



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

**DOKTORA  
TEZİ**

**SERVİKS KANSERİ TEDAVİSİNDE  
ELEKTROKEMOTERAPİNİN ETKİNLİĞİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**GÜNEY GÜR SOY**

**BİYOFİZİK ANA BİLİM DALI**

**MAYIS 2022**



**SERVİKS KANSERİ TEDAVİSİNDE ELEKTROKEMOTERAPİNİN  
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Güney GÜRSOY**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOFİZİK ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAYIS 2022**

Güney GÜRSOY tarafından hazırlanan “SERVİKS KANSERİ TEDAVİSİNDE ELEKTROKEMOTERAPİNİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi BİYOFİZİK Ana Bilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Doç. Dr. Meriç Arda EŞMEKAYA

Biyofizik Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

**İkinci Danışman:** Öğr. Gör. Dr. Zehra ÇİÇEK

Fizyoloji Ana Bilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

**Başkan:** Prof. Dr. Mehmet ÖZLER

Fizyoloji Ana Bilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

**Üye:** Prof. Dr. Kazime Gonca AKBULUT

Fizyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

**Üye:** Prof. Dr. Serdar DEMİRTAŞ

Biyofizik Ana Bilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

**Üye:** Doç. Dr. Cengiz KARAKAYA

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Onur İNAM

Biyofizik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 31/05/2022

Jüri tarafından kabul edilen bu çalışmanın Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum

Prof. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

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

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

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Güney GÜRSOY  
31/05/2022

# SERVİKS KANSERİ TEDAVİSİNDE ELEKTROKEMOTERAPİNİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Güney GÜRSOY

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2022

## ÖZET

Serviks kanseri, dünyada kadınlarda en yaygın görülen dördüncü malignitedir. Kanserin ileri evrelerinde düşük doz kemoterapi tedavide olumlu yanıt vermemektedir. Yüksek doz antineoplastik ilaç kullanımı ise önemli yan etkiler oluşturur. Tedavideki kısıtlayıcı durum yan etkileri daha az olan yeni nesil ilaçlara ve düşük doz ilaç kullanımını sağlayacak yeni tedavi yöntemlerine gereksinim oluşturmaktadır. Elektroporasyon (EP), kısa ve yüksek voltajlı elektrik pulsları ile hücre membranında hidrofilik por oluşumu ile membran geçirgenliğinin artırıldığı bir yöntemdir. Bu çalışmada, EP ile birlikte bleomisin, sisplatin ve kalsiyum uygulamasının (CaEP) serviks kanseri hücrelerinde (HeLa) hücre canlılığı, mitokondri membran potansiyeli ( $\Delta\Psi_m$ ), apoptotik aktivite, hücre döngüsü, p53, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri incelendi. HeLa hücrelerine 1 Hz tekraralama frekansında 100  $\mu$ s puls süresinde 0,4-3,2 kV/cm elektrik (E) alan uygulandı. Membranda oluşan permeabilizasyon PI yöntemi ile akım sitometride değerlendirilirken, hücre canlılıkları WST-8 yöntemi ile ELISA okuyucuda ölçüldü. Permeabilizasyonun ve canlılığın en yüksek olduğu değer etkin E alan değeri olarak belirlendi. HeLa hücrelerine uygulanan bleomisin ve sisplatin dozları için hücrelerin %50'sini inhibe eden konsantrasyon değerleri ( $IC_{50}$ ) sırasıyla  $214,11 \pm 4,7 \mu$ M ve  $35,16 \pm 3,3 \mu$ M olarak bulundu. EP ile birlikte uygulanan gruplarının  $IC_{50}$  değerleri bleomisin için  $0,44 \pm 0,3 \mu$ M, sisplatin için  $20,55 \pm 4,3 \mu$ M olarak hesaplandı. Yalnız kalsiyum uygulamasında hücre canlılığında değişim gözlenmez iken CaEP uygulamasıyla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. EP ile birlikte bleomisin ve CaEP maruziyetinde  $\Delta\Psi_m$ 'nde artış bulundu. EP maruziyetinin tüm E alan şiddetlerinde hücre döngüsünde G0/G1 arreste neden olduğu saptandı. HeLa hücrelerinde EP uygulamasının bleomisin sitotoksitesini 487 kat, sisplatin sitotoksitesini ise 1,71 kat artırdığı ve CaEP'nin alternatif bir tedavi yöntemi olabileceği belirlendi.

Bilim Kodu : 1008  
Anahtar Kelimeler : Elektroporasyon, Elektrokemoterapi, Kalsiyum elektroporasyon, Hücre canlılığı, Serviks kanseri  
Sayfa Adedi : 118  
Danışman : Doç. Dr. Meriç Arda EŞMEKAYA  
2. Danışman : Dr. Zehra ÇİÇEK

# THE EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF ELECTROCHEMOTHERAPY IN THE TREATMENT OF CERVICAL CANCER

(Ph. D. Thesis)

Güney GÜRSOY

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

May 2022

## ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common malignancy in women worldwide. Low-dose chemotherapy in advanced stages of cancer does not give a positive response in treatment. The use of high-dose antineoplastic drugs creates significant side effects. This restrictive situation in treatment creates a need for new generation drugs with less side effects and new treatment methods that will enable low-dose drug use. Electroporation (EP) is a method in which the membrane permeability is increased by the formation of hydrophilic pores in the cell membrane with short and high-voltage electrical pulses. In this study, the effects of EP plus bleomycin, cisplatin and calcium administration (CaEP) on cell viability, mitochondrial membrane potential, apoptotic activity, cell cycle, p53, Bax and Bcl-2 gene expression in cervical cancer cells (HeLa) were investigated. An electric (E) field of 0.4-3.2 kV/cm was applied to HeLa cells at a repetition frequency of 1 Hz and a pulse duration of 100  $\mu$ s. While the permeabilization of the membrane was evaluated in flow cytometry with the PI method, cell viability was measured in an ELISA reader with the WST-8 method. The value with the highest permeabilization and vitality was determined as the effective E area value. The concentration values ( $IC_{50}$ ) that inhibited 50% of the cells for bleomycin and cisplatin doses applied to HeLa cells were found to be  $214.11 \pm 4.7 \mu$ M and  $35.16 \pm 3.3$ , respectively. The  $IC_{50}$  values of the dose groups administered with EP were calculated as  $0.44 \pm 0.3 \mu$ M for bleomycin and  $20.55 \pm 4.3 \mu$ M for cisplatin. While no change was observed in cell viability in calcium application alone, a statistically significant decrease was observed in cell viability with CaEP application. An increase in  $\Delta\Psi_m$  was found with EP as well as bleomycin and CaEP exposure. It was determined that EP exposure caused G0/G1 arrest in the cell cycle at all E field intensities. It was determined that EP application in HeLa cells increased bleomycin cytotoxicity 487 times and cisplatin cytotoxicity 1.71 times, and that CaEP could be an alternative treatment method.

Science Code : 1008

Key Words : Electroporation, Electrochemotherapy, Calcium electroporation, Cell viability, Cervical cancer

Page Number : 118

Supervisor : Assoc. Prof. Meriç Arda EŞMEKAYA

Co Supervisor : Ph. D. Zehra ÇİÇEK

## TEŞEKKÜR

Tezin oluşumundan tamamlanmasına kadar geçen süreçte bilgi ve deneyimleri ile tezi yönlendiren, sağladığı mükemmel çalışma ortamı ile desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Meriç Arda EŞMEKAYA'ya, laboratuvar çalışmaları sırasında değerli zamanını ayırıp büyük bir titizlikle katkılarını sağlayan ikinci danışmanım Dr. Öğr. Gör. Zehra ÇİÇEK'e

Deneysel çalışmaları yapabilme imkanını sunan ve katkılarını esirgemeyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Fizyoloji ABD başkanı Prof. Dr. Mehmet ÖZLER ve Histoloji ve Embriyoloji ABD başkanı Prof. Dr. Barış BAYKAL hocalarım başta olmak üzere tüm anabilim dalı öğretim üyeleri'ne

Çalışmada kullanılan elektroporasyon cihazını bizimle paylaşarak literatüre katkı sunmamızı sağlayan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ongun ONARAN'a

Akademik hayata başlamama vesile olan desteğini üzerimden eksik etmeyen değerli ağabeyim Prof. Dr. Erhan ESER'e

