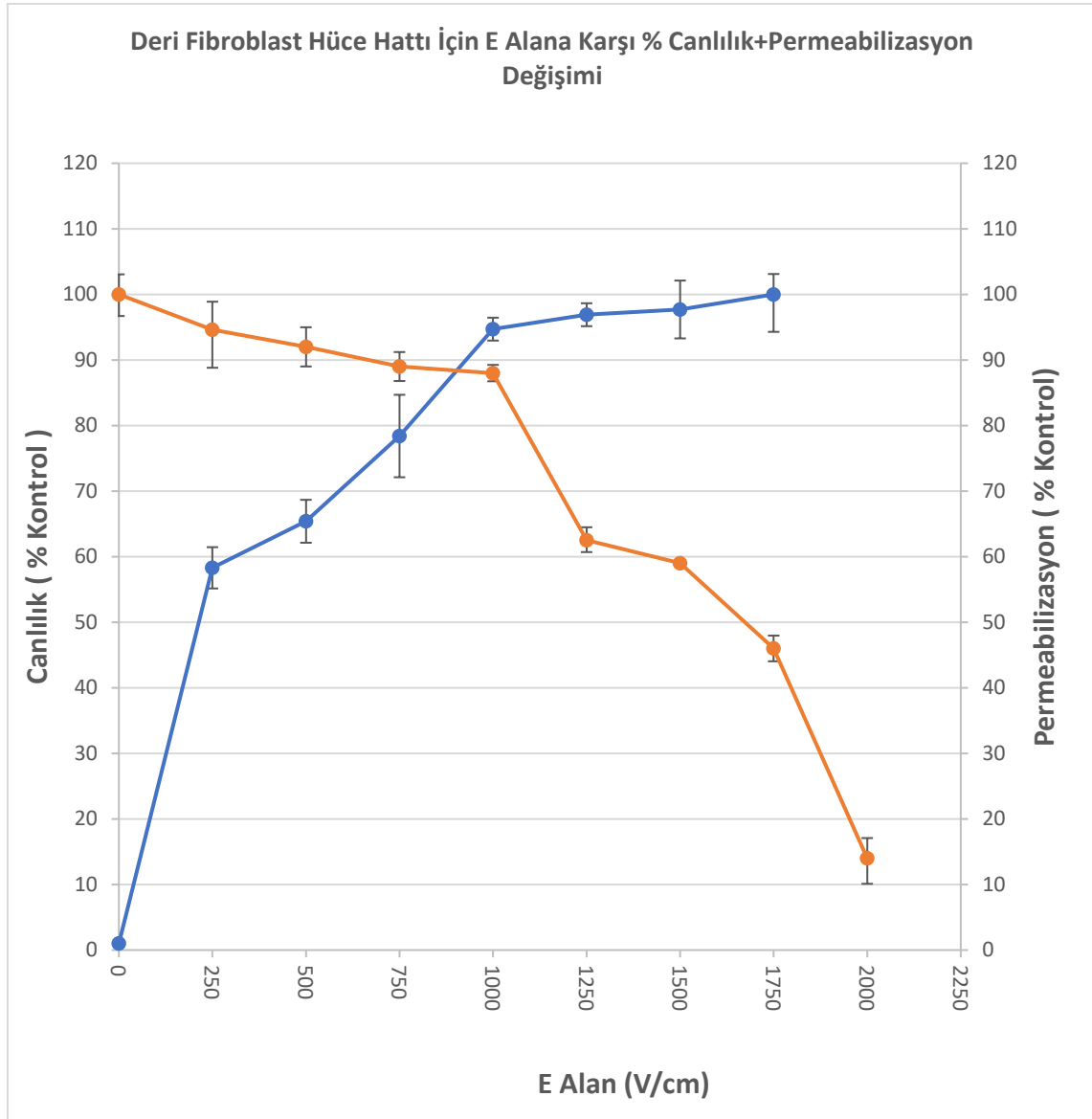
Şekil 4.4’ de insan melanoma hücrelerinde E alan artışına bağlı hücre canlılığı değişimi değerlendirildi. E alan uygulanmayan durumda hücre canlılığında herhangi değişim olmazken 100 μ s sürede ve 1Hz tekrarlama frekansında 250 V/cm E alan şiddetinde canlılık değeri % 96 olarak belirlenmiştir, E alan şiddeti arttıkça hücre canlılığı 500 V/cm’ de % 87 olarak belirlenirken, 1000 V/cm’ de % 84, 1500V/cm E alan değerinde ise %79 olarak belirlendi.



Şekil 4.4. İnsan melanom hücrelerinde 0-2000 V/cm (100 μ s) puls süresinde elektrik alan artışına bağlı olarak hücre canlılığı grafiği

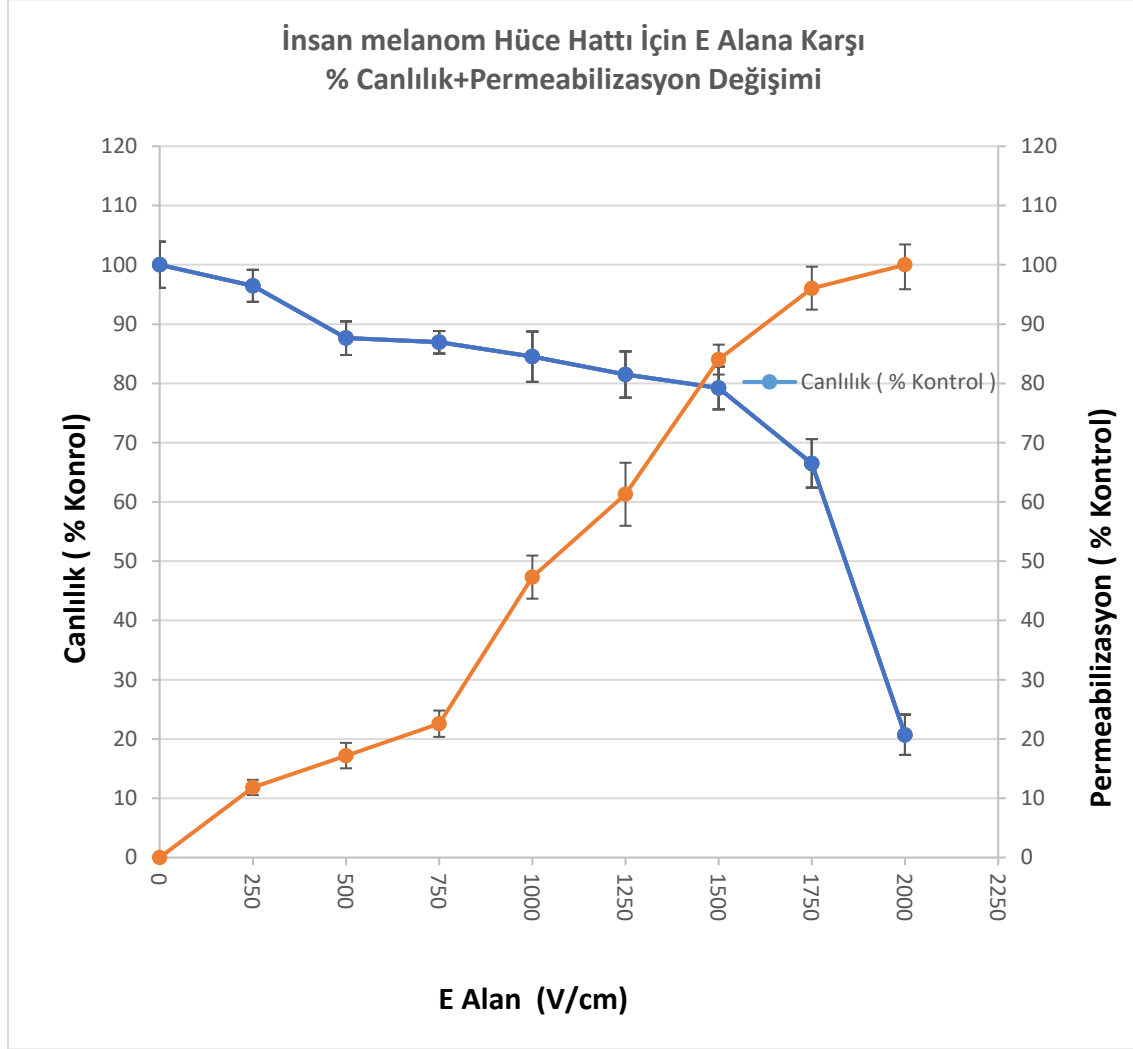
Hücrelerin her ikisine de uygulanan E alan arttıkça permeabilizasyonun arttığı fakat hücre canlılıklarının düştüğü tespit edildi. Hücreler permeabilize olurken aynı zamanda canlılık faaliyetlerini sürdürmelidir. Bu nedenle hem hücre canlılığı hem de permeabilizasyonun en yüksek olduğu E alan değeri belirlendi. Etkin elektroporasyon için hücre canlılığı ve permeabilizasyonun en yüksek olduğu değer belirlenmelidir.

Hücre canlılığının ve permeabilizasyonunun en yüksek olduğu bu E alan değeri etkin alan değeridir. Etkin E alan değerini belirleyebilmek amacıyla E alan artışına bağlı hücre canlılığı değişimi grafiği ile permeabilizasyon değişimi grafiği karşılaştırıldı. Sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için 1000V/cm E alan değerinde permeabilizasyon % 94 iken hücre canlılığının % 88 olduğu belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Deri fibroblast 0-1750V/cm (100 μ s) puls süresinde elektrik alan artışına bağlı olarak permeabilizasyon ve hücre canlılığı grafiği kesişimi

İnsan melanom hücreleri için 1500V/cm E alan değerinde permeabilizasyon % 84 iken hücre canlılığının %79 olduğu belirlendi. (Şekil 4.6).

