

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYO FİZİK (TIP) DOKTORA PROGRAMI

SONO-KEMOTERAPİ AMAÇLI ÜRETİLEN
MİKROKABARCIKLARIN KANSER HÜCRESİ İLE
ETKİLEŞİMİ

ERGÜN CEM KÖKEN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-18025 proje numarası ile ve Yükseköğretim Kurulu Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı ÖYP 14021 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Kanser.....	4
2.1.1. Meme Kanseri ve İnsidansı	5
2.1.2. Kansere Karşı Moleküler Terapiler	5
2.2. Antikanser Moleküler Terapiler İçin Taşıyıcı Yapılar	7
2.2.1. Lipozomlar	7
2.2.2. Polimerler	8
2.2.3. Dendrimerler.....	8
2.2.4. Misellar Nanoparçacıklar	9
2.2.5. İnorganik Nanomalzemeler	10
2.2.6. Mikrokabarcıklar	10
2.3. Ultrases	11
2.4. Ultrasesin Biyofiziksel Özellikleri	12
2.4.1. Ultrasesin Termal Etkileri	13
2.4.2. Ultrasesin Non-termal Etkileri	13
2.5. Ultrasesin Tıbbi Uygulamaları	19
2.6. Sonodinamik Terapi	19
2.6.1. Sonodinamik Terapinin Biyokimyasal Mekanizmaları.....	22
2.6.2. Sonodinamik Terapide Ultrasonik Kaviteasyonun Etkileri	23
2.6.3. Sonodinamik Terapi ile Kanser Hücresi Apoptozunun İndüklenmesi	25
2.6.4. Sonodinamik Terapide Kullanılan Ajanlar.....	26
2.7. Mikrokabarcıklar Ve Ultrases	30

2.7.1. Mikrokabarcık Yapıları	30
2.7.2. Mikrokabarcık – Ultrases Etkileşimi	32
2.7.3. Sonoporasyon	33
2.8. Ultrases ile Mikrokabarcık Yıkımına Dayanan Terapiler	37
2.8.1. İlaç ve Gen Transferi	37
2.8.2. Kök Hücre Transferi	39
2.8.3. Kan Beyin Bariyerinin Aşılması	40
2.9. Ultrases İle Mikrokabarcık Yıkımı Aracılı Sono-kemoterapi Yaklaşımı	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Kullanılan Cihazlar	43
3.2. Kullanılan Kimyasallar	43
3.4. Hücre Kültürü	44
3.5. Mikrokabarcık Üretimi Ve Karakterizasyonu	44
3.5. Ultrases Aracılı Mikrokabarcık Yıkımı	46
3.6. Hücre Canlılığı Analizi	47
3.7. Hoechst Boyama İle Apoptotik Yapıların İncelenmesi	47
3.8. Annexin V Apoptoz Tayini	48
3.9. Oksidatif Stress Analizi	48
3.10. Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi	49
3.11. İstatistiksel Değerlendirme	49
4. BULGULAR	50
4.1. Mikrokabarcık Boyut Dağılımı	50
4.2. Hücre Canlılığı Bulguları	50
4.3. Floresan Mikroskopik Apoptoz Bulguları	54
4.4. Annexin V Apoptoz Bulguları	55
4.5. Oksidatif Stres Bulguları	56
4.6. Mitokondri Membran Potansiyeli Değişim Bulguları	57
5. TARTIŞMA	59
5.1. Mikrokabarcık Destekli Sonokemoterapinin Seçilmesi	59
5.2. Sonosensitif Ajanın Seçimi	61
5.3. Ultrases Frekans ve Yoğunluğunun Seçilmesi	62
5.4. Kemoterapötik Ajanın Seçilmesi	63
5.5. Mikrokabarcık Bileşenlerinin Seçilmesi	65
5.5.1. Mikrokabarcık Kabuğunun Tasarlanması	65

5.5.2. Mikrokabarcık Çekirdeğinin Tasarlanması	66
5.6. Mikrokabarcık Karakterizasyon Çalışmaları.....	66
5.7. MCF-7 Hücre Hattında Toksisite Çalışmaları.....	66
5.7.1. Hücre Canlılık Analizi.....	67
5.7.2. Apoptoz Bulguları	68
5.7.4. Mitokondri Membran Potansiyeli.....	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	100



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1O2	: Singlet Oksijen
5-ALA	: 5-Aminolevulinik Asit
7-AAD	: 7-Aminoaktinomisin D
BKCa	: Büyük Kondüktanslı Kalsiyum ile Aktive Olan Potasyum Kanalı
BSA	: Bovine Serum Albumin
C3F8	: Perfloropropan
Ce6	: Klorin e6
CnFn+2	: Perflorokarbon
CNT	: Karbon Nanotüpler
DHE	: Dihidroetidyum
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSPC	: 1,2-disteroil-sn-gliserol-3-fosfolipin
FBS	: Fötal Bovine Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HIFU	: Yüksek Yoğunluklu Odaklanmış Ultrases Cerrahisi
HMME	: Hematoporfirin Monometil Eter
Hp	: Hematoporfirin
ICG	: İndosiyenin yeşili
ISC	: Sistemler Arası Geçiş
KBB	: Kan-Beyin Bariyeri
LFLX	: Lomefloksasin hidroklorid
MSN	: Metal Nanopartiküller
O2-	: Süperoksit İyonu
O2MK	: Oksijen yüklü mikrokabarcık
OH	: Hidroksil Radikali
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PDT	: Fotodinamik Terapi
PEG	: Polietilen Glikol
pEI	: Poli-Etilenimin
PLA	: Polilaktik Asit
PLGA	: Polilaktik-ko-glikolik Asit
pLL	: Poli-L-lizin
PpIX	: Ptoporfirin IX
QD	: Kuantum Noktaları
RB	: Rose Bengal
RES	: Retikulo-Endotel Sistem
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDT	: Sonodinamik Terapi
SF6	: Kükürt Heksaflorür
SiNP	: Silikon Nanopartikül
siRNA	: Küçük Karışan RNA
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanser tedavisinde ilaç taşıyıcı olarak kullanılan nanomalzemeler	9
Şekil 2. Akustik dalganın şematik gösterim	12
Şekil 3. Ultrases dalga formu ve kavitasyon.....	14
Şekil 4. Kararlı ve dinamik kavitasyon yapan mikrokabarcıkların biyofiziksel etkileri .	15
Şekil 5. Şok dalgası oluşumu	18
Şekil 6. Tıbbi uygulamalarda kullanılan farklı ultrases frekanslarına genel bakış.	19
Şekil 7. Jablonski diyagramı üzerinde tip 1 ve tip 2 fotosensitizasyon mekanizmalarının şematik gösterimi.	20
Şekil 8. Sonodinamik terapinin şematik gösterimi ve olası mekanizmaları	23
Şekil 9. SDT'ye bağlı apoptozun olası mekanizmaları	26
Şekil 10. Porfirin türevi sonosensitif ajanlar.	27
Şekil 11. Ksantin türevi sonosensitif ajanlar.	28
Şekil 12. Klorin e6 (3 sodyum tuz) kimyasal yapısı.....	29
Şekil 13. Mikrokabarcık yapısının şematik gösterimi.	31
Şekil 14. Kavitasyon doku etkileşimi.	33
Şekil 15. Kararlı ve dinamik kavitasyon yapan mikrokabarcıkların biyolojik etkileri...36	
Şekil 16. Mikrokabarcıklarda olası ilaç kargo alanlarının şematik gösterimi.	38
Şekil 17. İlaç yüklü mikrokabarcıklar ve ultrases ile hedefli ilaç dağıtımı	39
Şekil 18. Direkt ve indirekt ilaç dağılımı.....	41
Şekil 19. Sono-kemoterapi uygulaması için tasarlanan mikrokabarcık.....	42
Şekil 20. Mikrokabarcık üretim aşamaları.....	45
Şekil 21. Mikrokabarcıkların ışık mikroskopu altında görünüşleri ve boyut dağılımı grafiği.	50
Şekil 22. Farklı docetaxel dozlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	51
Şekil 23. Farklı Ce6 dozlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	52
Şekil 24. Tedavi grupları hücre canlılıklarının (%) karşılaştırılması.....	53
Şekil 25. Floresan mikroskopta deney gruplarına ait apoptotik yapılar.	54
Şekil 26. Tedavi gruplarındaki MCF-7 hücrelerinin apoptotik profilleri	56
Şekil 27. Tedavi gruplarının oksidatif stres bulguları.....	57

Şekil 28. Tedavi gruplarındaki MCF-7 hücrelerinin mitokondri membran potansiyellerindeki değişimler.	58
--	----



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Mekanik aktivasyonun ardından mikrokabarcık içeren tüpler.	45
Resim 2. Ultrases uygulama düzeneği.....	46
Resim 3. Mikrokabarcıklar ve Ultrases etkileşimi.	47



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Farklı docetaxel dozlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.	51
Tablo 2. Farklı Ce6 dozları uygulaması sonrasında MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri.	52
Tablo 3. Tedavi gruplarının hücre canlılığı yüzdeleri	53
Tablo 4. Tedavi gruplarının apoptoz bulguları (%).	55



ÖZET

SONO-KEMOTERAPİ İÇİN ÜRETİLEN MİKROKABARCIKLARIN KANSER HÜCRELERİYLE ETKİLEŞİMİ

Köken E.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2020.

Günümüzde kemoterapi, kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri dahil pek çok kanser türü için en sık uygulanan tedavilerden biridir. Fakat kemoterapinin sistemik yan etkileri ve kullanılan ilaçlara karşı sıkça gelişen ilaç direnci nedeniyle pek çok araştırmacı tedavinin daha etkin hale getirilmesi için alternatifler üzerinde çalışmaktadır. Mikrokabarcıkların eşliğinde verilen bir kemoterapi ilacı ve ultrasesle kimyasal olarak aktif hale gelerek ROS oluşturabilen bir sonosensitif ajanın, uygulanan ultrasesin etkisiyle kanser hücrelerine daha etkin biçimde hasar vermesini amaçlayan sono-kemoterapi yaklaşımı da bu alternatif uygulamalardan birisidir. Ultrason tepkili mikrokabarcıkların, bir sonosensitif ajan ve bir kemoterapötik ilaç ile kombinasyonu, mikrokabarcıkların ultrases ile patlatılmasıyla, hem hücrelerin bulunduğu alanda gelişmiş sonodinamik aktivasyon sağlama hem de kemoterapi ilacının kanser hücresi içerisine invazif olmayan bir şekilde verilmesi imkânı sunmaktadır.

Bu amaçla bu çalışmada insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamına mikrokabarcıklarla birlikte kemoterapi ilacı dosetaksel ve sonosensitif ajan Chlorin e6 verilmiş, ardından mikrokabarcıklar ultrases dalgasıyla patlatılarak hücre canlılıkları, apoptoz oranları, ROS üretimi ve mitokondri potansiyellerindeki değişimler incelenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre sono-kemoterapi uygulaması hücre canlılığını önemli oranda azaltmakta, hücrelerde apoptozu tetiklemekte, ROS oluşumunu artırarak hücrelere hasar vermekte ve mitokondri membran potansiyelini de bozup hücresel hasarı derinleştirmektedir.

Anahtar kelimeler: Dosetaksel, Klorin E6, Mikrokabarcık Yıkımı, Sono-kemoterapi, Ultrases

ABSTRACT

INTERACTIONS OF MICROBUBBLES PRODUCED FOR SONO-CHEMOTHERAPY WITH CANCER CELLS

Köken E.C. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Biophysics Program, PhD Thesis, Aydın, 2020.

Today, chemotherapy is one of the most common treatments for many types of cancer, including breast cancer, which is the most common cancer type in women. However, due to the systemic side effects of chemotherapy and drug resistance that develops frequently against chemotherapeutic drugs, many researchers are working on alternatives to make the treatment more effective. One of these alternative applications is sono-chemotherapy, which includes a chemotherapy drug accompanied by microbubbles, and a sonosensitive agent that can chemically become active by ultrasound, which can create ROS, effectively damage cancer cells with the effect of the applied ultrasound. The combination of ultrasound-responsive microbubbles with a sonosensitive agent and a chemotherapeutic drug offers the opportunity to both provide enhanced sonodynamic activation in the area of the cells and non-invasive delivery of the chemotherapy drug into the cancer cell by blasting the microbubbles with ultrasound.

For this purpose, in this study, the chemotherapy drug docetaxel and sonosensitive agent Chlorin e6 were introduced to the culture medium where the human breast cancer cell line MCF-7 cells were located, and then microbubbles were detonated with ultrasound waves, and cell viability, rate of apoptosis, ROS production and changes in mitochondrial membrane potentials were investigated.

According to the findings obtained, the application of sono-chemotherapy damages the cells by significantly reducing cell viability, triggering apoptosis in the cells, increasing the ROS formation and deepens the cellular damage by disrupting the membrane potential of the mitochondria.

Keywords: Chlorine E6, Docetaxel, Microbubble Destruction, Sono-chemotherapy, Ultrasound

1. GİRİŞ

Kanser hücrelerdeki hayati işlevleri sürdüren bazı genlerin mutasyonları sonrası fizyolojik apoptoz mekanizmalarının bozulmasıyla ortaya çıkan kontrolsüz hücre bölünmesi durumudur. Günümüzde kanser dünya genelinde görülen her altı ölümden birinin nedenidir. Artan yaşam beklentisi, epidemiyolojik ve demografik geçişler, kanserojen kimyasal madde ve gıda kullanımının artışı nedeniyle kanserin morbidite ve mortalite oranının günden güne artması, bu hastalığı önemli bir sağlık sorunu haline getirmektedir (WHO, 2020). Meme kanseri kadınlarda en yaygın görülen kanser olup mortalitesi en yüksek 5. kanser türüdür. Her ne kadar mamografi gibi görüntüleme yöntemleri ile erken dönemde teşhisi mümkün olsa da, meme kanseri dünya genelinde kadınlar için önemli bir risk unsuru olmaya devam etmektedir (Bray ve ark, 2018).

Kanser tedavisinde günümüzde geleneksel olarak cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bununla birlikte son yıllarda monoklonal antikorlar ve gen terapisi gibi yeni nesil tedavi yöntemleri de klinikte denenmektedir. Ancak bütün bu yöntemler sistemik toksisite, düşük seçicilik, ilaç direnci ve potansiyel yan etkiler gibi kısıtlamalar taşımaktadır (Dy ve Adjei, 2013). Bu sebeple kanser tedavisinde yüksek seçicilik özelliğine sahip ve minimal invaziv kanser tedavi yöntemlerine şiddetle ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonodinamik terapi (SDT), sonosensitif bir ajan ya da kemoterapötik bir ilacın düşük yoğunluklu ultrases ve sonikasyonla aktive edilmesiyle kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturduğundan özgün bir tedavi yöntemidir (Rosenthal ve ark, 2004). Ultrasesin derin yerleşimli kanserli dokulara da nüfuz edebilmesi, spesifik bir tümör lokalizasyonuna odaklanabilmesi ve tümör dokusunu çevreleyen sonosensitif ajanı aktif hale getirerek sitotoksik etkiyi tetiklemesi, bunları yaparken de tümör komşuluğundaki sağlıklı dokuya zarar vermemesi sonodinamik terapiyi kanser tedavisinde umut verici güncel bir yaklaşım haline getirmektedir (Chen ve ark, 2014a).

Sonodinamik terapide porfirinler, kemoterapötik ajanlar, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, klorinler gibi sonosensitif ajanlar kullanılmaktadır (Chen ve ark, 2014a; Rosenthal ve ark, 2004; Yu ve ark, 2004). Klorin e6 da (Ce6) klorofilden elde edilen tetrapirel monomeri olan bir sonosensitif ajandır. Ce6'nın spesifik olarak tümör dokularında birikerek yüksek sonodinamik aktivite gösterdiği, sağlıklı dokular için toksik olmadığı ve bu dokulardan

kolayca uzaklaştırılabildiği gösterilmiştir (Chen ve ark, 2013; Shi ve ark, 2011). Sonodinamik terapide Ce6 kullanılması ile mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması ve reaktif oksijen türevleri oluşumu üzerinden apoptoz yollarının uyarılması(Li ve ark, 2014), nedeniyle Ce6 diğer ajanlara göre daha avantajlı olabilmektedir. Bazı çalışmalarda sonodinamik terapide sonosensitif ajan ile kemoterapi ilacının birlikte uygulanmasının hedeflenen sitotoksik etkiyi çok daha güçlendireceği, daha hedefe yönelik bir tedavi sağlayabileceği gösterilmiştir. Bunların yanında SDT’de kullanılan kemoterapötik dozunun geleneksel tedavidekine göre çok daha düşük olması sayesinde ilacın yan etkilerinden de kaçınılabilecektir.

Ultras ses maruziyetinden sonra hücre membranında oluşan geçici açıklıkların oluşturulmasına “sonoporasyon” denilmektedir. Ultras ses uygulamasıyla hücre membranında sonoporasyon oluşturulması sayesinde hücre membranından geçemeyen ilaçların, genetik materyalin ya da proteinlerin hücre içine aktarılabilmesi sağlanmaktadır. Ultras ses eşliğinde eksojen mikrokabarcık uygulaması ile sonoporasyonun biyolojik etkileri artırılabilmekte ve daha hedefe yönelik bir tedavi mümkün olabilmektedir.

Mikrokabarcıklar perflorokarbon veya kükürt heksaflorür gibi gazla doldurulmuş merkezi boşluğun lipid, protein ve polimer yapıdaki stabil bir kabuk tarafından kapsüllenmesiyle oluşturulmuş, 0,5-10 µm boyutundaki vezikül benzeri yapılardır. Mikrokabarcıklar 2005 yılından beri insanlarda klinik tanı ve tedavi uygulamalarda kullanılmaktadır. Biyomedikal amaçla intravenöz yoldan dolaşımına verildikten belli bir süre sonra kan içerisinde çözünmekte, kabuk yapısı ve içeriğindeki gaz vücuttan çeşitli yollarla uzaklaştırılmaktadır. Mikrokabarcıklar biyolojik etkilerini bir takım mikro akımlarla kararlı ve dinamik kavitasyonlar oluşturarak ve şok dalgaları ya da jet formasyonu sonrası damar bütünlüğünü bozarak göstermektedir. Bu sayede mikrokabarcıkların damar dışına çıkarak içeriğindeki ilaç, genetik materyal ya da molekülleri hedef bölgeye ulaştırması sağlanmaktadır. Bunun yanında mikrokabarcıkların kavitasyon oluşturması sırasında reaktif oksijen türevleri oluşumu ve hücre içine kalsiyum akışı olması, hedef hücreler üzerinde apoptozu tetikleyen sitotoksik bir etki de oluşturmaktadır. Mikrokabarcık yıkımında meydana gelen bu mekanik ve kimyasal etkiler sayesinde kanser tedavisinde sonodinamik terapinin etkinliği artmaktadır.

Ayrıca mikrokabarcıkların yıkımı sırasında ortaya çıkan yüksek enerji, sonodinamik terapide kullanılan sonosensitif ajanların da güçlü bir şekilde uyarılmasını sağlamaktadır. Eksojen verilen mikrokabarcıkların ultras ses eşliğinde istenilen bölgede yıkılmasının sağlanması ile, kanser hücrelerini apoptoza götürme olasılığı artmaktadır.

Sonodinamik terapide ultrasesin kemoterapi ilacı ve sonosensitif ajan ile birlikte kullanımı geleneksel kemoterapi uygulamalarına kıyasla ilacın potensini artıran, yan etkilerini azaltan, hedefe yönelik bir tedavi sağlamaktadır. Bu uygulamaya eksojen mikrokabarcıkların da dahil edilmesi, mikrokabarcıkların mekanik ve kimyasal etkileri sayesinde sonosensitif ajanın aktiveleşme olasılığını ve sitotoksik etkisini kuvvetlendirmektedir.

Bu yönleriyle mikrokabarcıklar kanser tedavisinde hem hedef bölgeye kemoterapi ilacının veziküler yöntemlerle ulaşmasını, hem de mekanik etkilerle hedef kanser hücrelerinde apoptozun tetiklenmesini sağlayarak kanser tedavisinde umut verici bir yaklaşım olmaktadır. Hem mikrokabarcık tasarımındaki hem de ultrason cihazlarındaki ve metodolojideki gelişmeler bu teknolojiyi klinik olarak anlamlı hale getirmektedir.

Bizim çalışmamızda kemoterapi ilacıyla yüklenmiş mikrokabarcıkların ultrasesle desteklenmesi ile kanser hücrelerindeki sitotoksik etkinin artacağını öngörmekteyiz.

Bu çalışmada insan meme kanseri hücre hattı MCF7 üzerinde;

1. Kemoterapötik bir ajan olan DosetaxelTM ile sonosensitif bir ajan olan Klorin e6'nın mikrokabarcık eşliğinde ultrases uygulanmasıyla tümör hücreleri üzerindeki etkinliklerinin *in vitro* olarak incelenmesi,

2. DosetaxelTM 'nin ultrases ve mikrokabarcıklar ile sinerjistik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Günümüzde kanser dünya genelinde görülen her altı ölümden birinin nedenidir. Artan yaşam beklentisi, epidemiyolojik ve demografik geçişler nedeniyle kanser sebepli yeni vaka ve ölümlerin sayısı günden güne artmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü 2040 yılında dünya çapında 30 milyona yakın insanın kansere yakalanacağını ve 15 milyondan fazla kişinin kanser nedeniyle hayatını kaybedeceğini öngörmektedir. Kanser nedenli ölümlerde en çok akciğer, meme, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri görülmektedir (WHO, 2020).

Kanseri, hücrelerimizdeki hayati işlevleri sürdüren bazı genlerdeki mutasyonlara bağlı ortaya çıkan bir hastalık olarak tarif edebiliriz. Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesi, genomun hasara uğramasına neden olan birçok mutasyonu gerektirmektedir. Genomdaki bu hasar, deoksiribo nükleik asit (DNA) replikasyonunda meydana gelen hataların sonucu olabileceği gibi, metabolizma sırasın da meydana gelen serbest radikallerin DNA bazlarına etki etmesi gibi nedenlerden de kaynaklanabilmektedir. İyonize radyasyon, ultraviyole (UV) radyasyon ve kimyasal karsinojen gibi ajanların etkileşimi ile de DNA hasarı gerçekleşebilmektedir. DNA'da birçok hasar tamir etme mekanizması vardır. Ancak bu mekanizmaların işlevsiz veya yetersiz kaldığı durumlarda onarılamayan DNA hasarları, DNA dizisinde mutasyon adı verilen kalıcı değişikliklere sebep olmaktadır (Bertram, 2000; Cree, 2011).

Normal hücresel işleyişte hücrenin yaşam süresi dolduğunda veya onarılamayacak düzeyde bir DNA hasarı meydana geldiğinde, hücrede programlı bir ölüm gerçekleşir. Bu ölüm mekanizması apoptoz olarak adlandırılır. Apoptoz mekanizmasının herhangi bir şekilde bozulması, başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Wong, 2011).

2.1.1. Meme Kanseri ve İnsidansı

Meme kanseri dünya genelinde en sık tanı konulan ve kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü olup, sadece 2018 yılında, tüm dünyada yaklaşık 2,1 milyon kadın meme kanseri tanısı almıştır. Her sekiz kadından biri, yaşamının herhangi bir döneminde meme kanseri olma riski taşımaktadır (American Cancer Society, 2018). Dünya Sağlık Örgütü 2040 yılında 3 milyondan fazla kadının meme kanserine yakalanacağını ve 1 milyona yakın kadının meme kanseri nedeniyle hayatını kaybedeceğini ön görmektedir (Bray ve ark, 2018).

Meme kanseri için temel risk faktörleri kadın olmak, yaş, genetik geçiş, erken menarş, geç menopoz, hiç doğum yapmamış olmak, aşırı kilolu olmak gibi değişkenlerdir (Hamajima ve ark, 2012). Her ne kadar mamografi gibi görüntüleme yöntemlerinin yaygınlığı sayesinde erken tanıyla ölüm riski azalsa da, meme kanseri hala dünya genelinde kadınlar için önemli bir risk unsuru olmaya devam etmektedir (Bray ve ark, 2018).

2.1.2. Kansere Karşı Moleküler Terapiler

Kemoterapötik ilaçlar genel olarak alkile edici ajanlar, antimetabolitler, antibiyotikler ve topoizomeraz inhibitörleri olarak sınıflandırılmaktadır. Geleneksel kemoterapötikler de denilen bu ilaçlar, hücre bölünmesini veya DNA sentezini farklı yollarla engelleyerek etki göstermektedir. Artık günümüzde monoklonal antikorlar ve tirozin kinaz inhibitörleri gibi, DNA'ya doğrudan müdahale etmeden kanser hücrelerini ortadan kaldıran yeni nesil kemoterapi ilaçları da klinik kullanıma girmiştir.

Alkilleyici ajanlar protein, ribo nükleik asit (RNA) ve DNA gibi hücresel bileşenleri alkile eden oldukça reaktif ilaçlar olup, azot hardal veya platin türevleri gibi kemoterapötikleri kapsamaktadır. Temel etki mekanizmaları DNA ile etkileşime girerek, transkripsiyonu bozmak ve DNA hasar yollarını uyarmaktır. Bu sayede DNA metabolizmasının hayati işlevlerini engellerler ve hücrenin apoptozuna neden olurlar. Alkilleyici ajanlar, hücre döngüsünü sürecinin büyük kısmında etkili olabildikleri için, farklı kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılabilir. Günümüzde en çok bilinen alkilleyici kemoterapi ilaçları sisplatin, oksoplatin ve karboplatindir. Alkilleyici ajanlar birçok kanser türünün tedavisinde yaygın şekilde kullanılmalarına rağmen, birçok sistemi etkileyen ciddi yan etkileri ve bu ilaçlara karşı vücudun gösterdiği direncin tedavi başarısını düşürmesi, kemoterapideki etkinliklerini kısıtlamaktadır (Khoury ve ark, 2020; Mao ve ark, 2020).

Antimetabolitler, kanser hücresinin bölünme aşamasında DNA veya RNA yapısına eklenerek veya yeni nükleotitlerin oluşumunu bozarak, tümör hücrelerinin büyümesini engelleyen ajanlardır. İnsan vücudunda doğal olarak bulunan vitamin, amino asit ve DNA veya RNA öncülleri gibi bileşikler ile yapısal benzerlik gösterirler. Bu ilaçlar özellikle hızlı büyüyen ve bölünen hücrelerde toksik etki gösterirler. Pürin, pirimidin ve folat antagonistleri günümüzde en yaygın kullanılan antimetabolitlerdir (McGuire, 2005; Sigmond ve Peters, 2005; Chan ve Cronstein, 2013).

Kanser tedavisinde DNA transkripsiyonunu bozarak etki gösteren antibiyotikler de kullanılmaktadır. En iyi bilinen antitümör işlevli antibiyotik doksorubisin'dir. Doksorubisinin DNA interkalasyonu, lipid peroksidasyonu ve topoizomerez II' nin inhibisyonu olmak üzere üç farklı çalışma mekanizması tanımlanmıştır. Diğer antitümör etkili antibiyotikler daunorubisin, epirubisin ve bleomisin'dir (Beretta ve Zunino, 2007; Kong ve ark, 2018; Osaki ve ark, 2016; Vejpongsa ve Yeh, 2014).

Topoizomerezlar, DNA'nın süper sarmal yapısını koruyan temel enzimlerdir. Tip I veya II topoizomerezların inhibisyonu, bu süper sarmal yapıyı bozarak DNA transkripsiyonunu ve replikasyonunu engellemektedir. Topoizomerez inhibitörlerine örnek olarak doksorubisin, genistein ve topotekan gösterilebilir (Topcu, 2001; Delgado ve ark, 2018).

Mikrotübüller hücre iskelet yapısının temel bileşenleri olup, hücre içinde veziküllerin taşınması, sinyal iletimi ve hücre bölünmesi gibi olaylarda önemli görevlerde bulunurlar. Taksanlar (paklitaksel, dosetaksel) ve Vinca alkaloidleri (vinblastin, vinkristin) gibi ilaçlar, mikrotübülleri hedefleyerek mitozu inhibe eden ve apoptoza yol açan anti-mitotik ilaçlardır (Dumontet ve Jordan, 2010).

Monoklonal antikorlar, tümöre özgü antijenlerin belirli bölgelerine yapışır ve bu antijenlerin konakçının bağışıklık sistemi tarafından kolayca tanınmasını sağlarlar (Samaranayake ve ark, 2009). Bunun yanında, büyüme faktörlerinin bağlandığı reseptörleri bloke ederek kanser hücrelerinin büyümesini önlerler.

Sağlıklı hücrelerin malign hücrelere dönüşümünde genetik düzeydeki mutasyonların rolü olduğunun keşfedilmesi, kanser hücrelerini gen tedavisi için önemli bir hedef haline getirmiştir. Gen tedavisindeki ilk yaklaşım, terapötik bir genin, genomun spesifik olmayan bir bölgesine sokulmasıdır. Bu girişim, daha önce sentezlenmeyen bir terapötik proteinin ekspresyonunu takiben tedavinin gerçekleşmesi ile sonuçlanabilmektedir. Başka bir gen terapisi yaklaşımı ise, bir patolojiye sebebiyet veren hatalı protein üretimi durumlarında, bu proteine ait mRNA'nın ekspresyonunu düzenlemektir. Bu düzenlemeler antisens oligonükleotidler, ribozimler veya küçük karışan RNA (siRNA) kullanılarak

gerçekleştirilebilmektedir (Devi, 2006; Mansoori ve ark, 2014; Pastor ve ark, 2018; Xu ve Wang, 2015).

2.2. Antikanser Moleküler Terapiler İçin Taşıyıcı Yapılar

Günümüz kanser terapilerinin en önemli sorunu olarak, tedavi gören hastalarda oluşan sistemik yan etkiler görülmektedir. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için kullanılan ilaç ve diğer ajanları taşıyıcı yapılarla hedef dokuya gönderme yaklaşımı yaygınlaşmaktadır. Bu amaç için kullanılmak üzere pek çok farklı yapı sentezlenmekte ve etkinlikleri test edilmektedir.

2.2.1. Lipozomlar

Lipozomlar, fosfolipidlerin sulu bir ortamda dağılması sonrası kendiliğinden oluşan bir takım veziküllerdir (Şekil 1). İçeriğindeki polar baş grubu ve apolar hidrokarbon kuyruğu, sulu ortamda iki tabakalı yapılar oluşturur: karşılıklı konumlanmış kuyruklar ve sulu ortama doğru çıkıntı gösteren polar baş grupları. Bu özelliğinden dolayı, lipozomlar sulu iç kompartıman bölümünde hidrofilik ajanları tutabilirken, lipit kısmına hidrofobik ajanlar yükleyebilir (Gulati ve ark, 1998). Bileşimi hücre zarının yapısı ile benzer olduğundan, lipozomlar diğer sentetik malzemelere göre biyolojik açıdan daha uyumludur. Bunun yanında, fonksiyonel ligandları taşıyabilmesi, belirgin yüzey modifikasyonlarına uygun olması, boyut ve yük farklılıkları ve polietilen glikol (PEG) ile kaplanabilmesi, lipozomların spesifik ilaç vermek için kullanışlı ajanlar olmasını sağlamaktadır. Lipozomların ilaç verme uygulamalarında nano-taşıyıcı olarak tercih edilmesinin başka ek avantajları da bulunmaktadır. Lipozomlar, kendisine yüklenen ilacın çevreye istenmeyen şekilde maruz kalmasını önler, ilacı bozunmaya karşı korur, böylece ilacın vücuda salım hızını yavaşlatabilirler. Kolesterol ve doymuş yağ asitleri gibi lipit alt türleri, lipozomun ikili lipit tabakasını stabilize ederek plazma proteinlerinin ataklarına direnmelerini sağlar ve ilaç kaçışını engellerler. Bütün bunlarla birlikte lipozomların ilaç taşıyıcıları olarak geliştirilmesinde karşılaşılan en büyük zorluk, bu vezikülün *in vivo* olarak vücuda dağılımının ve vücuttan uzaklaştırılmasının tamamen kontrol edilememesidir (Allen ve Cleland, 1980;

Allen ve ark, 1991; Immordino ve ark, 2006; Scherphof ve ark, 1978; Senior ve Gregoriadis, 1982).

2.2.2 Polimerler

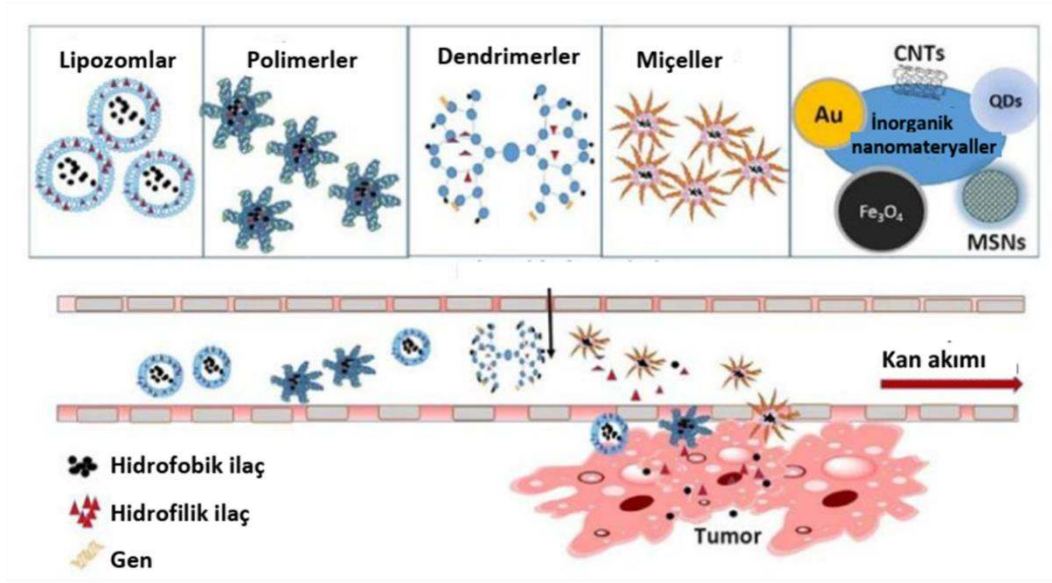
Polimerler şu şekilde kategorize edilebilir: i) protein, peptit, glikanlar, nişastalar ve selüloz gibi doğal polimerler; ii) doğal monomerlerden sentezlenen sentetik polimerler, örneğin polilaktik asit (PLA) ve polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA); ve iii) polihidroksibutirat gibi mikrobiyal fermantasyon polimerleri. Doğal ve sentetik polimerler, lipozomlar, dendrimerler ve miseller dahil olmak üzere çeşitli nanoparçacıkların sentezi için çeşitlendirilmiş bir platform oluşturur (Yu ve ark, 2006).

Yara iyileşmesi için kullanılan polimer nanopartiküller, miseller (Hu ve ark, 2013, 2011), nanojeller (Sinha ve ark, 2013) ve nanofiberler geniş ölçüde araştırılmıştır (Nguyen ve ark, 2013; Tan ve ark, 2015). Nanoparçacık sentezinde yaygın olarak kullanılan doğal polimerler arasında kitosan, dekstran, albümin, heparin, jelatin ve kollajen bulunmaktadır (Janib ve ark, 2010). Kitosan kaplı PLGA nanoparçacıkları (Ward ve Georgiou, 2011), kitosan nanoparçacıkları (Anitha ve ark, 2014; Mohammed ve ark, 2017; Raja ve ark, 2015), PEG ile kaplanmış PLA nanoparçacıkları ve poli-PLGA nanoparçacıkları proteinleri aktif bir formda taşıyabilmekte ve bunları hedef organlara ulaştırabilmektedir (Rabanel ve ark, 2015; Yang ve ark, 2014). Ayrıca Poli-L-lizin (pLL), Poli-Etilenimin (pEI), kitosan, katyonik proteinler ve katyonik peptitler gibi çeşitli doğal veya sentetik katyonik polimerler de DNA taşıyıcıları olarak kullanılmaktadır.

2.2.3. Dendrimerler

Dendrimerler doğada bulunan polimerik bir makromolekül sınıfı olup, 1970'lerin sonlarından itibaren sentetik olarak da sentezlenmeye başlanmıştır. Bunlar karmaşık küresel yapıda, 1-100 nanometre boyutundaki moleküllerdir. Dendrimerler şu şekilde karakterize edilmektedir: i) merkezi bir çekirdek; ii) merkezden çıkan ve "jenerasyon" denilen dallanmalar; iii) en az bir dal bağlantısı olan tekrarlı birimler; ve iv) terminal fonksiyonel gruplar (Buhleier ve ark, 1978; Tomalia ve ark, 2002).