Hayatım boyunca manevi desteğini esirgemeyen annem, babam ve kardeşime,  
Özellikle de özverisi, sabrı ve sonsuz desteğiyle hep yanımda olan eşim Ezgi GÜRSOY'a,  
en çok da bu yolculukta ayrı kalmakta zorlandığım ve yüreğimin derin sızısı olan canım kızım Ela GÜRSOY'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Elektroporasyon Teorisi .....	5
2.1.1. Por oluşum teorisi .....	6
2.1.2. Lipit çift tabakada kararsızlık teorisi.....	7
2.1.3. Membran potansiyeline etki .....	8
2.1.4. Geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz elektroporasyon .....	11
2.1.5. Elektroporasyon verimliliğini etkileyen faktörler .....	13
2.2. Elektrokemoterapi (EKT).....	15
2.2.1. Bleomisin .....	17
2.2.2. Sisplatin.....	18
2.3. Kalsiyum ve Kalsiyum Elektroporasyon (CaEP).....	19
2.3.1. Kalsiyum homeostazı: Sağlıklı ve kanser hücrelerinde .....	19
2.3.2. CaEP'nin etki mekanizması .....	20
2.4. Hücre Döngüsü.....	22
2.4.1. İnterfaz evresi.....	22
2.4.2. Mitotik faz.....	23

	<b>Sayfa</b>
2.4.3. Hücre döngüsünün düzenlenmesi .....	24
2.5. Hücre Ölümü.....	25
2.5.1. Apoptoz.....	25
2.5.2. İnstrinsik ve ekstrinsik yol: Apoptoz mekanizması.....	26
2.5.3. Apoptozun belirlenmesi .....	28
2.5.4. Nekroz.....	28
2.5.5. Apoptoz ve nekroz farklılıkları .....	29
2.5.6. Mitokondri membran potansiyeli ( $\Delta\Psi_m$ ) ve hücre ölümü ilişkisi.....	30
2.6. Serviks Kanseri .....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Deneysel Çalışma Planı ve Uygulamalar .....	35
3.2. Hücre Kültürü.....	39
3.2.1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar, kimyasal maddeler ve sarf malzemeler.....	39
3.2.2. Hücrelerin çözülmesi ve ekilmesi .....	42
3.2.3. Hücrelerin pasajlanması .....	42
3.2.4. Hücre sayımı .....	43
3.3. Analiz Protokolleri .....	44
3.3.1. WST-8 (CCK-8) Hücre canlılığı test protokolü.....	44
3.3.2. JC-1 Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi protokolü.....	45
3.3.3. Annexin V/FITC ve PI apoptozis kit ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi protokolü.....	46
3.3.4. PI/RNase ile hücre döngüsünün belirlenmesi protokolü .....	46
3.4. Elektroporasyon Uygulaması ve Etkin Elektrik Alan Değerinin Belirlenmesi...	47
3.5. Kemoterapötik İlaçların Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	48
3.6. Kalsiyumun Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi .....	48

**Sayfa**

3.7. EKT Uygulamasının Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi....	48
3.8. CaEP Uygulamasının Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi ..	49
3.9. Kemoterapötik İlaçların ve Kalsiyumun Mitokondri Membran Potansiyeline Etkisinin Belirlenmesi .....	49
3.10. EKT ve CaEP Uygulamalarının Mitokondri Membran Potansiyeline Etkisinin Belirlenmesi .....	50
3.11. EP, EKT, CaEP Uygulamalarının Hücre Döngüsüne Etkisinin Belirlenmesi ..	50
3.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi ile Bax, Bcl-2 ve P53'ün Belirlenmesi .....	51
3.13. İstatistiksel Analiz .....	51
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>53</b>
4.1. EKT ve CaEP için Belirlenen Etkin Elektrik Alan Değeri .....	53
4.2. Faz Kontrast ve İmmünfloresan Mikroskop Görüntüleri .....	57
4.3. Kemoterapötik İlaçlar ve Kalsiyumun Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri ve IC <sub>50</sub> Doz Değerinin Belirlenmesi.....	60
4.4. Kemoterapötik İlaçlar İle Kalsiyumun Kombine Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri .....	63
4.5. EKT Uygulaması ve IC <sub>50</sub> Değeri Bulguları.....	65
4.6. CaEP Uygulaması Bulguları .....	69
4.7. Elektroporasyon ile Birlikte Kemoterapötik İlaçlar ve Kalsiyumun Kombine Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri .....	71
4.8. EKT ve CaEP Uygulamasının $\Delta\Psi_m$ 'e Etkisi.....	74
4.9. Hücre Döngüsü Bulguları .....	79
4.10. PCR Analizi: Bax/Bcl2 ve p53 Gen Ekspresyonu Bulguları.....	86
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>89</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>101</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>105</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>115</b>

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Apoptoz belirleme yöntemleri .....	28
Çizelge 2.2. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü arasındaki farklar .....	29
Çizelge 2.3. Serviks kanseri TNM sınıflandırması ve FIGO evrelemesi .....	32
Çizelge 3.1. Elektroporasyon uygulaması analiz türü ve örnek sayıları.....	36
Çizelge 3.2. Kemoterapötik ilaç ve kalsiyum uygulaması analiz türü ve örnek sayıları	37
Çizelge 3.3. EKT ve CaEP uygulaması analiz türü ve örnek sayıları.....	38

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Hücre membranı ve fosfolipit yapı .....	5
Şekil 2.2. Por oluşum teorisi a) Por oluşumu, b) Porun kapanması.....	7
Şekil 2.3. Yarıçapı R olan küresel parçacığa uygulanan E alan. Kırmızı oklar dinlenme potansiyelini ( $\Delta\Psi_0$ ) ve siyah oklar indüklenmiş transmembran potansiyelini ( $\Delta\Psi_i$ ) temsil eder.....	10
Şekil 2.4. Elektroporasyon uygulamaları.....	12
Şekil 2.5. Elektroporasyon uygulamasının etkileri: E alan şiddeti ve maruz kalma süresinin bir fonksiyonu olarak geri dönüşümlü - geri dönüşümsüz elektroporasyon ve termal etki .....	13
Şekil 2.6. Elektroporasyon parametreleri a) Eksponansiyel puls, b) Kare puls ve c) Puls genişliği .....	15
Şekil 2.7. Elektrokemoterapi Uygulaması .....	17
Şekil 2.8. Bleomisin etki mekanizması.....	18
Şekil 2.9. Sisplatin etki mekanizması .....	19
Şekil 2.10. Kalsiyum etki mekanizması.....	21
Şekil 2.11. CaEP sonrası nekroz oluşumu .....	22
Şekil 2.12. Hücre döngüsü aşamaları.....	24
Şekil 2.13. İnstrinsik ve ekstrinsik yol: apoptozis mekanizması .....	27
Şekil 2.14. Serviks kanseri risk faktörleri, semptomlar ve tedavi yöntemleri .....	33
Şekil 4.1. HeLa hücrelerinde 1 Hz tekrarlama frekansında 100 $\mu$ s süresinde 0-3,2 kV/cm E alan şiddeti artışına bağlı 30dk inkübasyon sonrası hücre canlılığı.....	53
Şekil 4.2. HeLa hücrelerinde 1 Hz tekrarlama frekansında 100 $\mu$ s süresinde 0-3,2 kV/cm E alan şiddeti artışına bağlı permeabilizasyon .....	54
Şekil 4.3. HeLa hücrelerinde 1 Hz tekrarlama frekansında 100 $\mu$ s süresinde 0-3,2 kV/cm E alan şiddeti artışına bağlı hücre canlılığı ve permeabilizasyon eğrilerinin kesişimi.....	55
Şekil 4.4. HeLa hücrelerinde 1 Hz tekrarlama frekansında 100 $\mu$ s süresinde 0-3,2 kV/cm E alan şiddeti artışına bağlı 24 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı.....	55

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.5. 1 Hz tekrarlama frekansında 100 µs süresinde 0-3,2 kV/cm E alan şiddeti artışına bağlı HeLa hücrelerinin apoptotik floresan yoğunluğu.....	56
Şekil 4.6. Bleomisin dozuna bağlı olarak HeLa hücrelerinin canlılık değişimleri .....	60
Şekil 4.7. Sisplatin dozuna bağlı olarak HeLa hücrelerinin canlılık değişimleri.....	61
Şekil 4.8. CaCl <sub>2</sub> dozuna bağlı olarak HeLa hücrelerinin canlılık değişimleri .....	62
Şekil 4.9. Bleomisin ile CaCl <sub>2</sub> kombine dozlarının HeLa hücrelerinin canlılıklarına etkisi .....	63
Şekil 4.10. Sisplatin ile CaCl <sub>2</sub> kombine dozlarının HeLa hücrelerinin canlılıklarına etkisi .....	64
Şekil 4.11. HeLa hücrelerine elektroporasyon ile bleomisin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi .....	65
Şekil 4.12. EP+bleomisin ile bleomisin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması .....	66
Şekil 4.13. HeLa hücrelerine elektroporasyon ile sisplatin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi .....	67
Şekil 4.14. EP+sisplatin ile sisplatin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması .....	68
Şekil 4.15. CaEP'nin HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi .....	69
Şekil 4.16. CaEP ile yalnız CaCl <sub>2</sub> uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması .....	70
Şekil 4.17. EP ile birlikte bleomisin ve CaCl <sub>2</sub> kombinasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması .....	71
Şekil 4.18. EP ile birlikte sisplatin ve CaCl <sub>2</sub> kombinasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması .....	72
Şekil 4.19. Bleomisin maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi.....	74
Şekil 4.20. EP+Bleomisin maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi....	74
Şekil 4.21. Siplatin maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi.....	75
Şekil 4.22. EP+Siplatin maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi.....	76
Şekil 4.23. CaCl <sub>2</sub> maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi.....	77
Şekil 4.24. CaEP maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi .....	78