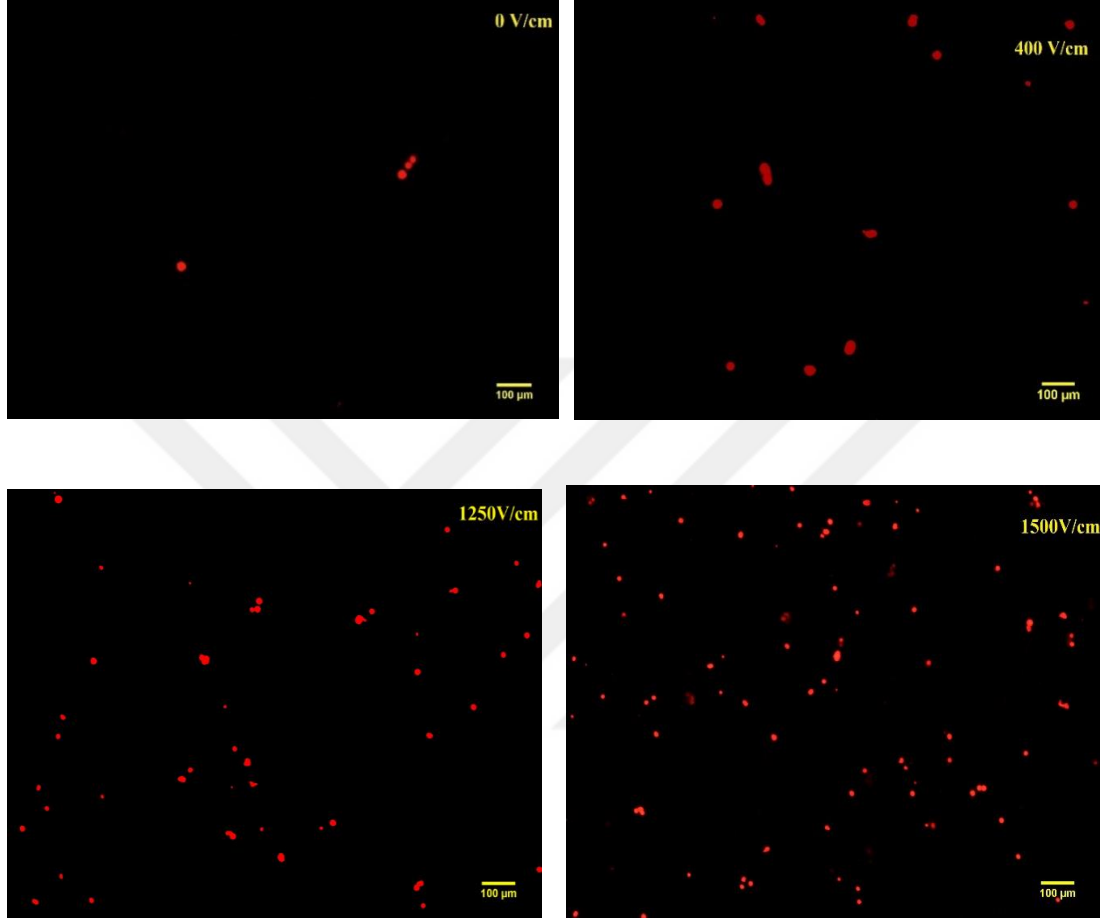


Şekil 4.6. İnsan melanom hücrelerinde elektrik alan artışına bağlı olarak permeabilizasyon ve hücre canlılığı grafiği kesişimi

4.2. Elektrik Alan Uygulaması Sonucu Floresan Mikroskop Görüntüleri Bulguları

Sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerine 100 μ s sürede ve 1Hz tekrarlama frekansında ve 0-1500V/cm aralığında E alan uygulandıktan sonra PI ile floresan mikroskop görüntüleri alındı.

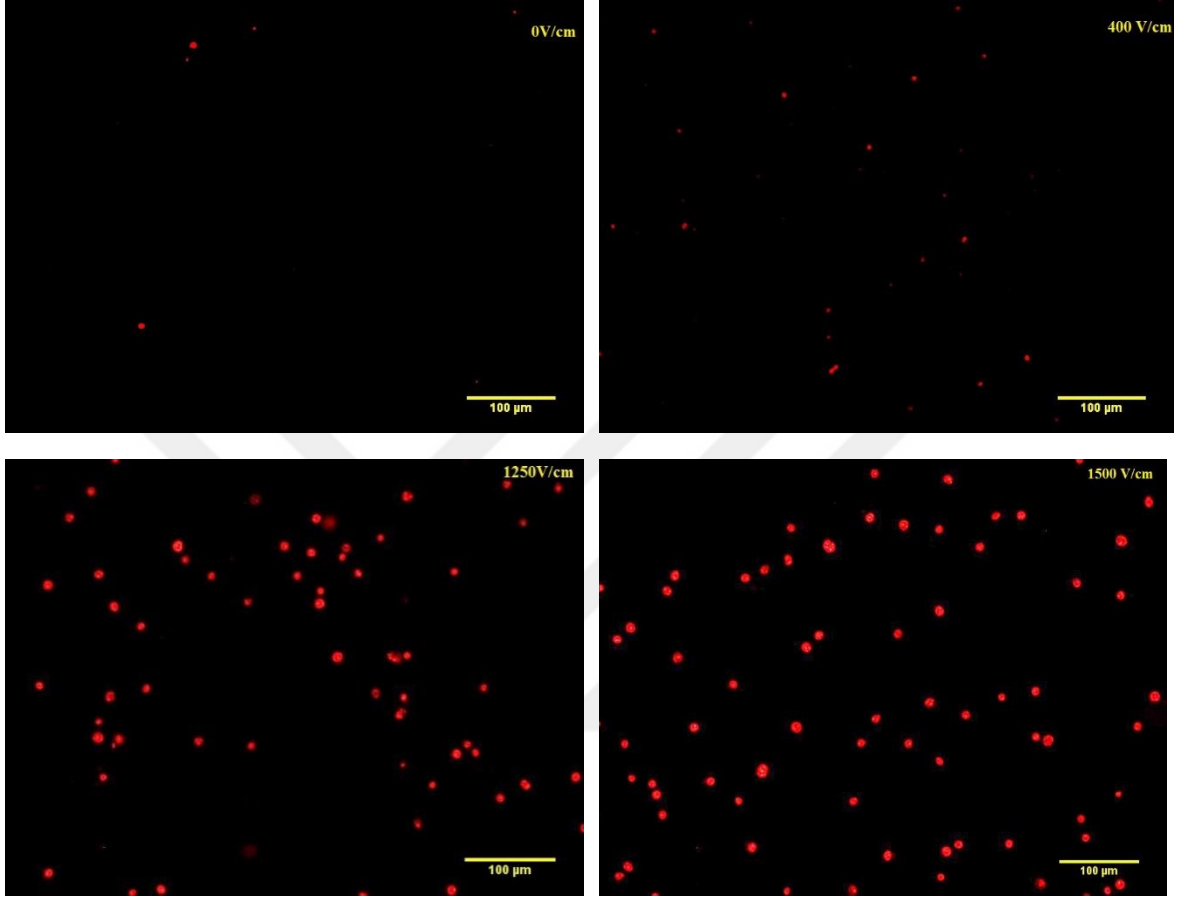
Hücre membran permeabilizasyonu arttıkça PI ile boyalı hücre sayısının arttığı gözlemlendi. 0V/cm, 400V/cm, 1250 V/cm ve 1500 V/cm E alan uygulanmasına ilişkin floresan mikroskop görüntüleri Resim 4.1' de verildi.



Resim 4.1. Elektrik alan uygulanan sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri (x10)

İnsan melanom hücrelerine 100 µs sürede ve 1 Hz tekrarlama frekansında ve 0-1500V/cm aralığında E alan uygulandıktan sonra PI ile floresan mikroskop görüntüleri alındı. E alan arttıkça membran permeabilizasyonunun artmakta olduğu gözlemlendi.

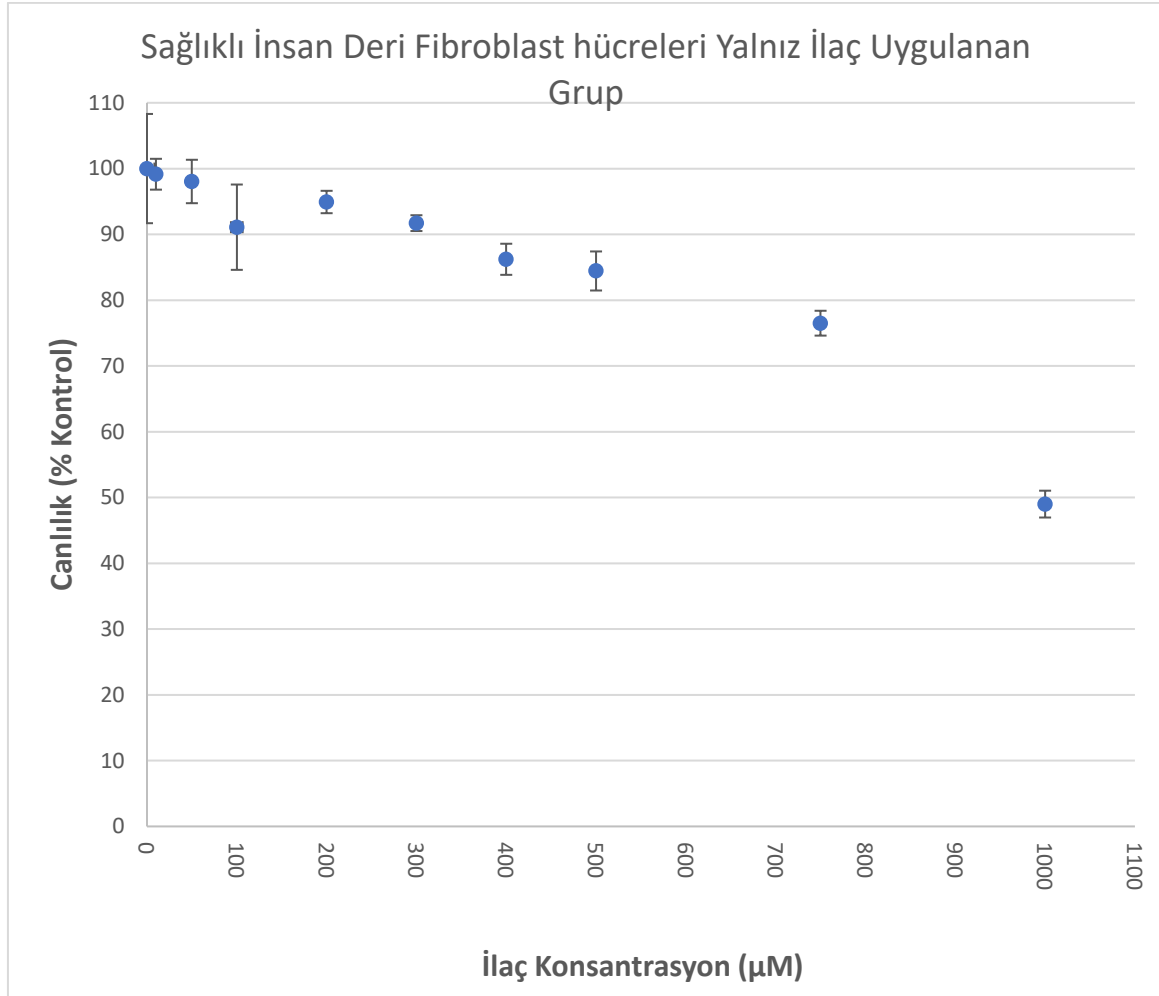
Hücre membran permeabilizasyonu arttıkça PI ile boyalı hücre sayısının arttığı gözlemlendi. 0V/cm, 400V/cm, 1250 V/cm ve 1500 V/cm E alan uygulanmasına ilişkin floresan mikroskop görüntüleri Resim 4.2' de verildi.