Doğrusal polimerlerin aksine dallı yapılanma gösteren dendrimerler, hedefe özel yüzey grupları sayesinde hassas olarak kontrol edilebilir bir mimariye sahiptir. Dendrimerlerin dallarına ilaç ve benzeri yüklerin pasif tuzaklanması ya da salınması için kullanılabilen çok çeşitli moleküller eklenebilmektedir. Dendrimerlerin yapısı geometrik olarak simetrik ve çevresinde birçok fonksiyonel grup, içerisinde de bir boşluk bulundurmaktadır. Moleküler ağırlığı hassas olarak kontrol edilebilmektedir. Bütün bu özellikler dendrimerlerin sıvı-mekanik performansının yükselterek, çok yönlü ve güçlü adsorpsiyon kabiliyetiyle dendrimerleri işlevsel nano taşıyıcılar yapmaktadır (Kesharwani ve ark, 2014).



Şekil 1. Kanser tedavisinde ilaç taşıyıcı olarak kullanılan nanomalzemeler. Farklı biyolojik özellikleri ile, nanomalzemeler geçirgenlik özelliği ve tutma etkisini artırabilir; biyoyararlanımı artırabilir; kemoterapi ilaçlarının toksisitesini azaltabilir; hidrofobik veya hidrofilik kemoterapi ilaçlarını kan dolaşımına bırakabilir ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki oluşturabilir. CNT, karbon nanotüpler; QD, kuantum noktaları; MSN, metal nanopartiküller. (Li ve ark, 2017)’den uyarlanmıştır.)

2.2.4. Misellar Nanoparçacıklar

Miseller, bir çekirdek ve bir kabuk yapısına sahip nanopartiküllerdir. Amfifilik blok kopolimerlerin, sulu ortam içinde kritik misel konsantrasyonunun üzerinde kendi kendine

birleşmesinden elde edilirler. Hidrofobik çekirdek kısmı bir rezervuar görevi görerek ilacın veya genetik materyalin çözünmesini önlerken, hidrofilik kabuk kısmı misele suda çözünürlük ve stabilite kazandırır. Bu kabuk yapısı sayesinde paklitaksel ve dosetaksel gibi suda çözünemeyen ilaçlar, hidrofilikliklerini arttırmak ve biyoyararlanımlarını kolaylaştırmak için suda çözünen bir tabaka ile kaplanmış olur. Hidrofilik kabuk ayrıca misele yüklenen ilacın korumasını sağlar, dolaşımdaki süresini uzatır, daha iyi geçirgenlik ve tutunma sağlar (Sun ve ark, 2008).

2.2.5. İnorganik Nanomalzemeler

Kuantum noktaları, süperparamanyetik demir oksitler, altın nanopartiküller, karbon nanotüpler, diğer metalik ve metalik olmayan nanopartiküller veya nanokristaller gibi inorganik nanomalzemeler radyoterapinin etkinliğini arttırmada ve tümör görüntüleme yöntemlerinin geliştirilmesinde fayda sağlarlar. Bu inorganik nanoparçacıkların bir kısmı 10-100 nm aralığında olup ve kılcal damarlara nüfuz edecek küçüklüktedir. Bu sayede dolaşımla iletilebilir ve bazı dokuların içerisine girebilirler. Daha büyük boyutlardaki nanoparçacıklar vücudun hastalığa özgü bölgelerinde pasif hedefleme ile verilmektedirler. Kanseri hedefleyen araçlar olarak da çok fonksiyonlu nano cihazlar geliştirilmiştir Bu cihazlar ilaç yükünü, antikör veya ligand gibi spesifik reseptör hedefleme ajanlarını ve manyetik rezonans görüntüleme için kullanılan kontrast maddeleri de içerebilmektedir. (Namiki ve ark, 2011). Bunun dışında, tedavide kullanılan ilaçlar nanomateryal matris içine eklenerek bir kapsül haline getirilir, devamında bu kapsül emilerek, tutularak veya çözülerek belirli bölgelere verilebilir. Ancak erken dönem klinik çalışmalarda, altın nanoparçacıklar (Libutti ve ark, 2010) ve silika nanoparçacıklar (Benezra ve ark, 2011) gibi bazı inorganik nanomalzemelerin toksik olması ve stabil olmaması gibi dezavantajları bulunmaktadır.

2.2.6. Mikrokabarcıklar

Mikrokabarcıklar içleri gaz dolu kabuk kısmı ise polimer, protein veya çeşitli lipidler olabilen yapılardır. Boyutları 0,5-10 µm olup ultrasonografide kontrast ajanları olarak kullanılmaya başlanılmışlardır. Mikrokabarcıklar görüntüleme için önemli kontrast maddeleri

ve hedefli ilaç dağıtımı için de taşıyıcılar olarak ortaya çıkmaktadır. Bir mikro-kabarcık çapı yaklaşık birkırmızı kan hücresi (~10 µm çapından daha az) kadar olduğundan, vücuttaki mikrodamarlarda ve kılcal damarlarda benzer reoloji gösterebilmektedir. Gaz çekirdeği, partikül hacminin çoğunu içerir ve ultrason geri saçılması ve ilaç iletimi için olanak sağlamaktadır. Sulu ortamda bu boyuttaki gaz kabarcıkları, yüzey gerilimi etkileri nedeniyle doğası gereği kararsızdır ve bu nedenle dengeleyici bir kabuk gerektirir. Kabuk, sürfaktanlar, lipidler, proteinler, polimerler veya bu malzemelerin bir kombinasyonundan oluşabilir. Merkezindeki gaz ilaç molekülleri için zayıf bir çözücü olduğundan, kabuk içinde veya üzerine yükleme stratejileri uygulanmalıdır (Geis ve ark, 2012; Sirsi ve Borden, 2009; Stride ve Edirisinghe, 2008).

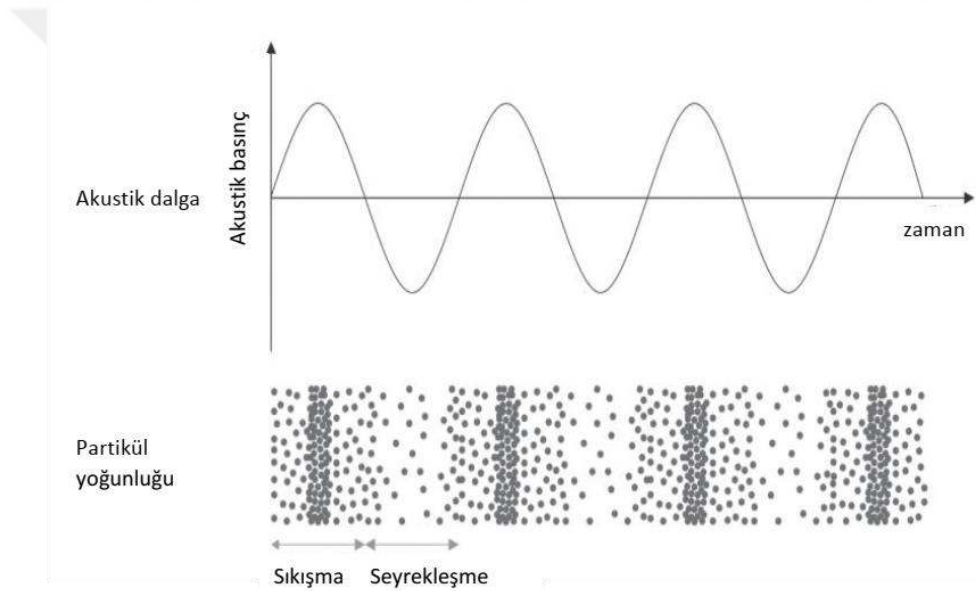
İlaç dağıtım araçları olarak mikrokabarcıkların başarısının anahtarı, ultrasonik dalgalara maruz kaldıklarında aşırı aktivite göstermeleridir. Gaz çekirdeği, basınç dalgasının seyrekleşme safhasında genişler ve kompresyon safhasında büzülür. Ultrases parametrelerine bağlı olarak, ultrasesgeri saçılımını ve/veya mikrokabarcık kabuğundan ilaçların serbest bırakılmasını ve lokal olarak verilmesini kolaylaştıran çeşitli fenomenler meydana gelebilir. Bu fenomenler sonraki bölümlerde özetlenmiştir (Bölüm 2.3 Ultrases ve 2.7 Mikrokabarcık ve Ultrases) ve bunlar akustik radyasyon kuvveti gibi hafif etkilerden dinamik kavitasyon gibi yüksek enerjili olaylara kadar uzanmaktadır. Bu fenomenlerin kombinasyonları görüntüleme, hedefleme, kontrollü salım ve vasküler geçirgenlik artışına izin vermektedirler. Mikrokabarcıklar teranostik ajanlardır. Yani, görüntüleme (teşhis), ilaç taşıma ve hedefe yönelik tedavide kapasite sağlama için eşzamanlı ve birlikte lokalize kontrast sağlamaktadırlar. Bu durumda, görüntüleme yöntemi ve terapötik tetikleyici esas olarak ultrasesdir. Bu nedenle takip eden bölümlerde önce ultrasesin biyofiziksel özellikleri ve terapötik kullanımları özetlenecek daha sonra da mikrokabarcıklar ve ultrases etkileşimi ile bu etkileşime dayanan terapi yaklaşımlarından bahsedilecektir.

2.3. Ultrases

Ses, longitudinal bir mekanik dalgadır. Ses dalgasının frekansı sağlıklı insan kulağının duyabildiği aralık olan 20 Hz- 20 kHz'in üzerinde olduğunda, buna 'ultrases' adı verilmektedir. Ultrases dalgalarının ortaya çıkmasındaki temel ilke, piezoelektrik olayıdır. Piezoelektrik kavramı, belli özellikteki kristallere elektrik enerjisi uygulandığında, bu

kristallerin atomlarının genişleyip sıkışması durumunu tanımlar. Bunun sonucunda oluşan mekanik enerji, ultrases dalgalarını oluşturmaktadır (Forbes ve ark, 2011).

Bir ultrases dalgası, yüksek basınç ve düşük basınç alanlarından oluşur (Şekil 2). Ultrasesi ileten ortamdaki moleküller de bu basınç alanlarına bağlı olarak titreşir. Moleküllerin birbirine yaklaşması 'sıkışma', birbirinden uzaklaşması 'seyrekleşme' olarak adlandırılmaktadır. Bu mekanik ve hızlı ileri-geri hareket, sesin mekanik olarak yayılan bir dalga olarak tanımlanmasının nedenidir. Partiküllerin yoğun olduğu bölgeler yüksek bir akustik basınca (sıkıştırma fazı) karşılık gelirken, partikül yoğunluğunun düşük olduğu bölgelerde akustik basıncın da düşük (seyrekleşme fazı) olduğu görülmektedir (Leighton, 2007; Peregrine, 1994).



Şekil 2. Akustik dalganın şematik gösterimi. Akustik dalga bir ortam içinde yayıldığı zaman, parçacık yoğunluğu yüksek (sıkıştırma fazı) ve düşük (seyrekleşme fazı) olan farklı alanlar oluşur. (Leighton, 2007)'den uyarlanmıştır.)

2.4. Ultrasesin Biyofiziksel Özellikleri

Tedavi amacıyla ultrasese maruz bırakılan bir dokuda birkaç biyolojik etki meydana gelmekte olup bunlar genel olarak 'termal' ve 'termal olmayan' etkiler olarak iki başlık altında incelenebilir.

2.4.1. Ultrasesin Termal Etkileri

Hedef doku içinde yayılan ultrases dalgasının taşıdığı enerjinin dokuda sıcaklık artışına neden olması sonucu, ultrasesin termal etkileri ortaya çıkmaktadır. Bu sıcaklık artışının düzeyi, uygulanan ultrasesin frekansına, şiddetine ve oluşum döngüsüne bağlıdır. Bunun yanında hedef dokunun türü, damarlanma yapısı ve dokunun önünde veya arkasında bulunan kuvvetli yansıtıcı dokuların varlığı da ultrases kaynaklı sıcaklık artışını belirleyen etkenlerdendir.

Ultrasesin dokularda oluşturduğu termal etki, bazı tıbbi konularda fayda sağlayabilmektedir. Ultra ses kaynaklı sıcaklık artışı sayesinde tendon ve skar dokusu gibi kollajen yapıların uzayabilirliğinde artış, eklem sertliğinde azalma, ağrı kesici etki, kan akışında değişiklikler, kas spazmında azalma görülebilmektedir. Ayrıca bu termal etki sayesinde yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrases cerrahisi (HIFU) yöntemi ile ablasyon tedavisi de gerçekleştirilebilmektedir (Gail Ter Haar, 1999).

2.4.2. Ultrasesin Non-termal Etkileri

Ultrasesin termal olmayan etkileri temel olarak belirli koşullar altında oluşabilen kavitasyon etkisi ve şok dalgalarıdır.

2.4.2.1. Kavitasyon

Kavitasyon, ultrasese maruz bırakılan bir ortamda gaz dolu kabarcıkların oluşumu ve bu kabarcıkların oluşturduğu etkilerdir.

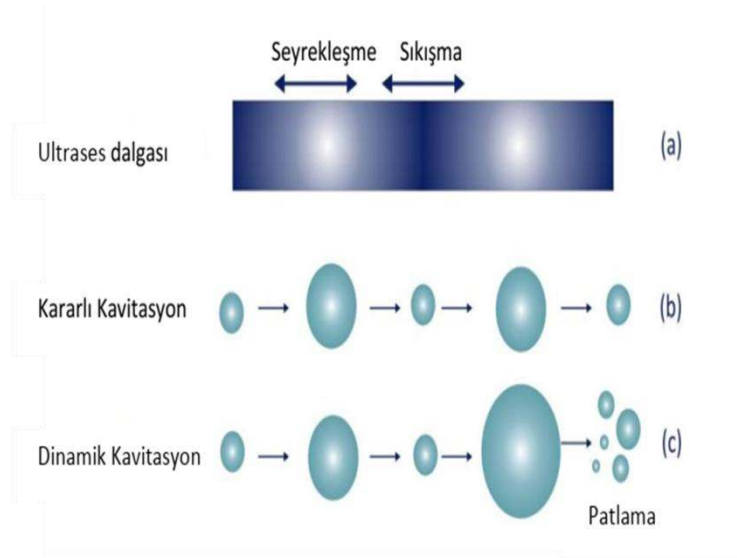
Çok düşük akustik basınçlarda (1MHz için $<100\text{kPa}$) mikrokabarcıklar simetrik ve doğrusal bir şekilde salınmaktadır. Bu, genişlemelerinin ve kompresyonlarının ultrases alanındaki basınç fazlarıyla ters orantılı olduğu anlamına gelir. Sonuç olarak, mikrokabarcıklar, iletilen ultrasesin (frekanslı doğrusal geri saçılma) aynı frekansına sahip bir geri saçılma üretir. Bu geri saçılımın yoğunluğu mikrokabarcık boyutuna bağlıdır. Frekans doğal rezonans frekansına daha yakın olduğunda mikrokabarcıkların tepkisi daha yüksektir.

Mikrokabarcık yarıçapı ne kadar yüksek olursa, rezonans frekansı o kadar düşük olmaktadır (Hernot ve Klibanov, 2008; Sboros, 2008).

Yüksek ultrases yoğunluklarında (0,1-1 MPa; 1MHz) mikrokabarcıklar doğrusal olmayan şekilde davranır. Bunun devamında mikrokabarcıkların genleşme fazı uzar, çünkü mikrokabarcıklar genleşmeye kıyasla sıkıştırmaya daha dayanıklıdır. Bu durum ‘stabil ya da kararlı kavitasyon’ olarak bilinir (Hernot ve Klibanov, 2008). Mikrokabarcık kavitasyonu sırasında, gaz akışı (seyrekleşme fazı) ve gaz çıkışı (sıkıştırma fazı) görülmektedir (Şekil 3b). Simetrik salınımlar söz konusu olduğunda, bir genleşme/sıkıştırma döngüsü boyunca net gaz akışı sıfırdır.

Bu simetrik salınımlar sırasında eğer mikrokabarcık hücre membranına yeterince yakınsa oluşturduğu itme ve çekme kuvvetleriyle komşu hücre membranında geçici porlar oluşturabilir (Şekil 4a). Bu salınımdan bağımsız olarak ultrases dalgasının itme gücüyle harekete geçen mikrokabarcık hücre membranına kadar sürüklenip uyguladığı itme kuvvetiyle membranda yine porasyona neden olabilmektedir (Şekil 4b).

Bununla birlikte, genleşme fazı uzadığında, mikrokabarcık içine bir net gaz girişi olmaktadır. Bu nedenle, mikrokabarcık rezonans boyutuna ulaşana kadar büyür ve burada kararlı, düşük genlikli salınım gösterir. Bu tür kararlı salınımlar, mikrokabarcıklar etrafında güçlü bir sıvı akışı yaratır, bu akımlara ‘mikro akım’ denilmektedir. Mikro akımlar hücre zarlarına bir kesme gerilimi uygulayarak zarların geçici olarak açılmasına neden olabilmektedir (Şekil 4c) (Ferrara ve ark, 2007; Sboros, 2008).

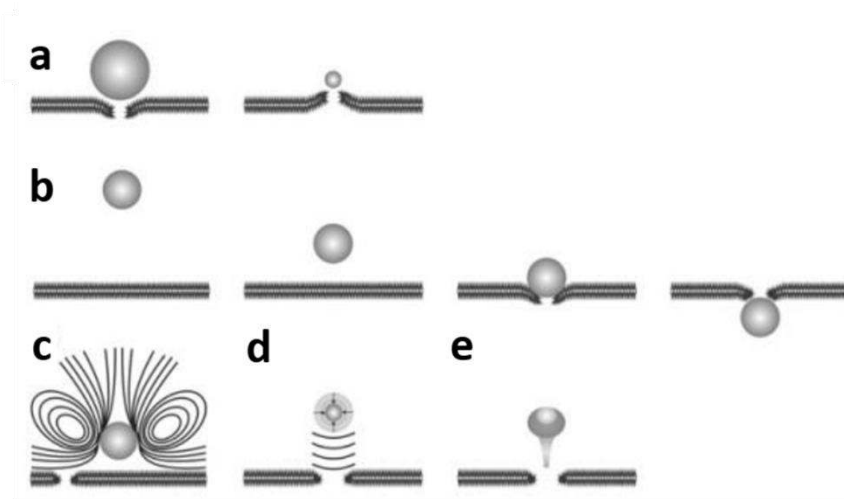


Şekil 3. Ultrases dalga formu ve kavitasyon. Ultrasonik alan (a) etkisi altında kararlı (b) veya dinamik kavitasyon (c) uygulanan mikrokabarcıkların şematik gösterim. (I Lentacker ve ark, 2013)’den uyarlanmıştır.)

Daha yüksek ultrases yoğunluklarında ($> 1\text{MPa}$; 1MHz) mikrokabarcıkların salınım genliği, mikrokabarcık ani akan sıvının ataletinden dolayı çökene kadar hızla büyür. Bu büyüyen mikrokabarcıklar daha sonra birçok küçük mikrokabarcıklara bölünür. Bu tip kavitasyona ‘dinamik kavitasyonu’ denir (Şekil 3c). Mikrokabarcıkların çökmesi sırasında mikrokabarcıkları çevreleyen sıvıda şok dalgaları oluşur (Şekil 4d).

Son olarak, çöken bir mikrokabarcık hücre duvarı gibi bir yüzeye yakın olarak yerleştirildiğinde asimetrik bir çökme meydana gelir, ve yüzeye doğru bir sıvı jeti oluşur. Bu oluşuma ‘jet formasyonu’ adı verilir (Şekil 4e). Şok dalgaları ve mikrojetler, hücre zarlarını delebilen ve hatta kan damarlarını geçebilen çok yüksek kuvvetler oluşturabilmektedir (Wu ve Nyborg, 2008; Wu ve ark, 2002).

Ultrases uygulaması, dokuda önceden var olan gaz kabarcıkları ile etkileşime girerek bu “mikrokabarcıkların” kavitasyonunu da sağlayabilir. Bununla birlikte, kavitasyonun mikrokabarcıkların enjekte edilmesinden daha önce, *in vivo* olarak oluşabildiğine dair çok az kanıt bulunmaktadır (Baker ve ark, 2001). Akustik kavitasyonun biyolojik etkilerini arttırmak için yapılan çalışmalarda, kan dolaşımına mikrokabarcıklar enjeksiyon uygulaması yapılmaktadır (Kooiman ve ark, 2020; Lentacker ve ark, 2013).



Şekil 4. Kararlı ve dinamik kavitasyon yapan mikrokabarcıkların biyofiziksel etkileri. (a), (b) ve (c) kararlı kavitasyonun neden olduğu biyofiziksel etkileri ifade ederken, (d) ve (e) dinamik kavitasyonun etkilerini gösterir. (a) İstikrarlı bir salınım yapan mikrokabarcıkların sırasıyla genleşme ve sıkıştırma fazında itme (solda) ve çekme (sağda) etkileri, zar bütünlüğünü bozar. (b) Akustik radyasyon kuvveti mikrokabarcıkların yer değiştirerek hücre zarını sıkıştırmasına, ve membran

bütünlüğünün bozulmasına neden olur. (c) Bir mikrokabarcığın kararlı salınımı, çevredeki sıvıda mikro-akımlar oluşturur. Bu akımlar hücre zarına mekanik stres uygulayarak gözenek oluşumuna neden olur. (d) Mikrokabarcık çökmesi ile oluşan şok dalgaları hücre zarında yüksek gerilmelere yol açar, bu da zar bütünlüğünün bozulmasına neden olur. (e) Mikrokabarcık bir yüzeyin yakınında çöktüğünde, çökme asimetriktir ve sıvıda yüzeye doğru bir jet formasyonu oluşmasına yol açar. Bu mikrojet hücre zarını delerek bir gözenek oluşturur. (Lentacker ve ark, 2013)’den uyarlanmıştır.)

Mikrokabarcıkların içinin gazla dolu olması, kabarcıkların basınç değişikliklerine karşı oldukça duyarlı olmasını sağlar. Bu nedenle mikrokabarcıklar ultrasese maruz bırakıldığında, hacimlerinde hızlı ve dramatik değişiklikler meydana gelebilir. Bu hacim değişiklikleri, kabarcıkların yakın çevresini önemli ölçüde etkileyebilecek ve terapötik etkilere aracılık edebilecek bir dizi mekanik, termal ve kimyasal olaya yol açar. Daha sade bir anlatım için bu olaylar tek bir kabarcık bağlamında tartışılmaktadır. Ancak mikrokabarcıkların biyolojik etkileri aslında tipik olarak bir kabarcık popülasyonu tarafından üretilmektedir ve bu popülasyondaki kabarcıklar arası etkileşimlerin etkisi de ihmal edilmemelidir.

2.4.2.2. Mekanik etkiler

Bir sıvının içerisindeki mikrokabarcık birden fazla zıt etkiye maruz kalır. Bunlar; mikrokabarcığın maruz kaldığı ultrases alanının mekanik basıncı; kabarcığı çevreleyen sıvının uyguladığı hidrostatik basınç; kabarcık içindeki gaz ve/veya buhar basıncı; yüzey gerilimi ve herhangi bir kaplama malzemesinin etkisi; çevreleyen sıvının ataleti; ve mikrokabarcığı çevreleyen sıvının ve/veya kaplamanın viskozitesinden, ısıl iletimden ve/veya akustik radyasyondan kaynaklanan sönümlemedir.

Dinamik ve kararlı kabarcık salınımları, balonun yakın çevresini etkileyen ve tedavide önemli olabilecek bir takım olaylara yol açabilir. Bunlar:

1. Doğrudan çarpışma: Orta salınım genliklerinde bile kabarcık duvarının hızlandırılması, hücre zarı gibi kırılgan yapıları kolayca deforme ederek yakındaki yüzeylere ve kan damarı duvarlarına ve kan damarı duvarları büyük kuvvetler uygulamak için yeterli (Hong Chen ve ark, 2011; Kudo, 2017; van Wamel ve ark, 2006).

2. Balistik hareket: Kabarcık salınımının yanı sıra, yayılan bir ultrases dalgası (birincil radyasyon kuvveti) tarafından sıvıda oluşturulan basınç gradyanının bir sonucu olarak tanımlanabilir. Kabarcıklar sıkıştırılabilirlik özellikleri sayesinde, ilacın bir lokalizasyonda

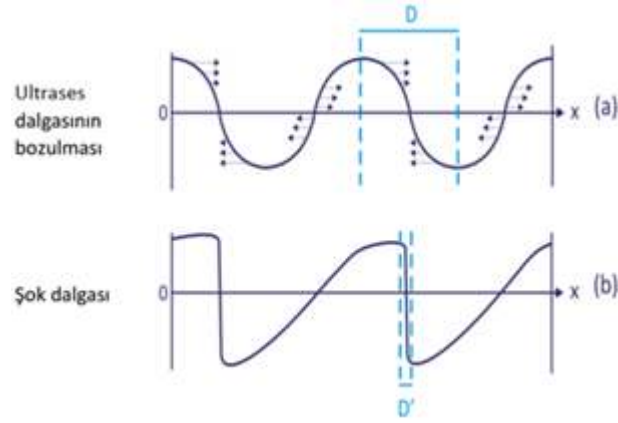
daha iyi birikmesini sağlayabilir (Dayton ve ark, 1999; Rychak ve ark, 2005) veya ilacı hedef dokuya (Bader ve Holland, 2013; Caskey ve ark, 2009) doğru itmek için gereken hızda taşınabilirler (Acconcia ve ark, 2016).

3. Mikro Akış:Yapışkan bir sıvıya salınan bir yapı, arayüzey sürtünmesi sonucunda momentum aktarımına sebep olur. Salınımdaki herhangi bir asimetri, mikro akış olarak bilinen bu yapının hemen yakınında, bu sıvının net hareketiyle sonuçlanır. Bu hareket sırayla yakındaki yüzeylere kayma gerilmeleri uygulayacak ve sıvının içindeki taşınımı artıracaktır. Kabarcık salınımlarının doğrusal olmayan doğası nedeniyle, hem kararlı hem de dinamik kavitasyon, önemli düzeyde mikro akış üreterek ~ 1 mm/s hızında sıvı hareketine neden olur (Pereno, 2018). Eğer kabarcık bir yüzeye yakınsa, asimetri oluşacak ve dolayısıyla mikro akışı daha da artıran küresel olmayan salınımlar da meydana gelecektir (Marmottant ve Hilgenfeldt, 2003; Nyborg, 1958).

4. Mikrojet oluşturma: Bir yüzeye yakın küresel olmayan kabarcık salınımları ile ilişkili bir başka olgu, kabarcık çökmesi sırasında sıvıda jet formasyonu oluşumudur. Çöken kabarcığın her iki tarafındaki sıvının ivmelenmesinde yeterli asimetri varsa, daha hızlı hareket eden sıvı, kabarcığı deforme eder ve karşı tarafta yüksek hızlı bir jet formasyonu oluşumuna neden olabilir. Mikro jetlemenin, çelik gibi oldukça esnek malzemelerde bile oyuk üretebildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, jet formasyonun yönü ve hızı, yakınındaki yüzeyin elastik özellikleri ile belirlendiğinden dolayı, jetin biyolojik dokudaki etkileri hücre iskeleti ve matriks yapıları ile ilişkili olmaktadır (Benjamin ve Ellis, 1996; X. Chen ve ark, 2014; Kudo ve Kinoshita, 2014; Naudé ve Ellis, 1961).

5. Şok dalgaları: Termal olmayan ultrases etkide akustik enerji, hücre yüzeyine kavitasyondan kaynaklanan basınçla iletilir. Kavitasyon ultrasesin doku sıvısında ilerlemesi sırasında meydana gelen basınç değişimlerinden kaynaklanan mikroskobik baloncukları tarif etmektedir.

Termal olmayan diğer ikincil etkiler, ultrasonik bir dalganın doğrusal olmayan yayılımı ile meydana gelmektedir (Peregrine, 1994). Ultrases dalgasının yoğunluğu yeterince yüksek olduğunda, ultrases dokuda doğrusal olmayan şekilde yayılmaya başlar. Bir sıvı veya doku yüksek basınç fazında sıkıştırıldığında, sertliği ve yoğunluğu artar. Sonuç olarak, yüksek basınçlı pikler düşük basınçlı fazlardan daha hızlı hareket eder. Bu doğrusal olmayan yayılma, başlangıçta sinüzoidal olan dalgaların bozulmasına yol açar ve sonuçta bir şok dalgasının oluşmasına neden olabilir (Şekil 5) (Humphrey, 2007; Kuznetsova ve Coakley, 2007; O'Brien, 2007).



Şekil 5. Şok dalgası oluşumu. Ultrasesin (a) lineer olmayan yayılmasından dolayı şok dalgası oluşumunun (b) şematik gösterimi. D ve D', normal bir ultrases dalgası ve şok dalgasındaki sırasıyla maksimum sıkıştırma ve maksimum dekompresyon alanı arasındaki mesafeyi gösterir. (Lentacker ve ark, 2008)'den uyarlanmıştır.)

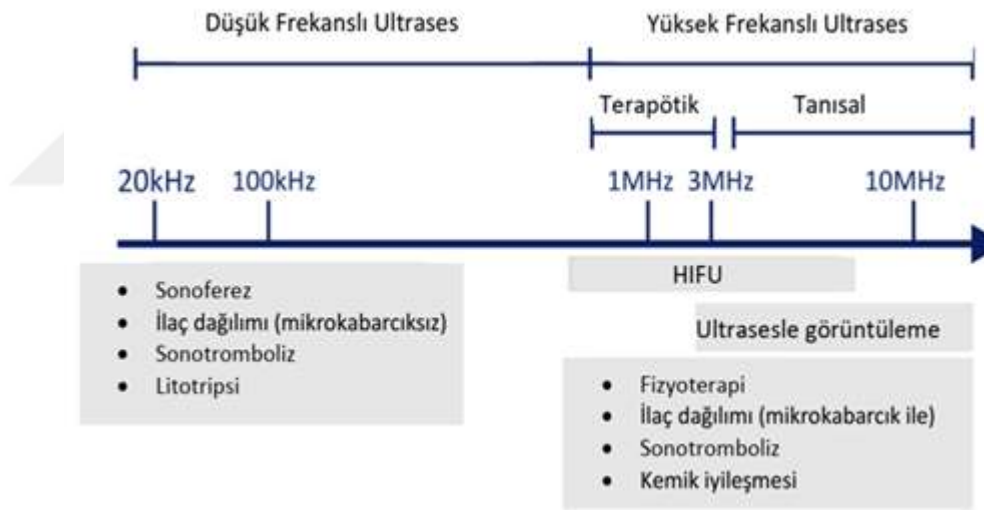
6. İkincil radyasyon kuvveti: Daha küçük salınım genliklerinde, bir kabarcık çevresindeki akışkanda bir basınç dalgası oluşturacaktır. Kabarcık bir yüzeye bitişirse, bu dalga ile yüzeyden yansıması sıvı içinde bir basınç değişimine ve kabarcık üzerinde ikincil bir radyasyon kuvvetine yol açar. Mikro jetlemede olduğu gibi, yüzeyin elastik özellikleri, yayılan ve yansıyan dalgalar arasındaki faz farkını ve dolayısıyla kabarcıkların yüzeye doğru hareketinin yönünü belirleyecektir.

2.4.2.3. Kimyasal Etkiler

Çevreleyen dokuda üretilen sıcaklık artışı, özellikle dinamik çöküş sırasında birkaç bin Kelvin'e ulaştığında, bu artış balonun içinde meydana gelen sıcaklıkla karşılaştırıldığında ihmal edilebilir olacaktır. Buna benzer şekilde gaz basıncı da önemli ölçüde artacaktır. Bu aşırı koşullar çok kısa bir süre devam etmesine rağmen, yüksek derecede reaktif kimyasal türler, özellikle reaktif oksijen türleri (ROS) ve elektromanyetik radyasyon emisyonu (sonolüminesans) üretebilmektedir. ROS'un çoklu biyolojik süreçlerde önemli rollerde bulunduğu, hem ROS hem de sonolüminesansın ilaç aktivitesini etkileyebileceği bilinmektedir (Beguin ve ark, 2019; Flint ve Suslick, 1991; Rosenthal ve ark, 2004; Trachootham ve ark, 2009; Winterbourn, 2008).

2.5. Ultrasesin Tıbbi Uygulamaları

Ultrasonik radyasyonun biyofiziksel etkileri çeşitli biyolojik tepkilere neden olabilir. Tanıda kullanılan ultrases, tıbbi olarak önemli biyo-etkilerden arındırılmıştır. Bunun aksine terapötik ultrasesin amacı, belirli bir biyolojik tepkiye neden olmaktır. Hangi biyofiziksel etkinin baskın olacağı esas olarak uygulanan ultrasesin frekansına ve yoğunluğuna bağlıdır. Yüksek frekanslı ultrases doku tarafından daha kolay emilir ve bu nedenle HIFU uygulamaları için son derece uygundur. Öte yandan, kavitasyon oluşumu amaçlandığında, düşük frekanslı ultrases daha uygundur ve ısı oluşumunu azaltmak için darbeli ultrases kullanılabilir. Ultrases tedavisi genel olarak iki alt kategoriye ayrılabilir: yüksek güç ve düşük güç terapileri. Yüksek güçlü akustik terapilere HIFU ve litotripsi; düşük güçlü terapilere örnek olarak sonoforez ve fizyoterapi gösterilebilir (Şekil 6).



Şekil 6. Tıbbi uygulamalarda kullanılan farklı ultrases frekanslarına genel bakış. (Watson, 2008)'den uyarlanmıştır.)

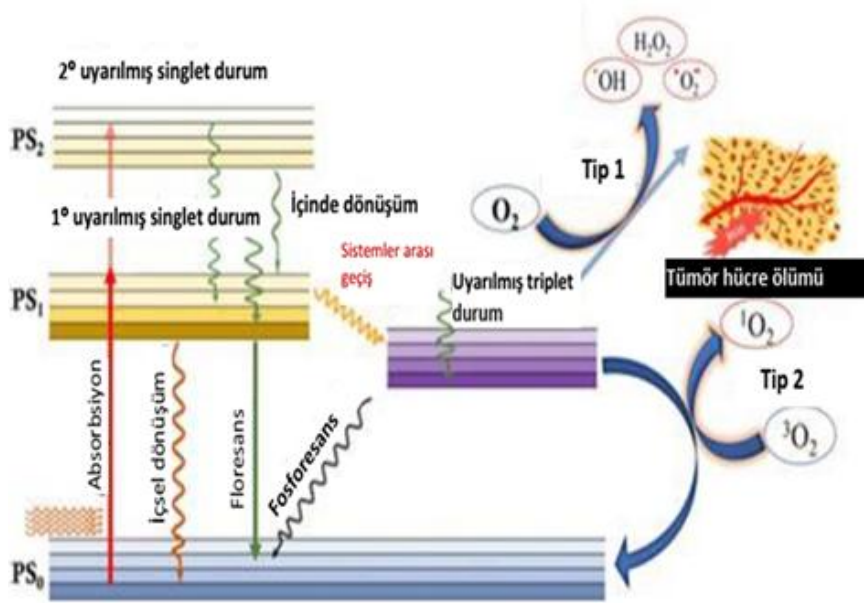
2.6. Sonodinamik Terapi

1970'lerin başında kansere karşı tedavi amacıyla kullanılmak üzere fotodinamik terapi (PDT) olarak adlandırılan bir yaklaşım geliştirilmiştir. Son yirmi yılda PDT minimal invaziv bir tedavi seçeneği olarak ilaç endüstrisinde ve tıbbi kimya alanında büyük ilgi görmüştür. PDT, düşük enerjili ışığın ve fotosensitif ajan (ışığa duyarlı hale getirici) denilen toksik olmayan bir maddenin sinerjistik etkileşimlerini içeren etkili ve spesifik bir tedavi yöntemidir

(Dolmans ve ark, 2003; Sharman ve ark, 1999). Bu yaklaşımda kullanılan fotosensitif ajanlar normalde kimyasal olarak zararsız olan, fakat ışıkla aktive olduğunda hücrelerde hasar oluşturabilen maddelerdir. Fotodinamik terapi, fotosensitif ajanları etkinleştirmek için kullanılan, nispeten düşük yoğunluklu ışığa dayalı bir işlemdir (Dougherty ve ark, 1975).