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.25. EP maruziyetinde hücre döngüsü .....	79
Şekil 4.26. Bleomisin ve EP+Bleomisin uygulamalarında hücre döngüsü .....	81
Şekil 4.27. Sisplatin ve EP+Sisplatin uygulamalarında hücre döngüsü .....	83
Şekil 4.28. CaCl <sub>2</sub> ve EP+ CaCl <sub>2</sub> uygulamalarında hücre döngüsü .....	85
Şekil 4.29. EKT ve CaEP Uygulamalarının Bax/Bcl-2 oranına etkisi .....	86
Şekil 4.30. EKT ve CaEP Uygulamasının p53 düzeyine etkisi .....	87

## RESİMLERİN LİSTESİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 3.1. HeLa hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri. ....	39
Resim 3.2. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar .....	41
Resim 3.3. Hücrelerin 25 cm <sup>2</sup> 'lik flasklara pasajlanmış görüntüsü.....	43
Resim 3.4. HeLa hücrelerinin 200x büyütmedeki invert mikroskop görüntüleri, (b) Thoma lamında HeLa hücrelerinin görünümü, (c) HeLa hücrelerinin proliferasyon testinde (WST-8) oluşan mor renkli formazan kristallerinin görünümü, (d) Thoma lamında tripan mavisi ile boyanan ölü HeLa hücrelerinin görünümü .....	44
Resim 4.1. E alan uygulanan HeLa hücrelerinin PI ile boyanmış immünfloresan mikroskop görüntüleri (20x Objektif).....	57
Resim 4.2. HeLa hücre hattında, Bleomisin, Sisplatin, CaCl <sub>2</sub> ile birlikte EP uygulamalarının 24 saat sonrasındaki 100x büyütmedeki invert mikroskop görüntüleri, (a) Kontrol, (b) 1,6 kV/cm EP, (c) Bleomisin 10 µM, (d) EP+Bleomisin 10 µM, (e) Bleomisin 100 µM, (f) EP+Bleomisin 100 µM, (g) Sisplatin 10 µM, (h) EP+Sisplatin 10 µM, (i) Sisplatin 25 µM, (j) EP+Sisplatin 25 µM, (k) CaCl <sub>2</sub> 1 mM, (l) EP+CaCl <sub>2</sub> 1 mM, (m) CaCl <sub>2</sub> 5 mM, (n) EP+CaCl <sub>2</sub> 5 mM.....	73

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklamalar</b>
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
cm	Santimetre
cm <sup>2</sup>	Santimetre kare
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
d	Membran kalınlığı
dk	Dakika
f	Frekans
GHz	GigaHertz
gr	Gram
Hz	Hertz
J	Joule
K	Kelvin
K <sup>+</sup>	Potasyum
kV	Kilovolt
M	Molar
mL	Mililitre
ms	Milisaniye
mV	Milivolt

**Simgeler****Açıklamalar****nm**

Nanometre

**O<sub>2</sub>**

Oksijen

**P**

Gerçirgenlik

**s**

Saniye

**V**

Volt

**V<sub>mak</sub>**

Maksimum genlik

 **$\Delta\Psi_0$** 

Dinlenim membran potansiyeli

 **$\Delta\Psi_i$** 

İndüklenmiş transmembran potansiyeli

 **$\Delta\Psi_m$** 

Mitokondri membran potansiyeli

 **$\epsilon_{mem}$** 

Membran dielektrik özelliği

 **$\mu\text{M}$** 

Mikromolar

 **$\mu\text{s}$** 

Mikrosaniye

 **$\sigma_m$** 

Ortamın geçirgenliği

 **$\sigma_{mem}$** 

Membran geçirgenliği

 **$\sigma_{sit}$** 

Sitoplazma geçirgenliği

 **$\tau_{puls}$** 

Puls süresi

**Kısaltmalar****Açıklamalar****AC**

Adenokarsinom

**AIF**

Apoptoz İndükleyici Faktör

**Apaf-1**

Apoptoz Proteaz Aktive Faktörü

**ATP**

Adenozin Trifosfat

**CAD**

Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz

**CaEP**

Kalsyum Elektroporasyon

**Kısaltmalar****Açıklamalar**

<b>CDK</b>	Siklin Bağımlı Kinaz
<b>CKI</b>	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri
<b>DISC</b>	Ölüm İndükleyen Sinyal Kompleksi
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's medium
<b>DNA</b>	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>E Alan</b>	Elektrik Alan
<b>EKT</b>	Elektrokemoterapi
<b>EP</b>	Elektroporasyon
<b>ER</b>	Endoplazmik retikulum
<b>F</b>	Faraday sabiti
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>FIGO</b>	Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu
<b>GLOBOCAN</b>	Global Kanser
<b>HeLa</b>	İnsan Serviks Kanseri Hücre Hattı
<b>HPV</b>	İnsan Papilloma Virüsü
<b>IC<sub>50</sub></b>	Hücrelerin Yarısını İnhibe Edici Konsantrasyon Değeri
<b>ICAD</b>	Deoksiribonükleaz İnhibitörü
<b>MD</b>	Moleküler Dinamik
<b>MW</b>	Mikrodalga
<b>NCKX</b>	Sodyum-Kalsiyum-Potasyum Değiştirici
<b>NCX</b>	Sodyum-Kalsiyum Değiştirici
<b>p53</b>	Protein 53
<b>PARP</b>	Poli ADP-ripoz Polimeraz
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

**Kısaltmalar****Açıklamalar****PI**

Propidyum İyodür

**PMCA**

Plazma Membranı Kalsiyum ATPaz

**PSA**

Penisilin Streptomisin Antibiyotiği

**RNA**

Ribonükleik Asit

**ROS**

Reaktif Oksijen Türleri

**RPM**

Dakika Başına Dönme Sayısı

**SCC**

Skvamöz Hücreli Karsinom

**SERCA**

Sarko-Endoplazmik Retikulum Kalsiyum ATPaz

**SR**

Sarkoplazmik Retikulum

**TNF**

Tümör Nekroz Faktör

**TNM**

Tümör-Nod-Metastaz

**UV**

Ultraviyole

## 1. GİRİŞ

Dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olan kanser, vücut organizsasyonunun en temel ögesini oluşturan hücrelerde başlar. Normal fizyolojik koşullarda vücudun ihtiyacı halinde ölen eski hücrelerin yerine yeni hücreler oluşur. Bazen bu süreç yanlış işlemeye başlar yeni hücreler, ihtiyaç olmadığı durumlarda dahi büyür ve eski hücreler gerektiğinde ölmezler. Bu süreç sonunda vücutta oluşan kitle veya anormal hücreler, tümör adı verilen bir kütle oluştururlar. Tümörler benign veya malign olarak sınıflandırılmaktadır. Benign tümörler kanser olarak tanımlanmazken, malign tümörler ise kanserdir ve yakın bölgedeki dokulara invazyon eğiliminde olup vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler. Kanser, dünyada ölüm nedenleri arasında ikinci sırada bulunmaktadır. Serviks kanseri de dünyada kadınlarda en yaygın görülen dördüncü kanser türü olup, en sık görülen jinekolojik kanserdir. Hastalığın etiyojisi çoğunlukla İnsan Papilloma Virüsü (HPV) enfeksiyonu ile bağlantılıdır. Tümör boyutuna bağlı olarak serviks kanseri için tercih edilen tıbbi tedaviler; cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi veya bunların kombine uygulamalarıdır. Kemoterapi gerek diğer tedavi seçenekleri ile kullanımı gerekse tek başına kullanımı tedavide önemli bir yere sahiptir. Fakat bununla birlikte, artan sayıda tekrarlayan vakaların varlığı, terapötik uygulamaların iyileştirilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin uygulanması için acil bir gerekliliği göstermektedir. Bleomisin ve sisplatin dahil olmak üzere çok sayıda farklı özellikte kemoterapötik ilaçlar serviks kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak, hücre membranının yapısı kullanılan kemoterapötik ilaçların hücre içine girişini sınırlı kılmaktadır. Bu sorun tedavide yüksek doz kullanımı ile aşılmaya çalışılmaktadır. Fakat yüksek doz ilaç kullanımı sağlıklı hücrelere önemli derece zarar vererek ölümlerine neden olabilmektedir. Bu nedenle, düşük doz ilaç kullanımı ile etkili bir tedavi sağlayacak yeni yöntemlerin geliştirilmesi serviks kanseri hastalarının tedavisi için kritik öneme sahiptir.