Resim 4.2. Elektrik alan uygulanan insan melanom hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri (x10)

4.3. İlaç Dozu Belirlenmesi Bulguları

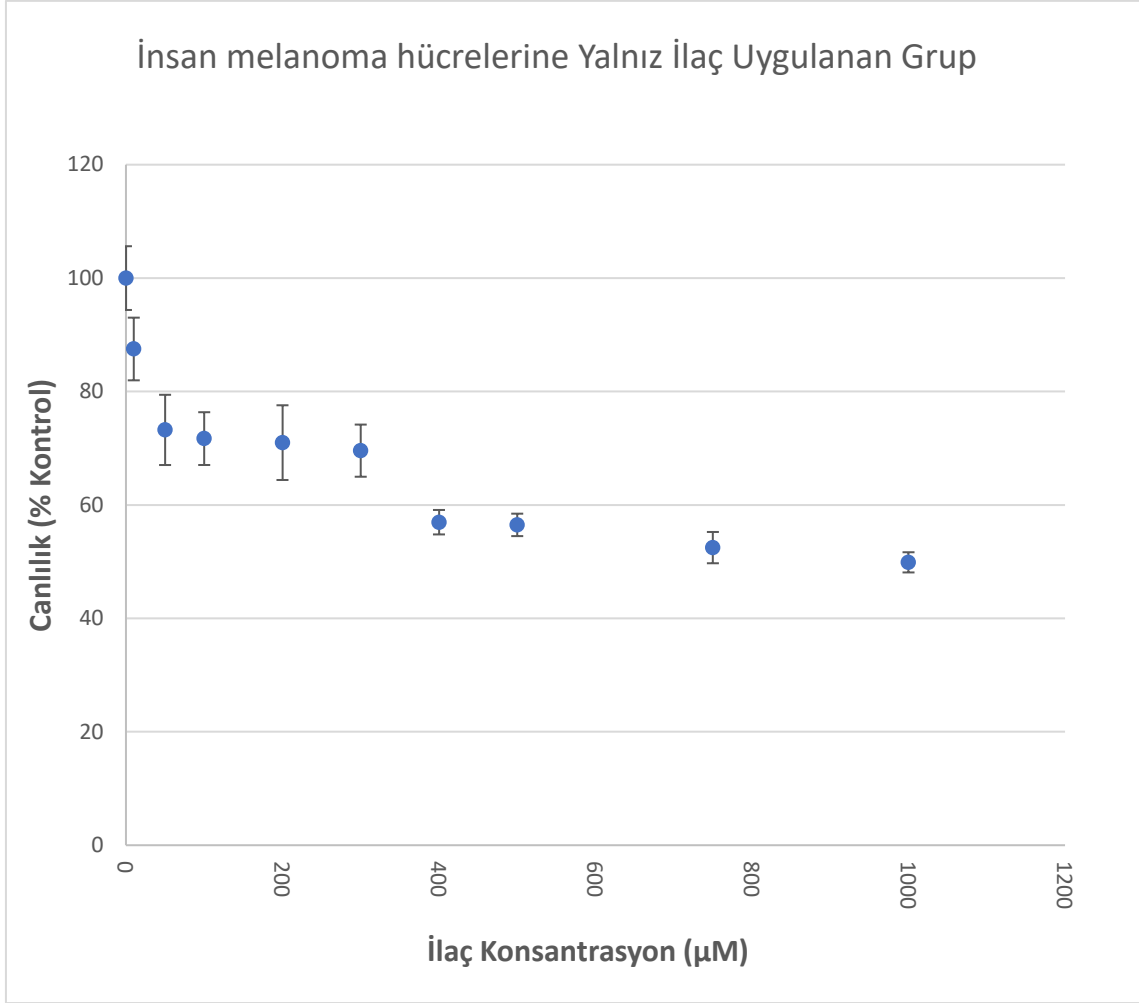
Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücrelerinde yalnız dakarbazin uygulanmasının konsantrasyona bağlı hücre canlılığı değişimleri sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8' de gösterildi. Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalama değerini göstermektedir. Dikey çubuklar standart sapma (n=3) olarak ifade edilmektedir.



Şekil 4.7. Sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinde dakarbazinin dozuna karşı hücre canlılığı değişimi

Şekil 4.7’de dakarbazinin dozuna bağlı olarak hücre proliferasyonunun azaldığı belirlendi. Herhangi bir ilaç uygulanmayan sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinde hücre canlılığı değişmezken, 10 µM ilaç konsantrasyonunda hücre canlılığı %99, 50 µM %98 ve 750 µM’ da %76 olarak tespit edildi.

Sağlıklı deri fibroblast için dakarbazinin inhibe edici konsantrasyonu IC₅₀: 1196 µM olarak belirlendi.



Şekil 4.8. İnsan melanom hücrelerinde ilaç dozuna karşı hücre canlılığı değişimi

Şekil 4.8’ de dakarbazin dozuna bağlı olarak hücre proliferasyonunun azaldığı belirlendi. Herhangi ilaç uygulanmayan insan melanoma hücrelerinde hücre canlılığı değişmezken, 10 µM ilaç konsantrasyonunda hücre canlılığı %87, 50 µM %73 ve 750 µM’ da %52 olarak tespit edildi.

İnsan melanoma hücreleri için dakarbazinin inhibe edici konsantrasyonu IC_{50} : 800,37 µM olarak belirlendi.

4.4. Elektroporasyonla Birlikte İlaç Uygulaması Bulguları

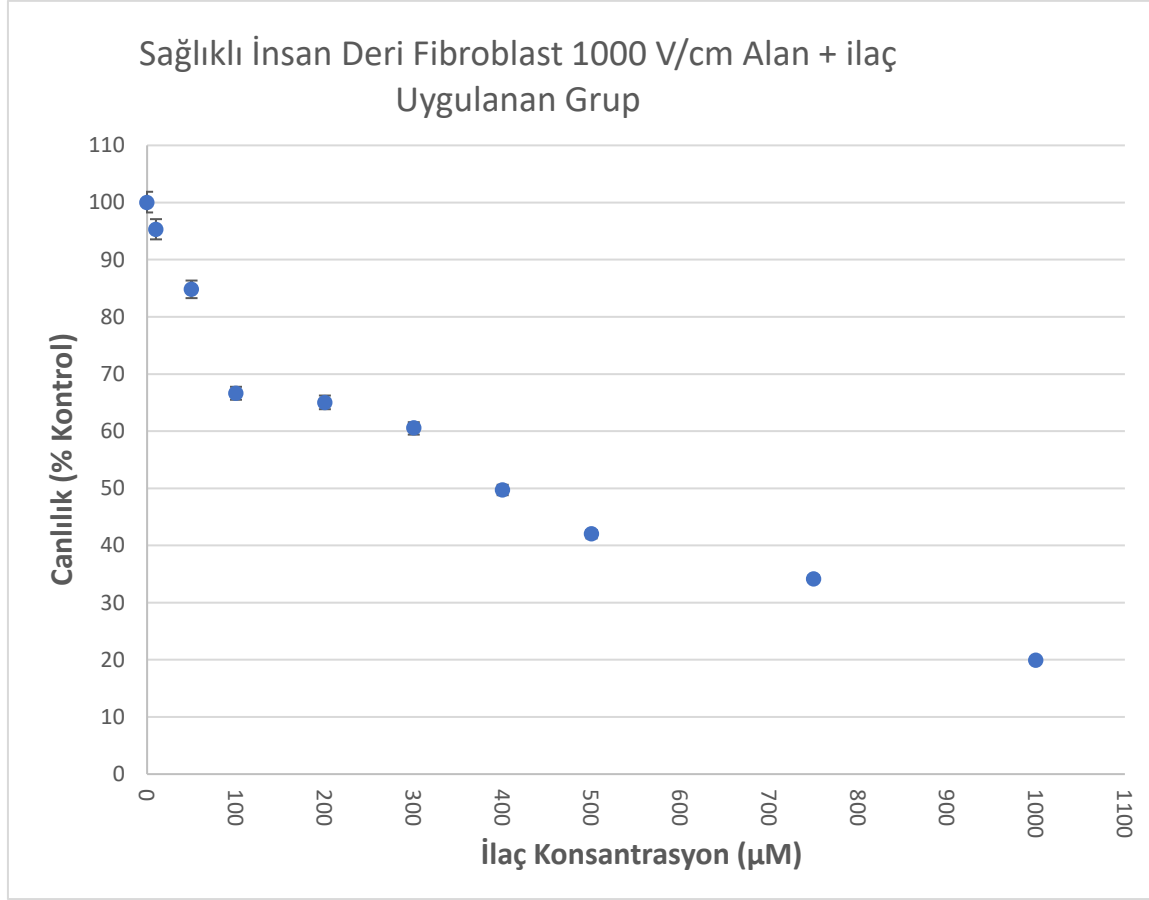
Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom (SK-MEL-30) hücre hatlarında;

Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' daki grafiklerden belirlenen etkin E alan altında dakarbazin uygulandı. Sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için belirlenen 1000V/cm ve insan melanom hücreleri için bulunan 1500V/cm etkin E alan değerleri ile birlikte 0-1000 μM aralığındaki konsantrasyonlarda dakarbazin uygulandı ve IC_{50} değerleri hesaplandı.

Sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için elektroporasyon ile dakarbazininin birlikte uygulanması sonucu hücre canlılığında meydana getirdiği değişim Şekil 4.9' da verildi. Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalama değerini göstermektedir. Dikey çubuklar standart sapma (n=3) olarak ifade edilmektedir. Çok düşük standart sapma değerleri grafik üzerinde görülememektedir.

Dakarbazinle birlikte 1000V/cm E alan uygulanan sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için 10 μM ilaç uygulanmasında canlılık % 95' e, 200 μM ilaç uygulanması durumunda % 65' e, 500 μM konsantrasyonda ise % 42 olarak tespit edildi.

Sağlıklı deri fibroblast için dakarbazininin inhibe edici konsantrasyonu IC_{50} :491,15 μM olarak hesaplandı.

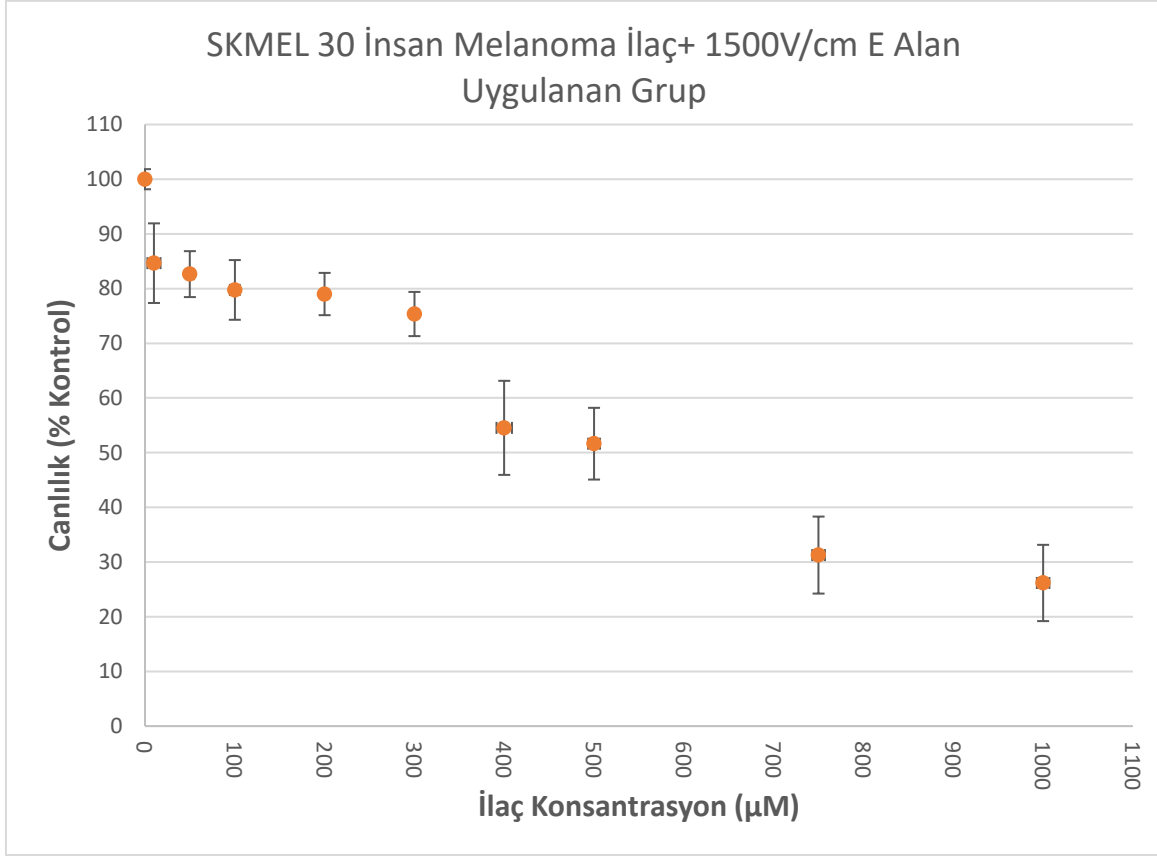


Şekil 4.9. Deri fibroblast hücreleri için 1000V/cm elektrik alan altında ilaç dozuna karşı hücre canlılığı değişimi

İnsan melanom hücreleri için elektroporasyon ile dakarbazininin birlikte uygulanması sonucu hücre canlılığında meydana getirdiği değişim Şekil 4.10' da verildi. Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalama değerini göstermektedir. Dikey çubuklar standart sapma (n=3) olarak ifade edilmektedir.

Elektroporasyon ile dakarbazininin birlikte uygulanması sonucu insan melanom hücreleri için canlılık değişimleri incelendiğinde doza bağlı olarak canlılığın azaldığı belirlendi. Herhangi ilaç uygulanmayan, yalnız E alan uygulanan grup için hücre canlılığı değişmezken, 1500V/cm E alanla birlikte 10 µM ilaç uygulanmasında canlılık % 84' e, 200 µM ilaç uygulanması durumunda % 79' a, 500 µM konsantrasyonda ise % 51 olarak tespit edildi.

İnsan melanom hücreleri için elektroporasyonla birlikte dakarbazin uygulanması neticesinde elde edilen inhibe edici konsantrasyon değeri **IC₅₀: 566,59 µM** olarak hesaplandı.



Şekil 4.10. SK-MEL-30 insan melanom hücrelerinde 1500V/cm elektrik alan altında ilaç dozuna karşı hücre canlılığı değişimi

Elektroporasyon ile dakarbazinin birlikte uygulanan gruplarla yalnız dakarbazin uygulanan grubun inhibe edici konsantrasyon değerlerinin oranlanması, elektroporasyonla birlikte dakarbazin uygulamasının sitotoksisiteyi;

- Sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinde 2,43 kat
- İnsan melanom hücrelerinde 1,41 kat arttırdığı gösterildi.

Düşük dozlarda bile elektroporasyonla birlikte dakarbazin uygulamasının sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinde ve insan melanoma hücrelerinde etkili olabileceği gösterildi.



5. TARTIŞMA

Kanser ölümcül riskleri barındıran hastalıklar arasında kalp ve damar hastalıklarından sonra ölüm nedeni olarak ikinci sırada yer alan önemli bir sağlık sorunudur. Kansere bağlı ölümlerin hızlı bir şekilde artıyor olması kanser tedavisi üzerine yapılan araştırmaların da yoğunlaşmasını da beraberinde getirmiştir.

Deri; vücudun, radyasyon, sıcaklık, kimyasallar ve mikrop gibi birçok dış stresten korunmasını sağlayan en büyük organıdır. Epidermis (dış tabaka), dermis (iç tabaka) ve deri altı dokulardan oluşur. Dermis ter bezleri, saç folikülü, kan damarları ve sinirlerden oluşurken, epidermis üç hücreden, skuamöz, bazal ve melanositlerden oluşur. Normal koşullar altında, bu hücreler sistematik hücre bölünmesine uğrarlar ve yeni hücreler üretirler. Bununla birlikte, epidermal hücrelerin anormal şekilde büyümesi ve anormal bölünmesi; skuamöz, bazal ve melanom hücrelerinden köken alan üç tip cilt kanserlerine neden olabilmektedir. Melanom dışı kanserler; skuamöz ve bazal deri kanseri oldukça yaygın görünen ve yaşamı tehdit etmeyen kanserlerdir ve erken dönemde tedavi edilmesi durumunda başarı (hayatta kalma şansı) yüksektir [67].

Melanom ise cilt kanserlerinin en agresif ve en ölümcül formu arasında yer almaktadır. Hastanın yaşam kalitesinin ve süresinin artırılması diğer tüm kanser tedavilerinde olduğu gibi melanom tedavisinde de önceliklidir. Bu amaçlarla çeşitli tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin en başında cerrahi, kemoterapi, radyoterapi gelmektedir.

Melanom erken evrede yakalandığında cerrahi müdahale etkili olabilirken, hastalığın bölgesel ve sistemik yayılımı gerçekleştiğinde, tedavi seçenekleri sınırlıdır ve genellikle tedavinin etkisiz olduğu değerlendirilmektedir. Böyle durumlarda hastanın yaşam süresi 6-9 ay gibi bir süre ile sınırlı kalmaktadır [58].

Radyoterapi melanom lezyonlarının tedavisinde nadir olarak kullanılmakta olan diğer bir yöntemdir ancak genel olarak cerrahi yerine tercih edilmemektedir [68]. Desmoplastik melanomlu hastaların tedavisinde, cerrahi ile birlikte radyoterapinin kullanılmasının yalnız cerrahi uygulanmasına kıyasla tümörün lokal kontrolünde etkili olduğu gösterilmiştir [69]. Ancak radyoterapi çoğu zaman palyatif amaçlarla kullanılmaktadır [70].

Melanom tedavisinde kullanılan bir diğerk yöntem ise kemoterepi olup bu tedavi yönteminde sislpatin, paklitaksel, dosetaksel, dakarbazin, temozolomid gibi sayısız kemoterapik ajan kullanılmaktadır [71]. FDA tarafından onaylı dakarbazin bu kemoterapik ajanlar içerisinde en yaygın ve en etkili ajan olarak tanımlanmaktadır [72]. Bu ilaç, nükleik asitlerin metilasyonu veya doğrudan DNA hasarına neden olarak, büyüme durması ve hücre ölümüyle sonuçlanan etkiler göstermektedir.