Fotosensitif ajanların moleküler oksijen varlığında uygun bir dalga boyundaki ışığa maruz kalması, singlet oksijeni (1O_2) ve/veya hücre içi sitotoksik olan diğer güçlü reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir. ROS oluşumunda yer alan fotokimyasal işlemler Şekil 7'deki Jablonski diyagramında özetlenmiştir (Şekil 7).

Fotosensitif ajan tarafından ışık enerjisinin soğurulmasından sonra bir elektron singlet temel enerji durumundan (S_0) daha yüksek enerjili singlet uyarılmış duruma (S_1 , S_2 ...) yükseltilir. S_1 'den daha yüksek orbitalleri işgal eden elektronlar, dahili dönüşüm olarak bilinen bir basamakla S_1 'e geri döner. S_1 'deki elektronun iki seçeneği vardır; (i) absorbe ettiği enerjiyi floresan ışımayla kaybedip S_0 'a dönebilir veya (ii) sistemler arası geçiş (ISC)' olarak bilinen dönüşümle uyarılmış elektronun spin durumunun değiştirildiği triplet bir uyarılmış enerji seviyesine geçiş yapabilir. Triplet uyarılmış durumda yarı ömür, tekli uyarılmış duruma göre önemli ölçüde daha uzundur. Bu da T_1 'in tekli uyarılmış durumlar için radyasyon olmayan ve kinetik olarak kullanılamayan süreçlerde yer almasını sağlar. PDT'de bu tür işlemler Tip I veya Tip II reaksiyonlar olarak sınıflandırılır (Bilgin ve ark, 2018; Basoglu ve ark, 2016).



Şekil 7. Jablonski diyagramı üzerinde tip 1 ve tip 2 fotosensitizasyon mekanizmalarının şematik gösterimi. (Baskaran ve ark, 2018)'den uyarlanmıştır.)

Tip I foto-reaksiyonlarda belirli moleküler substratlar, uyarılmış duyarlılaştırıcı tarafından doğrudan oksitlenebilir. Bu da süperoksit iyonu (O_2^-) ve benzeri ROS elemanlarını üretmek için moleküler oksijen ile daha fazla etkileşime girebilen azaltılmış duyarlılaştırıcı ile sonuçlanabilir (MacDonald ve Dougherty, 2001). Tip II foto-reaksiyonlarda, T1 durumu, singlet oksijen (1O_2) üretmek için bir enerji transfer işlemi yoluyla, karakteristik olmayan bir üçlü zemin durumuna (T0) sahip olan moleküler oksijen ile doğrudan etkileşime girer. Hem Tip I hem de Tip II reaksiyonlar aynı anda meydana gelmektedir, ancak Tip II reaksiyonlar aerobik ortamda tipik olarak daha baskındır. Singlet oksijenin yüksek reaktivitesi ve kısa yarı ömrü (0,04 μs) nedeniyle, difüzyon yarıçapı 20 nm'den azdır. Bu sebeple yalnızca kendi üretim bölgesine yakın hücreleri etkileyebilmektedir (Moan ve Berg, 1991). PDT'de kullanılan duyarlılaştırıcı tipi, konsantrasyonu, ışık dozu (hem dalga boyu hem de akıcılık) ve mevcut oksijen miktarı gibi çeşitli faktörler PDT'nin tedavideki etkinliği etkileyen faktörlerdir.

Klinik uygulamada PDT' deki büyük başarılarla rağmen, kanser tedavisinde daha yaygın kullanımını sınırlayan iki önemli dezavantaj vardır: Birincisi, görünür ışığın derin tümör dokularına sınırlı nüfuz etmesidir. Bu nedenle PDT sadece erişilebilir lezyonların tedavisinde kullanılabilir ve büyük tümörler üzerinde etkisi azdır. İkinci dezavantaj, fotosensitif ajanların kutanöz dokularda uzun süre tutulması nedeniyle oluşabilecek cilt toksisitesidir. Bu sebeple ışığa duyarlılaştırıcının uygulanmasından sonra hastaların birkaç hafta boyunca doğrudan güneş ışığından kaçınmaları gerekmektedir (Vrouenraets ve ark, 2003). Yeni model ışık kaynağı cihazların ve fotosensitif ajanların geliştirilmesi ile bu sınırlamaların üstesinden gelinebilmektedir, ancak PDT'nin dezavantajlarının aşılması hala metodolojik ve teknik bir zorluktur.

Sonodinamik terapi, PDT temelinde kurulmuş ve geliştirilmiş olan, yeni bir umut verici non-invaziv tedavi seçeneğidir. PDT'ye benzer prensiplerle kurgulanmış olan SDT, düşük yoğunluklu ultrases ve sonikasyon ile aktive edilebilen bir kimyasalın (bir sonosensitif ajan veya bir kemotropötik ilaç) kullanıldığı, ultrases tabanlı bir yaklaşımdır. Görünür ışığın aksine, ultrases insan dokusunun derinlerine gömülü kanser odaklarına da nüfuz edebilen bir mekanik dalgadır. Bu nedenle SDT, PDT'nin kullanımında karşılaşılan sınırlamaların üstesinden gelebilmektedir (Aksel ve ark, 2020). Ayrıca ultrases tümörün koordinatlarına tam olarak odaklanabilir ve tümör bölgelerinde sonosensitif ajanın sitotoksitesini etkili bir şekilde aktive edebilir veya arttırabilir. Böylece SDT kanser hücrelerini doğrudan öldürürken,

tümör komşuluğundaki sağlıklı dokulara minimum hasar vermektedir (Umemura ve ark, 1990; Yumita ve ark, 1989).

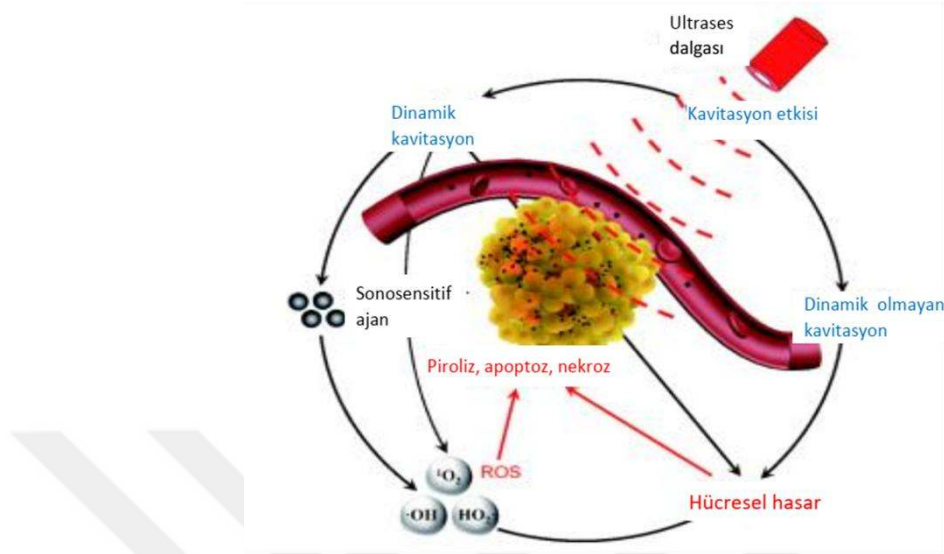
SDT yöntemi ilk olarak 1989 yılında, hematorporfirinin akustik alanlardaki sitotoksik etkilerini araştıran bilim insanları Yumita ve Umemura tarafından tanınmıştır (Yumita ve ark, 1989). Aynı ekip 1990 yılında SDT'nin *in vivo* ortamda uygulanabilirliğini göstermiştir (Umemura ve ark, 1990). 1992 yılında Umemura ve arkadaşları akustik aktivasyon altında porfirinin neden olduğu toksik etkiyi tanımlamak için “sonodinamik yaklaşım” terimini ortaya koymuşlar, bir yıl sonra da SDT uygulamasında singlet oksijenin etkilerini araştırmışlardır (Umemura ve ark, 1992; Umemura ve ark, 1993). Bu önemli kilometre taşlarından sonra SDT'nin olası mekanizmaları, yeni sonosensitif ajanlar ve kombinasyonel uygulamalar hakkındaki araştırmalar hızlanarak devam etmiştir. Son dönemde, dört meme kanseri vakasında SDT'nin PDT'ye yardımcı bir tedavi ve immünoterapi yöntemi olarak kullanımını içeren klinik çalışmalar da yapılmıştır (Inui ve ark, 2014; Wang ve ark, 2010, 2009).

SDT çalışmalarının olumlu bulgularla devam etmesine rağmen, etki mekanizmasının ayrıntıları hala belirsizliğini korumaktadır. En çok kabul edilen teori, dokuda ultrases ile aktive edildiğinde şiddetle üretilen ve yüksek basınç ve sıcaklıkla lokal olarak çöken kararlı ve dinamik ultrasonik kavitasyon etkisidir (Naji Meidani ve Hasan, 2004). Bu etki biyomoleküllerin ve suyun parçalanması, sonokimyasal türlerin oluşumu ve sonolüminesans gibi çeşitli kimyasal reaksiyonların meydana gelmesini sağlar. Bu kimyasal işlemlerin temel iki ana kimyasal ürünü serbest radikaller ve singlet oksijendir. Ayrıca, dinamik kavitasyon tarafından üretilen enerji, ardışık bir şekilde ROS üretebilen sonosensitif ajanları da aktive edebilir. Yeterli ROS üretimi sonucu, DNA parçalanması, sitoskeletal büzülme ve kromatin yoğunlaşması gibi apoptoza yol açan bir dizi biyolojik olay meydana gelmektedir.

2.6.1. Sonodinamik Terapinin Biyokimyasal Mekanizmaları

Son birkaç on yılda, SDT'nin mekanizmaları çeşitli biyolojik sistemlerde *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. SDT'nin etkinliği kullanılan sonosensitif ajanın tipi, maruz kalma sıklığı ve yoğunluğu, biyolojik modeller ve deney düzeneği gibi birçok farklı faktöre bağlıdır. Bu nedenle, tüm çalışmaların sonuçlarını açıklayabilen ayrıntılı bir mekanizmanın tanımlanması çok zordur. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda SDT'nin ortaya konulmuş olası mekanizmalar şunlardır: (i) ultrasonik kavitasyon etkisi; (ii) serbest radikallerin ve $^1\text{O}_2$ 'nin üretilmesi; ve (iii) Ultrasesle indüklenen direkt kanser hücresi

apoptozu. Şekil 8’de tipik sonodinamik reaksiyonları ve olası mekanizmaları özetlenmiştir (Bai ve ark, 2012; Rosenthal ve ark, 2004; Shibaguchi ve ark, 2011; Yu ve ark, 2004).



Şekil 8. Sonodinamik terapinin şematik gösterimi ve olası mekanizmaları.(Lafond ve ark, 2018)’den uyarlanmıştır.)

2.6.2. Sonodinamik Terapide Ultrasonik Kaviteasyonun Etkileri

Ultrasonik kaviteasyon etkisi, ultrasesden gelen akustik enerjinin doku sıvılarında mekanik basıncı hızla arttırarak mikrokabarcık oluşumuna yol açmasıyla oluşur (Chen ve ark, 2003).

Ultrasonik kaviteasyon iki tipte sınıflandırılabilir: dinamik ve kararlı kaviteasyon (Lajoinie ve ark, 2016). Dinamik kaviteasyon, yüksek yoğunluklu ultrases ile ilişkili güçlü kabarcıkların hızlı büyümesi, hızla büzülmesi ve çöküşü ile meydana gelir. Akustik basıncın genliği yeterince yüksek olup belli bir eşik değerini aşması mikrokabarcıkların kısa sürede çökmesine neden olabilir. Kaviteasyon mikrokabarcıklarının çökmesi sonucunda güçlü şok dalgaları, lokalize sıcaklık ve basınç artışı ile serbest radikaller meydana gelir (Pecha ve Gompf, 2000). Bu olumsuz fiziksel koşullar, hücre iskeleti ve hücre zarında hasara ve devamında hücrenin ölümüne yol açar (Rengeng ve ark, 2017). Öte yandan, düşük yoğunluklu ultrasese maruz kalan sıvılarda kararlı kaviteasyon görülmektedir. Bu durumda, akustik basıncın genliği çok yüksek değildir, bu nedenle küçük mikrokabarcıklar sadece nispeten

küçük bir yarıçap değişimi ile salınmaya neden olur (Lajoinie ve ark, 2016; Wu ve Nyborg, 2008).

Sonodinamik terapide serbest radikallerin ve singlet oksijen üretiminin yanı sıra, ultrasonik kavitasyon da mekanik basınçla hücre ve dokulara zarar verebilmektedir. Ancak SDT yoluyla oluşan sonokimyasal etkiler, hücrelerde önemli rollerde de görev alabilir. Hem kararlı hem dinamik kavitasyon mekanik etki oluşturabilse de, sonokimyasal ajanları sadece dinamik kavitasyon üretebilmektedir (Rosenthal ve ark, 2004). Dinamik kavitasyon sırasında gazla doldurulmuş mikrokabarcıkların çökmesi, yüksek sıcaklık ve basınç ile sonuçlanır, böylece sonokimyasal reaksiyonlara neden olan daha büyük bir şok dalgası meydana gelir (Riesz ve Kondo, 1992). En önemli sonokimyasal ajanlar serbest radikaller ve $^1\text{O}_2$ 'dir. Her ikisi de çevredeki substratları oksitleyebilen oldukça reaktif ajanlardır ve hedef hücreler üzerinde onarılamaz hasara neden olurlar. Yeterince yüksek derecede reaktif ajan üretildikten sonra, mitokondriyal membran potansiyelinin azalması, hücre iskeletinin çökmesi, kromatin yoğunlaşması, membran kırılması ve DNA parçalanması gibi bir dizi fizyolojik süreç başlar. Bütün bu biyolojik tepkimeler apoptoz ile sonuçlanır (Xu ve ark, 2016).

Dinamik kavitasyon, nanometrik düzeydeki bir mikrokabarcık aktivitesinin su buharının termolizi ile mikrosaniyelik bir zaman diliminde yüksek derecede reaktif hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) ve hidrojen atomları ürettiği oldukça şiddetli bir süreçtir (Rosenthal ve ark, 2004). Sonosensitif ajanlar ve ultrases tarafından üretilen serbest radikaller, hava dolu mikrokabarcık içindeki O_2 molekülleri ile reaksiyona girerek peroksil ve alkoksil radikalleri oluşturabilmektedir. Hem peroksil hem de alkoksil radikalleri, membran lipid peroksidasyonuna ve dolayısıyla hücre zarı kararsızlığına neden olabilir, bu da hücrelerin ultrasonik hasara karşı daha hassas olmalarına neden olur (Yumita ve ark, 2010). Dinamik kavitasyon tarafından üretilen bir başka ROS, sonodinamik reaksiyonlar sırasında baskın aracı olan singlet oksijendir. $^1\text{O}_2$ oluşum sürecinde sonosensitif ajan, düşük yoğunluklu ultrases ve moleküler O_2 gibi üç temel unsur rol oynamaktadır (Xu ve ark, 2016) (Miyoshi ve ark, 1995).

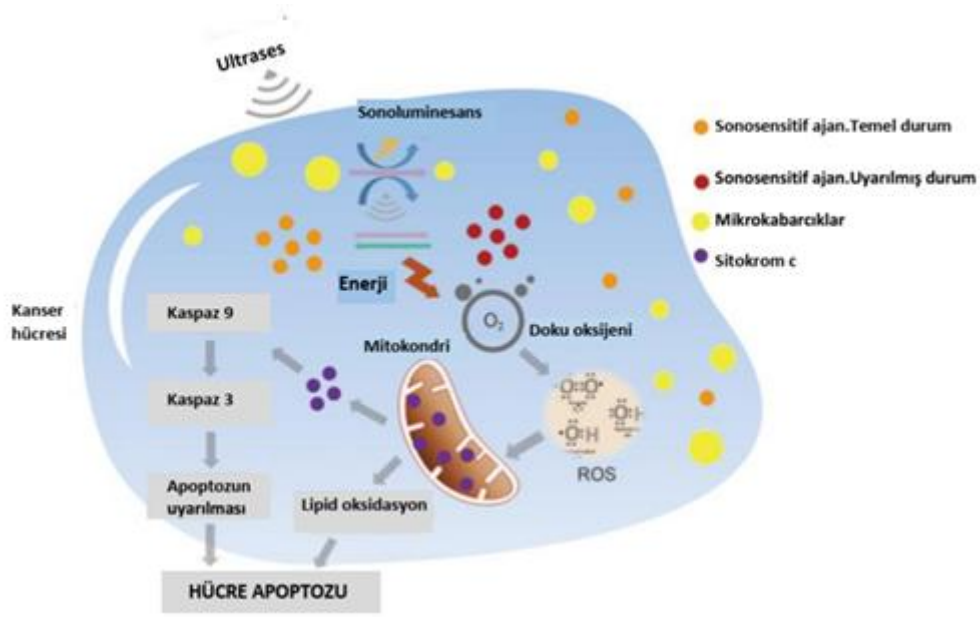
Sonosensitif ajanlar PDT işleminde olduğu gibi ultrasonik kavitasyon ile akustik enerjiyi kabul ettikten sonra, aktive olarak temel (zemin) durumdan uyarılmış duruma geçerler. Aktive edilmiş sonosensitif ajanlar daha sonra temel duruma geri döner ve çevredeki oksijen ile doğrudan reaksiyona girebilen bir enerji serbestleştirir. Sonuç olarak uyarılmış singlet oksijen üretilir. Oluşturulan $^1\text{O}_2$ oldukça reaktif bir ajandır ve oksitleyici reaksiyonları aktive ederek çevredeki hücre ve dokularda geri dönüşümsüz hücresel hasara sebep olur (Rosenthal ve ark, 2004).

2.6.3. Sonodinamik Terapi ile Kanser Hücresi Apoptozunun İndüklenmesi

Apoptoz yaşlı, hasarlı ve işlevsiz hücreleri ortadan kaldırmak amacıyla çeşitli hücre içi veya hücre dışı uyaranlar tarafından tetiklenmiş olan programlı hücre ölümüdür. Son zamanlarda apoptozun düşük yoğunluklu ve düşük frekanslı ultrases ile tetiklenebileceği, bu uyarının sonodinamik duyarlılık, hava dolu kabarcıklar veya kemoterapötiklerle daha da artırılabilmesi gösterilmiştir. Apoptozun ultrases ile tetiklenmesi durumu, HL-60, K562 ve U937 lösemi hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (Ashush ve ark, 2000; Feril ve ark, 2003, 2004). Bunun dışında tanıda kullanılan kontrast maddelerin ultrasonla tetiklenmiş apoptozu güçlendirdiği bildirilmiştir (Ando ve ark, 2006; Feril ve ark, 2003).

Günümüze kadar, ultrases kaynaklı apoptozun ayrıntılı mekanizmaları tam olarak ortaya konulamamıştır. Bazı *in vivo* çalışmalarda SDT'nin apoptoz yoluyla anjiyogenezi etkileyebileceğini belirtilmiştir (Wood ve ark, 2008). Mikrokabarcıklar ultrasesle ışılandıktan sonra, tümör bölgeleri içinde hem damarlara hem de vasküler endotelezarar verebilmektedir. Bu durum damarlarda trombopoezise yol açmakta, devamında bu damarların taşıdığı glikoz ve oksijen ile beslenen tümörlerin kanlanma ihtiyacı karşılanamamaktadır. Sonuçta oksidatif strese giren kanser hücreler apoptozu gitmektedir (Gordon ve ark, 2010; Hwang ve ark, 2005). SDT'nin anti-anjiyogenik gen aktarımında faydalı olabileceği ve hem *in vitro* hem de *in vivo* tümör büyümesini baskıladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Duvshani-Eshet ve ark, 2007; Nie ve ark, 2008).

Ultrases ile indüklenen apoptozun bir başka mekanizması, apoptoz ile ilişkili anahtar genlerin gen ekspresyonunun (Bai ve ark, 2012, Feril ve ark, 2005) ve apoptozla ilişkili sinyal yollarının düzenlenmesidir (Wang ve ark, 2014; Wang ve ark, 2008). Ultrases ile ışınlama sonrası apoptotik kaspazların aktive olması, Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunun artışı apoptozu tetiklemektedir (Q. Li ve ark, 2014; Y. Li ve ark, 2014; Tang ve ark, 2008, 2010; Yumita ve ark, 2010; Zheng ve ark, 2014). Bunun yanında birçok çalışma SDT ile indüklenen hücre apoptozunda kalsiyum iyonuna (Ca^{2+}) bağımlı yolun da etkilendiğini doğrulamıştır. Genel olarak, kabarcık aktivitesi kanser hücreleri içindeki Ca^{2+} seviyesini arttırmaktadır. Ca^{2+} seviyesindeki bu artış, apoptoz yollarını tetikleyerek hücre membranının bütünlüğünün bozulmasına sebep olmaktadır (Hutcheson ve ark, 2010; Juffermans ve ark, 2008; Kumon ve ark, 2009, 2007).



Şekil 9. SDT'ye bağılı apoptozun olası mekanizmaları. (Wan ve ark, 2016)'den uyarlanmıştır.

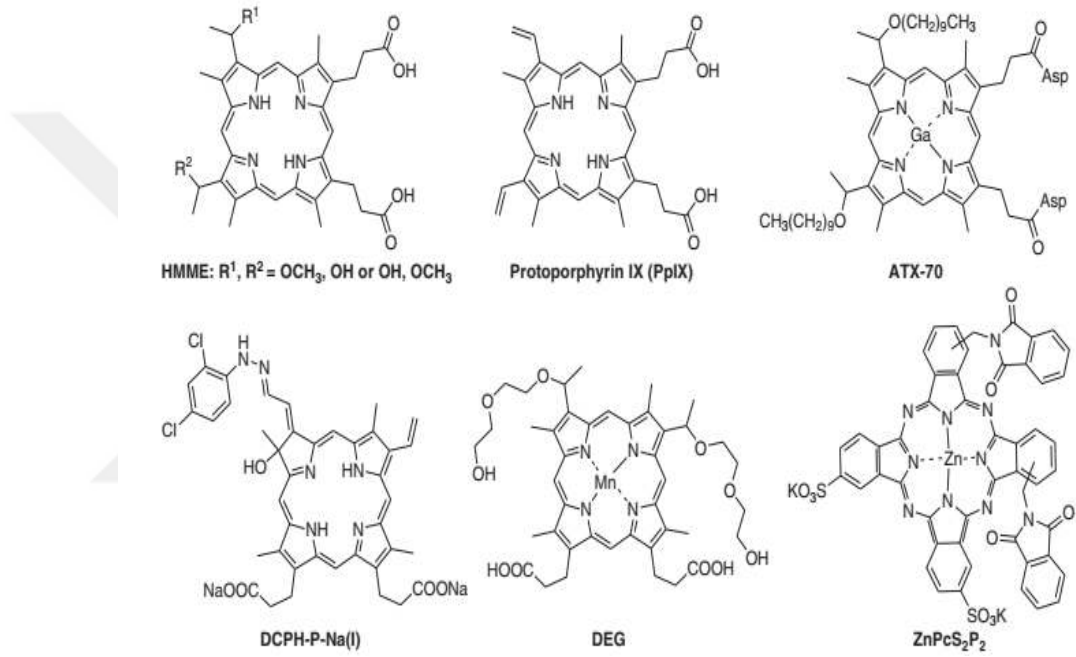
SDT kullanılan sonosensitif ajanın özelliklerine de bağılı olarak mitokondri hasarı yoluyla da apoptoza neden olabilmektedir. Ultrason ışınlaması, kanser hücrelerinin yüzeyi etrafındaki kavitasyonu indükler. Kavitasyon kabarcıklarının çökmesi ile sağlanan enerji, kanser hücrelerinde sonolüminesan ışık oluşumunu başlatır. Böylece, sonosensitif ajan temel durumundan uyarılmış bir duruma aktive edilir. Aktif hale getirilmiş sonosensitif ajan temel durumuna döndüğünde, salınan enerji, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve singlet oksijen dahil olmak üzere büyük miktarda ROS üretmek için çevresel oksijene aktarılabilir. Daha sonra hücre içi ROS, mitokondri membran hasarı ve sitokrom c salınımı yoluyla mitokondriye bağılı apoptozuna aracılık etmektedir (Wan ve ark, 2016) (Şekil 8).

2.6.4.Sonodinamik Terapide Kullanılan Ajanlar

2.6.4.1. Porfirinler

SDT çalışmalarında ilk başlarda PDT'de kullanılan fotosensitif ajanlar denenmiştir. Birinci nesil fotosensitif ajanlar olan porfirinler de PDT' de yaygın olarak kullanılan ajanlardandır. Porfirin bazlı sensitif ajanların bir kısmı Şekil10'da gösterilmiştir (Şekil 10).

Geçtiğimiz yirmi yılda SDT'de hematoporfirin (Hp), fotofrin, hematoporfirin monometil eter (HMME), protoporfirin IX (PpIX), ATX-70 ve son zamanlarda geliştirilen yeni porfirin türevleri gibi porfirinler denenmiş ve geliştirilmiştir. Bu sensitif ajanlar, akustik bir alan varlığında singlet oksijen veya hidroksil radikali oluşumunasebep olur ve SDT'de gözlenen sitotoksik etkilere aracılık ederler. Ön ilaç 5-aminolevulinik asit (5-ALA) bir protoporfirin IX öncüsüdür ve doğrudan ROS üretmese de, anabolik ürün protoporfirin IX ile ultrasese maruz kaldığında ROS oluşumu olduğunu göstermiştir (Li ve ark, 2012).

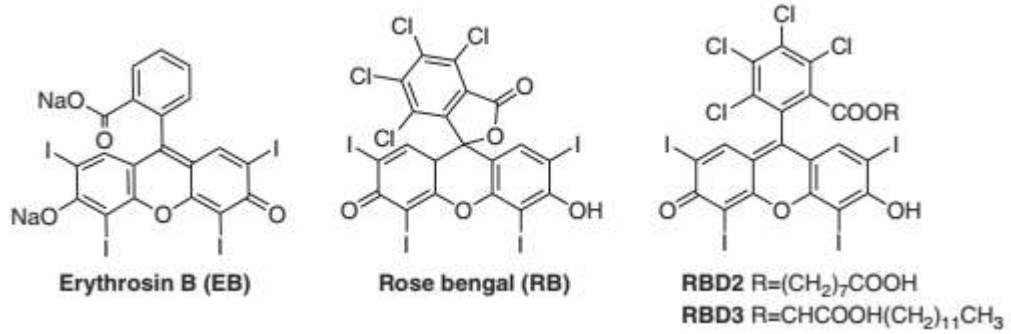


Şekil 10. Porfirin türevi sonosensitif ajanlar. (Costley ve ark, 2015)’den uyarlanmıştır.

2.6.4.2. Ksantinler

Ksantinler, eosinler, floresein ve rodaminlerin içinde bulunduğu bir boya sınıfıdır. Eritrosin B ve rose bengal (RB) gibi ksanten boyaları (Şekil 11), sonosensitif ajanlar olarak kullanılmaktadır ve ultrases altında yüksek sonodinamik verimlilik gösterebilmektedirler (Nonaka ve ark, 2009; Yumita ve ark, 2002). RB'nin *in vitro* sitotoksitesi, ultrasonik ışınlama ile önemli ölçüde arttırılabilmektedir, ancak *in vivo* uygulamaları, tümör dokularındaki düşük birikimi, karaciğerde hızlı sekestrasyon ve yüksek klirens ile sınırlıdır (Nonaka ve ark, 2009). Son yıllarda, RB'nin kimyasal modifikasyonu ile bu dezavantajların

üstesinden gelmeye çalışılmıştır, bu amaçla bazı amfifilik RB türevleri sentezlenmiştir (Sugita ve ark, 2010).



Şekil 11. Ksantin türevi sonosensitif ajanlar. (Costley ve ark, 2015)’den uyarlanmıştır.)

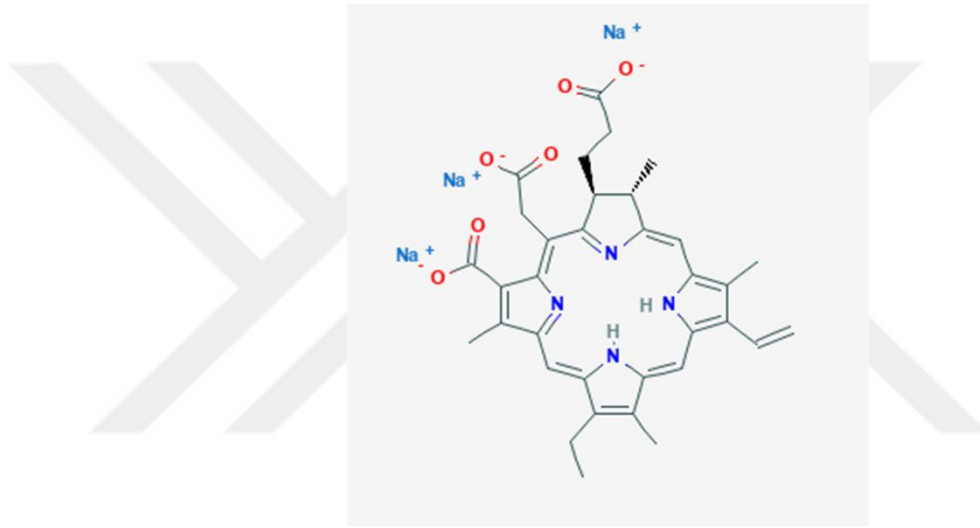
2.6.4.3. Kemoterapi ilacı ve steroid olmayan anti-enflamatuar ajanlar

Bazı kemoterapi ilaçları ve steroid olmayan anti-enflamatuar ajanlar da sonosensitif ajan olarak SDT’de yaygın olarak uygulanmıştır. Sonodinamik terapide en çok çalışılan kemoterapi ilacı olan doksorubisin, DNA hasarına, apoptoza, oksijen radikalının ve hidroksil radikalının üretimine ve kavitasyon etkisinin artmasına neden olabilir. Kemoterapide de yaygın kullanılan başka bir ilaç olan sisplatinin, ultrases maruziyeti ile apoptozu çok daha güçlü bir şekilde indükleyebildiği gösterilmiştir (Bernard ve ark, 2012; Wang ve ark, 2019). Son araştırmalar, steroid olmayan antiinflatuar ajan ve ultrases maruziyetinin kombinasyonunun tümörü daha iyi tedavi edebileceğini göstermektedir. İkinci nesil florokinolon kullanımı 180 sarkom hücre suşunun *in vitro* büyümesini baskılayabilir (ultrases frekansının ve enerjisinin de kritik öneme sahip olduğu dikkat çekicidir) ve etki mekanizması singlet oksijen üretimini içerebilmektedir (Huang ve ark, 2004; Okada ve ark, 2002).

2.6.4.4. Klorinler

Klorinler klinikte kullanılan önemli fotosensitif ajanlar, tetrahidroksifenil klorin (Temoporfin veya Foscan®) (Wagner ve ark, 2015), benzoporfin türevi (Verteporfin) (Chan ve ark, 2010) ve Radachlorin’dir (şimdi Bremachlorin®) (Biswas ve ark, 2014). Klorinlerin SDT çalışmalarında en çok kullanılan üyesi Klorin e6’dır (Ce6). Ce6 doğal olarak oluşan klorofilden türetilir ve kendi başına kullanılabilir.

Ce6, klorofilden bir ekstrakt olan monomer tetrapirel bileşigidir (Şekil 12). Ce6 spesifik olarak tümör dokularında birikerek yüksek sonodinamik aktivite gösterdiği, sağlıklı dokular için zehirli olmadığı ve bu dokulardan çabuk temizlendiği gösterilmiştir (Chen ve ark, 2013; Shi ve ark, 2011). Ce6 ile sonodinamik terapinin, U937 hücre hattında apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Li ve arkadaşları, Ce6 aracılı SDT'nin insan kronik miyelojenöz lösemi K562 hücrelerinde mitokondri membran potansiyelini bozarak, mitokondriyal apoptoz yolunu aktive edebildiğini gözlemlemişlerdir (Li, ve ark, 2014). Meme kanseri hücre hatlarında da benzer şekilde Ce6 aracılı SDT'nin, mitokondriyal hasara neden olduğu ve ROS üretimiyle apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Wang ve ark, 2015).



Şekil 12. Klorin e6 (3 sodyum tuz) kimyasal yapısının şematik gösterimi. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72549118>. Erişim tarihi 09.04.2020)

2.6.4.5. Diğer ajanlar

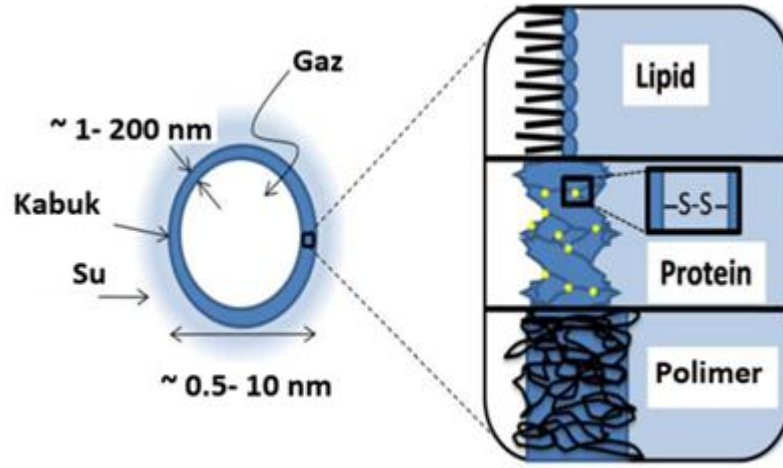
SDT'nin gelişmesiyle birlikte, daha yüksek sonodinamik verim ve daha az toksisiteye sahip yeni sonosensitif ajanların bulunması, SDT'nin daha ileri klinik uygulaması için önemli bir konu haline gelmiştir. Bunun için kurkumin, indosiyenin yeşili (ICG), akridin turuncusu, hipokrellin B ve 5-ALA gibi birçok küçük molekül sonosensitif ajan olarak kullanılmıştır. Bunun yanında, hidrofilik polimerler ile küçük moleküler sonosensitif ajanların kimyasal modifikasyonu ve kendi içinde foto / sonodinamik aktivitelere sahip nanopartiküllere atıfta bulunan nanosensitizörlerin hazırlanması da kanser tedavisinde araştırılmıştır.

2.7. Mikrokabarcıklar ve Ultrases

2.7.1. Mikrokabarcık Yapıları

Mikrokabarcıklar, stabil bir kabuk ile çevrilenmiş, merkezi gazla doldurulmuş yapılardır (Şekil 13). Mikrokabarcıkların yapımında ilk olarak merkezi doldurmak amacıyla hava kullanılmış (birinci nesil mikrokabarcıklar), ancak havanın suda çözünürlüğünün çok yüksek olması nedeniyle, bu mikrokabarcıklar kan dolaşımında hızla çözülmüş ve sönmüştür. Bu nedenle, ikinci nesil mikrokabarcıklar perflorokarbon gazları (C_nF_{n+2}) veya kükürt heksaflorür (SF_6) ile hazırlanmıştır. Bu iki gaz hidrofobik olduğundan dolayı mikrokabarcıkların gaz kaçağı ve suda çözünme problemi ortadan kaldırılmıştır (Price ve ark, 1998; Riess, 2003; Schutt ve ark, 2003).

Şekil 13'te farklı kabuk bileşimlerine sahip tipik bir mikrokabarcık yapısı gösterilmektedir. Biyomedikal amaçlar için kullanılan mikrokabarcıklar tipik olarak 0,5 ila 10 μm arasındadır (akciğer kılcal damarlarından geçiş için üst sınır). Toplam mikrokabarcık hacminin büyük kısmı, tek ve bütün bir bölüm olan gaz çekirdek kısmıdır. Kabuk, kapsüllenmiş gaz ve mikrokabarcığı çevreleyen sulu ortam arasında bir bariyer görevi görür. Kabuk bileşeni olarak lipid (~3 nm kalınlığında), protein (15-20 nm kalınlığında) ve polimer (100-200 nm kalınlığında) gibi farklı malzemeler kullanılabilir. Lipid molekülleri, hidrofobik etkileşim ve van der Waals kuvveti gibi fiziksel çekimler sayesinde bir arada tutulmaktadır. Proteinler birbirine kovalent disülfür bağları ile çapraz bağlanmakta, polimer zincirleri ise kovalent olarak çapraz bağlanmakta ve/veya birbirine dolanarak yığın benzeri bir malzeme oluşturmaktadır.