Biyoteknoloji, tıp, kanser ve hücre araştırmaları gibi alanlarda, normal hücre membranı işleviyle uyumlu olmayan kimyasal türlerin hücre membranı boyunca taşınması önemlidir. Bu yüzden moleküllerin hücre membranından transportunu sağlamak için mekanik, kimyasal, biyolojik ve elektriksel (elektroporasyon) olmak üzere çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Elektroporasyon (EP), güçlü elektrik pulslarının (1  $\mu$ s ila birkaç ms için 1-4 kV/cm) uygulanmasıyla birlikte hücre membranında nanometre boyutlarında geçici porların oluşmasını sağlayan basit ve nispeten toksik olmayan fiziksel bir yöntemdir. EP

yöntemi, normalde membranı geçemeyen (DNA, RNA, proteinler, antikorlar, ilaçlar vb.) moleküllerin geçişine olanak sağlayan bir olgudur. Membranların şarj süresine kıyasla hücrelere yüksek yoğunluklu elektrik alanların uygulanması, yükün yeniden dağılımına ve dinlenme potansiyeline ek olarak bir transmembran potansiyelinin oluşmasına neden olur. Transmembran potansiyeli birkaç yüz milivoltu aştığında, membran kararsızlıklarına yol açan yapısal düzenlemeler yeniden başlar ve kararsız zar daha sonra şekil değiştirerek nano ölçekli gözenekler olan hidrofilik yollar oluşturur ve molekül transferi ise bu gözeneklerden elektriksel kontrol altında veya difüzyon yoluyla gerçekleşir.

Elektrokemoterapi (EKT), hücre membranı tarafından zayıf geçirgenliğe sahip bir sitotoksik kemoterapötik ajanın geri gönüşümlü EP uygulaması ile birlikte uygulanarak hücre içine ilaç difüzyonunu artıran, lokal ve termal olmayan bir tümör tedavi yöntemidir. EKT ile kemoterapötik ajanın dozu düşürülerek tedavi sonrası oluşan yan etkiler azaltılabilmektedir. Bunun yanında tedavide kullanılan mevcut kemoterapötik ilaçlar yerine farklı yeni nesil anti-kanser ilaçların geliştirilmesi gerekliliği de devam etmektedir. Çoğu anti-kanser uygulaması, hücre içi kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) sinyal mekanizmalarını etkiler ve kanser tedavisinde hedef olarak  $Ca^{+2}$  yolaklarını destekler. Kemoterapötik ajanların yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalarda  $Ca^{+2}$ elektroporasyonun (CaEP) ATP miktarının azalmasına bağlı olarak tümör hücrelerinin ölümüne neden olabileceği ifade edilmektedir. Bu durum yan etkileri fazla, uygulama zorlukları ve maliyeti yüksek olan kemoterapötik ajanlar yerine yan etkileri çok daha az ve ucuz olan  $Ca^{+2}$  'un EP ile birlikte kanser tedavisinde kullanılabileceği fikrini desteklemektedir.

Bu çalışmada, serviks kanseri hücrelerinde (HeLa) EKT uygulaması ile kemoterapötik ilaçların etkisinin değerlendirilmesi, minimum ilaç dozlarında maksimum sitotoksisite ve kanserli hücre ölümünün sağlanması ve bu sayede sağlıklı hücre ölümlerinin önüne geçilerek kemoterapi kaynaklı yan etkilerin azaltılabileceğinin belirlenmesi, bunun yanında CaEP'nin HeLa hücrelerindeki sitotoksik etkisinin araştırılması ve oluşan etkilerin hücresel mekanizmalarla olan ilişkisini belirleyerek literatüre katkı sunulması amaçlandı. Ayrıca bu tez çalışması CaEP'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin ilk kez değerlendirildiği, Türkiye'de yapılan bir araştırma olması bakımından da özgün ve farklılık göstermektedir. Çalışma neticesinde alınan sonuçların Türkiye'de serviks kanseri tedavisinde EKT ve CaEP'nin klinik uygulamalarına ışık tutacağı düşünülmektedir.

Çalışma 4 aşamada planlandı ve uygulandı.

1. *Aşama*; Farklı elektik (E) alan şiddetlerinin HeLa hücrelerinin hücre canlılığı ve permeabilizasyon değerleri üzerindeki etkilerini belirleyerek EKT ve CaEP uygulamaları için etkin E alan değerinin belirlenmesi.

2. *Aşama*; Çalışma için seçilen kemoterapötik ajanların (bleomisin ve sisplatin) ve  $\text{CaCl}_2$ 'nin belirlenen dozlarda HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi ve hücrelerin yarısını inhibe eden konsantrasyon ( $\text{IC}_{50}$ ) değerlerinin hesaplanması.

3. *Aşama*; EKT ve CaEP uygulamalarının HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi,  $\text{IC}_{50}$  değerlerinin hesaplanması ve EP uygulamasının sitotoksosite üzerindeki etkisini belirlenmesi.

4. *Aşama*; Etkilerin hücrel mekanizmalar düzeyinde belirlenmesi için mitokondri membran potansiyeli ( $\Delta\Psi_m$ ), hücre siklusu ve gen ekspresyon (p53, Bax, Bcl-2) değişimlerinin belirlenmesi.

Bu tez çalışması 6 bölümden oluşmaktadır. Bölümlerde açıklanan konular ve sonuçlar aşağıdaki sıra ile verilmiştir.

2. *Bölüm*; Elektroporasyon teorisi ile başlamakta olup geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz elektroporasyon türleri, EKT uygulaması, kemoterapötik ilaçların etki mekanizması, kalsiyum ve CaEP mekanizmaları, hücre ölümü ve serviks kanserinin açıklanması ile tamamlanmaktadır.

3. *Bölüm*; Deney çalışma grupları ve deney planlaması ile başlayıp çalışma sırasında kullanılan cihaz ve malzemelerin sunulması, hücre kültürü, analiz protokolleri ile devam edip deney uygulama yöntemlerinin verilmesi ile son bulmaktadır.

4. *Bölüm*; Farklı E alan şiddetlerine bağlı olarak hücre canlılığı/sitotoksosite ve permeabilizasyon bulguları ve etkin E alan değerinin belirlenmesi, ilaç ve  $\text{CaCl}_2$  uygulamalarının canlılık üzerindeki etkileri ve  $\text{IC}_{50}$  değeri bulguları, EKT ve CaEP maruziyetinin canlılık ve sitotoksosite üzerindeki etkilerine dair bulgular, EP ve EP'siz

yapılan uygulamaların  $\Delta\Psi_m$ , hücre döngüsü ve gen ekspresyonu değişimlerine ait bulgular verilerek tamamlanmıştır.

5. *Bölüm*; Deney sonuçlarından elde edilen etkin E alan değeri,  $IC_{50}$  değerleri, uygulamaların sitotoksosite üzerindeki etkileri ve mekanizmalara ait bulgular literatürde mevcut çalışma sonuçları ile kıyaslanarak değerlendirilmesini içermektedir.

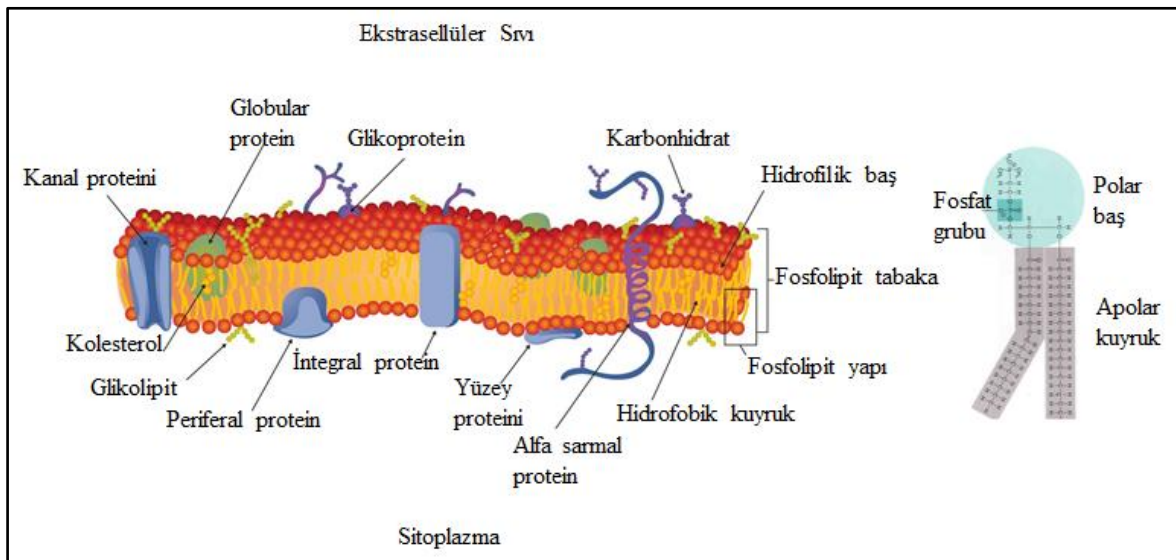
6. *Bölüm*; Deney çalışmalarından alınan bütün sonuçların yorumlanarak çalışmanın literatüre katkısını kapsamaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Elektroporasyon Teorisi