Melanomun başarılı bir şekilde tedavi edilmesinin önündeki en büyük engel, kemoterapiye karşı bilinen dirençtir [72]. Bu nedenle dakarbazin için tedaviye yanıt oranları, % 10-25 arasında değişmekte olup hayal kırıklığı yaratmaktadır.

Bu üç tedavi yönteminin uygulanabilirliğine rağmen tedavi başarısında ortaya çıkan hayal kırıklıkları araştırmacıları farklı tedavi yöntemlerini geliştirilmeye yönlendirmiştir. Bu kapsamda kemoterapik ilaç direncinin önüne geçerek tedavi etkinliğini arttırmak amacıyla kemoterapik ajanların birlikte kullanıldığı araştırmalar yapılmıştır [59].

1980'lerde, bu kemoterapik ajanlardan bazılarının birlikte kombine olarak verilmesi ile sinerjik etkilerin ortaya çıktığı gösterilmiş; bu kombine tedavilerde yanıt oranlarının % 20-50 arasında değişmekte olduğu görülmüştür. [73]

Falkson tarafından metastatik malign melanom hastaları ile yapılan çalışmada yalnız dakarbazin uygulanan hastaların tedaviye genel yanıt oranı % 20 iken dakarbazin ile birlikte interferon uygulanmış hastalarda yanıt oranının % 50' ye yükseldiği gözlemlenmiştir [74].

Guan Jiang ve arkadaşları tarafından yapılan istatistiki çalışmada; dakarbazine dayalı kombine tedavilerin genel yanıtı ve sağ kalım süresini ılımlı olarak arttırabileceği, ancak bununla birlikte yan etkilerin de artabileceği rapor edilmiştir [58].

Chapman ve arkadaşları tarafından tek ajanlı kemoterapi ile kombine kemoterapi arasındaki farkı görebilmek için, dakarbazin sislpatin ve vinblastin kombinasyonu ile karşılaştıran bir çalışma yapılmıştır. Her iki kombinasyon içinde yanıt oranı yalnız dakarbazin' e göre daha yüksek olmasına rağmen, iki tedavi seçeneği arasında hayatta kalma sürelerini arttırması bakımından fark bulunamamıştır [75].

Ne yazık ki, kombinasyon kemoterapisinin sağ kalım süresinde sınırlı bir etkiye sahip olduğu ve yan etkilerin fazlalığı nedeniyle etkili bir tedavi yöntemi olmaktan uzak kaldığı rapor edilmektedir [59, 73].

Kemoterapik ilaçların etkinliğini artırarak yan etkilerin azalmasını sağlayacak yöntemlerden birisi de yüksek şiddette E alan uygulanmasıyla hücre membranında por oluşturarak hücre içerisine kemoterapik ilacın daha fazla girmesini sağlayan elektroporasyon yöntemidir. Bu yöntem hücre içerisine giremeyen büyük moleküllerin (DNA, RNA, ilaç, iyon, vb.) hücre içerisine geçişine olanak sağlayan bir yöntemdir [4, 76, 77].

Elektroporasyon başarı ile uygulandığında hücresel membranlar, uygulanan dış E alan kesildikten sonra birkaç dakika boyunca geçirgen kalabilmekte ve bu durum kemoterapik ilaçların, büyük ve yüklü moleküllerin hücre içerisine geçişine olanak sağlayabilmektedir [78].

Elektrokemoterapi olarak isimlendirilen bu yöntem; elektroporasyon ile birlikte kemoterapik ilaçların tümör hücrelere içerisine daha fazla geçişine olanak vererek ilacın etkinliğini arttırmayı sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemle kemoterapik ilaçların etkisi önemli ölçüde güçlendirilir [35].

Elektrokemoterapi uygulamalarında hücre içerisine ilacın etkili bir biçimde geçmesini sağlamak için öncelikle elektroporasyon parametrelerinin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Hücrelerin permeabilizasyonlarını arttırırken, canlılığın korumasını sağlayacak elektriksel parametrelerin belirlenmesi amacıyla literatürde pek çok çalışma yapılmıştır [79, 80].

Gabriel ve arkadaşları Chinese hamster ovary (CHO) hücreleri ile yaptıkları elektropermeabilizasyon çalışmasında, hücreleri geçirgen hale getirmek için yüksek yoğunluklu bir alan kullanılması gerektiğini, ancak puls süresi, puls sayısı ve E alanının genliğine bağlı olarak uzun süreli ve kısa süreli hücre ölümlerinin artabileceğini göstermişlerdir [81].

Kubota ve arkadaşları, transitional hücre karsinomu (YST-1) üzerinde yaptıkları *in vitro* çalışmada hücre içerisine kemoterapik ilaç olan bleomisinini geçişini arttırabilmek için

gerekli etkin E alan değerini araştırmışlardır. Hücree permeabilizasyonunun ve hücree canlılığının en yüksek olduğu parametrelerin, 1 Hz tekrarlama frekansı, 100µs puls süresi ve 1000 - 1250 V / cm arasında E alan değeri olarak rapor etmişlerdir [82].

Gehl ve arkadaşlarının Çin hamster akciğer fibroblast (DC-3F) hücrelerinde *in vitro* olarak yaptıkları elektrokemoterapi çalışmasında; hücree canlılığı ve permeabilizasyonun en yüksek olduğu elektriksel parametreler 1 Hz, 99 µs puls süresi ve 1200V/cm E alan şiddeti olarak rapor edilmiştir [83].

Daha önce insan meme karsinoma (MCF-7) hücrelerinde yapmış olduğumuz *in vitro* elektrokemoterapi çalışmamızda tamoksifenin elektrokemoterapisi için optimal elektriksel parametreler; 1 Hz, 100 µs puls süresi ve 1750 V/cm E alan şiddeti olarak belirlenmiştir [84].

Neuroblastoma hücrelerinin kullanıldığı bir diğer elektrokemoterapi çalışmamızda ise cisplatin elektroporasyonu için permeabilizasyonun ve hücree canlılığının en yüksek olduğu etkin elektriksel parametreler; 1 Hz, 100 µs puls süresi ve 1500 V/cm E alan şiddeti olarak tespit edilmiştir [85].

Jaroszeski ve arkadaşları tarafından yapılan farklı kemoterapik ajanlar ve hücrelerin kullanıldığı *in vitro* elektrokemoterapi çalışmasında 99 µs puls süresinde permeabilizasyon ve canlılığın en yüksek olduğu E alan değeri insan pankreatik adenokarsinoma (capan-2) hücree hattı için 900 V/cm, insan yumurtalık kanseri (LN1) hücree hattı için 1100V/cm, insan meme duktal karsinoma hücreleri (T47D) için 900V/ cm, Lewis akciğer hücreleri için 750V/cm, sıçan hepatosellüler karsinoma (N1-S1) hücreleri için 1250 V/cm, insan endometriyal adenokarsinoma (ishikawa) hücreleri için 1200V/cm, B16 fare melanom hücreleri için 1200 V/cm olarak belirlenmiştir [86].

Cemazar ve arkadaşları ise insan dermal mikrovasküler endotel hücreleri (HMEC-1) ile yaptıkları elektrokemoterapi çalışmasında; hücree canlılığının yaklaşık %80 ve permeabilizasyonun %60 olduğu E alan değeri olan 1400 V/cm optimal E alanı olarak belirlemişlerdir [87].

Çalışmamızın birinci aşamasındaki elektrokemoterapi çalışması öncesinde etkin E alan parametreleri sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücreleri için belirlendi. 100 µs puls süresi ve 1 Hz tekrarlama frekansında sekiz kare elektrik dalgası uygulanması sonucunda hücre permeabilizasyonunun ve canlılığının en yüksek olduğu E alan değerleri sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için 1000V/cm ve insan melanom hücreleri için 1500 V/cm olarak tespit edildi.

İnsan melanom ve sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinin E alandan farklı derecelerde etkilendikleri gösterildi. İnsan melanom hücrelerinin, sağlıklı insan deri fibroblastlara göre etkin E alan parametreleri kıyaslanması sonucunda insan melanom hücrelerinin elektriksel alana daha dirençli olduğu gösterildi.

Farklı kemoterapik ajanlar, elektrik darbeleriyle permeabilize edilmiş hücrelerde birlikte test edilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda elektroporasyonla birlikte kemoterapik ilaçların etkinliğinin değişimleri rapor edilmiştir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında gerçekleştirilen elektrokemoterapi çalışmamızda; birinci basamakta belirlenen etkin E alan ile dakarbazinin birlikte uygulandığı hücrelere ilişkin bulguları, literatürdeki diğer kemoterapik ilaç çalışmaları ile karşılaştırıldı: Sisplatin, karboplatin ve bleomisin başta olmak üzere pek çok kemoterapik ajan ile bu çalışmalarda kullanılmış ve elektroporasyonla birlikte kemoterapik etkinliğin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Sersa ve arkadaşları yaptıkları *in vitro* çalışma sonucuna göre cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) kemoterapik ilacı melanom B16 tümörlerinde elektroporasyonla birlikte uygulandığında sitotoksik etkinin 70 kat arttığını rapor ettiler [88].

Jaroszeski ve arkadaşları tarafından yapılan *in vitro* çalışmada, 44 farklı kemoterapik ilaç ve yedi farklı hücre hattı üzerinde elektroporasyonla birlikte bleomisin uygulanmasının yalnız bleomisin uygulanmasına göre IC₅₀ değerini 100-5000 kat arasında arttırdığı, sisplatin ve carboplatinin ise altı farklı hücre hattı üzerinde 3-13 kat daha etkili olduğu, kemoterapik ilaç olan vincristinin ise çeşitli hücre hatlarında 1,3- 3,4 katlık bir sitotoksik artış gösterdiği tespit edilmiştir [86].