Şekil 13. Mikrokabarcık yapısının şematik gösterimi.(Sirsi ve Borden, 2009)'den uyarlanmıştır.)

Bir mikrokabarcığın kabuğu, mikrokabarcıktan gaz difüzyonunu engelleyerek mikrokabarcığın fizyolojik ortamda çözünmesini önlemek için gereklidir. Kabuğunun tipine göre mikrokabarcıklar yumuşak kabuklu ve sert kabuklu mikrokabarcıklar olarak sınıflandırılabilir. Yumuşak kabuklu mikrokabarcıkların kabuğu fosfolipitlerden oluşmakta olup birkaç nanometre inceliğindedir. Bu esnek fosfolipid yapısı, mikrokabarcıkların ultrases dalgalarının sıkıştırma ve seyrekleşme fazlarına cevap olarak kolayca salınmasına izin verir. Buna karşılık, daha kalın ve daha sert bir polimer veya protein kaplamasına sahip olan sert kabuklu mikrokabarcıkların salınımları daha zor, ama daha dengelenmiştir. Fosfolipid kabuklu mikrokabarcıkların kullanımı, çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Uzun ve doymuş bir yağ asidi zincirinden oluşan fosfolipidler kullanılarak, gaz-sıvı ara yüzünde yapışkan bir tek tabaka oluşturulur, bu da hem stabiliteyi korur, hem ultrasesle oluşan salınımların uyumlu olmasını sağlar. Ayrıca, fosfolipitler kolayca işlevselleştirilebilir ve hedeflenmiş ve ilaç yüklü mikrokabarcık üretimini mümkün kılar. Kan dolaşımında kalıcılığı arttırmak için çoğu zaman poli-etilen-glikol (PEG) zincirleri mikrokabarcık kabuğu yapısına dahil edilmektedir. Bu PEG zincirleri sterik engel sağlar, böylece mikro kabarcıkların birbirleriyle birleşmesini önler ve retikülo-endotel sistemi (RES) tarafından temizlenmeye yol açan kan bileşenleri ile etkileşimlerden korumaktadır (Grayburn, 2002; Lindner, 2004; Stride ve Edirisinghe, 2008).

Mikrokabarcıklar tipik olarak 0,5-10 µm arasında değişen bir boyuta sahiptir, bu boyutun damar dışına çıkmalarını (ekstravazasyon) engelleyecek kadar büyük olması, onları dolaşım için uygun ajanlar haline getirmektedir. Küçük mikrokabarcıkların stabilitesi daha düşüktür, çünkü daha yüksek bir Laplace basıncı taşırlar. Bunun yanında, bu büyüklük

aralığındaki mikrokabarcıklar, tıbbi ultrases görüntülemesi için kullanılan transdüserlerin frekansları da olan 1-10 MHz içinde bir rezonans frekansına sahiptir. Rezonans frekansı, mikrokabarcık salınımlarının maksimum olduğu frekanstır (Borden ve ark, 2005; Ferrara ve ark, 2007; Huang ve ark, 2008).

2.7.1.1. Mikro kabarcıkların güvenliği ve temizlenmesi

Mikrokabarcık kontrast maddelerinin güvenliği 2005 yılında yeniden gözden geçirilmiş (Jakobsen ve ark, 2005).insanlarda klinik kullanımlarına ilişkin kılavuzlar Avrupa Biyoloji ve Tıpta Ultrases Dernekleri Birliği (European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology) tarafından yayınlanmıştır (Albrecht ve ark, 2004; Claudon ve ark, 2013). Genel olarak, ultrases kontrast maddeleri oldukça güvenlidir ve iyi tolere edilmektedir. İnsanlarda çoğunlukla baş ağrısı ve bulantı gibi hafif düzeyde yan etkiler görülmekle birlikte, bu yan etkilerin de görülme sıklığı düşüktür. Aşırı duyarlılık veya alerjik olaylar çok nadir olarak rapor edilmiş, nefrotoksisite, kardiyotoksisite, serebral veya karaciğer toksisitesi henüz gösterilmemiştir (Ter Haar, 2010; Quaia, 2005). İntravenöz enjeksiyondan sonra mikrokabarcıklar periferik dolaşımda homojen bir intravasküler dağılım gösterirler. Mikrokabarcıkların retiküloendotelyal sistemler tarafından dolaşımdan uzaklaştırılması, büyük ölçüde mikrokabarcık kabuğunda bulunan maddelere bağlıdır. Fagositik hücreler tarafından hızlı bir şekilde alınmayan mikrokabarcıklar, kan akışında yavaş yavaş çözülürler. Mikrokabarcıkların gaz içeriği, akciğerler yoluyla elimine edilir. Perflorokarbonlar ve kükürt heksaflorür, insan vücudunda metabolize olmayan, ancak birkaç dakika içinde akciğerlerden dışarı atılan inert gazlardır. Mikrokabarcık kabuk bileşenleri ise böbrekler tarafından süzülür, karaciğer tarafından elimine edilir veya normal metabolizmaya girerler (Forsberg ve ark, 1999; Jang ve ark, 2009; Kabalnov ve ark, 1998; Quaia ve ark, 2002; Siracusano ve ark, 2011).

2.7.2. Mikrokabarcık – Ultrases Etkileşimi

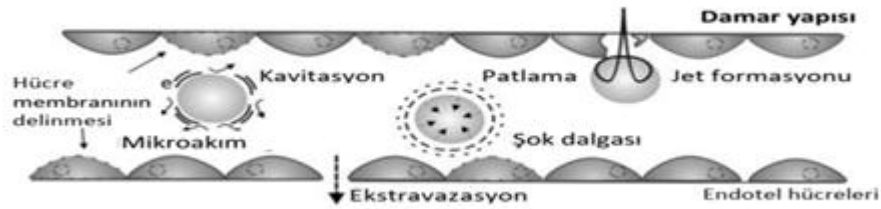
Kavitasyon yapan mikrokabarcıkların bulunduğu bölgede gelişen yumuşak (mikro akış) veya güçlü (şok dalgaları ve mikrojetler) kuvvetler biyolojik dokuları etkileyebilmektedir. Kavitasyon yapan bir mikrokabarcık çevresindeki mikro akışlar, mikrokabarcıklar olmadan

dokunun ultrases tedavisinden kaynaklanan akustik akıştan çok daha güçlüdür (Baker ve ark, 2001). Mikro akışların yoğunluğu, mikrokabarcıktan uzaklaştıkça hızla düşer. Sonuç olarak, kavitasyon yapan mikrokabarcıklara yakın şekilde yerleştirilmiş hücreler veya yüzeyler yüksek kesme gerilimlerine maruz kalır. Bu, hücre zarlarını geçici olarak geçirgen hale getirebilir ve hücrede ilaç naklini uyarabilir (Wu ve ark, 2002).

Patlayan bir mikrokabarcık durumunda, daha güçlü kuvvetler gelişir. Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada, kılcal rüptür, mikrovasküler sızıntı ve hemoliz bildirmiştir (Chappell ve Price, 2006; P. Li ve ark, 2004; Price ve ark, 1998; Vancraeynest ve ark, 2006; Wible ve ark, 2002). Bu, endotel hücre bariyerini geçemeyen ilaç uygulamaları için, farmasötik taşıyıcılara büyük bir potansiyel sunar. Farklı biyoetkilerin şematik bir özeti Şekil 14'te gösterilmiştir.

Ek olarak, birkaç çalışmada kavitasyonunun reaktif oksijen türlerinin oluşumuna sebep olduğu belirtilmiştir. Bunlar hücre zarlarına kimyasal baskı yapabilir ve hücre zarlarını geçirgen hale getirebilir (Juffermans ve ark, 2006; Kondo ve ark, 1998; Mišić ve Riesz, 2006). Uygulanan ultrasesin frekansına ve yoğunluğuna bağlı olarak, farklı biyo-etkiler daha önemli hale gelebilir.

Stabil olarak kavitasyon yapan bir mikrokabarcık (sol taraf) veya yerleştirilen mikrokabarcık (sağ taraf) nedeniyle oluşan biyolojik etkiler.



Şekil 14. Kavitasyon doku etkileşimi. Mikrokabarcıkların kavitasyonu ve patlaması sırasında ortaya çıkabilecek biyolojik etkilerin şematik gösterimi. (Lentacker ve ark, 2009)'den uyarlanmıştır.)

2.7.3. Sonoporasyon

Doksanlı yılların ortalarından beri, ultrasesin membranı geçemeyen bileşiklerin canlı hücrelere taşınmasını kolaylaştırabileceğini gösteren birçok çalışma yayınlanmıştır. Bunların arasında düşük moleküler ağırlıklı ilaçların, genetik ilaçların (pDNA, siRNA, mRNA), peptitlerin ve proteinlerin ultrasesle indüklenmiş alımını gösteren çeşitli raporlar bulunmaktadır (Amabile ve ark, 2001; Bao ve ark, 1997; Brayman ve ark, 1999; De Temmerman ve ark, 2011; Frenkel ve ark, 2002; Guzmán ve ark, 2001; Hallow ve ark, 2006;

Karshafian ve ark, 2010; Miller ve ark, 1999; Vandenbroucke ve ark, 2008). Genel olarak, bu ilaçların veya model ilaçların alımı, hücre zarının ultrases aracılı geçirgenliğine bağlanır.

Ultrases ile indüklenmiş hücre permeabilizasyonu üzerine yapılan ilk çalışmalar, ultrases maruziyetinden sonra ortaya çıkabilecek geçici hücre membran açıklıklarını “sonoporasyon” terimi ile tanımlamıştır (Bao ve ark, 1997; Ross ve ark, 2002; Ward ve Wu, 1999). Sonoporasyonu araştıran birkaç araştırma makalesi, ultrasesin biyofiziksel etkilerini arttırmak için mikrokabarcıkların kullanıldığını bildirmiştir. Bu mikrokabarcıklar bir lipid, protein veya polimer kabuğu ile stabilize edilmiş gaz dolu yapılardır ve bazıları klinik olarak ultrases kontrast maddeleri olarak onaylanmıştır (Ferrara ve ark, 2007; Hernot ve Klivanov, 2008). Mikrokabarcıklar gaz dolu ve dolayısıyla sıkıştırılabilir çekirdek yapısı nedeniyle ultrases basınç dalgalarına tepki verebilirler. Bu alternatif büyüme ve küçülme işlemine kavitasyon denmektedir. Daha düşük ultrases yoğunluklarında meydana gelenler kararlı kavitasyon, yüksek ultrases yoğunluklarında meydana gelenler dinamik kavitasyon olarak ayrılmaktadır (Şekil 15). Son kavitasyon olayı nihayetinde çok daha güçlü biyofiziksel etkilere yol açacak mikrokabarcık patlamasına neden olabilir.

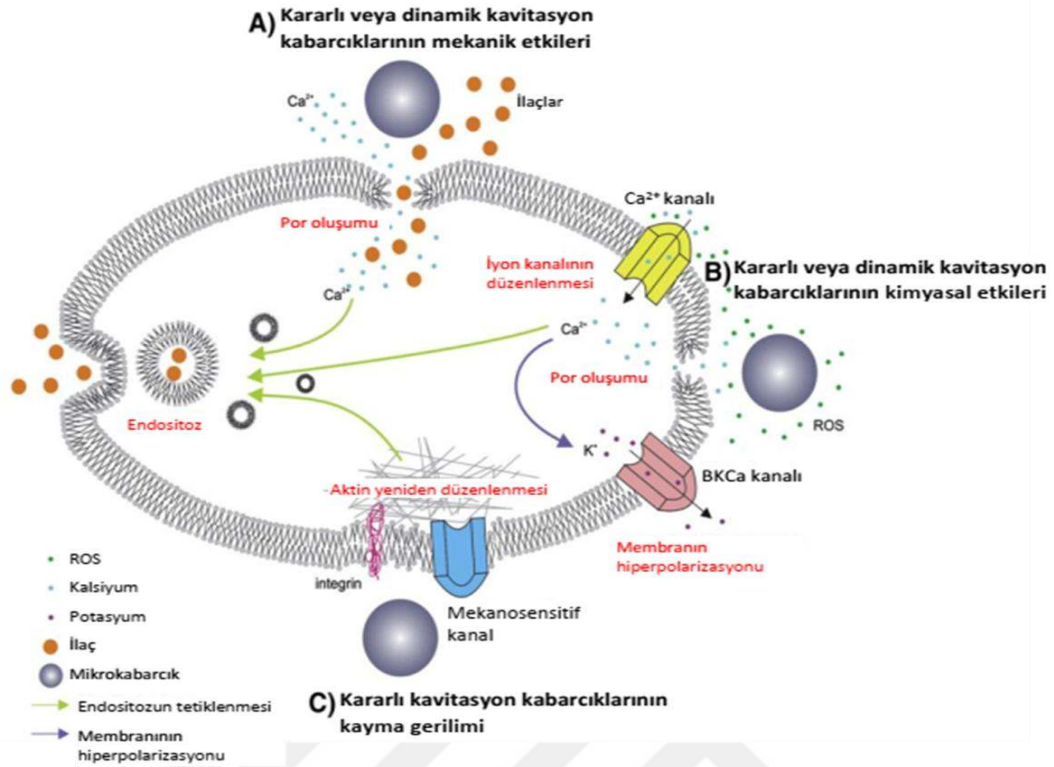
Ultrasonik kavitasyon, hücre zarlarının ve tümör dokularının geçirgenliğinin ultrasesle indüklenmesinde temel itici gücü olarak kabul edilmektedir. Sundaram ve arkadaşları kavitasyon mikrokabarcıklarının çökmesi sonucu hücre zarı bütünlüğünün bozulması ile terapötik ajanların hücre içine taşınmasının artabileceğini göstermiştir (Sundaram ve ark, 2003). Yapılan çalışmalarda adriamisin gibi kemoterapötik ilaçların ultrases eşliğinde hücre içine alımının artması ile, ilacın sitotoksik etkisinin de arttığı bildirilmiştir (Harrison ve ark, 1996; Saad ve Hahn, 1992; Yu ve ark, 2001). Bir başka çalışmada rhesus makak modelinde doku hedefli ilaç vermek için ultrasonik kavitasyon kullanılmış, ve ilacın kan-beyin bariyerinden geçişinin arttığı gösterilmiştir. Ultrasonik kavitasyon yaklaşımının güvenilir ve kontrol edilebilir olması sebebiyle terapötik ajanın etkinliğini arttırmak amacıyla tercih edilebilir yenilikçi bir yöntem olduğu düşünülmektedir (Konofagou, 2012; Park ve ark, 2012).

Sonoporasyon, belirli bir yoğunluk ve frekansta ultrases ışınlaması üzerine hücre zarına yakın kavitasyon mikrokabarcıklarının salınımının neden olduğu mekanik bir etki olup, genellikle dinamik ve kararlı kavitasyona eşlik etmektedir. Bu mekanik salınım sonucunda hücre zarında yarı ömrü yaklaşık 10 dakika, çapı 1-150 nanometre olan geçici mikrogözenekler meydana gelir. Bu mikrogözenekler sayesinde sonoporasyon hücre zarından madde iletimini artırır, bu da mikrovasküler geçirgenliğin ve ilaç taşınmasının artmasını sağlayabilmektedir. Yapılan çalışmalarda sonoporasyonun çeşitli tümörlere, iskelet kası ve böbreğe nükleik asit iletimini arttırmak için başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir. Bu özellikler

sonoporasyonu gen ve ilaç dağıtımı için yenilikçi ve çığır açıcı bir yöntem haline getirmektedir (Zeghimi ve ark, 2015). Sonoporasyon teknolojisi günümüzde hala klinik araştırmalar ile incelenmekte ve geliştirilmektedir (Kotopoulos ve ark, 2013).

Ultrases kaynaklı ilaç alımına katkıda bulunan farklı fizyolojik süreçlerin etkilerini kantitatif olarak belirlemek son derece zordur. Bu durum temel olarak sonoporasyonu incelemek için kullanılan farklı ultrases ayarları ve yöntemlerinin bolluğundan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle aşağıdaki üç ana ultrases koşulunu tanımlanmıştır: i) mikrokabarcıkların stabil kavitasyonuna yol açan düşük yoğunluklu ultrases, ii) kabarcık çökmesi ile dinamik kavitasyona yol açan yüksek yoğunluklu ultrases ve iii) mikrokabarcıkların yokluğunda ultrases uygulaması. Ultrasesin doku ile etkileşimi ise, ultrases ayarına bağlı olarak (i) mekanik etkiler, (ii) kimyasal etkiler ve (iii) termal etkileri indükleyebilmekte ve bunlar da çeşitli biyo-etkilere yol açabilmektedir.

Düşük ultrases yoğunluklarında, hücre membranından geçemeyen moleküllerin alınmasına katkıda bulunmak için iki mekanizma olduğu varsayılmaktadır: küçük gözeneklerin oluşumu (Van Wamel ve ark, 2004) ve endositoz (Meijering ve ark, 2009). Gözenek oluşumu sırasında görülen hücre membran geçirgenliğindeki değişikliklerin, kalsiyum girişi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Juffermans ve ark, 2009; Sabens ve ark, 2006; Yang ve ark, 2008). Ultrases kaynaklı mekanik stres ve kimyasal etkilerin, gözenek oluşumundan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Küçük ve yüksek moleküler ağırlıklı ilaçların alımını indüklemek için daha yüksek ultrases basınçları kullanılarak mikrokabarcık çökmesi ve ardından hücre zarında por oluşumu sağlanmıştır (Mayer ve Bekeredjian, 2008).



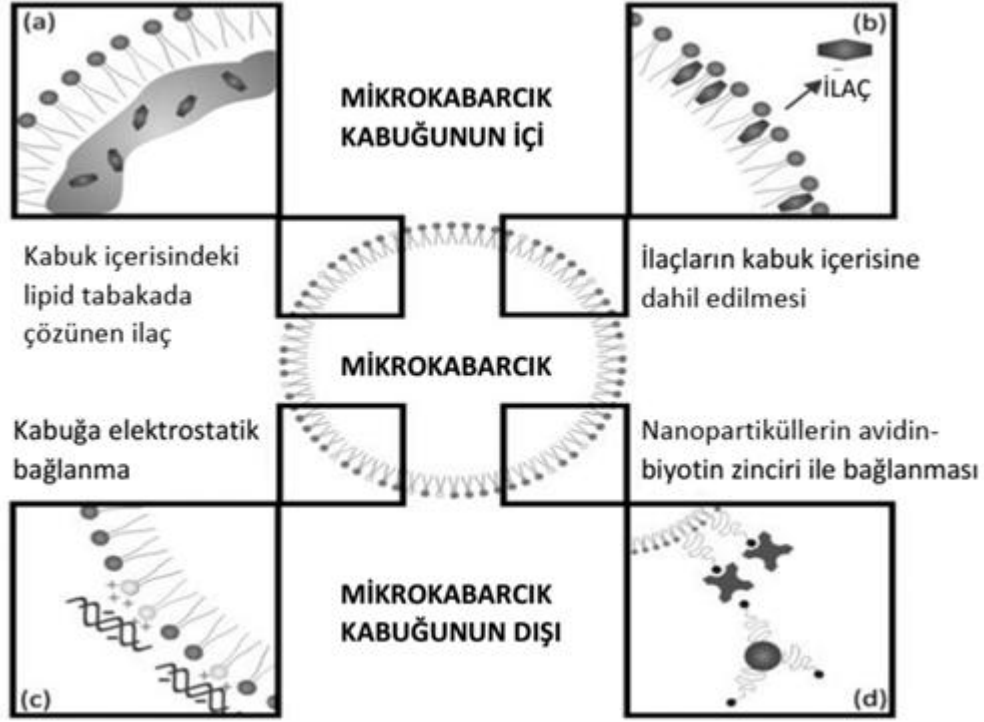
Şekil 15. Kararlı ve dinamik kavitasyon yapan mikrokabarcıkların biyolojik etkileri. (İne Lentacker ve ark, 2010)’den uyarlanmıştır.)

Kararlı ve dinamik kavitasyon kabarcıklarının mekanik etkileri, hücre zarında gözeneklerin oluşmasına neden olur. Bu, ilaçlar ve kalsiyum gibi moleküllerin pasif difüzyon yoluyla hücreye girmesine izin verir (Frenkel ve ark, 2002; Guzmán ve ark, 2001; Tran ve ark, 2007). Mikrokabarcık kavitasyonu sırasında ROS üretilir (Basta ve ark, 2003; Miura ve ark, 2003; VanBavel, 2007). Üretilen ROS’lar iyon kanallarını modüle edebilir (Bogeski ve ark, 2011) veya lipid peroksidasyonu ile membran bütünlüğünün bozulmasına neden olabilir (Dhalla ve ark, 2000). ROS’un aracılık ettiği kalsiyum akışı, BKCa kanalları üzerinden potasyum akışıyla kompanse edilir, bu da hücre zarının hiperpolarizasyonuna neden olur (Juffermans ve ark, 2008). Kalsiyum akışının ayrıca endositozu da uyardığı gösterilmiştir (Lariccia ve ark, 2011). Kararlı bir şekilde kavitasyon yapan kabarcıklar ve buna karşılık gelen kayma gerilmeleri ile üretilen mikro-akışlar hücre zarını deforme edebilir. Bu, sitoskeletal yeniden düzenlemelere ve mekanosensörler tarafından algılanan membran geriliminde farklılıklara yol açar (Apodaca, 2002). Bu sensörler endositoz/ ekzositoz süreçlerini etkileyen bir sinyal kaskadını başlatabilir (Lionetti ve ark, 2009).

2.8. Ultrases ile Mikrokabarcık Yıkımına Dayanan Terapiler

2.8.1. İlaç ve Gen Transferi

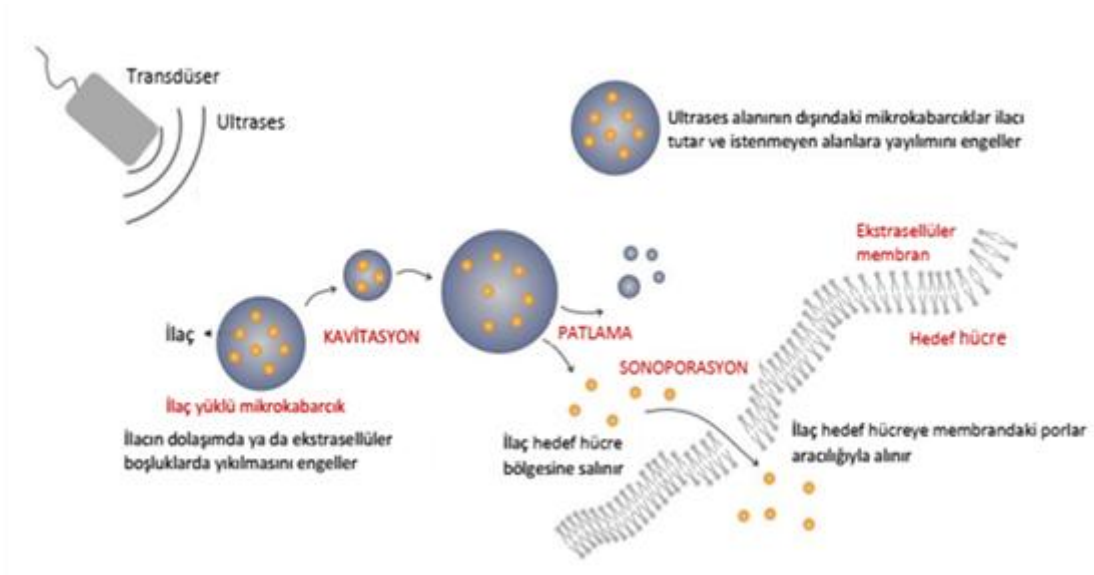
Moleküler düzeydeki biyoaktif maddeleri mikrokabarcıklara yüklemek için çeşitli fizikokimyasal etkileşimlerden faydalanılmaktadır (Şekil 16). İlaç molekülleri, elektrostatik veya hidrofobik etkileşimler yoluyla mikrokabarcık kabuğuna veya sadece fiziksel kapsülleme ile mikrokabarcık çekirdeğine yüklenebilir. Bu amaçla yüklü terapötikler (örneğin DNA, RNA), katyonik lipidler veya denatüre proteinler kullanıldığında, bu ajanlar mikrokabarcığın dış yüzeyine elektrostatik olarak bağlanabilir. Amfifilik moleküller fosfolipid kabuklu mikrokabarcıkların tek tabakasına nüfuz edebilir. Akustik olarak aktif liposferler, iç yağ katmanlarında oldukça hidrofobik moleküller içerir. Bu yük, ikincil taşıyıcı ile ilişkili mikrokabarcıkları kullanarak, lipozom ya da lipopleks gibi nanometrik parçacıkları mikrokabarcık ile ilişkilendirilebilir. Bu yaklaşım hem yükleme kapasitesini hem de transfeksiyon etkinliğini artırabilir (Lum ve ark, 2006). İlaç moleküllerinin, jelatin gibi biyolojik olarak uyumlu bir materyalle kaplanmış polimerlerin kabuklarıyla kapsüllenmesi, ilacın doğasından bağımsız olarak nispeten uygulanabilir bir yaklaşımdır. Bu mikrokabarcıklara "çift emülsifikasyon mikrokapsülleri" de denilmektedir. Mikrokabarcıkların etkili taşıma kapasitesi kabuklarıyla sınırlıdır. Liposferlerin kabukları, fosfolipid mikrokabarcıklar (2-3 nm (Dufrêne ve ark, 1997)) polimer mikrokapsülleri (50-200 nm, (Mehier-Humbert ve ark, 2007)), protein kabuklu mikrokabarcıklar ile (200 - 300 nm) karşılaştırıldığında oldukça kalındır. Örneğin, Unger ve arkadaşları kabuk kalınlıkları 500 nm'ye kadar kalın olabilen, çok daha büyük bir hacimli liposferler geliştirmiştir (Unger ve ark, 1998). Başka gruplar, daha da fazla yük taşıma kapasitesine sahip kısmen yağ dolu mikrokabarcıklar geliştirmiştir. Borden ve arkadaşları çok katmanlı bir teknikle plazmid DNA için mikrokabarcıkların yükleme kapasitesini on kattan fazla arttırmak için yeni bir yaklaşım ortaya koymuştur (Borden ve ark, 2005). Frenkel ve arkadaşları ise tüm kabuk hacminin yükleme yapmasına izin veren bir formülasyon kullanarak, albümin mikrokabarcıklar üzerinde yaklaşık 200 kat daha fazla pDNA yüklemesini başarmışlardır (Frenkel ve ark, 2002).



Şekil 16. Mikrokabarcıklarda olası ilaç kargo alanlarının şematik gösterimi. İlaçlar, perflorokarbon çekirdeği ve mikrokabarcık kabuğu (a) arasındaki bir yağ tabakasında çözülebilir veya mikrokabarcık kabuğu (b) içine dahil edilebilir. Mikrokabarcık kabuğunun dışındaki ilaç yüklemesi elektrostatik etkileşim (c) veya avidin-biyotin bağlantısı (d) ile gerçekleştirilebilir. Bir lipid mikrokabarcık kabuğu yerine albümin veya polimer kabukları kullanılabilir. (Ine Lentacker ve ark, 2009)’den uyarlanmıştır.)

Daha önce açıklandığı gibi, mikrokabarcıklar, ultrasese maruz kaldıklarında stabil veya dinamik kavitasyonuna uğrayabilirler. Stabil kavitasyon, “yumuşak” mikro akımların oluşmasına neden olurken, mikrokabarcıkların yerinden oynatılması şok dalgaları gibi çok yüksek kuvvetlere neden olabilir. Aynı zamanda, bir çökteltici mikrokabarcık bir hücre katmanını gibi bir sınıra yakın bir yere yerleştirildiğinde, hücre yüzeyine doğru yönlendirilen bir mikrojet oluşturulur. Bu olaylar hücre membranında geçici gözeneklerin oluşmasına neden olabilir. Hücre membran gözeneklerinin büyüklüğü ve süresi, uygulanan ultrases koşullarına, mikrokabarcık özelliklerine ve kullanılan hücre tiplerine bağlıdır. Çoğu hücre saniyeler veya dakikalar içerisinde membrndaki bu açıklığı kapatabilmektedirler. Güncel yayınlarda bu tamir sürecinin enerji bağımlı olduğu gösterilmiştir. Membran hasarları hücre içi veziküllerin ekszositozu ile tamir edilmektedir. Lizozomlar birbirleriyle kaynaşır ve daha sonra hücre zarı lipidleriyle kaynaşmak amacıyla hücre zarına taşınırlar. Makromoleküler ilaçlar, hücre membranındaki bu gözeneklerden hücrenin sitoplazmasına ulaşabilir. Mikrokabarcıklara ve

ultrasese maruz kalan hücrelerin protein, plazmid DNA, siRNA ve ilaçların hücre içine alındıkları gösterilmiştir (Şekil 17). Mikrojetler ve şok dalgalarının kan damarlarının geçirgenliklerini arttırarak yüksek moleküler ağırlıklı ilaçların ve nanopartiküllerin ekstrasvazasyonunu artırabildikleri de yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (Bekeredjian ve ark, 2006; Chen ve ark, 2016; Geis ve ark, 2012; Lentacker ve ark, 2013; Xu ve ark, 2016).



Şekil 17. İlaç yüklü mikrokabarcıklar ve ultrases ile hedefli ilaç dağıtımı. İlaç yüklü mikrokabarcıklar ve ultrases ile hedefli ilaç dağıtımının avantajlarını gösteren şematik genel bakış. (I. Lentacker ve ark, 2014)'den uyarlanmıştır.)

2.8.2. Kök Hücre Transferi

Ultrases hedefli mikrokabarcık yıkımının kök hücre farklılaşması ve migrasyonunda etkili olduğu farklı araştırma gruplarının yürüttüğü çalışmalarla gösterilmiştir. Kök hücrelerinin intravenöz verilmesi sonrası hedeflenen bölgede ultrases hedefli mikrokabarcık yıkımı gerçekleştirilerek, kök hücrelerin ekstrasvazasyonu sağlanmış ve böylece kök hücrelerin hedef dokuya doğru göçlerinin kolaylaştırılabildiği gösterilmiştir. Kardiyak uygulamalarda intrakardiyak uygulamanın intravenöz uygulamadan daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca dolaşıma verilen kök hücrelerin, ultrason hedefli mikrokabarcık yıkımı uygulamasının ardından kan beyin bariyerinde oluşturulan açıklık sayesinde kan beyin bariyerini aşarak beyin dokusuna doğru göçünün sağlanabildiği de gösterilmiştir (Chang ve ark, 2015; Wu ve ark, 2014).

2.8.3. Kan Beyin Bariyerinin Aşılması

Ultras ses aracılı mikrokabarcık yıkımının yeni ve heyecan verici bir uygulama alanı da kan-beyin bariyerinin (KBB) aşılmasında kullanılmaktadır (Etame ve ark, 2012). Çoğu molekül için geçirimsiz olan KBB nedeniyle beyin dokusuna ilaç gönderimi çok kısıtlanmaktadır. Santral sinir sisteminin endotel hücreleri birbirine yapışık ve sıkı bağlantılar ile sıkıca tutturulur, böylece apikal ve bazolateral yüzey bileşenlerinin birbirine karışmaları önlenmiş olur (Sweeney ve ark, 2019).

Kan beyin bariyerini geçici olarak açmak için düşük frekanslı, veya yüksek frekans düşük yoğunluklu ultras ses kullanılabilir (Konofagou, 2012). KBB'nin sadece ultras esle de açılabilirdiği gösterilmiştir, ancak intravenöz mikrokabarcık enjekte edilmesinden sonra ultras es uygulanması, beyin dokusu hasarı olmadan geri dönüşlü KBB açılmasını sağlayan tek yöntemdir. Mikrokabarcıkların mikrokırımlarla, şok dalgalarıyla ve mikro-jetlerle kaviteasyonu bu geri dönüşümlü açılıştan sorumludur (Hernot ve Klibanov, 2008; Hynynen, 2008; McDannold ve ark, 2012, sheikov ve ark, 2004, Hynynen ve ark, 2005, Choi ve ark, 2007).

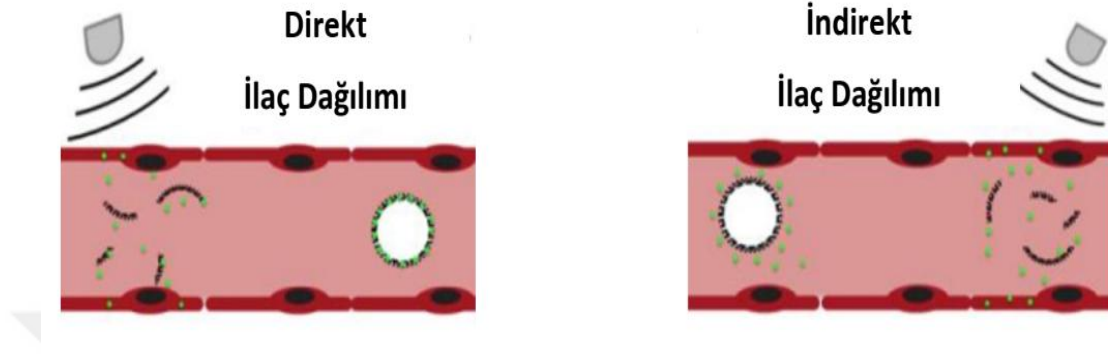
2.9. Ultras es İle Mikrokabarcık Yıkımı Aracılı Sono-kemoterapi Yaklaşımı

Kemoterapi klinik kanser tedavisinde çok önemli bir yöntemken, doğal veya edinilmiş kanser ilacı direnci klinikteki geniş uygulamalarını büyük ölçüde sınırlamaktadır. Kanserlerin kemoterapötik ilaçlara duyarlılığını arttırmak, kanser tedavisinin araştırma alanında her zaman odaklanmış bir konudur. İlk olarak, ultrason kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaçların alımını seçici olarak artırabilir, böylece normal hücreler ve dokular üzerindeki toksik ve yan etkilerini azaltabilir (Trendowski, 2014).

İkincisi, SDT, kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara duyarlılığını arttırmak için uygun olan mitokondri-kaspaz sinyal yolunu aktive edebilmektedir (Tang ve ark, 2010). Birlikte ele alındığında, SDT'nin kemoterapi ile kombine tedavisi muhtemelen kanser hücreleri üzerinde sinerjik terapötik etkiler elde edilecektir.

Mikrokabarcık aracılı ilaç salımı doğrudan ve dolaylı olarak iki şekilde gerçekleşebilir. Doğrudan ilaç salımında ilaç molekülleri mikrokabarcık kabuğunun içine ya da yüzeyine yüklendikten sonra patolojik olan bölgeye geçici ve lokal olarak kontrol edilebilir şekilde

salınırlar (Böhmer ve ark, 2010; Lammers ve ark, 2012; Yang ve ark, 2011). Dolaylı ilaç salımında ise ilaç ya da ilaç taşıyıcı sistem mikrokabarcık ve ultrases ile birlikte uygulanmaktadır (Şekil 18).



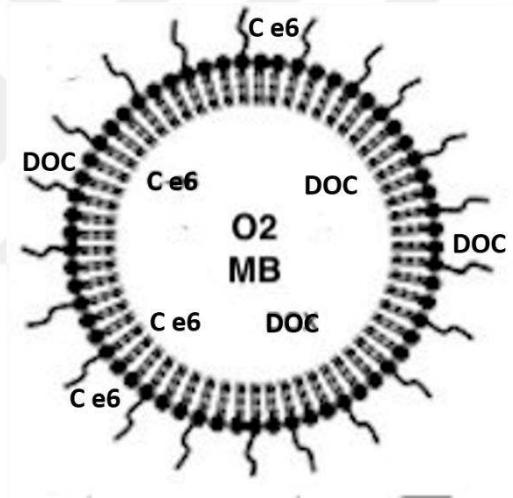
Şekil 18. Direkt ve indirekt ilaç dağılımı. (Koczera ve ark, 2017)’den uyarlanmıştır.)