Hücre membranı, çift tabaka halinde spontan şekilde organize olan lipitler (fosfolipitler, glikolipitler ve kolesterol), karbonhidratlar ve proteinlerden oluşur. Hücre membranının fosfolipit bileşeni, "baş" kısım olarak adlandırılan hidrofilik (polar) yapı ve "kuyruk" olarak bilinen hidrofobik (apolar) yapıdan oluşur. Bu yapı sayesinde hücre membranı sulu elektrolit çözeltisinde baş kısmı dış ve kuyruk kısmı ise iç kısımda olacak şekilde kendiliğinden toplanarak çift tabakayı meydana getirir.

Hücre membranına elektriksel açıdan bakıldığında her iki tarafı sulu elektrolit çözeltileriyle çevrelenmiş ince bir yalıtım katmanı olarak düşünülebilir. Pulsu E alan uygulaması gibi belirli koşullar altında, membranın bütünlüğü geçici olarak bozulur ve bileşenlerinin yeniden düzenlenmesi ile zardan geçemeyen moleküllerin taşınmasına olanak sağlayan sulu hidrofilik gözeneklerin oluşumuna yol açar.



Şekil 2.1. Hücre membranı ve fosfolipit yapı

EP, hücre ve dokulara pulslu E alan uygulaması ile membranda nanometre (nm) boyutunda hidrofilik porlar oluşturarak membran geçirgenliğinin artırıldığı biyofiziksel bir olaydır.

EP'nin altında yatan mekanizma henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da, süreci tanımlamak için iki teorik model önerilmektedir: Por oluşumu teorisi ve lipit çift tabakada kararsızlık teorisi [1-6].

### 2.1.1. Por oluşum teorisi

Hücre membranının yapısal bütünlüğü, uygulanan pulslu E alan tarafından bozulabilir, fakat fizikokimyasal mekanizmalar, lipit çift tabakanın yeniden düzenlenmesine olanak sağlar [7].

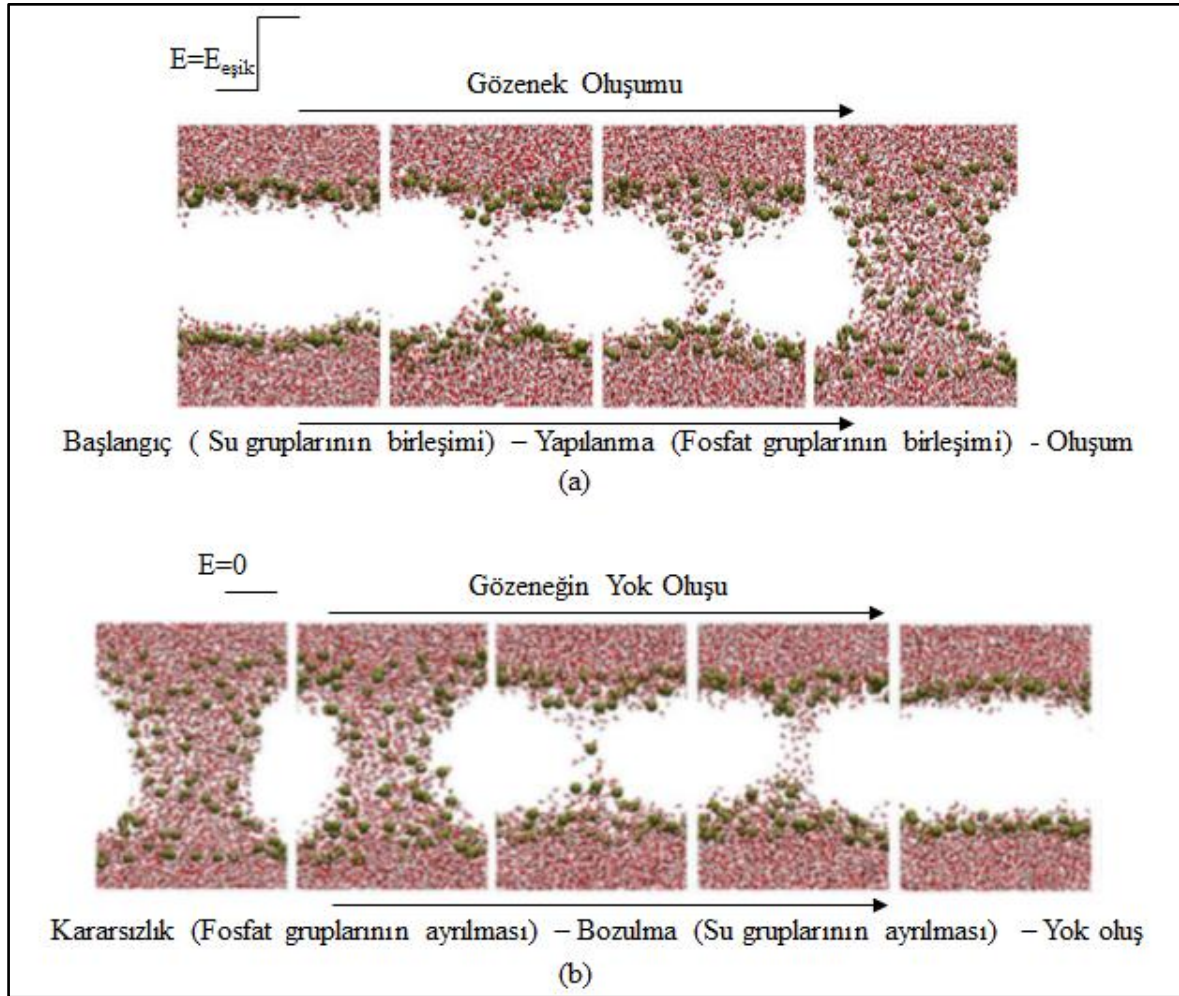
Geleneksel yöntemlerle nm boyutundaki porları gözlemek ve geçirgenleştirme dinamiklerini ayrıntılı olarak karakterize etmek mümkün değildir. Bu nedenle hesaplama yöntemlerini kullanmaya ihtiyaç vardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda lipit çift tabakası üzerindeki pulslu E alan etkilerini araştırmak için moleküler dinamik (MD) simülasyonları kullanılmıştır [8, 9]. MD simülasyonları gerçekleştirilirken belirli bir t anındaki kuvvet, konum, hız veya momentum gibi büyüklükler verilir ve daha sonra bu büyüklüklerin  $t+\Delta t$  zamanındaki durumunu tahmin etmek için kullanılır. Burada  $\Delta t$  bir femtosaniye ( $10^{-15}$ s) zaman birimidir.

Por oluşumu, pulslu E alan uygulandığı sürece gerçekleşir. Pulslu E alan kaldırıldıktan sonra, su molekülü ve fosfolipit baş grubu ters yönde membranın içinden dışarı geçerek por boyutunda bir azalma gözlenir. Oluşan elektroporun yaşam döngüsü por oluşumu ve por kapanması olarak iki ana adımla karakterize edilmektedir. [10].

Hücreye pulslu E alan uygulandığında su molekülleri membran yapısının düzenlenmesini indükleyerek çift tabaka arasında geçmeye başlar. Daha sonra membranın iç kısmındaki fosfolipit baş grubu oluşan yeni yapılanmaya göre düzenlenir ve por oluşumu tamamlanır [11].

Porun kapanması uygulanan E alanın kaldırılmasıyla başlar. Kapanma evresinde por boyutunun küçüldüğü yarı kararlı bir durum söz konusudur. Sürecin devamında fosfolipitlerin baş grupları ve su molekülleri membranın dışına doğru geçmeye başlar, fosfolipit grupları tamamen membrandan çıktığında sadece su molekülleri çift tabakanın içindedir ve stabil membran yapısına dönmek üzere membranın iki tarafına hızla hareket

ederler. Porun kapanma süreci por oluşumundan daha uzun bir süreçtir, MD ayrıca oluşan porların yaşam döngüsünün bazı adımlarının alana bağımlı olduğunu, diğerlerinin ise E alan gücünden daha az etkilendiğini göstermiştir [11, 12].