İnsan meme karsinoma (MCF-7) hücrelerinde yapmış olduğumuz *in vitro* elektrokemoterapi çalışmamızda elektroporasyon ve tamoksifen kombine kullanılmasının, östrojen reseptörü pozitif meme kanseri tedavisinde tek başına tamoksifen kullanımından istatistiki olarak anlamlı biçimde ($p < 0.05$) etkili bulunduğu gösterilmiştir [84].

Bir diğer çalışmamızda neuroblastoma hücrelerinin sisplatin sitotoksitesi ile yüksek yoğunluklu elektrik darbelerine maruz bırakılmasından sonraki sisplatin sitotoksiteleri IC_{50} değerlerinin ele alınması yolu ile karşılaştırıldı. Yalnız sisplatin uygulanan grupta $IC_{50} = 5.03 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlenirken, elektroporasyonla birlikte sisplatin sitotoksitesi $IC_{50} = 0.51 \mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi. Böylece düşük dozda sisplatin' in elektroporasyon ile birlikte neuroblastoma tedavisinde kullanılabileceğini gösterdi [85].

Gehl ve arkadaşlarının çalışmalarında hamster akciğer fibroblast (DC-3F) hücre hattı kullanılarak *in vitro* ortamda; elektroporasyonla birlikte karboplatin ve bleomisin etkinliğinin değerlendirilmesi IC_{50} değerlerinin karşılaştırılması ile yapılmıştır, bu karşılaştırma sonucunda karboplatin sitotoksitesinde 3 katlık bir artış söz konusu iken sisplatinde 2,3 katlık bir artış, bleomisin uygulanmasında ise sitotoksitede 300 katlık bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Elektroporasyonla birlikte kemoterapik ilaç kullanılmasının, ilacın etkinliğini 2,3-300 kat arasında arttırdığı tespit edilmiştir [83].

Orlowski ve arkadaşları, hamster akciğer fibroblast hücre hatlarında (DC3F) yaptıkları *in vitro* çalışmada plazma membranından zayıf difüze olan netropsininin E alan varlığında sitotoksitesinde 200 katlık bir artış tespit ederken, bleomisin ile yaptıkları çalışmada ise 700 katlık bir sitotoksitite artışı tespit ettiler [89]

Bicek ve arkadaşları B16F1 fare melanom hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada; $1 \mu\text{M}$ NAMI-A varlığında hücrelerin % 90' ının hayatta kaldığını gözlemlerken, $1 \mu\text{M}$ NAMI-A ve elektroporasyon kombine uygulanmasında hücrelerin % 10' unun hayatta kaldığını gösterdiler. Aynı çalışmada kısa ve yeterince güçlü E alan darbelerinin, hücre membranlarının geçirgenliğini geçici olarak arttırdığı, büyük moleküllerin hücrelere ve dokulara kolaylıkla erişmesini sağladığı ifade edilmektedir [4].

Literatürde yapılan çalışmalara ilave olarak yaptığımız bu araştırmada ilk kez insan melanom hücreleri ve sağlıklı deri fibroblast hücreleri elektroporasyon ile birlikte

dakarbazinin sitotoksik etkisi incelenmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda dakarbazinle birlikte insan deri fibroblast hücreleri için 1000V/cm, insan melanom hücreleri için 1500 V/cm E alan uygulanarak sitotoksitenin yalnız dakarbazinle muamele edilmiş gruba göre istatistiki açıdan anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi.

Melanom hücrelerinde elektroporasyonla birlikte dakarbazin uygulanmasının yalnız dakarbazin uygulanmasına göre ilaç sitotoksiteside istatistiki açıdan önemli ($p < 0,001$) artışa sebep olduğu belirlendi.

Deri fibroblast hücrelerinde elektroporasyonla birlikte dakarbazin uygulanmasının yalnız dakarbazin uygulanmasına göre ilaç sitotoksitesi değerlendirilmesi yapıldığında; elektroporasyonun ilaç sitotoksitesi üzerinde istatistiki açıdan önemli artışa sebep olduğu belirlenmiştir. ($p < 0,001$)

Özet olarak, bu çalışmada sağlıklı ve kanserli hücrelerin membranlarında E alan ile indüklenen geri dönüşümlü permeabilizasyona bağlı olarak sitotoksitenin arttığı gösterildi.

Sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücre hatlarının her ikisine de mikro saniye süre ile yüksek şiddette E alan uygulanması sonucunda sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücrelerinin permeabilizasyon değişimlerinin birbirinden farklı olduğu ortaya konuldu. Elektroporasyonla birlikte ilaç uygulanmasının sağlıklı ve melanomlu insan hücre hattında IC_{50} değerlerini azalttığı gözlemlendi. Daha az ilaç kullanılarak E alan altında kemoterapinin daha başarılı olabileceği gösterildi.

Bu çalışmada, E alan altında dakarbazin uygulanmasının; sağlıklı insan deri fibroblast hücrelerinde yalnız ilaca kıyasla sitotoksiteyi 2,43 kat arttırdığını, melanom hücre hattında da ise yalnız ilaca kıyasla 1,41 kat arttırdığı tespit edildi.

Böylelikle literatürde rapor edilen sonuçlarla uyumlu olarak elektriksel darbelerle birlikte kemoterapik ajanların kullanılmasının düşük dozlarda ilacın daha etkili olmasını sağladığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre elektroporasyon ve kemoterapik ilaç uygulanması lokal olarak gerçekleştirilmesi ile kemoterapik etkinlik artırılabilir.

Bu sonuçlar doğrultusunda elektroporasyonla kemoterapik ajanların birlikte kullanılmasının, kemoterapik ilacın tek başına kullanılmasına göre daha etkili olacağı düşünülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Her geçen gün görülen kanser çeşitliliğinin ve buna bağlı ölümlerin artması insanları tedirgin etmektedir. Kanser çeşitleri arasında yer alan melanom cilt kanserleri arasında en agresif formda olup, pek çok tedavi türüne karşı dirençli olduğundan, ölüm oranları gün geçtikçe artmaktadır. Çoğu kanser türünde olduğu gibi erken evrede tespit edilebilirse, melanom tedavisinde de öncelikli tedavi yaklaşımı cerrahidir. Ancak tümörün yüzeysel yayılımının fazla olması durumunda cerrahi, radyoterapi ve diğer tedavi yaklaşımları sınırlı kalmaktadır. Kemoterapik ilaçların etkinliğini arttırmak için kemoterapik ilaçların birbiriyle kombinasyonu denense de yan etkiler artarken hastaların yaşam sürelerinde beklenen başarının sağlanamadığı tespit edilmiştir. Bu nedenlerle kemoterapik ilaçların etkinliğini arttırmak için farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sunulan çalışma kemoterapi tedavisinde kullanılan dakarbazinin elektroporasyonla birlikte uygulanmasının sağlıklı insan deri fibroblast ve insan melanom hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini, yalnız dakarbazin kullanılmasına kıyasla değerlendirilmesi amacıyla *in vitro* olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma etkin E alan değerinin belirlenmesi, yalnız dakarbazin uygulanması sonucunda inhibe edici konsantrasyonların belirlenmesi ve etkin E alanla birlikte ilaç maruziyetinin inhibe edici konsantrasyon üzerindeki etkisinin belirlenmesi olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir:

İnsan melanom ve sağlıklı insan deri fibroblast olmak üzere her iki hücre grubuna 0-2000 V/cm aralığında yalnız E alan uygulandı ve permeabilizasyon ve hücre canlılığı sonuçları değerlendirilerek etkin E alan değeri belirlendi. Hücrelerin permeabilizasyonu PI kullanılarak akım sitometri cihazında, hücre canlılıkları MTT kullanılarak Elisa okuyucuda tespit edildi.

0-1000 μ M konsantrasyon aralığında yalnız dakarbazin uygulanarak ilacın sebep olduğu inhibitör konsantrasyon değeri tespit edildi. Hücre canlılıkları MTT kullanılarak Elisa okuyucuda tespit edildi. İnhibitör konsantrasyon değerleri hücre canlılık grafiklerinin eğiminden tespit edildi.

Sağlıklı insan deri fibroblast için tespit edilen 1000V/cm ve insan melanom hücreleri için tespit edilen 1500V/cm etkin E alan şiddetleri (0-1000 μ M) konsantrasyon aralığında dakarbazin ile birlikte uygulandı ve inhibitör konsantrasyonlar tespit edildi. Hücre canlılıkları MTT kullanılarak Elisa okuyucuda tespit edildi. İnhibitör konsantrasyon değerleri hücre canlılık grafiklerinin eğiminden tespit edildi.

Her iki hücre grubu için de uygulanan etkin E alanın hücre membran permeabilizasyonunu arttırması böylelikle kemoterapik ilaçların hücre içerisine daha fazla girmesi ve etkinlik göstermesi sağlandı. IC₅₀ değerleri ile belirlenen ilaç etkinlikleri kıyaslandı.

Çalışma sonuçları; etkin E alan değerinin değerlendirildiği, dakarbazin uygulanması sonucunda inhibe edici konsantrasyonların değerlendirildiği ve etkin E alanla birlikte ilaç maruziyetinin inhibe edici konsantrasyon üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bulgular olmak üzere aşağıda özetlenmiştir.

Etkin elektrik alan bulguları;

- 1000V/cm, sağlıklı insan deri fibroblast hücreleri için permeabilize etkinin ve hücre canlılığının en yüksek olduğu E alan değeri olarak bulundu.
- 1500V/cm, insan melanom hücreleri için permeabilize etkinin ve hücre canlılığının en yüksek olduğu E alan değeri olarak bulundu.

Yalnız dakarbazin uygulanması sonuçları değerlendirildiğinde;

- Dakarbazin uygulanan insan deri fibroblast hücreleri için inhibe edici konsantrasyon 1196 μ M olarak tespit edildi.
- Dakarbazin uygulanan insan melanom hücreleri için inhibe edici konsantrasyon 800,37 μ M olarak tespit edildi.