Wang ve ark. (2015) K562 hücrelerinde PpIX destekli düşük yoğunluklu ultrason ile birlikte doksorubisin uygulamasının etkinliğini değerlendirmiştir. Optimal koşul altında, kombinasyon tedavisi, her iki monoterapiye kıyasla doksorubisine yüksek direnç gösteren lösemi K562 hücrelerinin ölümünü önemli ölçüde arttırmıştır (Xiaobing Wang ve ark, 2015). Gao ve arkadaşları, Ce6 aracılı SDT ile birleştirilen adriyamisin, insan meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalmasına karşı önemli sinerjistik etkiler sergilediğini bulmuştur (Gao ve ark, 2010). Osaki ve ark (2016) fare meme tümör hücreleri üzerinde 5-ALA bazlı SDT ile kombine edildiğinde bleomisin terapötik gelişimini incelemişlerdir. Sonuçlar, 5-ALA bazlı SDT ve bleomisin kombinasyon tedavisi ile indüklenen tümör küçülmesinde etkili mekanizmalarının sadece kanser hücrelerinin doğrudan öldürülmesini değil, aynı zamanda vasküler kapanmayı da içerdiğini düşündürmektedir (Osaki ve ark, 2016).

McEwan ve ark (2016) pankreas kanseri tedavisinde kanser hücrelerini seçici olarak öldürmek amacıyla oksijen yüklü bir mikrokabarcık (O_2MK) tasarlamış, bu mikrokabarcık ile Rose Bengal'i (O_2MB-RB) ve antimetabolit 5-florourasil'i ($O_2MB-5FU$) kombine olarak uygulamışlardır. Sonuçlar, SDT ve antimetabolit tedavisinin kombine tedavisinin, üç farklı pankreas kanseri hücre hattının (BxPc-3, MIA PaCa-2 ve PANC-1) proliferasyonlarını önemli ölçüde inhibe ettiğini gösterdi. Ayrıca bu kombine tedavi, insan ksenograft BxPC-3 tümörü taşıyan SCID farelerindeki tümör büyümesini, her iki tedaviye kıyasla azaltmıştır (McEwan ve ark, 2016).

Benzer şekilde Gempitabin yüklü O₂MK ve Rose Bengal yüklü O₂MK'ların ultrases ile kombine edilmesiyle uygulanan *in vivo* sono-kemoterapi çalışmasında, pankreas tümörüne karşı kombine terapinin, tek başına gempitabin veya Rose Bengal aracılı SDT uygulamalarından çok daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında Gempitabinin oksijenli mikrokabarcıkla konjuge verildiği farelerde (böbrek ve karaciğerlerinde) ilaçtan kaynaklanan herhangi bir yan etki gözlenmemiştir (Nesbitt ve ark, 2018).

Ayrıca, O₂MB'ler, O₂'yi tümör mikro-ortamına etkili bir şekilde verebilir, böylece SDT'nin O₂'ye bağlı etkinliğini arttırır. O₂'nin yanı sıra sonosensitif ajan/antimetabolitin verilmesini kolaylaştırmak için mikrokabarcıkların kullanılması, hem harici olarak uygulanan ultrason kullanılarak sonosensitif ajanın aktive edilmesi olasılığını güçlendirmekte hem de kemoterapi ilacının geleneksel sistemik uygulanmasıyla karşılaştırıldığında ilacın etkinliğinin artması ve yan etkilerinin azaltılmasıyla daha hedefli bir yaklaşım sağlanmaktadır (şekil 19).



şekil 19. Sono-kemoterapi uygulaması için tasarlanan mikrokabarcık. Sonokemoterapi uygulaması için tasarlanan mikrokabarcık ve ajanların dağılımının şematik gösterimi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Sıcak Su Banyosu
- -80 °C derin dondurucu
- İnvert mikroskop
- Soğutmalı Santrifüj
- Steril Kabin
- Karbondioksit İnkübatör
- Plate Reader
- Muse Cell Analyzer
- Olympus BX-50 Floresan Mikroskop (Olympus BX-50, Olympus Optical Co., Tokyo, Japonya)
- Amalgamator
- Rotary Evaporator
- BTL 5710 Ultrases Cihazı (BTL, CZ)

3.2. Kullanılan Kimyasallar

- Docetaxel (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, ABD)
- Chlorin e6 trisodium salt (Scientific, Logan, UT, ABD)
- 18:0 PC (DSPC) (Avanti Lipids Inc, Alabaster, AL, ABD)
- DSPE-PEG (2000) Amine (Avanti Lipids Inc, Alabaster, AL, ABD)
- C₃F₈ (Meran Tıp Ürünleri Ltd. Şti., İstanbul, TR)
- Glycerol(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, ABD)
- Propylene Glycol (Sigma-Aldrich, Diegem, Belçika)
- Kloroform (Sigma-Aldrich, Diegem, Belçika)
- DMEM, high glucose, pyruvate (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD)

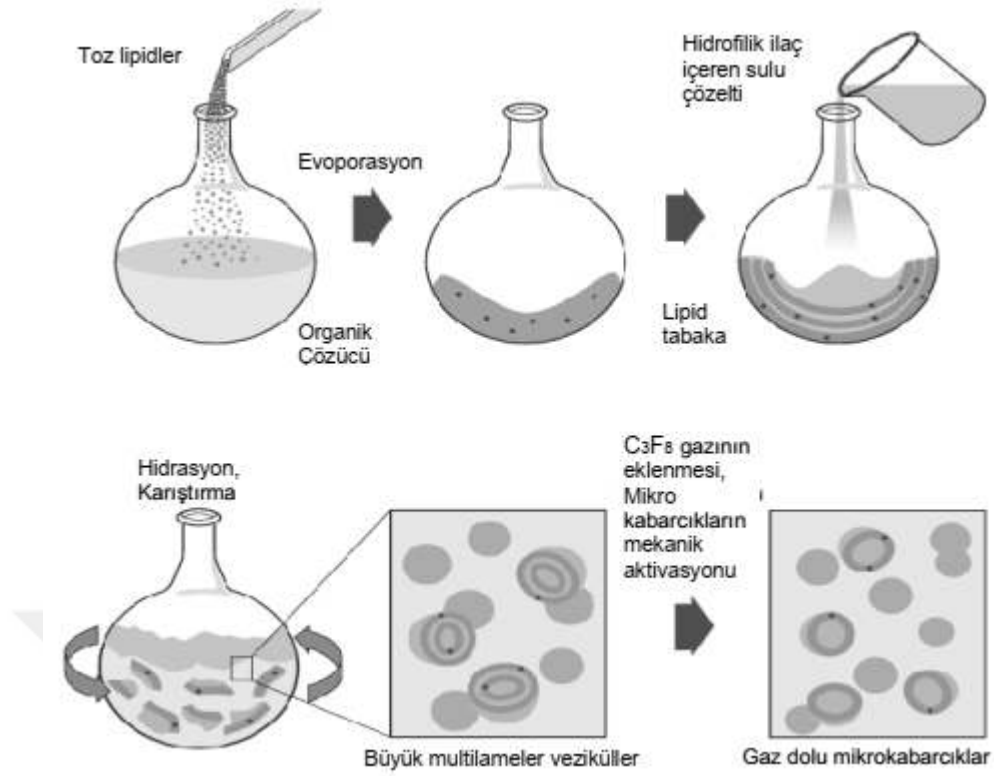
- FBS (Sigma-Aldrich, Diegem, Belçika)
- Penisilin, Streptozosin (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD)
- Trypsin –% 0,5 EDTA (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD)
- PBS-10X, w/o Ca^{++} , Mg^{++} (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD)
- L-Glutamine (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD)
- Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit (Millipore; Merck KgaA., Burlington, MA, ABD)
- Muse® Oxidative Stress Kit (Millipore; Merck KgaA., Burlington, MA, ABD)
- Muse® Mitopotential Assay Kit (Millipore; Merck KgaA., Burlington, MA, ABD)
- MTT (Sigma-Aldrich, Diegem, Belçika)
- Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD)

3.4. Hücre Kültürü

İnsan meme kanseri hücre hattı MCF-7 (ATCC® HTB-22) hücreleri (pasaj sayısı 3) American Type Culture Collection'dan (Manassas, Virginia, ABD) satın alınmıştır. Hücreler %10 (v/v) Fötal Bovine Serum (FBS), %1 (v/v) antibiyotik ve %1 L-glutamin içeren Dubelco's Modified Eagle Medium (DMEM) içerisinde kültür edilmiştir. Hücreler %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıkta nemlendirilmiş bir inkübatör içerisinde çoğaltılmışlardır.

3.5. Mikrokabarcık Üretimi Ve Karakterizasyonu

DSPC ve DSPE-PEG (1,2-disteroil-sn-gliserol-3-fosfoetanol-amin-N-[metoksi(poli-etilen glikol)-2000] amonyum tuzu) içeren mikrokabarcıklar 85:15 molar oranında uygun koşullarda hazırlanmıştır. Mikrokabarcık hazırlanması için uygun miktarda lipid tartılarak kloroform içinde çözülmesi için yuvarlak dipli balona alınmıştır. Sonrasında kloroform 65°C'ye getirilmiş rotari evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Yuvarlak dipli balonun dibinde kalan lipid film tabaka 1:2:7 oranında gliserol-propilenglikol distile su karışımında çözünmüştür. Sonunda 0,25 mg/ml lipid konsantrasyonuna sahip stok solüsyon hazırlanmıştır (Şekil 20).



Şekil 20. Mikrokabarcık üretim aşamaları.

Hazırlanan lipid solüsyondan 0,5 ml alınarak 1,5 ml kapaklı ependorf tüplerine pay edilmiş ve tüpün boş kısmı C_3F_8 gazıyla doldurulmuştur. Son olarak tüpler 4000 devir/dk'da çalışan karıştırıcı cihazda 20 saniye çalkalanarak mikrokabarcıklar elde edilmiştir (Resim 1).



Resim 1. Mekanik aktivasyonun ardından mikrokabarcık içeren tüpler.

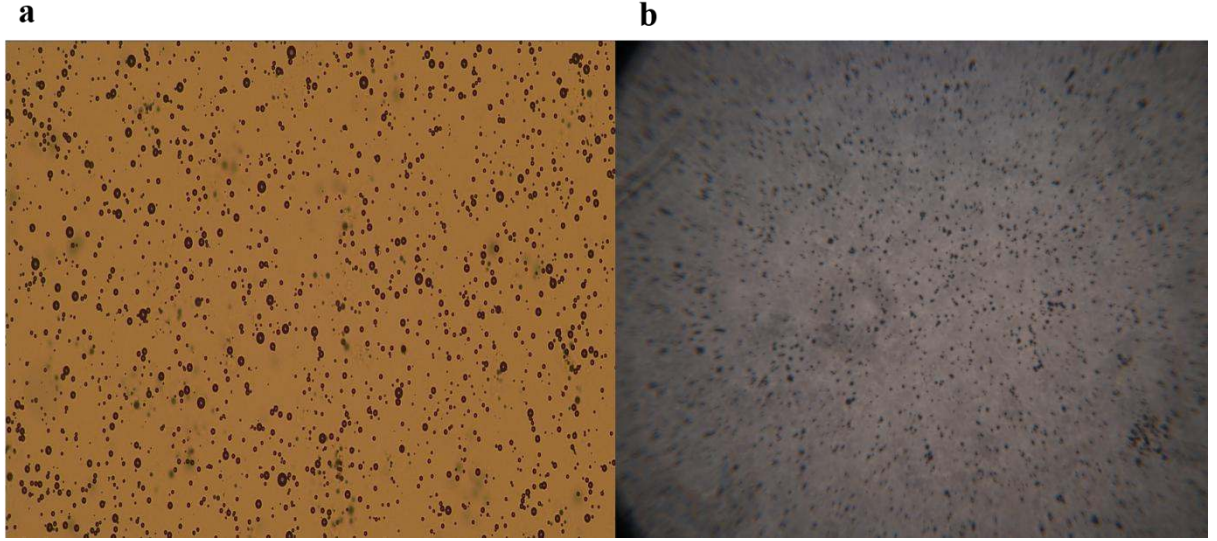
Mikrokabarcıklar sayılmak üzere belli oranda seyreltilerek Thoma lamına alınmış ve mililitredeki mikrokabarcık miktarları tespit edilmiştir. Mikrokabarcıkların boyutlarının belirlenmesi için mikrokabarcıklar lam üzerindeyken fotoğrafları çekilmiştir. Daha sonra bu görseller ImageJ programında parçacık boyut analizi eklentisi kullanılarak analiz edilmiş ve mikrokabarcık çaplarının dağılımı belirlenmiştir.

3.5. Ultrases Aracılı Mikrokabarcık Yıkımı

Hücrelere ultrases uygulamak amacıyla BTL 5710 Sono çift frekanslı ultrason terapi cihazı (BTL CZ) kullanılmıştır. 30 mm çapında transduser 5 cm'lik bir gazı giderilmiş su banyosu altına yerleştirilmiş, 1-MHz frekans, % 100 çalışma döngüsünde sürekli frekans ile hücreler ultrasese maruz bırakılmışlardır (Resim 2). Hücreler, 6 kuyucuklu plaklar üzerinde kültür edilmişler ve ultrases uygulaması öncesi su banyosunun üst kısmına sadece bir kuyucuk denk gelecek şekilde yerleştirilmişlerdir. Ultrases güç yoğunluğu (yoğunluk) 2 W/cm^2 uygulanmıştır. Hücre kültürlerinin içindeki, besiyeri sıcaklık artışı 1°C 'den daha düşük olmuştur. Ultrases uygulamaları ışığın olası etkilerini önlemek amacıyla loş ışıklı ortamda gerçekleştirilmiştir (Resim 3).



Resim 2. Ultrases uygulama düzeneği



Resim 3. Mikrokabarcıklar ve Ultrases etkileşimi.

Gaz dolu mikrokabarcıklar (a) ve $2\text{W}/\text{cm}^2$ Ultrases uygulamasıyla patlayan mikrokabarcıklar; gaz merkezini kaybedip lipid damlacıklar halinde görünmektedirler (b).

3.6. Hücre Canlılığı Analizi

Hücre canlılığını tespit etmek için MTT'nin formazan'a indirgenmesi kullanıldı. Kısaca, 24 oyuklu plakalarda tedavilerin uygulanmasının ardından 24 saatlik inkübasyonun sonunda, hücreler iki kez fosfat tamponlu salinle (PBS) yıkanmış ve MTT (100 mg/100 ml PBS) solüsyonu eklenmiştir. Hücreler 3 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. Oluşan Formazan kristalleri, Dimetil sülfoksit (500 ml) ile çözülmüştür. Absorbans, plate reader kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür. Üretilen bağlı renk, hayatta kalan hücre sayısı ile doğrudan orantılıdır.

3.7. Hoechst Boyama İle Apoptotik Yapıların İncelenmesi

Tedavi uygulamalarından sonra, MCF-7 hücreleri 24 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. Hücreler PBS'de yıkanmış ve hem tedavi hem de kontrol hücreleri, 37°C 'de 5 dakika boyunca Hoechst 33258 (1 mg/ml konsantrasyonda bir stok çözeltiden hazırlanmış 5 ug/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır) ile boyanmıştır. Boyayla hemen inkübasyonun ardından hücreler bir floresan mikroskobu kullanılarak gözlemlenmiştir. Mikroskopta BP330-380

/LP420 nm Ex/Em filtre seti uyarlı ve görüntüler renkli bir cihaz kamerası kullanılarak kaydedilmiştir.

3.8. Annexin V Apoptoz Tayini

Tedavi gruplarının canlı, erken/geç apoptotik ve ölü hücrelerinin kantitatif analizi için Muse Annexin V & Dead Hücre Test Kiti (Millipore; Merck KgaA., Burlington, MA, ABD) ve Muse Cell Analyzer (Muse™ Cell Analyzer; Millipore, Burlington, MA, ABD) cihazı kullanılmıştır. Analiz için apoptotik hücrelerin membranlarının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserinleri boyayan Annexin V boyası ve bir ölü hücre belirteci olan 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) boyası kullanılmıştır.

Tedavi uygulamaları sonrasında bütün hücreler, Tripsin-EDTA (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD) ile kaldırılmış ve son konsantrasyon 5×10^5 hücre/ml olacak biçimde %1 Bovine serum albumin (BSA) ve %1 Fetal Bovine Serum (FBS) içeren tuzlu fosfat tamponu (PBS) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, ABD) içerisinde seyreltilmişlerdir. Daha sonra 100 µl Annexin V ve 7-AAD karışımı ile 100 µl hücre süspansiyonu bir mikrotüp içerisinde karıştırılmış ve 30 dakika boyunca 37°C’de inkübe edilmiş ve ardından Muse Cell Analyser’da analiz edilmişlerdir.

Apoptotik oran, dört ayrı popülasyonun ayırt edilmesiyle şu şekilde belirlenmiştir:

1. Saptanabilir apoptoz olmayan canlı hücreler : Annexin V (-) ve 7-AAD (-)
2. Erken apoptotik hücreler : Annexin V (+) ve 7-AAD (-)
3. Apoptotik hücreler : Annexin V (+) ve 7-AAD (+)
4. Apoptotik olmayan bir yolla ölen ölü hücreler : Annexin V (-) ve 7-AAD (+)

Tüm deneyler üç tekrar halinde yapılmıştır.

3.9. Oksidatif Stress Analizi

Tedavi grupları arasında oksidatif strese maruz kalma oranlarını tespit edebilmek için Muse Oxidative Stress Kit (Millipore; Merck KgaA., Burlington, MA, ABD) kullanılarak Muse Cell Analyzer cihazında ölçümler yapılmıştır. Bunun için tedavi gruplarına ait hücreler kuyucuklu plaklardan tripsin-EDTA uygulanarak kaldırılmış daha sonra da hücreler santrifüj tüplerinde santrifüj edilerek tripsin EDTA uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler 1X çalışma

tamponu içerisinde 1×10^7 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyon edilmiş ve oksidatif stress reaktifıyla inkübe edilmiştir. Reaktifin içeriğindeki dihidroetidyum (DHE) hücrelerde oluşan ROS'u belirlemektedir. DHE süperoksit anyonuyla okside olduğunda DNA ile etkileşime girebilen floresan bir molekül olan etidyum bromür oluşur ve sonunda etidyum bromür DNA'ya bağlanır ve kırmızı floresans vermektedir. Oluşan floresansın yoğunluğu da Muse Cell Analyzer tarafından ölçülmüştür.

3.10. Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi

Bu yöntemde, mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikleri ve hücre ölümünün bir göstergesi olarak 7-AAD'yi saptamak için Mitopotential Assay Kit(Millipore; Merck KGaA., Burlington, MA, ABD) kullanılmıştır. Bu yöntemde göre yüksek membran potansiyeli, bozulmamış mitokondrinin iç zarı içinde mitopotansiyel boya birikimine, dolayısıyla yüksek floresansa neden olurken,mitokondri membranının depolarize olan hücrelerde floresansın azaldığı gözlenmektedir. Bundan dolayı bu akış sitometrisi bazlı deney 4 hücre popülasyonunu mitokondri membran potansiyelinin durumuna göre farklılaştırmaktadır;

1. Depolarize canlı hücreler: MitoPotential(-) ve 7-AAD(-),
2. Canlı hücreler: MitoPotential(+) ve 7-AAD(-)
3. Depolarize ölü hücreler: MitoPotential (+) ve 7-AAD (+)
4. Ölü hücreler : MitoPotential(-) ve 7-AAD(+)

Tedavi uygulamalarının ardından MCF-7 hücreleri floresan boyalarla inkübe edilmişler ve mitokondri membranı depolarize hücrelerin oranı (canlı depolarize, ölü depolarize) Muse Cell Analyzer ile ölçülmüştür.

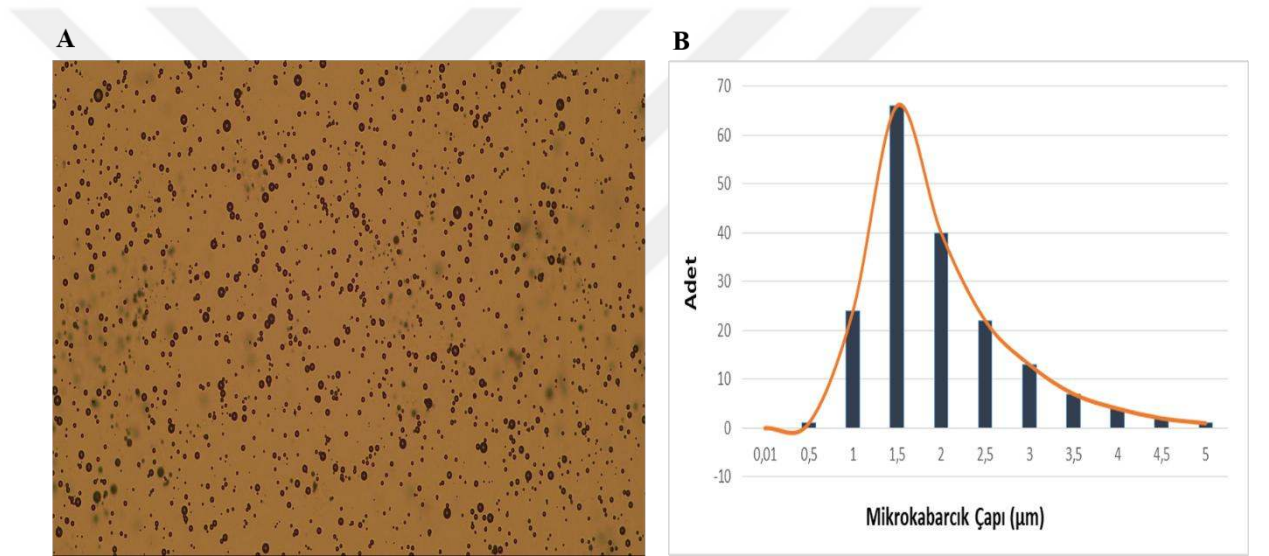
3.11. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplara tek yön varyans analizi (ANOVA) ve Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak örneklerin birbirleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yapılan istatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlardan $P < 0,05$ olan değerler önemli kabul edilmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Mikrokabarcık Boyut Dağılımı

Mikrokabarcıklar üretildikten sonra lam üzerine alınmış ve ışık mikroskopunda (Olympus BX-50) görüntüleri alınmıştır (Şekil 21a). Alınan görüntülerdeki mikrokabarcık boyutları ImageJ programıyla analiz edilmiş ve boyut dağılım grafiği oluşturulmuştur (Şekil 21b). Analiz sonucunda mikrokabarcıkların yaklaşık çapı 1-2 μm , konsantrasyonu 1×10^9 mikrokabarcık/ml olarak belirlenmiştir.



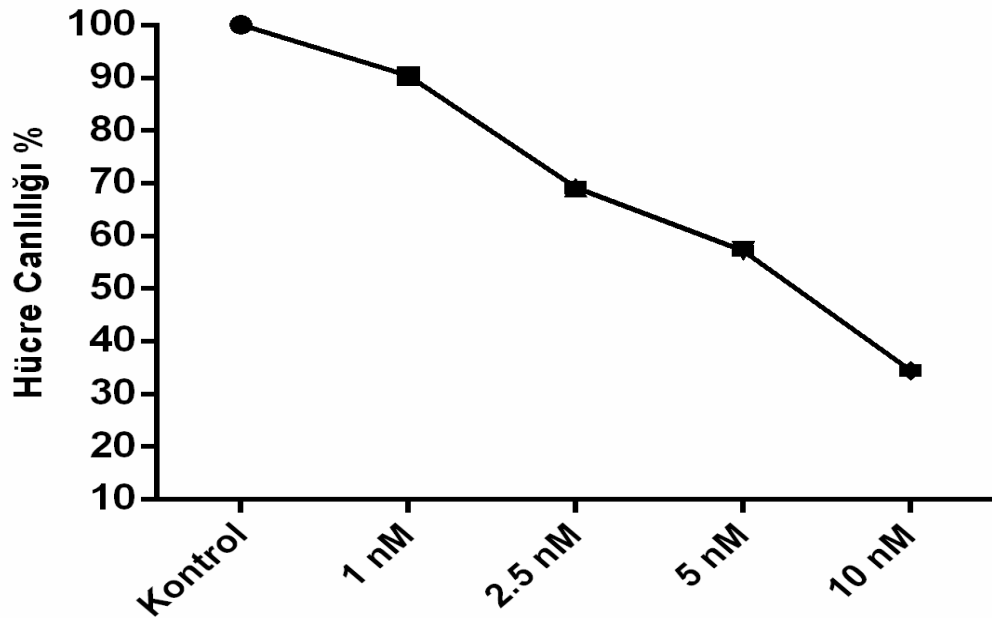
Şekil 21. Mikrokabarcıkların ışık mikroskopu altında görünüşleri ve boyut dağılımı grafiği.

4.2. Hücre Canlılığı Bulguları

MCF-7 hücreleri üzerinde uygulanacak Docetaxel dozuna karar vermek için hücrelere artan dozlarda (1; 2,5; 5 ve 10 nM) ilaç uygulaması yapılmıştır. İlaç uygulamalarından 24 saat sonra hücre canlılıkları MTT testi sonrası elde edilen absorbans değerleri ile hesaplanmıştır. Buna göre Tablo 1’de görüleceği gibi 2,5 nM ve üzerindeki dozlarda hücre canlılığı %30’dan daha fazla azaldığı hesaplanmıştır. Bu nedenle tedavi gruplarında uygulanacak Docetaxel dozu olarak 1 nM seçilmiştir (Şekil 22).

Tablo 1. Farklı docetaxel dozlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

Docetaxel Dozları	1 nM	2.5 nM	5 nM	10 nM
Hücre Canlılığı (%) Ortalama ve Standart Sapma	90,37 $\pm$ 1,33	69,17 $\pm$ 1,29	57,14 $\pm$ 0,85	34,44 $\pm$ 1,03



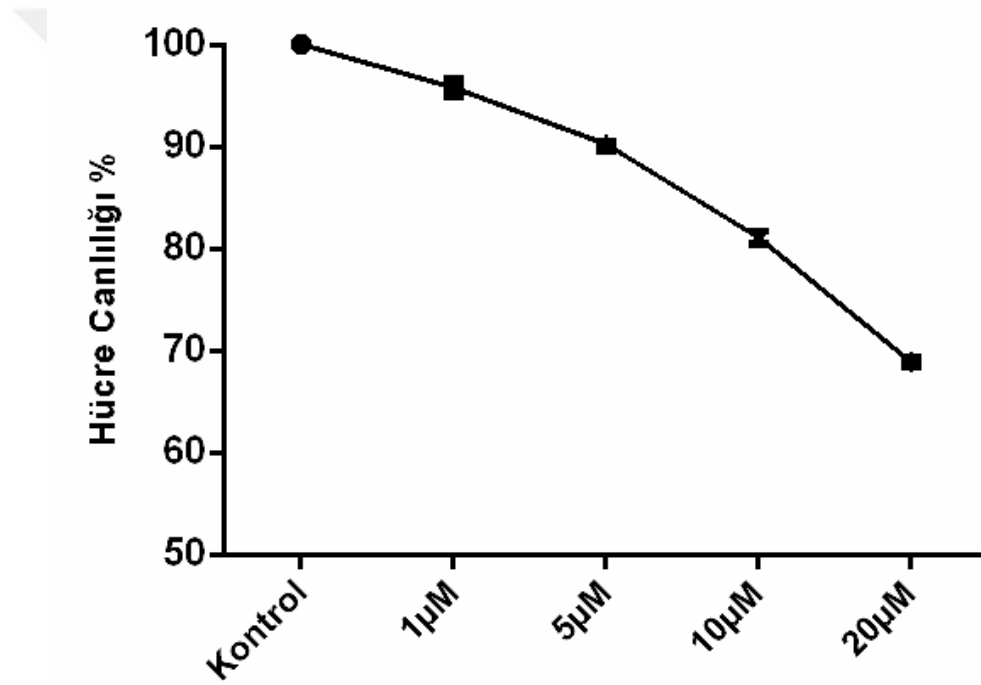
Şekil 22. Farklı docetaxel dozlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

Benzer olarak tedavi gruplarında uygulanacak Ce6 dozunun belirlenmesi için MCF-7 hücrelerine artan dozlarda Ce6 uygulaması yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücre canlılıkları MTT testi sonrası elde edilen absorbans değerleri ile hesaplanmıştır.

Buna göre, Tablo 2’de de görüleceği gibi 10 μ M Ce6 uygulamasından itibaren hücre canlılığı yaklaşık %20 ve üzerinde düşüş görülmüştür. Tedavi uygulamaları için 5 μ M Ce6 dozu seçilmiştir (Şekil 23).

Tablo 2. Farklı Ce6 dozları uygulaması sonrasında MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri.

Ce6 Dozları	1 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M
Hücre Canlılığı (%) Ortalama ve Standart Sapma	95,79 $\pm$ 1,65	90,23 $\pm$ 0,49	81,05 $\pm$ 1,24	68,87 $\pm$ 1,04

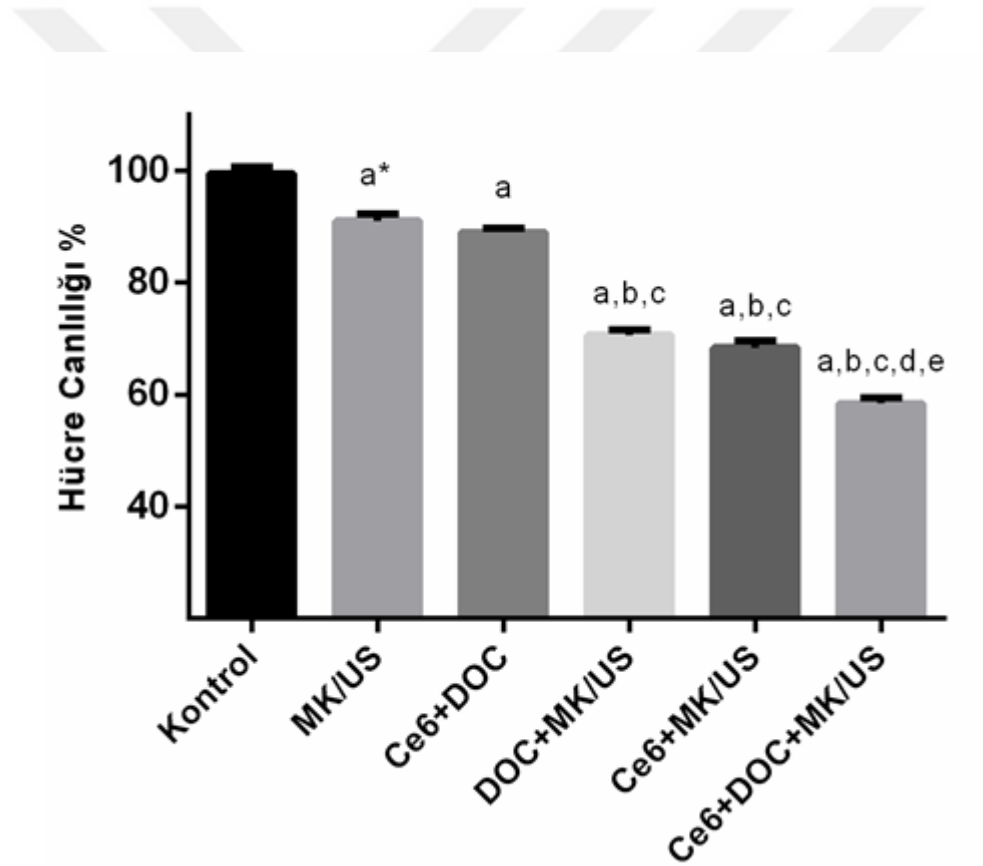


Şekil 23. Farklı Ce6 dozlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

Belirlenen Doc ve Ce6 dozlarıyla birlikte tedavi grupları oluşturulmuş ve uygulamalar yapılmıştır. Tedavi uygulamalarından 24 saat sonra MTT testi yapılarak gruplar arasındaki hücre canlılığı yüzdeleri karşılaştırılmıştır (Tablo 3). Buna göre bütün tedavi grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Tedavi grupları arasında hücre canlılığı yüzdesinin en düşük bulunduğu grup Ce6+DOC+MK/US grubu olmuştur (Şekil 24).

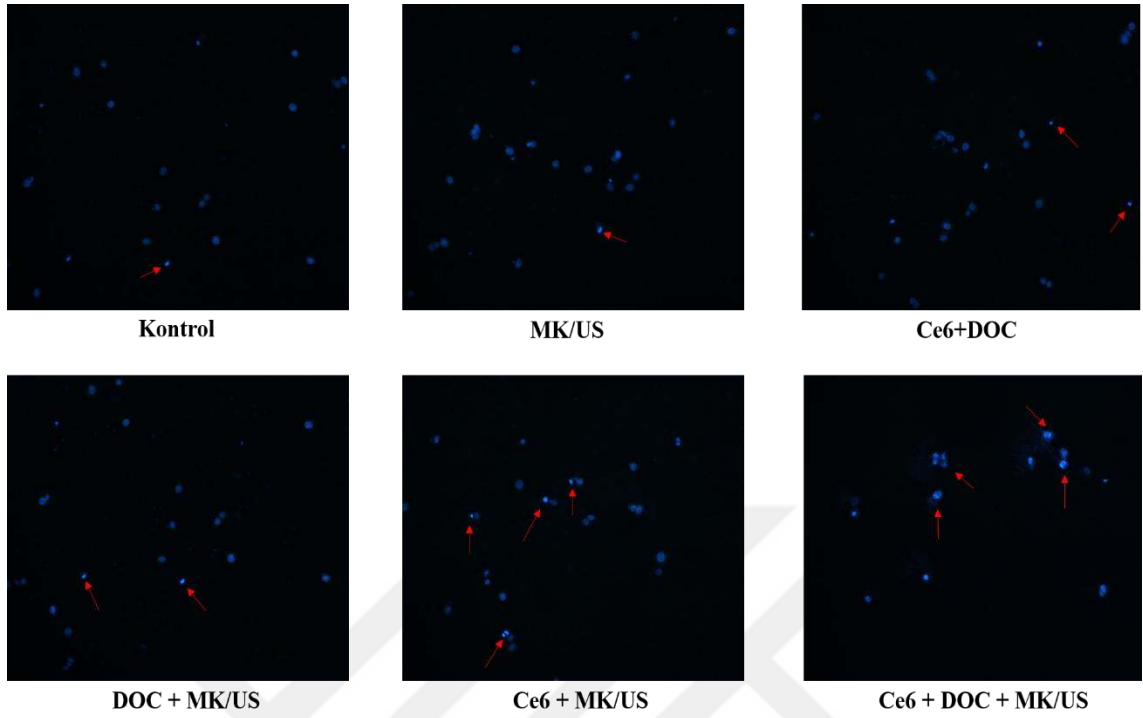
Tablo 3. Tedavi gruplarının hücre canlılığı yüzdeleri

Gruplar	Kontrol	MK/US	Ce6+DOC	DOC+MK/ US	Ce6+MK/ US	Ce6+DOC+M K/US
Hücre Canlılıkları (%) Ortalaması ve Standart Sapma	99,50±2,37	91,07±2,55	89,00±1,60	70,68±1,87	68,42 ±2,44	58,46±2



Şekil 24. Tedavi grupları hücre canlılıklarının (%) karşılaştırılması. a, kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (a: $p<0,0001$, a*: $p<0,001$); b, MK/US grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (b: $p<0,0001$); c, Ce6+DOC grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (c: $p<0,0001$); d, DOC+MK/US grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (d: $p<0,0001$); e, Ce6+MK/US grubuyla diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (e: $p<0,0001$).

4.3. Floresan Mikroskopik Apoptoz Bulguları



Şekil 25. Floresan mikroskopta deney gruplarına ait apoptotik yapılar.