Şekil 2.2. Por oluşum teorisi a) Por oluşumu, b) Porun kapanması

### 2.1.2. Lipit çift tabakada kararsızlık teorisi

Pulslu E alan uygulaması hücre membranında geçici kararsızlığa neden olur. Geçici membran kararsızlığı, hücrenin işlevselliğini ve en kötü durumda yaşayabilirliğini etkileyebilecek bir stresi temsil eder. Pulslu E alanının uygulanmasından sonra, hücrelerde meydana gelen hasarı kontrol etmek için hücrelerin dakika/saat'ler süresince izlenmesi gerekir.

Elektro-geçirgenleştirme olayı biri puls uygulaması sırasında ve diğeri puls uygulamasından sonra olmak üzere birbirini takip eden iki adımda ortaya çıkar. İki süreç de farklı kinetiklere sahiptirler. İlk adım hızlıdır ( $\mu\text{s}$  ila  $\text{ms}$ ) ve kısadır, E pulsunun olması gerekir ancak hücre ölümünü önlemek için uygulanan E alanın şiddetine bağlı bir sınır vardır. Bu adım sırasında elektroforetik etkiler gözlemlenebilir.

İkinci adım ise, pulslu E alan uygulamasından sonra birkaç saniyeden birkaç dakikaya kadar süren uzun ve yavaş bir süreçtir. E alan uygulanması membran potansiyelinde artışa neden olur. Bu artış kritik bir değere (200 mV) ulaşırsa, lipid çift tabaka membran üzerindeki kuvvetlere dayanamaz ve sızmalar gerçekleşebilir. Membran üzerinde indüklenen sızıntı durumunu ms zaman ölçeğinde zarın yeniden düzenlenmesi takip eder. Sızıntıların yavaş bir şekilde kapanması saniyeler süresince gözlemlenir ve böylece membran, bütünlüğünü geri kazanabilir. Membranın bütünlüğünü geri kazanması büyük ölçüde sıcaklığa bağlıdır, hücreler düşük sıcaklıkta ( $4^{\circ}\text{C}$ ) saatlerce geçirgen tutulabilirken  $37^{\circ}\text{C}$ 'de hızlı bir kapanma gerçekleşir. Membranın bütünlüğünü geri kazanmasından sonra canlılık etkilenmez fakat membran yapısı hala değişken durumdadır. Hücrenin başlangıç durumuna geri dönmesi için saatlere ihtiyacı vardır. Bu durum elektro-geçirgenliğin sadece lipid çift tabakanın değişim süreci olmadığını, hücre davranışlarını da içeren hücresel bir süreç olduğunu göstermektedir [6, 13].

### 2.1.3. Membran potansiyeline etki

Bütün canlı hücrelerde intraselüler ve ekstraselüler ortam arasında bir elektriksel potansiyel fark vardır. Bu potansiyel fark, istirahat membran potansiyeli olarak isimlendirilir. Oluşan potansiyel farkın sebebi membranın içi ve dışı arasındaki yük dağılımının farklılığından kaynaklanır. Hücrede ekstraselüler ortamda pozitif yük fazlalığı, intraselüler ortamda ise negatif yük fazlalığı mevcuttur. Bu nedenle istirahat durumunda hücrenin içi dışına göre daha negatiftir. Membranın tek bir iyonla geçirgen olduğu durumda istirahat membran potansiyeli Nernst denklemi (2.1) ile ifade edilir. Bu durumda membran potansiyeli, o iyonun denge potansiyeline eşit olur.

$$E_m = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_{dış}}{[X]_{iç}} \quad (2.1)$$

Biyolojik membranlar birden çok iyonu geçirgenlik gösterir. Bu durumda istirahat membran potansiyeli sadece intraselüler ve ekstraselüler ortamdaki iyon konsantrasyonlarına değil, membranın bu iyonlara ait geçirgenlik değerine de bağımlı olur. Bu durumda istirahat membran potansiyelini hesaplamak için Goldman-Hodgkin-Katz denklemi (2.2) kullanılır.

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_{dış} + P_{Na}[Na]_{dış} + P_{Cl}[Cl]_{iç}}{P_K[K]_{iç} + P_{Na}[Na]_{iç} + P_{Cl}[Cl]_{dış}} \quad (2.2)$$

Burada R evrensel gaz sabiti olup  $8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  'e eşittir. T Kelvin cinsinden sıcaklıktır, z iyon türünün değeridir, F Faraday sabitidir ve  $96,485 \text{ C mol}^{-1}$  'e eşittir. P, membranın o iyonu karşı gösterdiği geçirgenlik ifadesidir.  $[X]_{dış}$ , hücre dışı ortamdaki iyon türünün konsantrasyonudur ve  $[X]_{iç}$ , iyon türünün hücre içi konsantrasyonudur. Dinlenme membran potansiyeli hücreden hücreye göre değişiklik gösterir, nöronlar için  $-70 \text{ mV}$ , iskelet kası hücresi için  $-90 \text{ mV}$  ve epitel hücreleri için  $-50 \text{ mV}$  civarındadır.

Canlı hücrelerin bulunduğu biyolojik bir süspansiyona pulslu E alan uygulandığında hücre membranı üzerinde zıt işaretli yüklerin birikmesine neden olur bu durumda zarın iç ve dış kısmı arasındaki potansiyel farka indüklenmiş transmembran potansiyeli denir ve  $\Delta\Psi_i$  denklemi (2.3) ile ifade edilir [14].

$$\Delta\psi_i = f \cdot E \cdot R \cdot \cos(\theta) \cdot \left[ 1 - e^{-\frac{t}{\tau_m}} \right] \quad (2.3)$$

R hücrenin yarıçapıdır,  $\theta$ ,  $\Delta\Psi$ 'nin hesaplandığı nokta ile uygulanan E alan arasındaki açıdır, f denklem (2.4)'de gösterildiği gibi hücrenin dielektrik ve geometrik özelliklerine bağlı parametredir.  $\tau_m$  Membran şarj süresi sabiti olup, zarın ( $\sigma_{mem}$ ), sitoplazmanın ( $\sigma_{sit}$ ), dış ortamın ( $\sigma_m$ ) geçirgenliğine ve membranın dielektrik özelliği ( $\epsilon_{mem}$ ) ile zar kalınlığına (d) bağlıdır ( Denklem 2.5).

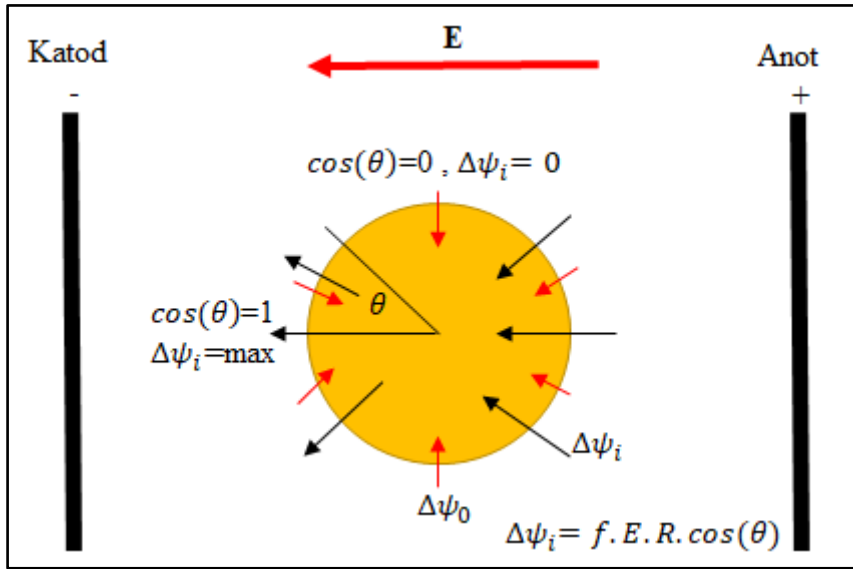
$$f = \frac{3 \cdot \sigma_m [3 \cdot d \cdot R^2 \cdot \sigma_{sit} + (3 \cdot d^2 \cdot R - d^3) (\sigma_{mem} - \sigma_{sit})]}{2 \cdot R^2 (\sigma_{mem} + 2 \sigma_m) (\sigma_{mem} + \frac{1}{2} \sigma_{sit}) - 2 (R - d)^3 (\sigma_m - \sigma_{mem}) (\sigma_{sit} - 2 \sigma_{mem})} \quad (2.4)$$

$$\tau_m = \frac{R \cdot \epsilon_{mem} / d}{\frac{2 \sigma_m \sigma_{sit}}{2 \sigma_m + \sigma_{sit}} + \frac{R}{d} \sigma_{mem}} \quad (2.5)$$

Yalıtkan bir zara sahip küresel şekilli hücreler düşünüldüğünde,  $\sigma_{mem} > \sigma_m$ ,  $\sigma_{sit}$  ve f faktörü 3/2'ye eşit olarak basitleştirilebilir. Bu sadeleştirme Schwan denklemi (Denklem 2.6) ile verilir [15, 16].

$$\Delta\psi_i = \frac{3}{2} \cdot E \cdot R \cdot \cos(\theta) \quad (2.6)$$

Schwan denklemi, elektroporasyon veya elektrofüzyon için kritik transmembran potansiyeline ulaşmak için gereken E alanını belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, Schwan denklemi sadece homojen bir dış E alana maruz kalan küresel şekilli hücreler için geçerli olup farklı şekilli parçacıklar durumunda şekil faktörünün dahil edilmesi gerekmektedir [17-19].