Etkin elektrik alan ile birlikte dakarbazin uygulanması sonuçları değerlendirildiğinde;

- İnsan deri fibroblast hücrelerine; 1000V/cm etkin E alan ile birlikte dakarbazin uygulanmasının inhibe edici konsantrasyonu önemli ölçüde azaltarak 1196 μ M' dan 491,15 μ M' a düşürdüğü gözlemlendi.

- İnsan melanom hücrelerine; 1500V/cm etkin E alan ile birlikte dakarbazin uygulanmasının inhibe edici konsantrasyonunu önemli ölçüde azaltarak 800,37 μM ' dan 566,59 μM 'a düşürdüğü gözlemlendi.

İlaç sitotoksitesindeki artışa ilacın inhibitör konsantrasyonundaki azalma karşılık gelmektedir ve böylelikle her iki hücre üzerinde de ayrı ayrı tespit edilen etkin E alanla birlikte dakarbazin uygulanmasının istatistiki açıdan sitotoksiste üzerinde önemli bir artışa sebep olduğu görülmektedir.

Deney sonuçlarından elektroporasyonla birlikte dakarbazin uygulanmasının insan deri fibroblast hücrelerinde yalnız ilaca kıyasla sitotoksititeyi 2,43 kat arttırdığı, melanom hücre hattında da ise yalnız ilaca kıyasla 1,41 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Sitotoksitedeki artış ilaç dozlarının daha düşük dozlarda uygulanarak daha etkin kemoterapi gerçekleştirmesine olanak sağlayabilecektir. Lokal uygulamalarla birlikte kemoterapik ilacın etkinliğinin artmasına olanak sağlanabilecektir.

Düşük dozda etkin tedavi ile birlikte kemoterapik ajanların yan etkilerine daha az maruz kalma yararı sağlanacaktır. Kemoterapik ilaçların yüksek dozlarda kullanılmasının önüne geçecek yeni tedavi yaklaşımlarının kapısını aralayacaktır.

Ancak belirlenen yararların etkinliğini görebilmek için; Elektroporasyonla birlikte ilaç etkinliklerinin sağlıklı ve kanserli hücreler üzerindeki etkisinin *in vitro* olarak incelenmesi sonucunda elde ettiğimiz bu sonuçlar gelecekte *in vivo* ortamda mutlaka çalışılmalıdır.



KAYNAKLAR

1. Usaj, M., et al. (2011). Cell counting tool parameters optimization approach for electroporation efficiency determination of attached cells in phase contrast images. *Journal of Microscopy*, 241(3), 303-314.
2. Reigada, R. (2014). Electroporation of heterogeneous lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(3), 814-821.
3. Tsong, T.Y. (1991). Electroporation of cell-membranes. *Biophysical Journal*, 60(2), 297-306.
4. Bicek, A., et al. (2007). Combined therapy of the antimetastatic compound NAMI-A and electroporation on B16F1 tumour cells in vitro. *Bioelectrochemistry*, 71(2), 113-117.
5. Weaver, J.C. and Y.A. (1996). Chizmadzhev, Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41(2), 135-160.
6. Chen, C., et al. (2010). Electroporation of cells using EM induction of ac fields by a magnetic stimulator. *Physics in Medicine & Biology*, 55(4), 1219-1229.
7. Farkas, D.L., et al. (1989). Simultaneous imaging of cell and mitochondrial membrane potentials. *Biophysical Journal*, 56(6), 1053-1069.
8. Sengel, J.T. and Wallace, M.I. (2016). Imaging the dynamics of individual electropores. *Biophysics and Computational Biology, Chemistry*, 113(19), 5281-5286.
9. Hibino, M., et al. (1991). Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophysical Journal*, 59(1), 209-220.
10. Young, J.L. and Dean, D.A. (2015). Electroporation-mediated gene delivery. *Advances in Genetics*, 89, 49-88.
11. Tsong, T.Y. (1991). Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal*, 60(2), 297-306.
12. M. Reberšek and D. Miklavčič, (2014). Cell Membrane Electroporation—Part 3: The Equipment. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 30(3), 8-18.
13. Mir, L.M., et al. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4262-4267.
14. Lohr, F., et al. (2001). Effective tumor therapy with plasmid-encoded cytokines combined with in vivo electroporation. *Cancer Research*, 61(8), 3281-3284.
15. Lucas, M.L. and Heller, R. (2001). Immunomodulation by electrically enhanced delivery of plasmid DNA encoding IL-12 to murine skeletal muscle. *Molecular Therapy*, 3(1), 47-53.

16. Rebersek, M. (2017). *Beyond Electroporation Pulse Parameters: From Application to Evaluation*, in *Handbook of Electroporation*. U.S.A.: Springer International Publishing.
17. Birk, A., Rinne, A. and Bunemann, M. (2015). Membrane Potential Controls the Efficacy of Catecholamine-induced beta1-Adrenoceptor Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 290(45), 27311-27320.
18. Geng, T. and Lu, C. (2013). Microfluidic electroporation for cellular analysis and delivery. *The Royal Society of Chemistry*, 13(19), 3803-3821.
19. Molina, F.M. (2013). Aurore Burgain Chain and D. Scherman, *DNA Electrotransfer: An Effective Tool for Gene Therapy, Gene Therapy - Tools and Potential Applications*, InTech, DOI: 10.5772/52528, France.
20. Teissie, J. and Rols, M.P. (1993). An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophysical Journal*, 65(1), 409-413.
21. Kim, K. and Lee, W.G. (2017). Calibration of on-chip cell electroporation by a pseudo-volumetric uptake model. *Micron*, 99, 32-39.
22. Tang, L., Yao, C. and Sun, C. (2009). Apoptosis induction with electric pulses - a new approach to cancer therapy with drug free. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(4), 1098-1101.
23. Ghosh, P.M., Keese, C.R. and Giaever, I. (1993). Monitoring electropermeabilization in the plasma membrane of adherent mammalian cells. *Biophysical Journal*, 64(5), 1602-1609.
24. Neal, R.E., and Davalos, R.V. (2009). The feasibility of irreversible electroporation for the treatment of breast cancer and other heterogeneous systems. *Annals of Biomedical Engineering*, 37(12), 2615-2625.
25. Nakamura, H. and Funahashi, J. (2013). Electroporation: past, present and future. *Development, Growth & Differentiation*, 55(1), 15-19.
26. Mir, L.M. and Orlowski, S. (1999). Mechanisms of electrochemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35(1), 107-118.
27. Tuhin S.S., Wang, P.C. and Tseng, F.G. (2013). Electroporation Based Drug Delivery and Its Applications, in *Advances in Micro/Nano Electromechanical Systems and Fabrication Technologies*, Editor. K. Takahata, InTech, DOI: 10.5772/55369.
28. Corovic, S., Bester, J. and Miklavcic, D. (2009). An e-learning application on electrochemotherapy. *BioMedical Engineering OnLine*, 8, 26.
29. Hui, S.W. (2002). The application of electroporation to transfect hematopoietic cells and to deliver drugs and vaccines transcutaneously for cancer treatment. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 1(5), 373-384.

30. Abiror, I.G., et al. (1979). 246 - Electric breakdown of bilayer lipid membranes I. The main experimental facts and their qualitative discussion. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 6(1), 37-52.
31. Eller, A., et al. (2015). Local control of perivascular malignant liver lesions using percutaneous irreversible electroporation: initial experiences. *CardioVascular and Interventional Radiology*, 38(1), 152-159.
32. Choi, J.W., et al. (2014). Assessment of chronological effects of irreversible electroporation on hilar bile ducts in a porcine model. *CardioVascular and Interventional Radiology*, 37(1), 224-230.
33. Chen, X., et al. (2015). Electric Ablation with Irreversible Electroporation (IRE) in Vital Hepatic Structures and Follow-up Investigation. *Scientific Reports*, 5, 16233.
34. Forjanic, T. and Miklavcic, D. (2016). Mathematical model of tumor volume dynamics in mice treated with electrochemotherapy. *Medical & Biological Engineering & Computing*.
35. Kaehler, K.C., Egberts, F. and Hauschild, A. (2010). Electrochemotherapy in symptomatic melanoma skin metastases: intraindividual comparison with conventional surgery. *Dermatologic Surgery*, 36(7), 1200-1202.
36. Tuong, W., Cheng, L.S. and Armstrong, A.W. (2012). Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. *Dermatol Clin*, 1, 113-124.
37. Peterson, M., Albertini, M.R. and Remington, P. (2015). Incidence, Survival, and Mortality of Malignant Cutaneous Melanoma in Wisconsin, 1995-2011. *Wisconsin Medical Journal*, 114(5), 196-201.
38. Jemal, A., et al. (2001). Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(9), 678-83.
39. Cancer Facts and Figures. (2017). American Cancer Society journal, Editor. American Cancer Society: Atlanta.
40. Lucas, R.M., et al. (2015). The consequences for human health of stratospheric ozone depletion in association with other environmental factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(1), 53-87.
41. Sula, B., et al. (2016). Epidemiological and clinical characteristics of malignant melanoma in Southeast Anatolia in Turkey. *Pan African Medical Journal*, 24, 22.
42. Eser, S., et al. (2010). Cancer incidence rates in Turkey in 2006: a detailed registry based estimation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 11(6), 1731-1739.
43. Brash, D.E., et al. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22), 10124-10128.
44. Hemminki, K., et al. (2002). Demonstration of UV-dimers in human skin DNA in situ 3 weeks after exposure. *Carcinogenesis*, 23(4), 605-609.