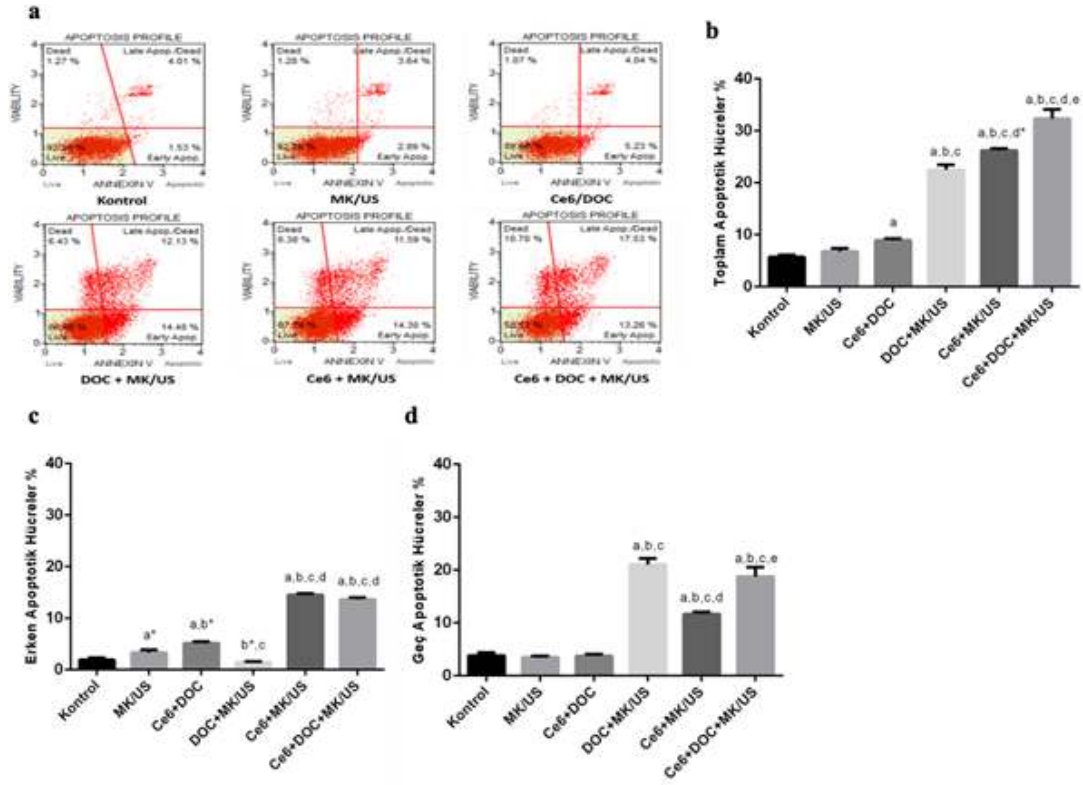
Hoechst boyama ile deney gruplarına ait hücreler floresan mikroskopta incelenmiştir. Homojen mavi boyanan hücreler herhangi bir DNA fragmentasyonu olmadığını ve hücrelerin canlı hücreler olduğunu göstermekte, mavi daha parlak odakların bulunduğu hücreler ise apoptotik DNA kondensasyonuna işaret edeceği için bu hücreler apoptotik olarak değerlendirilmiştir. Buna göre Kontrol grubuna ait hücrelerde çok nadir olarak apoptotik hücreler görülmüş hücrelerin büyük çoğunluğu canlı olarak gözlenmiştir. Aynı şekilde MK/US grubu hücreleri de büyük oranda canlı hücrelerden oluştuğu görülmüştür. Ce6/DOC ve DOC+MK/US grubu hücrelerinde apoptotik cisimcikler bir miktar daha sık görülmekle birlikte hücrelerin çoğu yine canlı hücrelerin çoğunun yine canlı hücrelerden oluştuğu gözlenmiştir. Ce6+MK/US ve Ce6+DOC+MK/US grubu hücrelerinde apoptotik hücrelerin yoğunluklarının ciddi oranda arttıkları gözlenmiştir (Şekil 25).

4.4. Annexin V Apoptoz Bulguları

Tablo 4. Tedavi gruplarının apoptoz bulguları (%).

	Canlı	Toplam Apoptoz	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Debris
Kontrol	93,14 ± 0,25	5,73 ± 0,37	32,36 ± 1,80	3,83 ± 0,60	1,14 ± 0,14
MK/US	91,53 ± 0,38	6,77 ± 0,63	3,33 ± 0,53	3,44 ± 0,27	1,7 ± 0,45
Ce6+DOC	89,97 ± 0,31	8,93 ± 0,32	5,163 ± 0,29	3,76 ± 0,28	1,10 ± 0,04
DOC+MK/US	67,39 ± 0,39	22,49 ± 0,98	1,42 ± 0,16	21,06 ± 1,13	7,90 ± 0,59
Ce6+MK/US	68,96 ± 0,59	26,20 ± 0,37	14,53 ± 0,25	11,67 ± 0,42	6,41 ± 0,07
Ce6+DOC+MK/US	57,04 ± 2,23	32,36 ± 1,80	13,62 ± 0,40	18,75 ± 1,79	10,59 ± 0,66

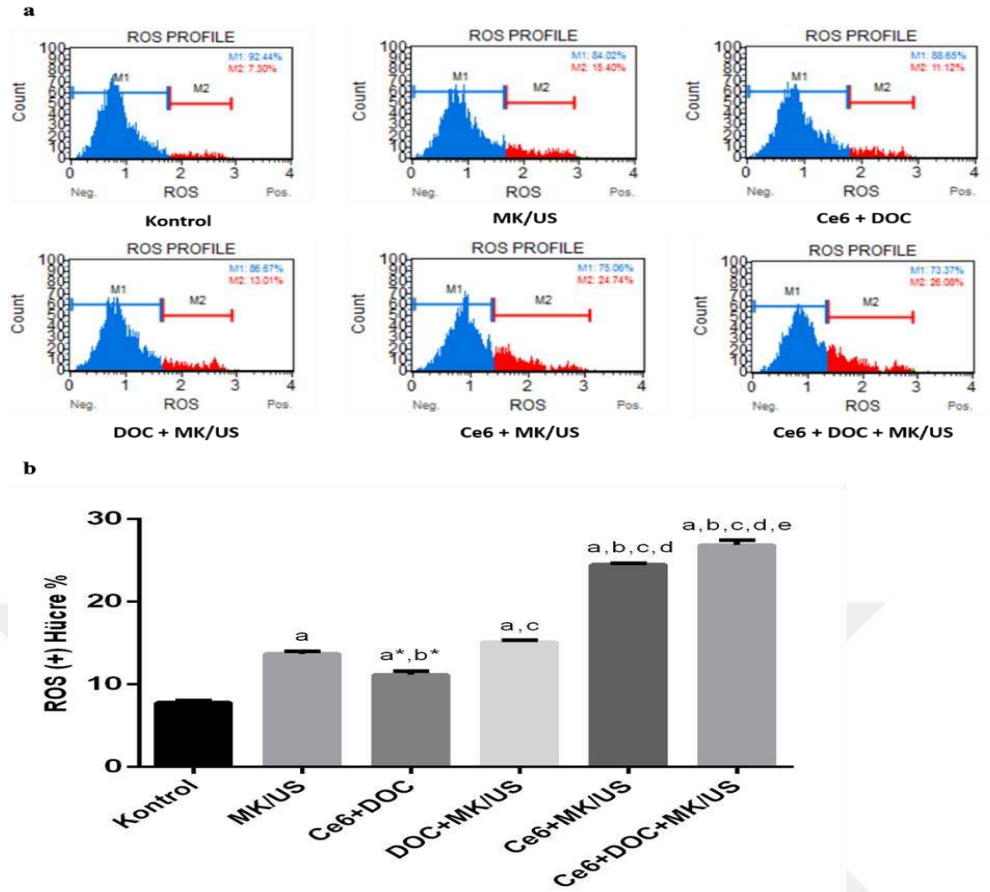
Annexin V apoptoz analizi sonucunda total apoptoz oranı en fazla olan grup sonokemoterapi grubu (Ce6+DOC+MK/US) olmuştur. Erken apoptoz görünen hücrelerin en fazla Ce6+MK/US grubunda olduğu saptanmıştır. Geç apoptotik hücre sayısı en fazla olan grubun ise DOC+MK/US grubu olduğu görülmüştür.



Şekil 26. Tedavi gruplarındaki MCF-7 hücrelerinin apoptotik profilleri: a, kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (a: $p < 0,0001$, a*: $p < 0,01$); b, MK/US grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (b: $p < 0,0001$, b*: $p < 0,001$); c, Ce6+DOC grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (c: $p < 0,0001$); d, DOC+MK/US grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (d: $p < 0,0001$, d*: $p < 0,01$); e, Ce6+MK/US grubuyla diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (e: $p < 0,01$).

4.5. Oksidatif Stres Bulguları

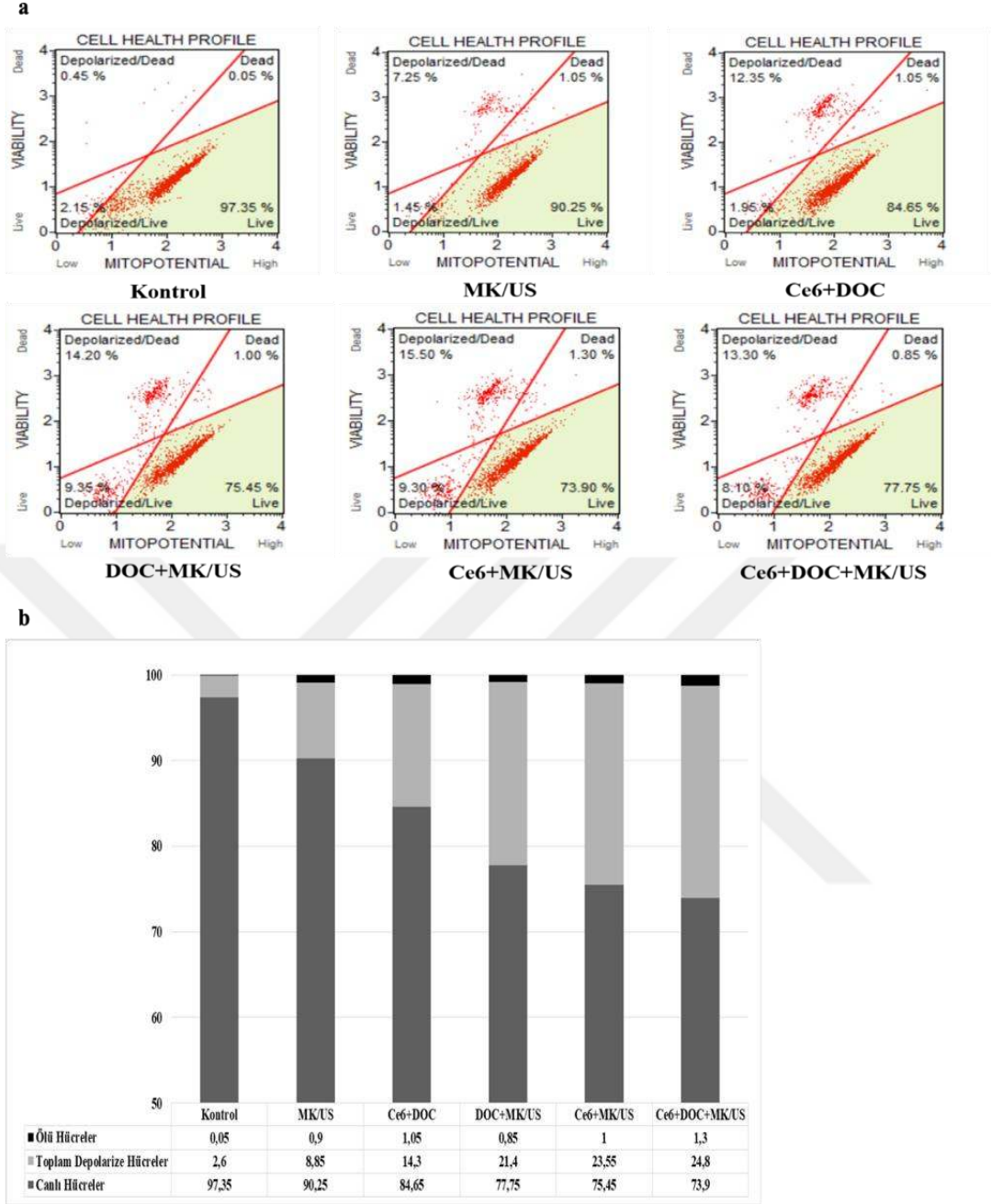
Tedavi uygulamalarının ardından MCF-7 hücrelerinin oksidatif stres profilleri karşılaştırılmıştır. Şekil 27’de görüleceği gibi en fazla ROS pozitif hücrenin Ce6+DOC+MK/US grubunda olduğu saptanmıştır. Bu gruptan sonra en fazla ROS pozitif hücre bulunan grup ise Ce6+MK/US grubu olmuştur.



Şekil 27. Tedavi gruplarının oksidatif stres bulguları.a, kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (a: $p<0,0001$, a*: $p<0,001$); b, MK/US grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (b: $p<0,0001$, b*: $p<0,01$); c, Ce6+DOC grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (c: $p<0,0001$); d, DOC+MK/US grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (d: $p<0,0001$); e, Ce6+MK/US grubuyla diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark (e: $p<0,01$).

4.6. Mitokondri Membran Potansiyeli Değişim Bulguları

Deney gruplarına ait hücrelerin mitokondri zar membran potansiyeli değişimleri Muse Analyser kullanılarak değerlendirilmiştir. Şekil 28’de görüleceği gibi mitokondri zar membran potansiyeli en fazla bozulan grup sono-kemoterapi grubu (Ce6+DOC+MK/US) ve ardından da Ce6+MK/US grubu olmuştur.



Şekil 28. Tedavi gruplarındaki MCF-7 hücrelerinin mitokondri membran potansiyellerindeki değişimler.

5. TARTIŞMA

5.1. Mikrokabarcık Destekli Sonokemoterapinin Seçilmesi

Ultrases hedefli mikrokabarcık yıkımı, solid tümör tedavisinde sınırlı bir alana ilaç salımında umut vadeden bir yöntem olan yeni bir tedavi yaklaşımıdır (Mayer ve ark, 2008). Mikrokabarcıklar lipid ya da polimer bir kabuk ile çevrelenerek stabilize edilmiş 1–10 µm çapındaki gaz dolu mikrokürelerdir (Sirsi ve Borden, 2009). Düşük akustik basınç altında mikrokabarcıklarda tekrarlayan hacimsel bir titreşim gerçekleşir, bu duruma kararlı kavitasyon adı verilir (Stewart ve Sidhu, 2006). Yüksek akustik basınçlarda ise mikrokabarcıklar şiddetli genişleme-büzülmeler geçirir ve patlarlar (destruction), buna dinamik kavitasyon denilmektedir (Hernot ve Klivanov, 2008; E. Stride ve Saffari, 2003). Kanser tedavisinde mikrokabarcıkların dinamik kavitasyon etkisinden faydalanılmaktadır. Mikrokabarcıkların hedef tümör bölgesindeki damarların içerisinde ultasesle patlatılması, ilacın ve ilaç taşıyıcı sistemlerin ekstrasvazasyonu, penetrasyonu ve hücre içine alımının artması ile sonuçlanır (Kooiman, Vos, ve ark, 2014; I. Lentacker ve ark, 2014). Bunun dışında sonokemoterapi ile mikrokabarcıkların birlikte uygulanması oksidatif hasarı arttırarak da sitotoksik etkiyi arttırmaktadır (R. Carlisle,). Ultrases enerjisinin üç boyutlu insan dokusuna odaklanabilmesi özelliği sayesinde, çevre dokuya hasar vermeden hedef bölgeye ilaç taşınması için ultrases aracılı mikrokabarcıkların kullanılması mümkündür (E. Stride ve Saffari, 2003). Mikrokabarcık yapısına ilaç ilave edildiği ya da birlikte uygulandığı takdirde, gönderilen ilaçlar mikrokabarcıkların patladığı bölgede birikmekte, böylece mikrokabarcıklar tümör hücreleri üzerinde daha hedefli bir tedavi sağlayabilmektedir (Mayer ve ark, 2008; Sirsi ve Borden, 2012).

Mikrokabarcık aracılı ilaç salımı doğrudan ve dolaylı olarak iki şekilde gerçekleşebilir. Doğrudan ilaç salımında ilaç molekülleri mikrokabarcık kabuğunun içine ya da yüzeyine yüklendikten sonra patolojik olan bölgeye geçici ve lokal olarak kontrol edilebilir şekilde salınırlar. Dolaylı ilaç salımında ise ilaç ya da ilaç taşıyıcı sistem mikrokabarcık ve ultrases ile birlikte uygulanmaktadır (Böhmer ve ark, 2010; Koczera ve ark, 2017; Lammers ve ark, 2012; F. Y. Yang ve ark, 2011).

Son yıllarda, mikrokabarcık aracılı ultrases destekli ilaç salımı için umut vadeden çeşitli araştırmalar yapılmış ve ticari mikrokabarcık formları da geliştirilmiştir (Martin ve

Dayton, 2013; Tsutsui ve ark, 2004; Unga ve Hashida, 2014). Bu çalışmalarda SonoVue®, Optison™ veya Definity® gibi mikrokabarcıkların aktif içeriklerle yüklendiğinde veya birlikte enjekte edildiğinde ultrases ile olan etkileşimleri ve terapötik etkinlikleri araştırılmıştır.

Tümör mikroçevresine SDT ve/veya kemoterapi ajanı ile birlikte mikrokabarcık uygulamasının, sistemik kemoterapötik uygulamasına göre tümör hücrelerine daha hassas olarak hedeflenmiş bir uygulama sağlamakta; bunun yanında oluşturduğu oksijen radikalleri ile sitotoksik etkiyi arttırmaktadır (Burkard ve Van Liew, 1994; McEwan ve ark, 2015). Nomikou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, SDT’de sonosensitif ajanın bir mikrokabarcık eşliğinde uygulanmasının, tek başına sonosensitif ajan kullanılmasına göre daha fazla singlet oksijen oluşumunu sağlayacağı, bu yolla sitotoksik etkisinin de daha yüksek olacağı gösterilmiştir (Nomikou, Fowley, ve ark, 2012). Mc Ewan ve arkadaşları *in vitro* pankreas kanser hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada SDT ile birlikte 5-Florourasil kemoterapötik ajanı ve oksijen yüklü mikrokabarcık kombinasyonunu uygulamış, sonuç olarak sadece SDT ve sadece 5-Florourasil tedavisine göre tümör hücre canlılığında anlamlı düzeyde azalma olduğunu göstermişlerdir (McEwan ve ark, 2016). Nesbitt ve arkadaşlarının pankreas kanserinin tedavisinde gemsitabin ve mikrokabarcık ile desteklenmiş sonokemoterapi uygulamasında geleneksel kemoterapi uygulamasına göre 240 kat daha düşük konsantrasyonda gemtisabin ilacı uygulanmış ile akut toksisite ve yan etkiler gözlemlenmeden daha etkin bir terapötik etki olduğu gözlemlenmiştir (Nesbitt ve ark, 2018).

Mikrokabarcık ve ultrases aracılı indirekt ilaç salımı son yıllarda klinikte hastalar üzerinde de denenmektedir. Dimcevski ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı Faz 1 klinik araştırmada, ileri evre pankreas kanseri olan 10 hastanın tedavisinde sistemik uygulanan gemtisabinin etkisinin, lokalize ultrases ve intravenöz mikrokabarcık uygulaması ile arttığı gösterilmiştir (Dimcevski ve ark, 2016). Sonuç olarak bu kombine tedavi protokolünün tek başına gemtisabin kemoterapisine göre ilave bir toksisite oluşturmadığı ya da yan etki sıklığını arttırmadığı, hastaların geçmiş gemtisabini taha iyi tolere edebildiği, 5 hastada maksimum tümör çapının küçüldüğü, bunun yanında hastaların ortalama sağkalım süresinin de 8,9 aydan 17,6 aya kadar uzadığı gösterilmiştir. Benzer bir prelinik çalışmada farelerde ksenograft pankreas kanseri tedavisinde gemtisabin ile birlikte mikrokabarcık destekli sonoporasyon uygulandığında tümör çapında belirgin azalma olduğu, ortalama sağkalım süresinin %10 uzadığı gösterilmiştir (Kotopoulis ve ark, 2013). Bunun dışında glioblastoma hastaları üzerinde ilk defa yapılan bir uygulama ile doksorubisin ile sonoporasyon

uygulamasının etkileri incelenmeye başlanmıştır, bu çalışmanın sonuçları da heyecanla beklenmektedir (Carpentier ve ark, 2016).

Günümüze kadar yapılmış olan preklinik ve klinik araştırmaların da gösterdiği gibi kemoterapi ilacının SDT ve mikrokabarcık ile kombine edilmesi, kemoterapi ilacının klinik etkisini arttırabilecek, yaşam kalitesini iyileştirebilecek, sağkalımı uzatabilecek bir uygulamadır. Ayrıca bu üçlü kombinasyon herhangi bir ilave toksisiteye yol açmamaktadır. Kullanılması gereken kemoterapötik ilacın dozunun azalması ve ilacın kanserli bölgeye odaklanması da arttığı için, sağlıklı organlara verilen hasar en aza indirilmektedir.

Mikrokabarcık aracılı ilaç salımı doğrudan ve dolaylı olarak iki şekilde gerçekleşebilmektedir. Doğrudan ilaç salımında ilaç molekülleri mikrokabarcık kabuğunun içine ya da yüzeyine yüklendikten sonra patolojik olan bölgeye geçici ve lokal olarak kontrol edilebilir şekilde salınırlar. Dolaylı ilaç salımında ise ilaç ya da ilaç taşıyıcı sistem mikrokabarcık ve ultrases ile birlikte uygulanmaktadır (Böhmer ve ark, 2010; Lammers ve ark, 2012; F. Y. Yang ve ark, 2011). Bu çalışmada dosetakselin mikrokabarcık destekli sonokemoterapi yöntemi ile uygulandığında meme kanserinde sitotoksik etkisinin arttığının gösterilmesi amaçlanmaktadır. Bu sebeple dolaylı ilaç salım yöntemi tercih edilmiş ve meme kanseri hücrelerine dosetaksel mikrokabarcıklar ile birlikte eş zamanlı olarak uygulanmıştır.

5.2. Sonosensitif Ajanın Seçimi

Sonodinamik terapide sonosensitif ajan olarak porfirin ve türevleri, kemoterapötik ilaçlar, nonsteroid antiinflamatuvarlar ve klorinler gibi pek çok kimyasal kullanılmaktadır (Haijun Chen ve ark, 2014b; Rosenthal ve ark, 2004; Wan ve ark, 2016). Klorin e6 (Ce6) klorofil ekstraktı sonosensitif bir bileşiktir. Daha önce yapılan çalışmalardan, Ce6'nın tümör dokularında selektif olarak birikebildiği, sağlıklı dokulardan çabuk elimine edilebildiği ve toksik etki oluşturmadığı bilinmektedir (B. Chen ve ark, 2013; H. Shi ve ark, 2011).

Li ve arkadaşları insan kronik myelositik lösemi K562 hücreleri üzerinde Ce6 aracılı SDT uygulamasının mitokondri-bağımlı apoptoz yolağını aktive edebildiğini göstermişlerdir (Y. Li, Wang, ve ark, 2014). Wang ve arkadaşları meme kanseri üzerinde Ce6 aracılı SDT uygulamasını araştırdığı çalışmada 4T1, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre çözeltilerini 1 µg/ml Ce6 ile inkübe ettikten sonra ultrases uygulaymış, sonuç olarak bu kombine tedavi ile

mitokondri hasarı ve ROS üretimi üzerinden kanser hücrelerinin apoptoza uğradığını ispatlamışlardır (P. Wang ve ark, 2015).

Chen ve arkadaşlarının insan akciğer adenokarsinom hücresi SPCA-1 üzerinde yaptığı çalışmada Ce6 varlığında/yokluğunda ultrasesin terapötik etkileri incelenmiş, Ce6'nın tümör dokusunda birikim konsantrasyonunun tümör yakınındaki kas dokusuna göre belirgin yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca *in vivo* ortamda ultrases (0,4–1,6 W/cm²) ya da Ce6 (10–40 mg/kg) tek başına uygulandıkları takdirde anlamlı sayılabilecek bir anti-tümör etkisi göstermedikleri, ancak Ce6 ultrases ile (1.6 W/cm²) kombine uygulandığında tümör boyutunda belirgin azalma (p<0,05) olduğu kanıtlanmıştır (B. Chen ve ark, 2013).

Başka bir çalışmada (Haiping Wang ve ark, 2013) meme kanseri MDA-MB-231 hücreleri üzerinde 0,36 W/cm² ve 0,72 W/cm² yoğunluğundaki ultrases ile birlikte çeşitli konsantrasyonlarda Ce6'nın (1, 2, 5, 10 ug/ml) sitotoksik etkisi incelenmiş, ROS üretimi ve mitokondri membran potansiyelindeki azalmanın 0,72 W/cm² yoğunluğundaki ultrases ile yüksek Ce6 konsantrasyonlarında (5 ve 10 µg/ml) daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada da yan etkilerinin azlığı ve benzer araştırmalardaki tedavi başarısının yüksekliği göz önünde bulundurularak, SDT uygulamasında sonosensitif ajan olarak Ce6 kullanılmıştır. Bu amaçla meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücrelerine artan dozlarda Ce6 uygulanmış, MTT analizi ile hücre canlılıkları değerlendirilmiştir. Buna göre Ce6 tedavi uygulaması için hücre canlılığının en yüksek olduğu (%90) doz olan 5 µM dozu seçilmiştir.

5.3. Ultrases Frekans ve Yoğunluğunun Seçilmesi

Sonodinamik terapide ultrases ayarıyla ilgili parametreler mikrokabarcık-hücre etkileşimini arttırarak ya da azaltarak ilaç salım sürecini etkilemektedir. Frekans ve akustik basınç oluşacak kavitasyon çeşidi, tedavi alanının derinliği ve ulaşılacak istenen odak hacmi ile ilişkiliyken, ultrases yoğunluğu ve uygulama süresi gibi diğer parametreler dokudaki ısı artışı ve tedavi düzeyi arasında bir denge kurulmasını sağlamaktadır. 3-5 cm derinliğindeki dokularda ultrasesin absorpsiyonu için yaklaşık 1 MHz frekansında, daha yüzeysel lezyonlar için ise yaklaşık 3 MHz frekansında uygulanması daha uygundur (Speed, 2001). Mikrokabarcık destekli SDT çalışmalarında ise ultrases genellikle 1 MHz frekansına ayarlanmaktadır, çünkü bu düzey standart mikrokabarcık formülasyonlarında ($\pm 3 \mu\text{m}$ boyutunda) kabarcıkların çoğunun rezonans frekansı ile kabaca eşleşmektedir (Roovers ve ark, 2019). Sonodinamik terapide genellikle canlı hücreler üzerinde termal ya da mekanik

etkiler oluşturmıyacak, güvenli olarak kabul edilen düşük yoğunlukta ultrases (0,5-4 W/cm²) kullanılmaktadır (Serpe ve ark, 2012). İlaç alımını arttırmak için 80 kPa- 1,1 MPa aralığında akustik basınç kullanılmaktadır (Kooiman ve ark, 2011; Kudo ve ark, 2009). Bu aralıkta hem kararlı, hem dinamik kavitasyon tetiklenebilmektedir. Bunların dışında ultrasesin uygulama süresi ve atım tekrarı gibi parametrelerin maksimum terapötik düzeyine, çalışılan hücre tipine göre karar verilmelidir.

Bizim çalışmamızda 1x10⁶ konsantrasyonda MCF-7 hücresi süspansiyonu üzerine 1, 1,5 ve 2 W/cm² yoğunlukta ultrases (1 MHz) 20 saniye boyunca uygulanmış, kullanılan en yüksek ultrases yoğunluğunda (2 W/cm²) dahi hücre canlılık oranının %97'nin üzerinde kaldığı gözlenmiştir. Benzer çalışmalara ve bizim ön çalışma verilerimize bağlı olarak tüm deney gruplarımızda 1 MHz frekansında, 2 W/cm² yoğunluğunda, 20 saniye süre ile ultrases uygulaması yapılmıştır.

5.4. Kemoterapötik Ajanın Seçilmesi

Dosetaxel meme kanseri tedavisinde tek başına kullanılmakta olan, taksol grubunun üyesi sistemik etkili bir kemoterapi ilacıdır. Mikrotübül polimerizasyonunu inhibe etme özelliği kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermektedir. Günümüzde başta meme kanseri olmak üzere, over, prostat, mesane, mide ve akciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır 20,21. Molekül ağırlığı 807,9 g/mol'dür. DMSO ve etanolde çözünürken, sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür. Taksol ailesinin diğer üyesi olan paklitaxele göre dosetaxelin hücre içine alımı daha iyi, hücreden atılması daha yavaş, yarı ömrü daha uzun ve tübülünlere karşı afinitesi daha yüksektir. Ayrıca dosetaxel hücre mitozunun hem sentez, hem bölünme fazlarını engelleyebilmektedir. Bütün bu özellikler dosetaxelin kanser tedavisindeki potansini arttırmakta ve kemoterapide tercih edilmesini sağlamaktadır (Ali ve ark, 1995; Díaz ve Andreu, 1993; Marchettini ve ark, 2002).

Dosetakselin hücreyi apoptoza götürmesi üç farklı mekanizma üzerinden gerçekleşmektedir: mikrotübül dinamiklerini bozmak (esas etki), hücre siklusunu kesintiye uğratmak ve Bcl-2' nin fosforilasyonunu indüklemek. Bu mekanizmalar MCF-7 meme kanseri hücre hattı başta olmak üzere, çeşitli insan hücre hatlarında *in vitro* olarak gösterilmiştir (Lyseng-Williamson ve Fenton, 2005).

Dosetakselin antikanser ilaç olarak yaygın kullanımına rağmen, tedavideki başarısını

kısıtlayan bazı etkenler bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi kemik iliğini baskılaması ve hastalarda ajana karşı var olan ya da sonradan gelişen ilaç direncidir. Bu faktörler çoğu zaman ilacın doz kısıtlamasına ya da tedaviye ara verilmesine sebep olmakta, ve süreci olumsuz etkilemektedir (Rowinsky ve ark, 1993). Hemen hemen tüm kemoterapötik ilaçlarda olduğu gibi dosetakselde de yan etkilerin azaltılabilmesi, başarılı bir kanser tedavisi için büyük önem taşımaktadır. Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda desteklendiği üzere, ilaçlar bir takım taşıyıcı sistemlerle aktif veya pasif olara istenilen hedef dokuya yönlendirilebilmekte, ultrases eşliğinde ilacın toksik etkisi arttırılabilmekte, bu sayede çok düşük dozlarda ilaç kullanılarak bile hedef dokuda yüksek ilaç konsantrasyonlarına ulaşılabilir. Böylece yan etkiler veya diğer sağlam dokulara verilen hasar da en aza indirilebilmektedir.

Bu nedenle bu çalışma kapsamında ciddi yan etkileri ve kısıtlamaları olan, ama günümüzde klinikte hala yaygın bir şekilde kullanılmakta olan dosetaksel seçilmiş ve ilaç ultrases eşliğinde taşıyıcı sistemler ile birlikte uygulanarak terapötik etkinliği incelenmiştir.

Bayet-Robert ve arkadaşlarının 2009 yılında MCF-7 hücre hattı çalışmalarında kullanılan dosetaksel dozuna dair yaptıkları araştırmada, %5 DMSO içinde çözündürülerek hazırlanan 5 uM (yüksek doz) ve 1 nM (düşük doz) uygulaması sonuçları karşılaştırılmıştır. Yüksek doz uygulamasında hücre mitozunun uzun süreli durakladığı ve belirgin düzeyde hücre ölümü olduğu gözlemlenmiştir. 1 nM Doc uygulamasında ise hücre çoğalmasında 24 saatte %6,3 ($p<0,05$) mitotik arrest olduğu gösterilmiştir. (Bayet-Robert ve ark, 2010).

İnsan kanser hücre hatları Hs746T (mide), AGS (mide), HeLa (serviks), CaSki (serviks), BxPC3 (pankreas) ve Capan-1 (pankreas) üzerinde dosetakselin IC50 (yarı maksimum inhibitör konsantrasyon) konsantrasyonunun sırasıyla 1 nM, 1 nM, 0,3 nM, 0,3 nM, 0,3 nM ve 0,3 nM olduğu gösterilmiştir (Balcer-Kubiczek ve ark, 2006).

Morse ve arkadaşlarının farklı meme kanseri hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, MCF-7 hücrelerinde 24 saat docetaxel uygulamasında IC50 değerinin 3,87 nM olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada MCF-7 hücreleri 24 saat 10 nM Docetaksel ile inkübe edildiğinde hücre ölümünün %4,5-12,2 olduğu, 100 nM dozu kullanıldığında ise hücre ölümünün %25,4 oranına çıktığı gösterilmiştir (Morse ve ark, 2005).

Bu çalışmada deney gruplarına uygulanan dosetaxel dozuna karar vermek için MCF-7 hücrelerine artan dozlarda dosetaxel uygulaması yapılmış ve MTT analizi ile hücre canlılıkları değerlendirilmiştir. Buna göre hücre canlılık oranının en yüksek (%90) olduğu 1 nM dozu, tedavi dozu olarak kabul edilmiştir. Çalışmada sadece kemoterapötik ajanın değil, mikrokabarcıkların sonokemoterapi ile birlikte kombine olarak uygulanmasının terapötik etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Hücrelerin büyük çoğunluğunu apoptoza

götürecek olan yüksek doz değil, düşük doz olarak değerlendirilen 1 nM dozunun seçilmesi, bu amaçla da tutarlı bir uygulamadır.

5.5. Mikrokabarcık Bileşenlerinin Seçilmesi

Mikrokabarcık ve ultrases kombinasyonu, sonoporasyon ve sonopermeabilizasyon mekanizmaları aracılığıyla damar duvarı ve hücre membran bütünlüğünü etkilemektedir (Karshafian ve ark, 2010; Tran ve ark, 2007). Kararlı ve/veya dinamik kavitasyon sayesinde oluşan bu geçici perforasyon ve artmış endo/transitozis ilacın sınırlı bir süre içinde belirli bir bölgeye salımı için (örneğin solid tümör ya da kan-beyin bariyeri) oldukça yararlı bir durumdur (Derieppe ve ark, 2015; Unger ve ark, 2001; van Wamel ve ark, 2006). Sonoporasyon eşliğinde artmış ilaç salımının altında yatan kesin mekanizma tamamen çözölmüş değildir. Ancak sonoporasyon potensinin mikrokabarcığın kabuk ve içerdığı gaz yapısına bağılı olarak değışkenlik gösterdiği bilinmektedir (H. L. Liu ve ark, 2014; Ting ve ark, 2012). Bu sebeple mikrokabarcık kapsölünü oluşturan bileşenlerin ve mikrokabarcık merkezine yüklenen gazın çeşidi hassasiyetle seçilmelidir.

5.5.1. Mikrokabarcık Kabuğunun Tasarlanması

Mikrokabarcık kabuk bileşenlerinin yapısı mikrokabarcıkların stabilizasyonu için önemli olup, terapötik yükün hedeflenen bölgede ve istenen zamanda mikrokabarcıktan serbestlenmesini sağlamak için önemlidir. Mikrokabarcıkların stabilize edilmesi için çeşitli çalışmalarda hidrofobik kuyruk ve hidrofilik kafa gruplarından oluşan tek tabakalı bir lipid kapsöl kullanılmıştır (Ibsen ve ark, 2011; McEwan ve ark, 2015). Bu lipid tabakası, mikrokabarcık ultrasese maruz kaldığında parçalanarak içerisindeki hidrofobik yükü hedef bölgeye (tümör dokusu) serbest bırakmaktadır.

Kabukları lipid materyalden oluşan mikrokabarcık tasarımları modifiye edilerek hem lipofilik hem lipofobik ilaç ve/veya ajanların taşınması mümkün kılınabilmektedir (Ine Lentacker ve ark, 2009; Roovers ve ark, 2019; Sirsi ve Borden, 2009). Borden ve arkadaşları daha uzun yağ asidi zincirlerinin, kabuk stabilizasyonunu arttırdığını, mikrokabarcığın çözölmeye karşı daha dirençli hale getirdiğini kanıtlamıştır (Borden ve ark, 2005). Bu durum yüksek kohezite (moleküller arası çekim kuvveti) ve bu tür kabukların esnekliği ile

açıklanabilmektedir. Van Rooij ve arkadaşları DPPC (16 karbonlu) bazlı mikrokabarcıkların akustik stabilitesinin DSPC (18 karbonlu) türevlerine göre daha düşük olduğunu göstererek bu durumu doğrulamışlardır (van Rooij ve ark, 2015). Kooiman ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da kabuk yapısında DSPC bulunan kabarcıkların çözünmeye karşı daha dirençli olduğunu göstermiştir (Kooiman, Kokhuis, ve ark, 2014).

Bu veriler ışığında bizim çalışmamızda da kabuk stabilizasyonunu daha güçlü sağlaması sebebiyle, uzun yağ asidi zincirli bir fosfolipid olan DSPC tercih edilmiştir.

5.5.2. Mikrokabarcık Çekirdeğinin Tasarlanması

Perflorokarbon gazının çözünürlüğünün düşük olması, *in vivo* ortamda mikrokabarcıkların dolaşımında daha uzun süre kalabilmelerini sağlamaktadır (Podell ve ark, 1999). Böylece mikrokabarcığın yarı ömrü uzamakta, mikrokabarcık hedeflenen bölgede istenilen zamanda patlatılabilmesi kolaylaşmaktadır. Çalışmamızda bu sebeple bir perflorokarbon türevi olan C3F8 oktofloropropan gazı kullanılmıştır.