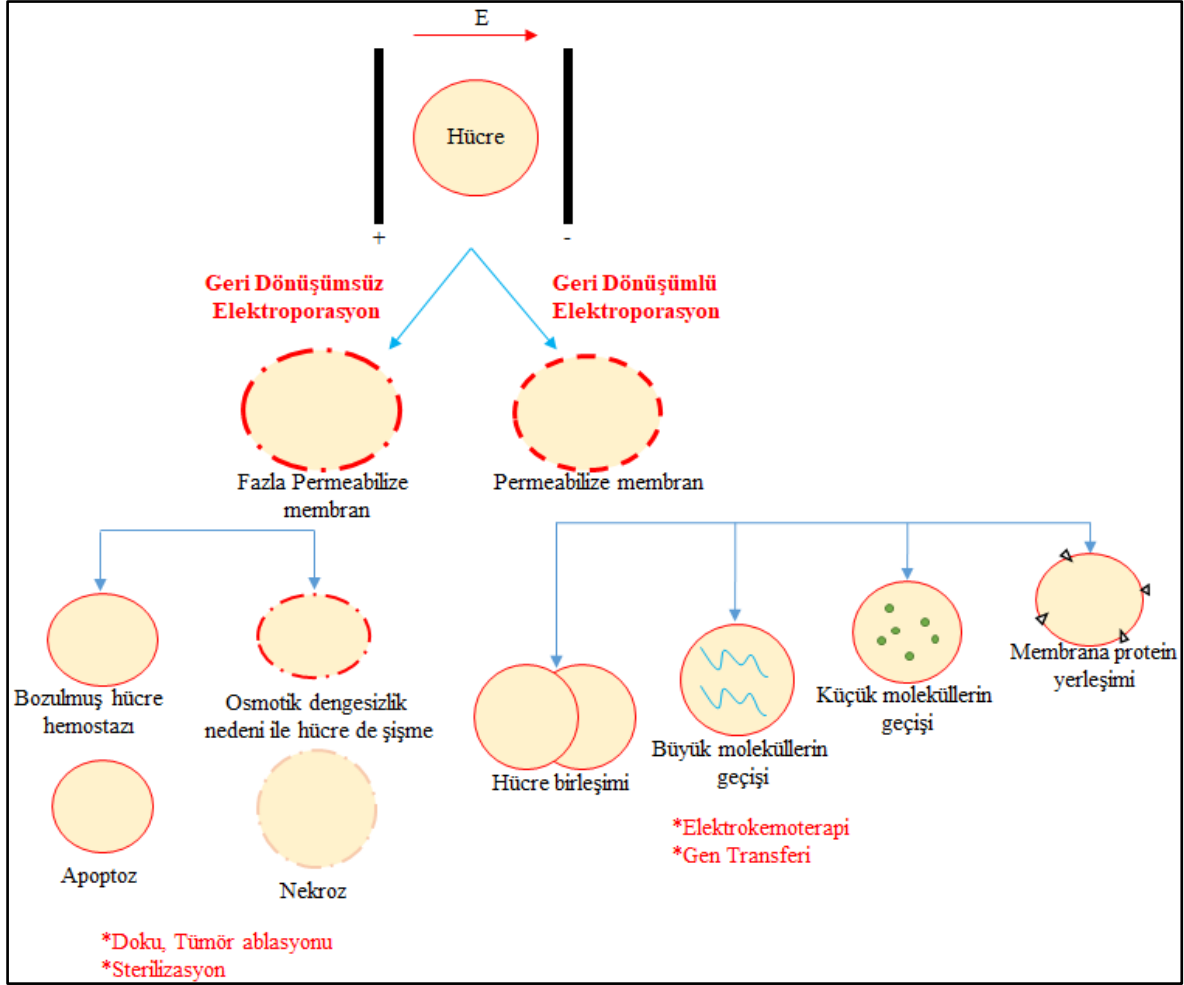
Şekil 2.3. Yarıçapı R olan küresel parçacığa uygulanan E alan. Kırmızı oklar dinlenme potansiyelini ( $\Delta\Psi_0$ ) ve siyah oklar indüklenmiş transmembran potansiyelini ( $\Delta\Psi_i$ ) temsil eder.

Elektriksel yüklerden oluşan karmaşık bir sistem olan hücre, pulslu bir E alana maruz kaldığında hücre membranının topolojisi değişir. Pulslu E alan uygulamasının hücre üzerinde görülen ilk etkisi, hücrenin şeklini küreselden elipsoide doğru değiştirmesidir. E alan uygulaması çoğunlukla hücre iskeletine bağlanmış proteinleri etkileyerek membran proteinlerinde bir takım değişikliklere yol açar [20].

#### 2.1.4. Geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz elektroporasyon

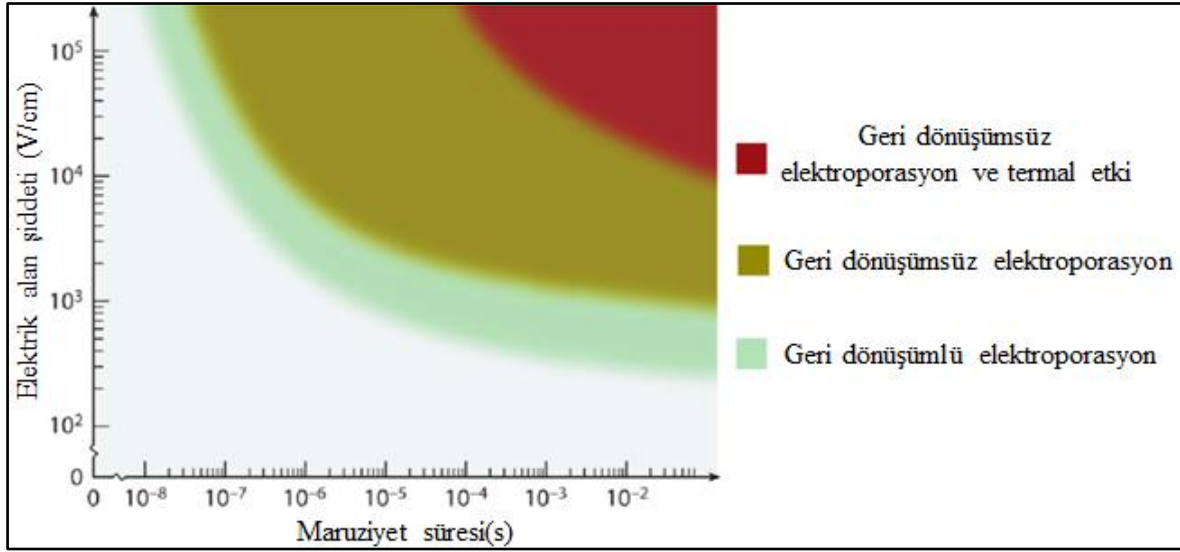
Elektro-permeabilizasyon bir eşik olgusudur ve puls parametrelerinin özelliklerine bağlı olarak geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz por oluşumuna neden olabilir. Hücre zarında geçici sulu gözeneklerin oluşumunu tetiklemek için, uygulanan E alan 200 mV - 1V aralığında kritik bir değere ulaşmalıdır [21, 22].