45. Gandini, S., et al. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *European Journal of Cancer*, 41(1), 45-60.
46. Ford, J.M. and Hanawalt, P.C. (1997). Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 28073-28080.
47. Gandini, S., et al. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European Journal of Cancer*, 41(14), 2040-2059.
48. Sena, J.S., et al. (2016). Occupational skin cancer: Systematic review. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, 62(3), 280-286.
49. Gloster, H.M., and Brodland, D.G. (1996). The epidemiology of skin cancer. *Dermatologic Surgery*, 22(3), 217-226.
50. Bleyer, W.A. (2002). Cancer in older adolescents and young adults: epidemiology, diagnosis, treatment, survival, and importance of clinical trials. *Medical and Pediatric Oncology*, 38(1), 1-10.
51. Caini, S., et al. (2009). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. *European Journal of Cancer*, 45(17), 3054-3063.
52. Gandini, S., et al. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European Journal of Cancer*, 41(1), 28-44.
53. Stierner, U., et al. (1992). Regional distribution of common and dysplastic naevi in relation to melanoma site and sun exposure. A case-control study. *Melanoma Research*, 1(5-6), 367-375.
54. Hodi, F.S., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 363(8), 711-723.
55. Lens, M.B. and Dawes, M. (2004). Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *British Journal of Dermatology*, 150(2), 179-185.
56. Rigel, D.S., Russak, J. and Friedman, R. (2010). The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60(5), 301-316.
57. Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(1), 11-30.
58. Jiang, G., et al. (2014). Dacarbazine combined targeted therapy versus dacarbazine alone in patients with malignant melanoma: a meta-analysis. *PLoS One*, 9(12).
59. Claudriana Locatelli, F.B.F.-M. and Creczynski-Pasa, T.B. (2013). *Current Therapies and New Pharmacologic Targets for Metastatic Melanoma*.

60. Quirin, C., et al. (2007). Combining adenoviral oncolysis with temozolomide improves cell killing of melanoma cells. *International Journal of Cancer*, 121(12), 2801-2807.
61. Yin, Z., Xu, J. and Luo, D. (2012). A meta-analysis comparing long-term recurrences of toenail onychomycosis after successful treatment with terbinafine versus itraconazole. *Journal of Dermatological Treatment*, 23(6), 449-452.
62. Carter, S.K. (1976). Dacarbazine. *International Journal of Dermatology*, 15(1), 59-61.
63. Eggermont, A.M. and Kirkwood, J.M. (2004). Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *European Journal of Cancer*, 40(12), 1825-1836.
64. Middleton, M.R., et al. (2000). Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 18(1), 158-166.
65. Mir, L.M., et al. (1998). Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *British Journal of Cancer*, 77(12), 2336-2342.
66. Metelmann, H.R. and Von Hoff, D.D. (1983). In vitro activation of dacarbazine (DTIC) for a human tumor cloning system. *International Journal of Cell Cloning*, 1(1), 24-32.
67. Santhanam, R.K., et al. (2016). Bioactive Constituents of *Zanthoxylum rhetsa* Bark and Its Cytotoxic Potential against B16-F10 Melanoma Cancer and Normal Human Dermal Fibroblast (HDF) Cell Lines. *Molecules*, 21(6).
68. Strojjan, P. (2010). Role of radiotherapy in melanoma management. *The Journal of Association of Radiology and Oncology*, 44(1), 1-12.
69. Guadagnolo, B.A., et al. (2014). The role of adjuvant radiotherapy in the local management of desmoplastic melanoma. *Cancer*, 120(9), 1361-1368.
70. Seegenschmiedt, M.H., et al. (1999). Palliative radiotherapy for recurrent and metastatic malignant melanoma: prognostic factors for tumor response and long-term outcome: a 20-year experience. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 44(3), 607-618.
71. Atallah, E. and Flaherty, L. (2005). Treatment of metastatic malignant melanoma. *Current Treatment Options in Oncology*, 6(3), 185-193.
72. Lev, D.C., et al. (2003). Dacarbazine causes transcriptional up-regulation of interleukin 8 and vascular endothelial growth factor in melanoma cells: a possible escape mechanism from chemotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(8), 753-763.
73. Eapen, S. and Dutcher, J.P. (2005). A review of evidence-based treatment of stage IIB to stage IV melanoma. *Cancer Investigation*, 23(4), 323-337.

74. Falkson, C.I. (1995). Experience with interferon alpha 2b combined with dacarbazine in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Medical Oncology*, 12(1), 35-40.
75. Chapman, P.B., et al. (1999). Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 17(9), 2745-2751.
76. Chen, J., et al. (2005). Protection against influenza virus infection in BALB/c mice immunized with a single dose of neuraminidase-expressing DNAs by electroporation. *Vaccine*, 23(34), 4322-4328.
77. Chang, S.L., et al. (2000). The effect of electroporation on iontophoretic transdermal delivery of calcium regulating hormones. *The Journal of Controlled Release*, 66(2-3), 127-133.
78. Pakhomov, A.G., et al. (2007). Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. *Arch Biochem Biophys*, 465(1), 109-118.
79. Kanduser, M., Sentjurc, M. and Miklavcic, D. (2008). The temperature effect during pulse application on cell membrane fluidity and permeabilization. *Bioelectrochemistry*, 74(1), 52-57.
80. Neumann, E., Sowers, A.E. and Jordan, C.A. (1989). *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. Boston, MA: Imprint: Springer. XVIII, 436.
81. Gabriel, B. and Teissie, J. (1995). Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electroporation of Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*, 1266(2), 171-178.
82. Kubota, Y., et al. (1996). Electroporation in bladder cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 39(1-2), 67-70.
83. Gehl, J., Skovsgaard, T. and Mir, L.M. (1998). Enhancement of cytotoxicity by electroporation: an improved method for screening drugs. *Anticancer Drugs*, 9(4), 319-325.
84. Esmekaya, M.A., et al. (2016). Effects of Electroporation on Tamoxifen Delivery in Estrogen Receptor Positive (ER+) Human Breast Carcinoma Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*,
85. Esmekaya, M.A., et al. (2016). Effects of Cisplatin Electrochemotherapy on Human Neuroblastoma Cells. *The Journal of Membrane Biology*, 249(5), 601-610.
86. Jaroszeski, M.J., et al., *Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro*. *Anti-Cancer Drugs*, 2000. 11(3): p. 201-208.
87. Cemazar, M., et al. (2001). Electroporation of human microvascular endothelial cells: evidence for an anti-vascular mechanism of electrochemotherapy. *British Journal of Cancer*, 84(4), 565-570.

88. Sersa, G., Cemazar, M. and Miklavcic, D. (1995). Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum (II) in mice. *Cancer Research*, 55(15), 3450-3455.
89. Orlowski, S., et al. (1988). Transient electroporation of cells in culture - increase of the cyto-toxicity of anticancer drugs. *Biochemical Pharmacology*, 37(24), 4727-4733.

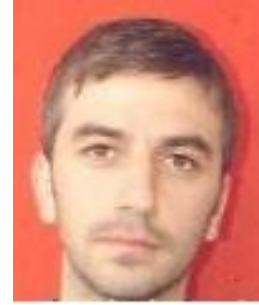




ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : COŞKUN, Alaaddin
 Uyuğu : T.C
 Doğum tarihi ve yeri : 29.12.1982 / Yenimahalle
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0505 654 2574
 e-mail : alaaddincoskun@yahoo.com



Eğitim

| Derece | Eğitim Birimi | Mezuniyet tarihi |
|---------------|--|------------------|
| Doktora | Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı | Devam ediyor |
| Yüksek Lisans | Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü /Fizik | 2009-2012 |
| Lisans | Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü | 2001-2005 |
| Lise | Prof. Dr. Şevket Raşit Hatipoğlu Lisesi | 1996-1999 |

İş Deneyimi

| Yıl | Yer | Görev |
|-------------------|---|---------------------------------|
| 2014-Devam ediyor | Yuratek Tıbbi Cihazlar /Ankara | Ar-Ge Uzmanı |
| 2012-2013 | Gazi Non- İyonizan Radyasyondan Korunma Merkezi/ANKARA | Uzman |
| 2010-2012 | Eldaş Deney Ve Kalibrasyon Merkezi /Ankara | Medikal Cihaz Test Mühendisi |

Yabancı Dil

İngilizce

Projeler

- Proje Yürütücüsü : “Keratokonüs Tedavisinde Kullanılacak Kornea Çapraz Bağlama Cihazı Geliştirilmesi” TÜBİTAK TEYDEB KOBİ AR-GE 1507 , 2016
- Araştırmacı: “Elektroporasyon Yöntemi ile Melanoma Tedavisinde Kullanılan Doksorubisinin Sitotoksitesinin Arttırılması” GAZİ ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR PROJESİ (BAP), 2015
- Proje Yürütücüsü: “Patojen tespitine yönelik yarıiletken temelli biyosensör geliştirilmesi ve üretilmesi” BİLİM SANAYİ VE TEKNOLOJİ BAKANLIĞI, TEKNOGİRİŞİM, 2013

Yayınlar

- Esmekaya MA, Kayhan H, Yagci M, Coskun A, Canseven AG. 2016. Effects of Electroporation on Tamoxifen Delivery in Estrogen Receptor Positive (ER+) Human Breast Carcinoma Cells. Cell Biochem Biophys.
- Esmekaya MA, Kayhan H, Coskun A, Canseven AG. 2016. Effects of Cisplatin Electrochemotherapy on Human Neuroblastoma Cells. J Membr Biol 249:601-610.

Sözlü Sunumlar

- “Change in propidium iodide (PI) fluorescence intensity of MEC- 1 Cells due to treatment with microsecond electric pulses” Electroporation based Technologies and treatment. International SCIENTIFIC WORKSHOP and POSTGRADUATE COURSE, Ljubljana/ Slovenia, Kasım 2015

Kongreler

- “Ca²⁺ Electroporation in chronic-B lymphocytic leukaemia (MEC-1) cells” 22. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu BIOMED, Ankara, Mayıs 2017
- “The Estimation of Pore of Size Distribution On Electroporated Cell Membrane” 22. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu BIOMED, Ankara, Mayıs 2017
- “Change in propidium iodide (PI) fluorescence intensity of MEC- 1 Cells due to treatment with microsecond electric pulses” Electroporation based Technologies and

treatment congress, Ljubljana/ Slovenia, Kasım 2015

- “n-GaAs (001) Yüzey Pasivizasyonu ve Thiol Etkileşmesi” Turkish Physical Society 28 th International Physic Congress, Bodrum, Eylül, 2011.





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