5.6. Mikrokabarcık Karakterizasyon Çalışmaları

Işık mikroskopunda mikrokabarcıkların yaklaşık çapı 1-2 μm , konsantrasyonu 1×10^9 mikrokabarcık/ml olarak belirlenmiştir. Bu boyut ve konsantrasyon ölçümleri, mikrokabarcık uygulamalarının yapıldığı daha önceki çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (McEwan ve ark, 2015).

5.7. MCF-7 Hücre Hattında Toksisite Çalışmaları

Sonokemoterapinin *in vitro* etkinliğini belirlemek için preklinik çalışmalarda rutin olarak kullanılan insan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 96 kuyucuklu plate'lere ekilmiştir. Hücrelerin tedavi grupları şu şekilde uygulanmıştır: (i) kontrol, (ii) mikrokabarcık(MK)/US, (iii) Ce6 + DOC, (iv) DOC + MK/US, (v) Ce6 + MK/US, (vi) Ce6 + DOC + MK/US. Bütün deney gruplarında kullanılan Ce6 ve Dosetaxel dozları sırasıyla 5 μM ve 1 nM olarak aynı tutulmuştur.

5.7.1. Hücre Canlılık Analizi

Çalışmamızın sonuçlara göre hücre canlılığı en düşük grup, mikrokabarcık destekli sonokemoterapi ile tedavi edilen grup (Ce6+DOC+MK/US grubu) olarak tespit edilmiş, bu grup ile diğer gruplar arasında anlamlı fark ($p<0.0001$) bulunmuştur.

Sadece SDT uygulanan grupta (Ce6 + DOC grubu) hücre canlılığı %89, sonokemoterapi uygulanan grupta (DOC + MK/US) hücre canlılığı %70,68, mikrokabarcık ve SDT uygulanan grupta (Ce6 + MK/US) %68,42, mikrokabarcık ve sonokemoterapi grubunda (Ce6 + DOC + MK/US) ise %58,46'dır.

Logan ve arkadaşlarının 2019 yılında MCF-7 hücre hattında ultrases hedefli mikrokabarcık yıkımı yöntemi ile Rose-Bengal aracılı SDT ve paklitaksel-doksorubisin kemoterapisini kombine etmişler, mikrokabarcık ile sonokemoterapinin birlikte uygulandığı grupta hücre canlılığında %72,6 oranında bir azalma ($p<0,001$) olduğunu göstermişlerdir (Logan ve ark, 2019). Nesbitt ve arkadaşlarının 2018 yılında pankreas kanseri hücreleri üzerinde gemtisabin destekli sonokemoterapi ile mikrokabarcıkların kombine etkisini inceledikleri çalışmada hücre canlılığında %60'ın üzerinde bir azalma olduğunu ($p<0,001$) göstermişlerdir (Nesbitt ve ark, 2018). McEwan ve arkadaşlarının pankreas kanserinde 5-Florourasil ile kombine edilmiş MK/US'nin terapötik etkinliğini *in vivo* ve *in vitro* çalışmada da (McEwan ve ark, 2016), sonokemoterapi uygulanan grupta tümör hücre canlılık oranının yaklaşık %60 oranında azaldığı, bu düşüşün de kemoterapi ajanının ya da SDT'nin tek başına uygulanmasına göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu ($p<0.01$) gösterilmiştir.

5.7.3. Oksidatif Stres

Ultrases ve mikrokabarcık yokluğunda Ce6 ve dosetakselin birlikte uygulamasındaki etkinlik yetersizliği, ilaçların sub-lethal dozları kullanıldığından şaşırtıcı değildi. Bununla birlikte, ultrases ve mikrokabarcık maruziyetini takiben tümör hücrelerindeki sitotoksik etkinin önemli oranda artıyor olması, dosetakselin hücre içine alımını artıran bir sonoparatif etkiden kaynaklanabilir. Kombine dosetaksel, mikrokabarcık ve SDT tedavi grubunda hücre koloni sayısındaki en büyük düşüşün gözlemlenmesi, bu üç tedavinin birbirini tamamladığını ve gözlenen genel sitotoksik etkiyi arttırdığını göstermektedir.

Günümüze kadar mikrokabarcık destekli sonokemoterapi yöntemi üzerine yapılmış sınırlı sayıdaki araştırma değerlendirildiğinde, hücre canlılık analizine dair çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerin geçmiş sonuçlarla korele olduğu görülmektedir. Bu durum, mikrokabarcık destekli sonokemoterapiyi, geleneksel kanser tedavi yöntemlerine alternatif olan çığır açıcı bir uygulama yapmaktadır.

5.7.2. Apoptoz Bulguları

Deney gruplarının erken apoptotik yüzdeleri karşılaştırıldığında, mikrokabarcık ve SDT'nin birlikte uygulandığı gruplarda (Ce6+MK/US ve Ce6+DOC+MK/US grupları) erken apoptotik hücre yüzdesi sırayla %14,53 ve %13,62 olup, bu oranlar diğer gruplara göre anlamlı ve belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Geç apoptoz değerlendirildiğinde ise, dosetaksel ve mikrokabarcığın birlikte uygulandığı gruplarda apoptoz yüzdesi sırasıyla %21,06 ve %18,75 olup, diğer gruplara göre anlamlı yüksektir ($p<0,001$). Toplam apoptoz yüzdeleri değerlendirildiğinde ise en yüksek apoptoz oranı (%32,36), sonokemoterapinin mikrokabarcıklarla birlikte uygulandığı gruptadır. Elde edilen veriler Docetaxelin daha çok geç apoptozu, Ce6 ve ultrasesin ise daha çok erken apoptozu tetiklediğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda Hoechst boyama ile tespit edilen floresan mikroskopik apoptoz bulguları ile Annexin-5 apoptoz kitinden elde edilen sonuçlar birbirini desteklemektedir.

Daigeler ve arkadaşlarının 2010 yılında mikrokabarcık destekli SDT ve taurolidin ilacının sinerjistik etkilerini ve insan fibrosarkoma hücreleri üzerinde apoptotik etkilerini inceledikleri çalışmada, mikrokabarcık destekli sonokemoterapi uygulamasında apoptoz oranının yaklaşık %55'e ulaştığı, bu oranın diğer tedavi gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu ($p<0,001$) gösterilmiştir (Daigeler ve ark, 2010).

5.7.3. Oksidatif Stres

Çalışmamızda reaktif oksijen türevlerinin ölçümüyle belirlenen oksidatif stres bulguları değerlendirildiğinde, mikrokabarcık destekli sonokemoterapi grubunda (Ce6+DOC+MK/US) oksidatif stresin en yüksek olduğu gözlenmiştir. ROS üretiminin en yüksek olduğu ikinci grup ise, Ce6 ile mikrokabarcıkların ultrases ile birlikte uygulandığı Ce6+MK/US grubudur.

Oksidatif stres, hücre içinde reaktif oksijen türevlerinin artması sonucu DNA, protein ve lipid hasarı oluşmasıdır. Wan ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada SDT'nin yüksek miktarda hücre içi ROS oluşumunu tetikleyerek malign hücrelerde doğrudan sitotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir (Wan ve ark, 2016).

Sonodinamik terapide kararlı ve dinamik kavitasyonlar, ultrasesin uygulandığı bölgede çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucu serbest radikal ve singlet oksijen oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca özellikle dinamik kavitasyon sırasında ortaya çıkan enerji, sonosensitif ajanları aktifleştirerek ROS üretimine neden olmakta, böylece hücrenin apoptozunu tetiklemektedir. Ancak sonosensitif ajan olmadan ultrases uygulanan hücrelerde apoptozun kimyasal değil, fiziksel mekanizmalar üzerinden tetikleniyor olması (Rosenthal ve ark, 2004), sonosensitif ajanın ROS üretimi ve oksidatif hasar oluşumundaki önemini göstermektedir. Sonosensitif ajanın aktifleşmesi sonrası hücre içinde oluşan ROS, mitokondri membran hasarı ve sitokrom c yolu üzerinden de hücrenin apoptozunu sağlamaktadır (Wan ve ark, 2016).

Wang ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladıkları bir çalışmada karaciğer kanser hücreleri üzerinde oridonin kemoterapi ilacını protohemin sonosensitif ajanı ile birlikte mikrokabarcık destekli sonokemoterapi uygulamalarında kullanmışlar, en yüksek ROS üretiminin bu grupta olduğunu göstermişlerdir (Wang ve ark, 2019). Yine Wang ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada meme kanseri hücre hatlarında da Ce6 aracılı sonodinamik terapinin ROS üretimi ve mitokondri hasarı üzerinden apoptozu indüklediği bildirmiştir (P. Wang ve ark, 2015).

Mikrokabarcıkların da oluşturdukları kavitasyon etkisi sırasında ROS üretimi ile oksidatif hasara neden oldukları bilinmektedir. Mikrokabarcık kaynaklı ROS, BKCa kalsiyum kanallarını aktive ederek hücrenin hiperpolarize olmasını sağlar, endositozu tetikler ve membran bütünlüğünün bozulmasına sebep olur (Van Bavel ve ark, 2007, Lariccia ve ark, 2011, Juffermans ve ark, 2008). Çalışmamızda ROS üretiminin mikrokabarcık ve Ce6'nın birlikte uygulandığı gruplarda en fazla olması, oksidatif hasarın oluşumunda Ce6 ve mikrokabarcıkların sinerjistik etki ile çalıştıklarını göstermektedir.

5.7.4. Mitokondri Membran Potansiyeli

Mitokondri membranının depolarizasyonu mitokondri hasarını yansıtmaktadır. Sonokemoterapi grubundaki hücrelerin büyük çoğunluğunun mitokondri membran potansiyellerinin değiştiği görülmektedir. Li ve arkadaşları, insan kronik miyelojenöz lösemi

K562 hücrelerinde Ce6 aracılı SDT uygulaması yapmış, Ce6'nın mitokondri membran potansiyelini bozarak apoptozu tetikleyebileceğini göstermişlerdir. Wang ve arkadaşlarının 2015'te yaptığı çalışmada meme kanseri hücre hatlarında Ce6 aracılı sonodinamik terapinin mitokondriyel hasara neden olduğu ve ROS üretimiyle apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Wang ve ark, 2015).

Çalışmamızda elde ettiğimiz mitokondri membran hasarı sonuçları, daha önce Ce6 ile yapılan sonodinamik çalışmalarıyla paralellik göstermektedir. Bu da mikrokabarcık destekli sonokemoterapide, sonosensitif ajan olarak Ce6 kullanmanın, apoptozu mitokondriyal yolak üzerinden de uyurabileceğini göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mikrokabarcıklar MCF-7 meme kanseri hücrelerinde sonokemoterapinin sitotoksik etkisini arttırarak kanser tedavisinde daha güçlü yanıt alınmasını sağlamaktadır. Bu sitotoksik etkiler çalışmamızda hücre sağkalımının azalması, apoptozun artması, oksidatif hasarın tetiklenmesi ve mitokondri membran potansiyelinin bozulmasının gösterilmesi ile kanıtlanmıştır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler, mikrokabarcık destekli sonokemoterapinin meme kanseri tedavisinde etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Mikrokabarcıkların lokalize uygulanan ultrases ile istenilen zamanda, istenilen bölgede patlatılabilmesi, mikrokabarcık ve SDT'nin lokalize etkilerinin yanı sıra, kemoterapötik ajanın da sadece hedef bölgede etki göstermesini sağlamaktadır. Bu durum hedefe yönelik tedavinin başarısını arttırmaktadır.

Mikrokabarcık destekli sonokemoterapide kullanılan Dosetaksel dozu, konvansiyonel kemoterapi dozundan daha düşüktür. Bu yöntemde tedavi etkinliği daha yüksek olmasının yanında, kullanılan dozun azalmasından dolayı kemoterapi ilacının sağlıklı dokulara yaptığı yan etkileri minimuma inmektedir. Tedavide kullanılan bileşenlerden her biri (mikrokabarcıklar, dosetaksel, klorin E6, ultrases) daha önceki çalışmalarda insanlarda güvenle kullanıldığından dolayı, çalışmada kullandığımız tedavi yaklaşımı da hızla klinik uygulamaya geçirilebilecek bir imkan sağlamaktadır.

Farklı kanser hücreleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* ortamda yapılacak ileri çalışmalar ile, mikrokabarcık destekli sonokemoterapi yöntemi teknolojisi geliştirilerek, sadece meme kanseri değil, diğer kanser türlerinde de klinik uygulamaya aktarılabilecek etkili bir yöntem olacaktır.

KAYNAKLAR

Acconcia CN, Leung BYC, Goertz DE. The microscale evolution of the erosion front of blood clots exposed to ultrasound stimulated microbubbles. *The Journal of the Acoustical Society of America* 2016, 139(5), 135-141.

Aksel M, Bozkurt Girit Ö, Bilgin MD. Pheophorbide a-mediated Sonodynamic, Photodynamic and Sonophotodynamic Therapies Against Prostate Cancer. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2020, 31, 10909.

Albrecht T, Blomley M, Bolondi L, Claudon M, Correas JM, Cosgrove D, Stanford G. Guidelines for the use of contrast agents in ultrasound: January 2004. *Ultraschall in der Medizin* 2004, 25(4), 249-256.

Ali SM, Hoemann MZ, Aubé J, Mitscher LA, Georg GI, McCall R, Jayasinghe LR. Novel Cytotoxic 3-(tert-Butyl) 3'-Dephenyl Analogs of Paclitaxel and Docetaxel. *Journal of Medicinal Chemistry* 1995, 38(19), 3821-3828.

Allen TM, Cleland LG. Serum-induced leakage of liposome contents. *BBA - Biomembranes* 1980, 597(2), 418-426.

Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *BBA - Biomembranes* 1991, 1066(1), 29-36.

Amabile PG, Waugh JM, Lewis TN, Elkins CJ, Janas W, Dake MD. High-efficiency endovascular gene delivery via therapeutic ultrasound. *Journal of the American College of Cardiology* 2001, 37(7), 1975-1980.

American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. Side Effects of Medical Cancer Therapy: Prevention and Treatment: Second Edition 2018, s 43-63.

Ando H, Feril LB, Kondo T, Tabuchi Y, Ogawa R, Zhao QL, ... Misaki T. An echo-contrast agent, Levovist, lowers the ultrasound intensity required to induce apoptosis of human leukemia cells. *Cancer Letters* 2006, 242(1), 37-45.

Anitha A, Sowmya S, Kumar PTS, Deepthi S, Chennazhi KP, Ehrlich H, Jayakumar R. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 2014, 31(7), 603-632.

Apodaca G. Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 2002, 282(2), 179-190.

Ashush H, Rozenszajn LA, Blass M, Barda-Saad M, Azimov D, Radnay J, Zipori D, Rosenschein U. Apoptosis induction of human myeloid leukemic cells by ultrasound exposure. *Cancer Research* 2000, 60(4), 1014-1020.

Bader KB, Holland CK. Gauging the likelihood of stable cavitation from ultrasound contrast agents. *Physics in Medicine and Biology* 2013, 58(1), 127-144.

Bai W-K, Shen E, Hu B. The induction of the apoptosis of cancer cell by sonodynamic therapy: a review. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu* 2012, 24(4), s 368–373.

Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Physical therapy* 2001, 81, s 1351–1358.

Balcer-Kubiczek EK, Attarpour M, Jiang J, Kennedy AS, Suntharalingam M. Cytotoxicity of docetaxel (Taxotere®) used as a single agent and in combination with radiation in human gastric, cervical and pancreatic cancer cells. *Chemotherapy* 2006, 52(5), 231-240.

Bao S, Thrall BD, Miller DL. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound in Medicine and Biology* 1997, 23(6), 953-959.

Baskaran R, Lee J, Yang S-G. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomaterials Research* 2018, 22(1), 25.

Basoglu H, Bilgin MD, Demir MM. Protoporphyrin IX-loaded magnetoliposomes as a potential drug delivery system for photodynamic therapy: Fabrication, characterization and in vitro study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2016, 13, s 81–90.

Basta G, Venneri L, Lazzerini G, Pasanisi E, Pianelli M, Vesentini N, Picano E. In vitro modulation of intracellular oxidative stress of endothelial cells by diagnostic cardiac

ultrasound. *Cardiovascular Research* 2003, 58(1), 156-161.

Bayet-Robert M, Morvan D, Chollet P, Barthomeuf C. Pharmacometabolomics of docetaxel-treated human MCF7 breast cancer cells provides evidence of varying cellular responses at high and low doses. *Breast cancer research and treatment* 2010, 120(3), 613–626.

Beguin E, Shrivastava S, Dezhkunov N V., Mchale AP, Callan JF, Stride E. Direct Evidence of Multibubble Sonoluminescence Using Therapeutic Ultrasound and Microbubbles. *ACS Applied Materials and Interfaces* 2019, 11(22), 19913-19919.

Bekeredjian R, Katus HA, Kuecherer HF, Bekeredjian R. Therapeutic use of ultrasound targeted microbubble destruction: A review of non-cardiac applications. *Ultraschall in der Medizin* 2006, 27(2), 134–140.

Benezra M, Penate-Medina O, Zanzonico PB, Schaer D, Ow H, Burns A, Bradbury MS. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *Journal of Clinical Investigation* 2011, 121(7), 2768-2780.

Benjamin, T.B. and Ellis A. The collapse of cavitation bubbles and the pressure thereby produced against solid boundaries. *Philosophical Transactions Of The Royal Society London A* 1996, 260, 221-240.

Beretta GL, Zunino F. Molecular mechanisms of anthracycline activity. *Topics in Current Chemistry* 2007, 283.

Bernard V, Mornstein V, Škorpíková J, Jaroš J. Ultrasound and cisplatin combined treatment of human melanoma cells A375 the study of sonodynamic therapy. *Ultrasound in medicine & biology* 2012, 38(7), 1205–1211.

Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 2000, 21(6), 167-223.

Bilgin MD, Ozlem Caliskan S. Photodynamic Therapy. The most recent studies in sciences and art 2018, 2, 1190-1206.

Biswas R, Moon JH, Ahn JC. Chlorin e6 derivative radachlorin mainly accumulates in mitochondria, lysosome and endoplasmic reticulum and shows high affinity toward tumors in

nude mice in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* 2014, 90(5), 1108-1118.

Bogeski I, Kappl R, Kummerow C, Gulaboski R, Hoth M, Niemeyer BA. Redox regulation of calcium ion channels: Chemical and physiological aspects. *Cell Calcium* 2011, 50(5), 407-423.

Böhmer MR, Chlon CHT, Raju BI, Chin CT, Shevchenko T, Klibanov AL. Focused ultrasound and microbubbles for enhanced extravasation. *Journal of Controlled Release* 2010, 148(1), 18-24.

Borden MA, Kruse DE, Caskey CF, Zhao S, Dayton PA, Ferrara KW. Influence of lipid shell physicochemical properties on ultrasound-induced microbubble destruction. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 2005, 52(11), 1992-2002.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018, 68(6), 394-424.

Brayman AA, Coppage ML, Vaidya S, Miller MW. Transient poration and cell surface receptor removal from human lymphocytes in vitro by 1 MHz ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology* 1999, 25(6), 999-1008.

Buhleier E, Wehner W, Vögtle F. “Cascade”- And “non-skid-chain-like” syntheses of molecular cavity topologies. *Synthesis* 1978, 2, 155-158.

Burkard ME, Van Liew HD. Oxygen transport to tissue by persistent bubbles: Theory and simulations. *Journal of Applied Physiology* 1994, 77(6), 2874-2878.

Carpentier A, Canney M, Vignot A, Reina V, Beccaria K, Horodyckid C, Idhah A. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Science Translational Medicine* 2016, 8, 343.

Caskey CF, Qin S, Dayton PA, Ferrara KW. Microbubble tunneling in gel phantoms. *The Journal of the Acoustical Society of America* 2009, 125(5), 183.

Chan ESL, Cronstein BN. Mechanisms of action of methotrexate. *Bulletin of the Hospital*

for Joint Diseases 2013, 71(1), 5–8.

Chan WM, Lim TH, Pece A, Silva R, Yoshimura N. Verteporfin PDT for non-standard indications-a review of current literature. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2010, 248(5), 613-626.

Chang X, Liu J, Liao X, Liu G. Ultrasound-mediated microbubble destruction enhances the therapeutic effect of intracoronary transplantation of bone marrow stem cells on myocardial infarction. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015, 8(2), 2221–2234.

Chappell JC, Price R. Targeted therapeutic applications of acoustically active microspheres in the microcirculation. *Microcirculation* 2006, 13(1), 57-70.

Chen B, Zheng R, Liu D, Li B, Lin J, Zhang W. The tumor affinity of chlorin e6 and its sonodynamic effects on non-small cell lung cancer. *Ultrasonics sonochemistry* 2013, 20(2), 667–673.

Chen F, Li Y, Feng Y, He X, Wang L. Evaluation of Antimetastatic Effect of lncRNA-ATB siRNA Delivered Using Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction. *DNA and Cell Biology* 2016, 35(8), 393–397.

Chen Haijun, Zhou X, Gao Y, Zheng B, Tang F, Huang J. Recent progress in development of new sonosensitizers for sonodynamic cancer therapy. *Drug discovery today* 2014a, 19(4), 502–509.

Chen Haijun, Zhou X, Gao Y, Zheng B, Tang F, Huang J. Recent progress in development of new sonosensitizers for sonodynamic cancer therapy. *Drug Discovery Today* 2014b, 19(4), 502-509.

Chen Hong, Brayman AA, Kreider W, Bailey MR, Matula TJ. Observations of translation and jetting of ultrasound-activated microbubbles in mesenteric microvessels. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2011, 37(12), 2139-2148.

Chen WS, Brayman AA, Matula TJ, Crum LA, Miller MW. The pulse length-dependence of inertial cavitation dose and hemolysis. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2003, 29(5), 739-748.

Chen X, Leow RS, Hu Y, Wan JMF, Yu ACH. Single-site sonoporation disrupts actin cytoskeleton organization. *Journal of the Royal Society Interface* 2014, 11, 95.

Claudon M, Dietrich CF, Choi BI, Cosgrove DO, Kudo M, Nolsøe CP, Xu HX. Guidelines and Good Clinical Practice Recommendations for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) in the Liver - Update 2012. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2013, 39(2), 187-210.

Costley D, Mc Ewan C, Fowley C, McHale AP, Atchison J, Nomikou N, Callan JF. Treating cancer with sonodynamic therapy: A review. *International Journal of Hyperthermia* 2015, 6736(2), 1–11.

Cree IA. Cancer biology. *Methods in Molecular Biology* 2011, 731, 1-11.

Daigeler A, Chromik AM, Haendschke K, Emmelmann S, Siepmann M, Hensel K, ... Hauser J. Synergistic effects of sonoporation and taurolidin/TRAIL on apoptosis in human fibrosarcoma. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2010.

Dayton P, Klibanov A, Brandenburger G, Ferrara K. Acoustic radiation force in vivo: A mechanism to assist targeting of microbubbles. *Ultrasound in Medicine and Biology* 1999, 25(8), 1195-1201.

De Temmerman ML, Dewitte H, Vandenbroucke RE, Lucas B, Libert C, Demeester J, Rejman J. mRNA-Lipoplex loaded microbubble contrast agents for ultrasound-assisted transfection of dendritic cells. *Biomaterials* 2011, 32(34), 9128-9135.

Delgado JL, Hsieh CM, Chan NL, Hiasa H. Topoisomerases as anticancer targets. *Biochemical Journal* 2018, 475(2), 373-398.

Derieppe M, Rojek K, Escoffre JM, De Senneville BD, Moonen C, Bos C. Recruitment of endocytosis in sonopermeabilization-mediated drug delivery: A real-time study. *Physical Biology* 2015, 12(4), 4-6.

Devi GR. siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer Gene Therapy* 2006, 13(9), 819-829.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension* 2000, 18(6), 655-673.

Díaz JF, Andreu JM. Assembly of Purified GDP-Tubulin into Microtubules Induced by Taxol and Taxotere: Reversibility, Ligand Stoichiometry, and Competition. *Biochemistry* 1993, 32(11), 2747-2755.

Dimceviski G, Kotopoulis S, Bjånes T, Hoem D, Schjøl J, Gjertsen BT, Gilja OH. A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer. *Journal of Controlled Release* 2016, 243, 172-181.

Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews. Cancer* 2003, 3, 380–387.

Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *Journal of the National Cancer Institute* 1975, 55(1), 115-121.

Dufrène YF, Barger WR, Green JBD, Lee GU. Nanometer-scale surface properties of mixed phospholipid monolayers and bilayers. *Langmuir* 1997, 13(18), 4779-4784.

Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: A dynamic field of cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010, 9(10), 790-803.

Duvshani-Eshet M, Benny O, Morgenstern A, Machluf M. Therapeutic ultrasound facilitates antiangiogenic gene delivery and inhibits prostate tumor growth. *Molecular Cancer Therapeutics* 2007, 6(8), 2371-2382.

Dy GK, Adjei AA. Understanding, recognizing, and managing toxicities of targeted anticancer therapies. *CA: a cancer journal for clinicians* 2013, 63, 249–279.

Etame AB, Diaz RJ, Smith CA, Mainprize TG, Hynynen K, Rutka JT. Focused ultrasound disruption of the blood-brain barrier: a new frontier for therapeutic delivery in molecular neurooncology. *Neurosurgical focus* 2012, 32(1), 1-8.

Feril L. B., Kondo T, Takaya K, Riesz P. Enhanced ultrasound-induced apoptosis and cell lysis by a hypotonic medium. *International Journal of Radiation Biology* 2004, 80(2), 165-175.

Feril Loreto B., Kondo T, Ogawa R, Zhao QL. Dose-dependent inhibition of ultrasound-induced cell killing and free radical production by carbon dioxide. *Ultrasonics Sonochemistry*

2003, 10(2), 81-84.

Feril Loreto B., Kondo T, Zhao QL, Ogawa R, Tachibana K, Kudo N, Nakamura S. Enhancement of ultrasound-induced apoptosis and cell lysis by echo-contrast agents. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2003, 29(2), 331-337.

Feril Loreto B., Tsuda Y, Kondo T, Zhao QL, Ogawa R, Cui ZG, Riesz P. Ultrasound-induced killing of monocytic U937 cells enhanced by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. *Cancer Science* 2004, 95(2), 181-185.

Ferrara K, Pollard R, Borden M. Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2007, 9(1), 415-447.

Flint EB, Suslick KS. The temperature of cavitation. *Science* 1991, 253(5026), 1397-1399.

Forbes MM, Steinberg RL, O'Brien WD. Frequency-dependent evaluation of the role of definity in producing sonoporation of Chinese hamster ovary cells. *Journal of Ultrasound in Medicine* 2011, 30(1), 61-69.

Forsberg F, Goldberg BB, Liu J Bin, Merton DA, Rawool NM, Shi WT. Tissue-specific US contrast agent for evaluation of hepatic and splenic parenchyma. *Radiology* 1999, 210(1), 125-132.

Frenkel PA, Chen S, Thai T, Shohet R V., Grayburn PA. DNA-loaded albumin microbubbles enhance ultrasound-mediated transfection in vitro. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2002, 28(6), 817-822.

Gao H jie, Zhang W min, Wang X huai, Zheng R nian. Adriamycin enhances the sonodynamic effect of chlorin e6 against the proliferation of human breast cancer MDA-MB-231 cells in vitro. *Journal of Southern Medical University* 2010, 29(10), 2291-2294.

Geis N, Katus H, Bekerredjian R. Microbubbles as a Vehicle for Gene and Drug Delivery: Current Clinical Implications and Future Perspectives. *Current Pharmaceutical Design* 2012, 18(15), 2166-2183.

Gordon MS, Mendelson DS, Kato G. Tumor angiogenesis and novel antiangiogenic strategies. *International Journal of Cancer* 2010, 126(8), 1777-1787.

- Grayburn PA.** Current and future contrast agents. *Echocardiography* 2002, 19(3), 259-265.
- Gulati M, Grover M, Singh S, Singh M.** Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 1998, 165(2), 129-168.
- Guzmán HR, Nguyen DX, Khan S, Prausnitz MR.** Ultrasound-mediated disruption of cell membranes. II. Heterogeneous effects on cells. *The Journal of the Acoustical Society of America* 2001, 110(1), 597.
- Haar G. Ter.** Ultrasound bioeffects and safety. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: *Journal of Engineering in Medicine* 2010, 224(2), 363-373.
- Hallow DM, Mahajan AD, McCutchen TE, Prausnitz MR.** Measurement and correlation of acoustic cavitation with cellular bioeffects. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2006, 32(7), 1111-1122.
- Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Friedenreich CM, Calle EE, Fukao A.** Menarche, menopause, and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet Oncology* 2012, 13(11), 1141-1151.
- Harrison GH, Balcer-Kubiczek E, Gutierrez PL.** In vitro mechanisms of chemopotential by tone-burst ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology* 1996, 22(3), 355-362.
- Hernot S, Klibanov AL.** Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008, 60(10), 1153–1166.
- Hu CMJ, Fang RH, Copp J, Luk BT, Zhang L.** A biomimetic nanosponge that absorbs pore-forming toxins. *Nature Nanotechnology* 2013, 8(5), 336-340.
- Hu CMJ, Zhang L, Aryal S, Cheung C, Fang RH, Zhang L.** Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108(27), 10980-10985.
- Huang D, Okada K, Komori C, Itoi E, Suzuki T.** Enhanced antitumor activity of ultrasonic irradiation in the presence of new quinolone antibiotics in vitro. *Cancer Science* 2004, 95(10), 845-849.

Huang SL, McPherson DD, MacDonald RC. A Method to Co-Encapsulate Gas and Drugs in Liposomes for Ultrasound-Controlled Drug Delivery. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2008, 34(8), 1272–1280.

Humphrey VF. Ultrasound and matter-Physical interactions. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2007, 93(1–3), 195–211.

Hutcheson JD, Schlicher RK, Hicks HK, Prausnitz MR. Saving cells from ultrasound-induced apoptosis: Quantification of cell death and uptake following sonication and effects of targeted calcium chelation. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2010,36(6), 1008-1021.

Hwang JH, Brayman AA, Reidy MA, Matula TJ, Kimmey MB, Crum LA. Vascular effects induced by combined 1-MHz ultrasound and microbubble contrast agent treatments in vivo. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2005, 31(4), 553-564.

Hynynen K. Ultrasound for drug and gene delivery to the brain. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008, 60(10), 1209-1217.

Ibsen S, Benchimol M, Simberg D, Schutt C, Steiner J, Esener S. A novel nested liposome drug delivery vehicle capable of ultrasound triggered release of its payload. *Journal of Controlled Release* 2011, 155(3), 358-366.

Immordino ML, Dosio F, Cattell L. Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine* 2006, 1(3), 297-309.

Inui T, Makita K, Miura H, Matsuda A, Kuchiiike D, Kubo K, Sakamoto N. Case report: A breast cancer patient treated with GcMAF, sonodynamic therapy and hormone therapy. *Anticancer Research*, 34(8), 4589-4593.

Jakobsen JÅ, Oyen R, Thomsen HS, Morcos SK, Almén T, Aspelin P, Webb JAW. Safety of ultrasound contrast agents. *European Radiology* 2005, 15(5), 941-945.

Jang HJ, Yu H, Kim TK. Imaging of Focal Liver Lesions. *Seminars in Roentgenology* 2009, 44(4), 266-282.

Janib SM, Moses AS, MacKay JA. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010, 62(11), 1052-1063.

Juffermans L. J.M., Dijkmans PA, Musters RJP, Visser CA, Kamp O. Transient permeabilization of cell membranes by ultrasound-exposed microbubbles is related to formation of hydrogen peroxide. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2006, 291(4), 1595-1601.

Juffermans Lynda J.M., Kamp O, Dijkmans PA, Visser CA, Musters RJP. Low-Intensity Ultrasound-Exposed Microbubbles Provoke Local Hyperpolarization of the Cell Membrane Via Activation of BKCa Channels. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2008, 34(3), 502-508.

Juffermans Lynda J.M., van Dijk A, Jongenelen CAM, Drukarch B, Reijerkerk A, de Vries HE, Musters RJP. Ultrasound and Microbubble-Induced Intra- and Intercellular Bioeffects in Primary Endothelial Cells. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2009, 35(11), 1917-1927.

Kabalinov A, Bradley JA, Flaim S, Klein D, Pelura T, Peters B, Weers J. Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream: 2. Experiment. *Ultrasound in Medicine and Biology* 1998, 24(5), 751-760.

Karshafian R, Samac S, Bevan PD, Burns PN. Microbubble mediated sonoporation of cells in suspension: Clonogenic viability and influence of molecular size on uptake. *Ultrasonics* 2010.

Kesharwani P, Jain K, Jain NK. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Progress in Polymer Science* 2014.

Khoury A, Deo KM, Aldrich-wright JR. Recent advances in platinum-based chemotherapeutics that exhibit inhibitory and targeted mechanisms of action. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2020, s 111070.

Klazina Kooiman, Silke Roovers, Simone A.G. Langeveld, Robert T. Kleven, Heleen Dewitte, Meaghan A. O'reilly, Jean-Michel Escoffre, Ayache Bouakaz, Martin D. Verweij, Kullervo Hynynen, Ine Lentacker ESACKH. Ultrasound-responsive cavitation nuclei for therapy and drug delivery. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2020, 46(6), 1296–1325.

Koczera P, Appold L, Shi Y, Liu M, Dasgupta A, Pathak V, ... Lammers T. PBCA-based

polymeric microbubbles for molecular imaging and drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2017, 259, s 128–135.

Kondo T, Mišík V, Riesz P. Effect of gas-containing microspheres and echo contrast agents on free radical formation by ultrasound. *Free Radical Biology and Medicine* 1998, 25(4-5), 605-612.

Kong J, Yi L, Xiong Y, Huang Y, Yang D, Yan X, Zhu X. The discovery and development of microbial bleomycin analogues. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018, 102(16), 6791-6798.

Konofagou EE. Optimization of the ultrasound-induced blood-brain barrier opening. *Theranostics* 2012, 2(12), 1223-1237.

Kooiman K, Foppen-Harteveld M, Der Steen AFWV, De Jong N. Sonoporation of endothelial cells by vibrating targeted microbubbles. *Journal of Controlled Release* 2011, 154(1) 35-41.

Kooiman K, Kokhuis TJA, van Rooij T, Skachkov I, Nigg A, Bosch JG, van der Steen A, van Cappellen W, de Jong N. DSPC or DPPC as main shell component influences ligand distribution and binding area of lipid-coated targeted microbubbles. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2014, 116(9), 1217-1227.

Kooiman K, Vos HJ, Versluis M, De Jong N. Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2014, 72, 28–48.

Kotopoulos S, Dimcevski G, Helge Gilja O, Hoem D, Postema M. Treatment of human pancreatic cancer using combined ultrasound, microbubbles, and gemcitabine: A clinical case study. *Medical Physics* 2013, 40(7), 72-79.

Kudo N. High-Speed In Situ Observation System for Sonoporation of Cells With Size- and Position-Controlled Microbubbles. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 2017, 64(1), 273-280.

Kudo N, Kinoshita Y. Effects of cell culture scaffold stiffness on cell membrane damage induced by sonoporation. *Journal of Medical Ultrasonics* 2014, 41(4), 411-420.

Kudo N, Okada K, Yamamoto K. Sonoporation by single-shot pulsed ultrasound with

microbubbles adjacent to cells. *Biophysical Journal* 2009, 96(12), 4866-4876.

Kumon RE, Aehle M, Sabens D, Parikh P, Han YW, Kourennyi D, Deng CX. Spatiotemporal Effects of Sonoporation Measured by Real-Time Calcium Imaging. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2009, 35(3), 494-506.

Kumon RE, Parikh P, Sabens D, Aehle M, Kourennyi D, Deng CX. Measuring and modeling sonoporation dynamics in mammalian cells via calcium imaging. *AIP Conference Proceedings*, 2007, 484-491.

Kuznetsova LA, Coakley WT. Applications of ultrasound streaming and radiation force in biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 2007, 22(8), 1567–1577.

Lafond M, Yoshizawa S, Umemura S. Sonodynamic Therapy Advances and Challenges in Clinical Translation. *Journal of Ultrasound in Medicine* 2019, 38(3), 567-580.

Lajoinie G, De Cock I, Coussios CC, Lentacker I, Le Gac S, Stride E, Versluis M. In vitro methods to study bubble-cell interactions: Fundamentals and therapeutic applications. *Biomicrofluidics* 2016, 10(1), 111-115.

Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release* 2012, 161(2), 175-187.

Lariccia V, Fine M, Magi S, Lin MJ, Yaradanakul A, Llaguno MC, Hilgemann DW. Massive calcium-activated endocytosis without involvement of classical endocytic proteins. *Journal of General Physiology* 2011, 137(1), 111-132.

Leighton TG. What is ultrasound? *Progress in biophysics and molecular biology* 2007, 93(1–3), 3–83.

Lentacker I, De Cock I, Deckers R, De Smedt SC, Moonen CTW. Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2014, 72, 49–64.

Lentacker I, De Cock I, Deckers R, De Smedt SC, Moonen CTW. Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. *Advanced drug delivery reviews* 2013, 72, 49-64.

Lentacker Ine, De Smedt SC, Sanders NN. Drug loaded microbubble design for ultrasound triggered delivery. *Soft Matter* 2009, 5(11), 2161.

Lentacker Ine, Geers B, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN. Design and evaluation of doxorubicin-containing microbubbles for ultrasound-triggered doxorubicin delivery: Cytotoxicity and mechanisms involved. *Molecular Therapy* 2010, 18(1), 101–108.

Lentacker Ine, Vandenbroucke RE, Lucas B, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN. New strategies for nucleic acid delivery to conquer cellular and nuclear membranes. *Journal of Controlled Release* 2008, 132(3), 279–288.

Li P, Armstrong WF, Miller DL. Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: Comparison of three different contrast agents. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2004, 30(1), 83-91.

Li Q, Liu Q, Wang P, Feng X, Wang H, Wang X. The effects of Ce6-mediated sonophotodynamic therapy on cell migration, apoptosis and autophagy in mouse mammary 4T1 cell line. *Ultrasonics* 2014, 54(4), 981–989.

Li Y, Wang P, Wang X, Su X, Liu Q. Involvement of mitochondrial and reactive oxygen species in the sonodynamic toxicity of chlorin e6 in human leukemia K562 cells. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2014, 40(5), 990–1000.

Li Y, Wang P, Zhao P, Zhu S, Wang X, Liu Q. Apoptosis induced by sonodynamic treatment by protoporphyrin IX on MDA-MB-231 cells. *Ultrasonics* 2012, 52, 490–496.

Li Z, Tan S, Li S, Shen Q, Wang K. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review). *Oncology Reports* 2017, 38(2), 611-624.

Libutti SK, Paciotti GF, Byrnes AA, Alexander HR, Gannon WE, Walker M, Tamarkin L. Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clinical Cancer Research* 2010, 16(24), 6139-6149.

Lindner JR. Microbubbles in medical imaging: Current applications and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004, 3(6), 527-533.

Lionetti V, Fittipaldi A, Agostini S, Giacca M, Recchia FA, Picano E. Enhanced Caveolae-Mediated Endocytosis by Diagnostic Ultrasound In Vitro. *Ultrasound in Medicine*

and Biology 2009, 35(1), 136-143.

Liu HL, Fan CH, Ting CY, Yeh CK. Combining microbubbles and ultrasound for drug delivery to brain tumors: Current progress and overview. *Theranostics* 2014, 4(4), 432-444.

Lum AFH, Borden MA, Dayton PA, Kruse DE, Simon SI, Ferrara KW. Ultrasound radiation force enables targeted deposition of model drug carriers loaded on microbubbles. *Journal of Controlled Release* 2006, 111(2), 128-134.

Lyseng-Williamson KA, Fenton C. Docetaxel: A review of its use in metastatic breast cancer. *Drugs* 2005, 65(17), 2513-2531.

MacDonald IJ, Dougherty TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 2001, 5(2), 105-129.

Mansoori B, Shotorbani SS, Baradaran B. RNA interference and its role in cancer therapy. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2014, 4(4), 313-321.

Mao C, Li M, Zhang W, Zhou H, Yin J. Pharmacogenomics for the efficacy of platinum-based chemotherapy: Old drugs , new integrated perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2020, 126, 1-9.

Marchettini P, Stuart OA, Mohamed F, Yoo D, Sugarbaker PH. Docetaxel: Pharmacokinetics and tissue levels after intraperitoneal and intravenous administration in a rat model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2002, 49(6), 499-503.

Marmottant P, Hilgenfeldt S. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature* 2003, 423(6936), 153-156.

Martin KH, Dayton PA. Current status and prospects for microbubbles in ultrasound theranostics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2013, 5(4), 329-345.

Mayer CR, Bekerredjian R. Ultrasonic gene and drug delivery to the cardiovascular system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008, 60(10), 1177-1192.

Mayer CR, Geis NA, Katus HA, Bekerredjian R. Ultrasound targeted microbubble destruction for drug and gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2008, 5(10), 1121–

McDannold N, Arvanitis CD, Vykhodtseva N, Livingstone MS. Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: Safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. *Cancer Research* 2012, 72(14), 3652-3663.

McEwan C, Kamila S, Owen J, Nesbitt H, Callan B, Borden M, Callan JF. Combined sonodynamic and antimetabolite therapy for the improved treatment of pancreatic cancer using oxygen loaded microbubbles as a delivery vehicle. *Biomaterials* 2016, 80, 20–32.

McEwan C, Owen J, Stride E, Fowley C, Nesbitt H, Cochrane D, Callan JF. Oxygen carrying microbubbles for enhanced sonodynamic therapy of hypoxic tumours. *Journal of Controlled Release* 2015, 203, 51–56.

McGuire J. Anticancer Antifolates: Current Status and Future Directions. *Current Pharmaceutical Design* 2005, 9(31), 2593–2613.

Mehier-Humbert S, Yan F, Frinking P, Schneider M, Guy RH, Bettinger T. Ultrasound-mediated gene delivery: Influence of contrast agent on transfection. *Bioconjugate Chemistry* 2007, 18(3), 652-662.

Meijering BDM, Juffermans LJM, van Wamel A, Henning RH, Zuhorn IS, Emmer M, Kamp O. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circulation research* 2009, 104(5), 679–687.

Miller DL, Bao S, Morris JE. Sonoporation of cultured cells in the rotating tube exposure system. *Ultrasound in Medicine and Biology* 1999, 25(1), 143-149.

MIŠÍK V, RIESZ P. Free Radical Intermediates in Sonodynamic Therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 899(1), 335–348.

Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circulation research* 2003, 92(2), 1-10.

Miyoshi N, Mišík V, Fukuda M, Riesz P, Misik V. Effect of Gallium-Porphyrin Analogue ATX-70 on Nitroxide Formation from a Cyclic Secondary Amine by Ultrasound: On the Mechanism of Sonodynamic Activation. *Radiation Research* 1995, 143(2), 194.

MOAN J, BERG K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology* 1991, 53(4), 549-553.

Mohammed MA, Syeda JTM, Wasan KM, Wasan EK. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics* 2017, 9(4), 53.

Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2005, 4(10), 1495–1504.

Naji Meidani AR, Hasan M. Mathematical and physical modelling of bubble growth due to ultrasound. *Applied Mathematical Modelling* 2004, 28(4), 333-351.

Namiki Y, Fuchigami T, Tada N, Kawamura R, Matsunuma S, Kitamoto Y, Nakagawa M. Nanomedicine for cancer: Lipid-based nanostructures for drug delivery and monitoring. *Accounts of Chemical Research* 2011, 44(10), 1080-1093.

Naudé CF, Ellis AT. On the mechanism of cavitation damage by nonhemispherical cavities collapsing in contact with a solid boundary. *Journal of Fluids Engineering, Transactions of the ASME* 1961, 83(4), 648-656.

Nesbitt H, Sheng Y, Kamila S, Logan K, Thomas K, Callan B, ... Callan JF. Gemcitabine loaded microbubbles for targeted chemo-sonodynamic therapy of pancreatic cancer. *Journal of Controlled Release* 2018, 279(December 2017), 8–16.

Nguyen TTT, Ghosh C, Hwang SG, Tran LD, Park JS. Characteristics of curcumin-loaded poly (lactic acid) nanofibers for wound healing. *Journal of Materials Science* 2013, 48(20), 7125-7133.

Nie F, Xu HX, Lu M De, Wang Y, Tang Q. Anti-angiogenic gene therapy for hepatocellular carcinoma mediated by microbubble-enhanced ultrasound exposure: An in vivo experimental study. *Journal of Drug Targeting* 2008, 16(5), 389-395.

Nomikou N, Fowley C, Byrne NM, McCaughan B, McHale AP, Callan JF. Microbubble–sonosensitiser conjugates as therapeutics in sonodynamic therapy. *Chemical Communications* 2012, 48(67), 8332.

Nonaka M, Yamamoto M, Yoshino S, Umemura SI, Sasaki K, Fukushima T. Sonodynamic therapy consisting of focused ultrasound and a photosensitizer causes a selective antitumor effect in a rat intracranial glioma model. *Anticancer Research* 2009, 29(3), 943-950.

Nyborg WL. Acoustic Streaming near a Boundary. *Journal of the Acoustical Society of America* 1958, 30(4), 329-339.

O'Brien WD. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology* 2007, 93(1–3), 212–255.

Okada K, Itoi E, Miyakoshi N, Nakajima M, Suzuki T, Nishida J. Enhanced antitumor effect of ultrasound in the presence of piroxicam in a mouse air pouch model. *Japanese Journal of Cancer Research* 2002.

Osaki T, Ono M, Uto Y, Ishizuka M, Tanaka T, Yamanaka N, Okamoto Y. Sonodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid enhances the efficacy of bleomycin. *Ultrasonics* 2016, 67, 76-84.

Osaki T, Yokoe I, Uto Y, Ishizuka M, Tanaka T, Yamanaka N, ... Okamoto Y. Bleomycin enhances the efficacy of sonodynamic therapy using aluminum phthalocyanine disulfonate. *Ultrasonics Sonochemistry* 2016, 28, 161–168.

Park EJ, Zhang YZ, Vykhodtseva N, McDannold N. Ultrasound-mediated blood-brain/blood-tumor barrier disruption improves outcomes with trastuzumab in a breast cancer brain metastasis model. *Journal of Controlled Release* 2012, 163(3), 277–284.

Pastor F, Berraondo P, Etxeberria I, Frederick J, Sahin U, Gilboa E, Melero I. An rna toolbox for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2018, 17(10), 751-767.

Pecha R, Gompf B. Microimplosions: Cavitation collapse and shock wave emission on a nanosecond time scale. *Physical Review Letters* 2000, 84(6), 1328-1330.

Peregrine DH. The Acoustic Bubble. By T. G. Leighton. *Journal of Fluid Mechanics* 1994, 272, 407-408.

Podell S, Burrascano C, Gaal M, Golec B, Maniquis J, Mehlhaff P. Physical and biochemical stability of Optison®, an injectable ultrasound contrast agent. *Biotechnology and*

Applied Biochemistry 1999, 30(3), 213-223.

Price RJ, Skyba DM, Kaul S, Skalak TC. Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *Circulation* 1998, 98(13), 1264-1267.

Quaia E. Classification and Safety of Microbubble-Based Contrast Agents. *Contrast Media in Ultrasonography*, 1, 3-14.

Quaia E, Blomley MJK, Patel S, Harvey CJ, Padhani A, Price P, Cosgrove DO. Initial observations on the effect of irradiation on the liver-specific uptake of Levovist. *European Journal of Radiology* 2002, 41(3), 192-199.

Rabanel JM, Faivre J, Tehrani SF, Lalloz A, Hildgen P, Banquy X. Effect of the polymer architecture on the structural and biophysical properties of PEG-PLA nanoparticles. *ACS Applied Materials and Interfaces* 2015, 7(19), 10374-10385.

Raja MAG, Katas H, Wen TJ. Stability, intracellular delivery, and release of siRNA from chitosan nanoparticles using different cross-linkers. *PLoS ONE* 2015, 10(6), 1-19.

Rengeng L, Qianyu Z, Yuehong L, Zhongzhong P, Libo L. Sonodynamic therapy, a treatment developing from Photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2017, 19, 159-166.

Riess JG. Fluorocarbon-based injectable gaseous microbubbles for diagnosis and therapy. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2003, 8(3), 259-266.

Riesz P, Kondo T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radical Biology and Medicine* 1992, 13(3), 247-270.

Roovers S, Segers T, Lajoinie G, Deprez J, Versluis M, De Smedt SC, Lentacker I. The Role of Ultrasound-Driven Microbubble Dynamics in Drug Delivery: From Microbubble Fundamentals to Clinical Translation. *Langmuir* 2019, 35(31), 10173–10191.

Rosenthal I, Sostaric JZ, Riesz P. Sonodynamic therapy a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* 2004, 11(6), 349-363.

Ross JP, Cai X, Chiu J-F, Yang J, Wu J. Optical and atomic force microscopic studies on

sonoporation. *The Journal of the Acoustical Society of America* 2002, 111(3), 1161-1164.

Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (TAXOL®). *Seminars in Oncology* 1993, 20(3), 1-15.

Rychak JJ, Klibanov AL, Hossack JA. Acoustic radiation force enhances targeted delivery of ultrasound contrast microbubbles: In vitro verification. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 2005, 52(3), 421-433.

Saad AH, Hahn GM. Ultrasound-enhanced effects of adriamycin against murine tumors. *Ultrasound in Medicine and Biology* 1992, 18(8), 715-723.

Sabens D, Aehle M, Steyer G, Kourennyi D, Deng CX. Calcium imaging of sonoporation of mammalian cells. İçinde *AIP Conference Proceedings*, 2006, 533-537.

Samaranayake H, Wirth T, Schenkwein D, Rätty JK, Ylä-Herttuala S. Challenges in monoclonal antibody-based therapies. *Annals of Medicine* 2009, 41(5), 322-331.

Sboros V. Response of contrast agents to ultrasound. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008, 60(10), 1117–1136.

Scherphof G, Roerdink F, Waite M, Parks J. Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interaction with high-density lipoproteins. *BBA - General Subjects* 1978, 542(2), 296-307.

Schutt EG, Klein DH, Mattrey RM, Riess JG. Injectable Microbubbles as Contrast Agents for Diagnostic Ultrasound Imaging: The Key Role of Perfluorochemicals. *Angewandte Chemie International Edition* 2003, 42(28), 3218-3235.

Senior J, Gregoriadis G. Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability? *FEBS Letters* 1982, 1445(1), 109-114.

Serpe L, Foglietta F, Canaparo R. Nanosonotechnology: the next challenge in cancer sonodynamic therapy. *Nanotechnology Reviews* 2012, 1(2), 173–182.

Sharman W, Allen C, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug discovery today* 1999, 4, 507–517.

Shi H, Liu Q, Qin X, Wang P, Wang X. Pharmacokinetic study of a novel sonosensitizer

chlorin-e6 and its sonodynamic anti-cancer activity in hepatoma-22 tumor-bearing mice. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 2011.

Shibaguchi H, Tsuru H, Kuroki M, Kuroki M. Sonodynamic cancer therapy: A non-invasive and repeatable approach using low-intensity ultrasound with a sonosensitizer. *Anticancer Research* 2011 31(7), 2425-2429.

Sigmond J, Peters GJ. Pyrimidine and purine analogues, effects on cell cycle regulation and the role of cell cycle inhibitors to enhance their cytotoxicity. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 2005, 24(10–12), 1997–2022.

Sinha M, Banik RM, Haldar C, Maiti P. Development of ciprofloxacin hydrochloride loaded poly(ethylene glycol)/chitosan scaffold as wound dressing. *Journal of Porous Materials* 2013, 20(4), 799-807.

Siracusano S, Bertolotto M, Ciciliato S, Valentino M, Liguori G, Visalli F. The current role of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) imaging in the evaluation of renal pathology. *World Journal of Urology* 2011, 29(5), 633-638.

Sirsi SR, Borden M. Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications. *Bubble Science, Engineering and Technology* 2009, 1(1–2), 3–17.

Sirsi SR, Borden M a. Advances in ultrasound mediated gene therapy using microbubble contrast agents. *Theranostics* 2012, 2(12), 1208–1222.

Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology* 2001, 40(129), 1331-1336.

Stewart VR, Sidhu PS. New directions in ultrasound: Microbubble contrast. *British Journal of Radiology* 2006, 779(939), 188-194.

Stride E., Saffari N. Microbubble ultrasound contrast agents: A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 2003, 217(6), 429-447.

Stride Eleanor, Edirisinghe M. Novel microbubble preparation technologies. *Soft Matter* 2008, 4(12), 2350.

Sugita N, Iwase Y, Yumita N, Ikeda T, Umemura SI. Sonodynamically induced cell damage using rose bengal derivative. *Anticancer Research* 2010, 30(9), 3361-3366.

Sun TM, Du JZ, Yan LF, Mao HQ, Wang J. Self-assembled biodegradable micellar nanoparticles of amphiphilic and cationic block copolymer for siRNA delivery. *Biomaterials* 2008.

Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S. An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. *Biophysical Journal* 2003.

Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic B V. Blood-brain barrier: From physiology to disease and back. *Physiological Reviews* 2019, 99(1), 21-78.

Tan S, Gan C, Li R, Ye Y, Zhang S, Wu X, Wu M. A novel chemosynthetic peptide with β -sheet motif efficiently kills *Klebsiella pneumoniae* in a mouse model. *International Journal of Nanomedicine* 2015, 10, 1045-1059.

Tang W, Liu Q, Wang X, Wang P, Cao B, Mi N, Zhang J. Involvement of caspase 8 in apoptosis induced by ultrasound-activated hematoporphyrin in sarcoma 180 cells in vitro. *Journal of Ultrasound in Medicine* 2008, 27(4), 645–656.

Tang W, Liu Q, Zhang J, Cao B, Zhao P, Qin X. In vitro activation of mitochondria-caspase signaling pathway in sonodynamic therapy-induced apoptosis in sarcoma 180 cells. *Ultrasonics* 2010, 50(6), 567–576.

Ter Haar Gail. Therapeutic ultrasound. *European Journal of Ultrasound* 1999, 9(1), 3–9.

Ting CY, Fan CH, Liu HL, Huang CY, Hsieh HY, Yen TC, Yeh CK. Concurrent blood-brain barrier opening and local drug delivery using drug-carrying microbubbles and focused ultrasound for brain glioma treatment. *Biomaterials* 2012, 33(2), 704-712.

Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Smith P. A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules. *Polymer Journal* 2002, 17(1), 117-132.

Topcu Z. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2001, 17(5), 421-433.

Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated

mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery* 2009, 8(7), 579-591.

Tran TA, Roger S, Le Guennec JY, Tranquart F, Bouakaz A. Effect of ultrasound-activated microbubbles on the cell electrophysiological properties. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2007, 33(1), 158-163.

Trendowski M. The promise of sonodynamic therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* 2014, 33(1), 143-460.

Tsutsui JM, Xie F, Porter RT. The use of microbubbles to target drug delivery. *Cardiovascular Ultrasound* 2004, 2(1), 23.

Umemura S., Kawabata K, Yumita N, Nishigaki R, Umemura K. Sonodynamic approach to tumor treatment. *Proceedings - IEEE Ultrasonics Symposium*, 1992, 1231-1240.

Umemura S, Yumita N, Nishigaki R, Umemura K. Mechanism of cell damage by ultrasound in combination with hematoporphyrin. *Japanese Journal of Cancer Research* 1990, 81, 962–966.

Umemura Shin-ichiro -i, Yumita N, Nishigaki R. Enhancement of Ultrasonically Induced Cell Damage by a Gallium-Porphyrin Complex, ATX-70. *Japanese Journal of Cancer Research* 1993, 84(5), 582-588.

Unga J, Hashida M. Ultrasound induced cancer immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2014, 72, 144-153.

Unger EC, Hersh E, Vannan M, Matsunaga TO, McCreery T. Local drug and gene delivery through microbubbles. *Progress in Cardiovascular Diseases* 2001, 44(1), 45-54.

Unger EC, McCreery TP, Sweitzer RH, Caldwell VE, Wu Y. Acoustically active lipospheres containing paclitaxel: A new therapeutic ultrasound contrast agent. *Investigative Radiology* 1998, 33(12), 886-892.

van Rooij T, Luan Y, Renaud G, van der Steen AFW, Versluis M, de Jong N, Kooiman K. Non-linear Response and Viscoelastic Properties of Lipid-Coated Microbubbles: DSPC versus DPPC. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2015, 41(5), 1432-1445.

Van Wamel A, Bouakaz A, Versluis M, De Jong N. Micromanipulation of endothelial cells: Ultrasound-microbubble-cell interaction. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2004, 30(9), 1255-1258.

van Wamel A, Kooiman K, Harteveld M, Emmer M, ten Cate FJ, Versluis M, de Jong N. Vibrating microbubbles poking individual cells: Drug transfer into cells via sonoporation. *Journal of Controlled Release* 2006, 112(2), 149-155.

VanBavel E. Effects of shear stress on endothelial cells: Possible relevance for ultrasound applications. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2007, 93(1–3), 374–383.

Vancraeynest D, Havaux X, Pouleur AC, Pasquet A, Gerber B, Beauloye C, ... Vanoverschelde JLJ. Myocardial delivery of colloid nanoparticles using ultrasound-targeted microbubble destruction. *European Heart Journal* 2006, 27(2), 237-245.

Vandenbroucke RE, Lentacker I, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN. Ultrasound assisted siRNA delivery using PEG-siPlex loaded microbubbles. *Journal of Controlled Release* 2008, 126(3), 265–273.

Vejpongsa P, Yeh ETH. Topoisomerase 2 β : A promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2014, 95(1), 45-52.

Vrouenraets MB, Visser GWM, Snow GB, Van Dongen GAMS. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Research* 2003, 23(1B), 505-522.

Wagner A, Denzer UW, Neureiter D, Kiesslich T, Puespoeck A, Rauws EAJ, Wolkersdörfer GW. Temoporfin improves efficacy of photodynamic therapy in advanced biliary tract carcinoma: A multicenter prospective phase II study. *Hepatology* 2015, 65-2(5), 1456-1465.

Wan G-Y, Liu Y, Chen B-W, Liu Y-Y, Wang Y-S, Zhang N. Recent advances of sonodynamic therapy in cancer treatment. *Cancer biology & medicine* 2016, 13(3), 325–338.

Wang Haiping, Liu Q, Zhang K, Wang P, Xue Q, Li L, Wang X. Comparison between sonodynamic and photodynamic effect on MDA-MB-231 cells. *Journal of Photochemistry*

and Photobiology B: Biology 2013, 127, 182-191.

Wang Huan, Yang Y, Chen H, Dan J, Cheng J, Guo S, ... Tian Y. The predominant pathway of apoptosis in THP-1 macrophage-derived foam cells induced by 5-Aminolevulinic acid-mediated sonodynamic therapy is the mitochondria-caspase pathway despite the participation of endoplasmic reticulum stress. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2014, 33(6), 1789-1801.

Wang P, Li C, Wang X, Xiong W, Feng X, Liu Q, ... Xu C. Anti-metastatic and pro-apoptotic effects elicited by combination photodynamic therapy with sonodynamic therapy on breast cancer both in vitro and in vivo. *Ultrasonics Sonochemistry* 2015, 23, 116–127.

Wang XB, Liu QH, Wang P, Zhang K, Tang W, Wang BL. Enhancement of apoptosis by sonodynamic therapy with protoporphyrin IX in isolate sarcoma 180 cells. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 2008, 23(2), 238-246.

Wang XF, Cao XL, Dong HB, Liu B, Wang X, Liu BM, Wang X. Synthesis and sonodynamic activity evaluation of ciprofloxacin derivatives. *Journal of International Pharmaceutical Research* 2019, 46(8), 1-9.

Wang Xiaobing, Jia Y, Su X, Wang P, Zhang K, Feng X, Liu Q. Combination of Protoporphyrin IX-mediated Sonodynamic Treatment with Doxorubicin Synergistically Induced Apoptotic Cell Death of a Multidrug-Resistant Leukemia K562/DOX Cell Line. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2015, 41(10), 2731–2739.

Wang Xiaohuai, Luo Y, Mitchell D, Moss RW. Rationale of combined PDT and SDT modalities for treating cancer patients in terminal stage - The proper use of photosensitizer: A reply. *Integrative Cancer Therapies* 2010, 9(4), 320-321.

Wang Xiaohuai, Zhang W, Xu Z, Luo Y, Mitchell D, Moss RW. Sonodynamic and Photodynamic Therapy in Advanced Breast Carcinoma: A Report of 3 Cases. *Integrative Cancer Therapies* 2009, 8(3), 283-287.

Ward M, Wu J. Ultrasound-induced cell lysis and sonoporation enhanced by contrast agents. *The Journal of the Acoustical Society of America* 1999, 106(4), 2230.

Ward MA, Georgiou TK. Thermoresponsive polymers for biomedical applications.

Polymers 2011, 3(3), 1215-1242.

Watson T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. *Ultrasonics* 2008, 48(4), 321-329.

WHO. WHO report on cancer: Setting priorities investing wisely and providing care for all. Investing Wisely and Providing Care for All. WHO Press 2020.

Wible JH, Galen KP, Wojdyla JK, Hughes MS, Klibanov AL, Brandenburger GH. Microbubbles induce renal hemorrhage when exposed to diagnostic ultrasound in anesthetized rats. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2002, 28(11-12), 1535-1546.

Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology* 2008, 4(5), 278-286.

Wong RSY. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2011, 30(1), 87.

Wood AKW, Bunte RM, Price HE, Deitz MS, Tsai JH, Lee WMF, Sehgal CM. The Disruption of Murine Tumor Neovasculature by Low-intensity Ultrasound-Comparison Between 1- and 3-MHz Sonication Frequencies. *Academic Radiology* 2008, 15(9), 1133-1141.

Wu J, Nyborg WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Advanced drug delivery reviews* 2008, 60(10), 1103–1116.

Wu J, Ross JP, Chiu J-F. Reparable sonoporation generated by microstreaming. *The Journal of the Acoustical Society of America* 2002, 111(3), s 1460–1464.

Wu S, Li L, Wang G, Shen W, Xu Y, Liu Z, Tan K. Ultrasound-targeted stromal cell-derived factor-1-loaded microbubble destruction promotes mesenchymal stem cell homing to kidneys in diabetic nephropathy rats. *International Journal of Nanomedicine* 2014, 9(1), 5639–5651.

Xu C fei, Wang J. Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015, 10(1), 1-12.

Xu H, Zhang X, Han R, Yang P, Ma H, Song Y, Wang H. Nanoparticles in sonodynamic

therapy: State of the art review. *RSC Advances* 2016, 6(56), 50697-50705.

Xu J, Zeng X, Liu Y, Luo H, Wei Z, Liu H, Yan F. A novel dual-targeted ultrasound contrast agent provides improvement of gene delivery efficiency in vitro. *Tumor Biology* 2016, 37(7), 8609–8619.

Yang F, Gu N, Chen D, Xi X, Zhang D, Li Y, Wu J. Experimental study on cell self-sealing during sonoporation. *Journal of Controlled Release* 2008, 131(3), 205-210.

Yang FY, Lin YS, Kang KH, Chao TK. Reversible blood-brain barrier disruption by repeated transcranial focused ultrasound allows enhanced extravasation. *Journal of Controlled Release* 2011, 151(1), 111-116.

Yang X, Wu S, Wang Y, Li Y, Chang D, Luo Y, Hou Z. Evaluation of self-assembled HCPT-loaded PEG-b-PLA nanoparticles by comparing with HCPT-loaded PLA nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* 2014, 9(1), 687.

Yu L, Dean K, Li L. Polymer blends and composites from renewable resources. *Progress in Polymer Science* 2006, 31(6), 576-602.

Yu T, Wang Z, Jiang S. Potentiation of cytotoxicity of adriamycin on human ovarian carcinoma cell line 3AO by low-level ultrasound. *Ultrasonics* 2001, 39(4), 307–309.

Yu T, Wang Z, Mason TJ. A review of research into the uses of low level ultrasound in cancer therapy. *Ultrasonics sonochemistry* 2004, 11(2), s 95–103.

Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, Umemura S. Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound. *Japanese journal of cancer research* 1989, 80, 219–222.

Yumita Nagahiko, Kawabata K, Sasaki K, Umemura S. Sonodynamic effect of erythrosin B on sarcoma 180 cells in vitro. *Ultrasonics sonochemistry* 2002, 9(5), 259–265.

Yumita Nagahiko, Okudaira K, Momose Y, Umemura SI. Sonodynamically induced apoptosis and active oxygen generation by gallium-porphyrin complex, ATX-70. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2010, 66, 1071–1078.

Zeghimi A, Escoffre JM, Bouakaz A. Role of endocytosis in sonoporation-mediated membrane permeabilization and uptake of small molecules: A electron microscopy study.

Physical Biology 2015, 12(6), 1-12.

Zheng L, Sun X, Zhu X, Lv F, Zhong Z, Zhang F, Tian Y. Apoptosis of THP-1 derived macrophages induced by sonodynamic therapy using a new sonosensitizer hydroxyl acetylated curcumin. *PloS ONE* 2014, 9(3), e93133.



ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Ergün Cem Köken
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Osmaniye / 02.03.1984
E-mail : eckoken@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik	Eylül 2020
Y. Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik	Ağustos 2014
Lisans	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	Temmuz 2009

BURSLAR ve ÖDÜLLER

1. 2nd Place Of The Best e-poster award, Med Update Europe GMBH, Viyana, 2017

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2012-2020	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik A.D.	Araş. Gör.

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

1. Köken E, Öz Oyar E, Uyanıkgil Y, Azak B, Bilister C, Aksun S, Yiğittürk G, Köken EC. Exogenous follistatin administration cisplatin induced acute kidney injury through anti inflammation and anti-apoptosis effects. Bratislava Medical Journal-Bratislavske Lekarske Listy 2020, 121(2), 143-150.
2. Kızılay Z, Kahraman Çetin N, Aktaş S, Köken EC, Özkul A. Effects of methyl palmitate on axon and myelin healing in an experimental sciatic nerve injury model in rats. Neurological Sciences and Neurophysiology 2019, 36(4), 215-222.
3. Geçgelen Cesur M, Önal T, Bilgin MD, Şirin FB, İnan Vissun S, Köken EC, Alkan A, Cesur G. Histological and biochemical investigation of the effects of low intensity pulsed ultrasound on orthodontic tooth movement. Konuralp Tıp Dergisi 2019, 11(1), 119-125.

2. PROJELER

1. Ehrlich Asit Tümör Hücreleri Üzerinde Kloraluminyum Ftalosiyanın Ve Dosetakselin Sonodinamik Etkilerinin Araştırılması, Araştırmacı, 2013.
2. Deneysel diyabet modelinde pterostilbenin ve pterokarbosidin olası nöroprotektif etkisinin elektrobiyofiziksel nosiseptif biyokimyasal ve FTIR spektroskopik yöntemlerle araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 2015.
3. Sono-Kemoterapi İçin Üretilen Mikrokabarcıkların Kanser Hücreleriyle Etkileşimi, Araştırmacı, 2017.

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. **Bozkurt Girit Ö, Pınarbaşı MM, Köken EC, Bilgen M, Severcan F, Bilgin MD.** *Levetiracetam treatment in presence of low frequency magnetic field restored the alterations in white matters of injured spinal cords: An FTIR imaging study.* 30th Annual Biophysics Congress (International) 2018. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
2. **Pınarbaşı MM, Bozkurt Girit Ö, Köken EC, Bilgen M, Bilgin MD.** *Levetiracetam treatment in presence of low frequency magnetic field restored alterations in spinal cord injury.* 11th FENS Forum of Neuroscience 2018. (Özet Bildiri/Poster)
3. **Bozkurt Girit Ö, Pınarbaşı MM, Köken EC, Bilgen M, Bilgin MD.** *Low frequency magnetic field and levatiracetam treated spinal cord injury.* SPEC2018, 10th Conference SPEC2018 2018. (Özet Bildiri/Poster)
4. **Öz Oyar E, Uyanıkgil Y, Aksun S, Köken E, Azak Pazarlar B, Bilister C, Yiğittürk G, Köken EC.** *Exogenous follistatin administration in cisplatin induced acute kidney injury reduces renal damage.* 1st Nephro Update Europe 2017. (Özet Bildiri/Poster)
5. **Köken EC, Lentacker I.** *Design And Characterization Of Cationic Microbubbles For siRNA Transfer.* 22. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, BIOMED 2017. (Özet Bildiri/Poster)
6. **Bilgin MD, Evcı Kiraz ED, Bozkurt Girit Ö, Kılıç MA, Bakay D, Aksel M, Köken EC.** *Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüsünde ELF EMF Ölçümleri Ve Öğrencilerin ELF EMF Maruziyeti Hakkındaki Bilgi Düzeyleri.* I. Uluslararası Şehir, Çevre Sağlık Kongresi; Şehir Çevre ve Sağlıkta İşbirliği 2016. (Tam Metin Bildiri)
7. **Bilgin MD, Evcı Kiraz ED, Bozkurt Girit Ö, Kılıç MA, Bakay D, Köken EC, Aksel M.** *Cep Telefonları ve Sağlık Üzerine Zararlı Etkileri Hakkında Üniversite Öğrencilerinin Bilgi Düzeylerinin Değerlendirilmesi.* I. Uluslararası Şehir, Çevre Sağlık Kongresi; Şehir Çevre ve Sağlıkta İşbirliği 2016. (Tam Metin Bildiri)
8. **Köken EC, Bilgin MD.** *Investigation of Sonodynamic Effects of Chloraluminium Phthalocyanine on Ehrlich Ascites Tumor Cells.* International Congress On Ultrasonics 2015. (Özet Bildiri/)
9. **Bilgin MD, Köken EC.** *Non Invasive In Vivo Optical Measurements Of Blood Oxygenation.* 9th EBSA European Biophysics Congress 2013.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. **Pınarbaşı MM, Bozkurt Girit Ö, Köken EC, Bilgen M, Bilgin MD.** *Manyetik alan ve levetirasetamla tedavi edilmiş spinal kord hasarı: FTIR görüntüleme çalışması.* 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi 2018 (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
2. **Köken E, Öz Oyar E, Azak Pazarlar B, Bilister C, Uyanıkgil Y, Aksun S, Köken EC.** *Sıçanlarda sisplatin kaynaklı akut böbrek hasarının tedavisinde eksojen follistatin uygulamasının etkileri.* 1. Temel onkoloji sempozyumu 2018. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
3. **Bakay İD, Bozkurt Girit Ö, Kılıç MA, Köken EC, Aksel M, Bilgin MD.** *Elektromanyetik Alanın Sağlık Üzerine Etkileri Hakkında Adnan Menderes Üniversitesi Öğrencilerinin Farkındalıkları.* 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi 2017. (Poster)
4. **Köken EC, Lentacker I.** *Gen Transferi İçin Katyonik Microkabarık Tasarımı ve Karakterizasyonu.* 28-29. Ulusal biyofizik Kongresi 2017. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
5. **Aksel M, Köken EC, Bozkurt Girit Ö, Bilgin MD.** *İnsan Kolon Kanseri Hücre Dizinlerinde Metilen Mavisli Aracılı Sonodinamik Terapinin Etkinliği.* 27. ULUSAL BİYOFİZİK KONGRESİ 2015.
6. **Köken EC, Özlem Çalışkan S, Bilgin MD.** *Ehrlich Asit Tümör Hücreleri Üzerinde Kloraluminyum Ftalosiyanın Ve Dosetakselin Sonodinamik Etkilerinin Araştırılması.* 27. ULUSAL BİYOFİZİK KONGRESİ 2015.
7. **Bozkurt Ö, Keser H, Köken EC, Bilgin MD.** *Diyabetik Nöropatide Pterostilben Tedavisinin Koruyucu Etkileri.* 13. ULUSAL SİNİRBİLİM KONGRESİ 2015.
8. **Aksel M, Köken EC, Bozkurt Girit Ö, Bilgin MD.** *Borik Asidin Biyolojik Ortamlarla Etkileşimi ve HL 60 İnsan Promiyelositik Lösemi Hücrelerindeki Apoptotik ve Antikanserojen Etkisi.* 26. Ulusal Biyofizik Kongresi 2014
9. **Aksel M, Köken EC, Başoğlu H, Bozkurt Girit Ö, Bilgin MD.** *Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüsünde İyonize Olmayan Radyasyon Ölçümü ve İyonize Olmayan Radyasyon Maruziyetine İlişkin Öğrencilerin Bilgi Düzeylerinin Ölçülmesi.* 25. ULUSAL BİYOFİZİK KONGRESİ 2013.