EP'nin etkinliği, uygulanan E pulsu parametrelerine (pulsun şekli, sayısı, süresi ve şiddeti) bağlıdır. Membran elektroporasyonunu sağlayan uygulamalar oldukça kısa süreli (mikrosaniye ( $\mu$ s), milisaniye (ms)) ve E alan şiddeti ise kV/cm'ler düzeyindedir. E alan eşik değerinin altında tutulursa, hücre membranını orijinal durumunu geri kazanabilir ve böylece geri dönüşümlü elektroporasyon'dan bahsedilebilir [23]. Geri dönüşümlü elektroporasyonda 1  $\mu$ s ile 1 ms arasında pulslar uygulanarak 0,5-1 V arasında transmembran potansiyeli oluşturulur. Böyle bir yükselme için E pulsunun genliği 1000-10.000 V/cm arasında olmalıdır. Geri dönüşümlü elektroporasyon, membranın geçici yüksek iletkenlik durumudur ve hücrelerin canlılığını koruduğu normal şartlarda altında membran tarafından dışlanan tıpta ve biyoteknolojide, küçük moleküllerden (floresan boya, ilaçlar, vb.) büyük moleküllere (DNA, antikorlar, vb.) kadar değişen maddeleri hücre içine girişini sağlamak için kullanılır [20, 24].



Şekil 2.4. Elektroporasyon uygulamaları

Eğer E alan eşik değeri aşarsa, hücre membranı hasar görür ve hücre canlılığı tehlikeye girer bu durum, geri dönüşümsüz elektroporasyon'dur [25, 26]. Geri dönüşümsüz elektroporasyon hücrede kimyasal strese yol açarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Geri dönüşümsüz elektroporasyon non-termal etkisi ile tümör ablasyonunda kullanılmaktadır [27].



Şekil 2.5. Elektroporasyon uygulamasının etkileri: E alan şiddeti ve maruz kalma süresinin bir fonksiyonu olarak geri dönüşümlü - geri dönüşümsüz elektroporasyon ve termal etki

### 2.1.5. Elektroporasyon verimliliğini etkileyen faktörler

Hücelere uygulanan EP'nin verimliliğini etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar; E alan şiddeti, puls genişliği, puls sayısı ve şeklidir. Etkili bir EP uygulaması için bu faktörlerin iyi belirlenmesi gereklidir.

#### Elektrik alan şiddeti

E alan şiddeti, EP'nin verimini ve hücre canlılığını etkileyebilecek en önemli faktördür. Hücreleri elektropore etmek için indüklenmiş transmembran potansiyeli ( $\Delta\Psi_i$ ), eşik potansiyele yaklaşmak için yeterince büyük olmalıdır. Denklem 2.6'da görüldüğü gibi  $\Delta\Psi_i$ , E alan şiddeti ile doğru orantılıdır. Uygulanan E alan çok düşük ise  $\Delta\Psi_i$ , eşik potansiyelden çok daha küçük olacak ve hücre membranında elektriksel bozulma meydana gelmeyecektir. Bu durumda hücreler uygun şekilde elektropore olamazlar. Diğer taraftan, uygulanan alan şiddeti çok yüksek ise  $\Delta\Psi_i$ , eşik potansiyelden çok daha büyük olacak ve geri dönüşü olmayan membran bozulmasına yol açacaktır. Bu durumda membranda oluşan porlar kapanmaz ve hücre ölümü meydana gelir. Bu nedenle uygun bir alan kuvvetinin seçilmesi EP uygulaması için kritik bir adımdır. Denklem 2.6'da görülebileceği gibi sabit bir indüklenmiş transmembran potansiyeli oluşturmak için gereken alan şiddeti, hücrenin yarıçapı ile ters orantılıdır. Dolayısıyla, küçük hücreleri elektropore etmek için kullanılan alan şiddeti çok yüksek olup yaklaşık olarak olarak 10 kV/cm düzeyindedir. Memeli kültür

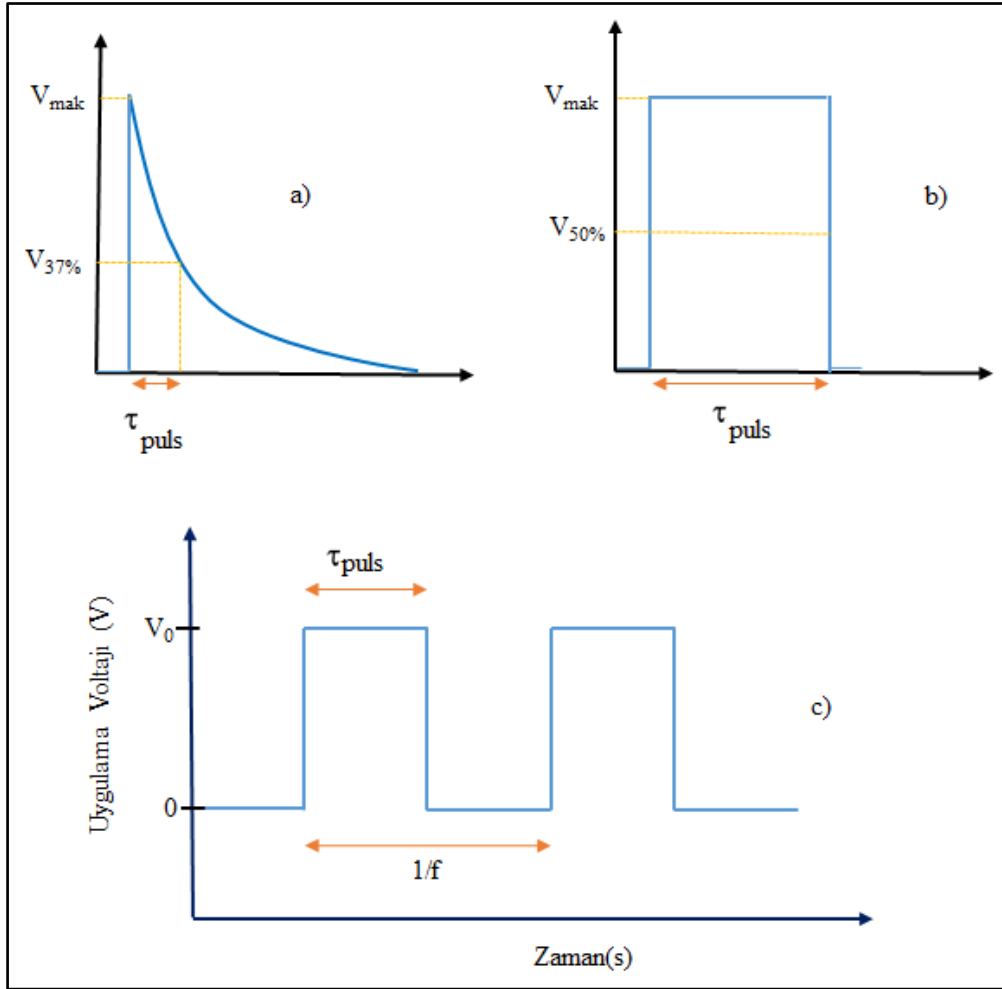
hücreleri gibi daha büyük hücreler için uygulanan alan şiddeti ise yaklaşık 1-2 kVcm'dir [1, 28, 29].

### Puls genişliği

Etkili bir EP için en önemli ikinci parametre puls genişliğidir ve  $\tau$  ile ifade edilir.  $\tau$ , çok kısa olduğunda, zarda elektriksel bir bozulma meydana gelebilmesi için yeterli zaman olmayacaktır. Ancak çok uzun bir  $\tau$ , membranda aşırı hasara neden olur ve hücre canlılığını devam ettiremez. Kare puls kullanıldığında, tipik darbe genişliği ms'nin 1/10'undan daha azdır. E alan şiddetinin ve puls genişliği parametrelerinin birbirini tamamladığı bulunmuştur. Belirli bir hücre tipi için puls genişliği azaltıldığında optimal E alan değeri artar [29].

### Puls sayısı ve şekli

EP'de en sık kullanılan iki tür dalga şekli vardır. Bunlar, eksponansiyel dalga ve kare dalga'dır. Eksponansiyel dalga formu genellikle bakteri çalışmalarında kullanılmaktadır. Kare dalga pulsü ise, daha çok memeli hücre çalışmalarında, elektrokemoterapi ve DNA transferinde tercih edilmektedir. Büyük voltaj kuyruk profilinden dolayı ekponansiyel dalga pulsü elektroforatik harekete yol açarak hücrenin iletkenliğini yüksek değerlere çıkarabilmektedir fakat varyansları fazladır. Kare dalga pulsün voltaj ve süresi sabittir. Bu yüzden ilacın membrandan kontrollü olarak uygulanması kare dalga puls ile daha iyi yapılabilmektedir. Etkili membran elektroporasyonu için bazı hücrelerde tek bir darbe bile yeterli olabilmektedir. Fakat çoğu hücre tipinde çoklu pulsların uygulanması gen transferi ve elektrokemoterapi verimliliğini büyük ölçüde artırmaktadır. Elektrokemoterapi uygulamalarında 8 kare dalga pulsü kullanılmaktadır [30].



Şekil 2.6. Elektroporasyon parametreleri a) Eksponansiyel puls, b) Kare puls ve c) Puls genişliği

## 2.2. Elektrokemoterapi (EKT)

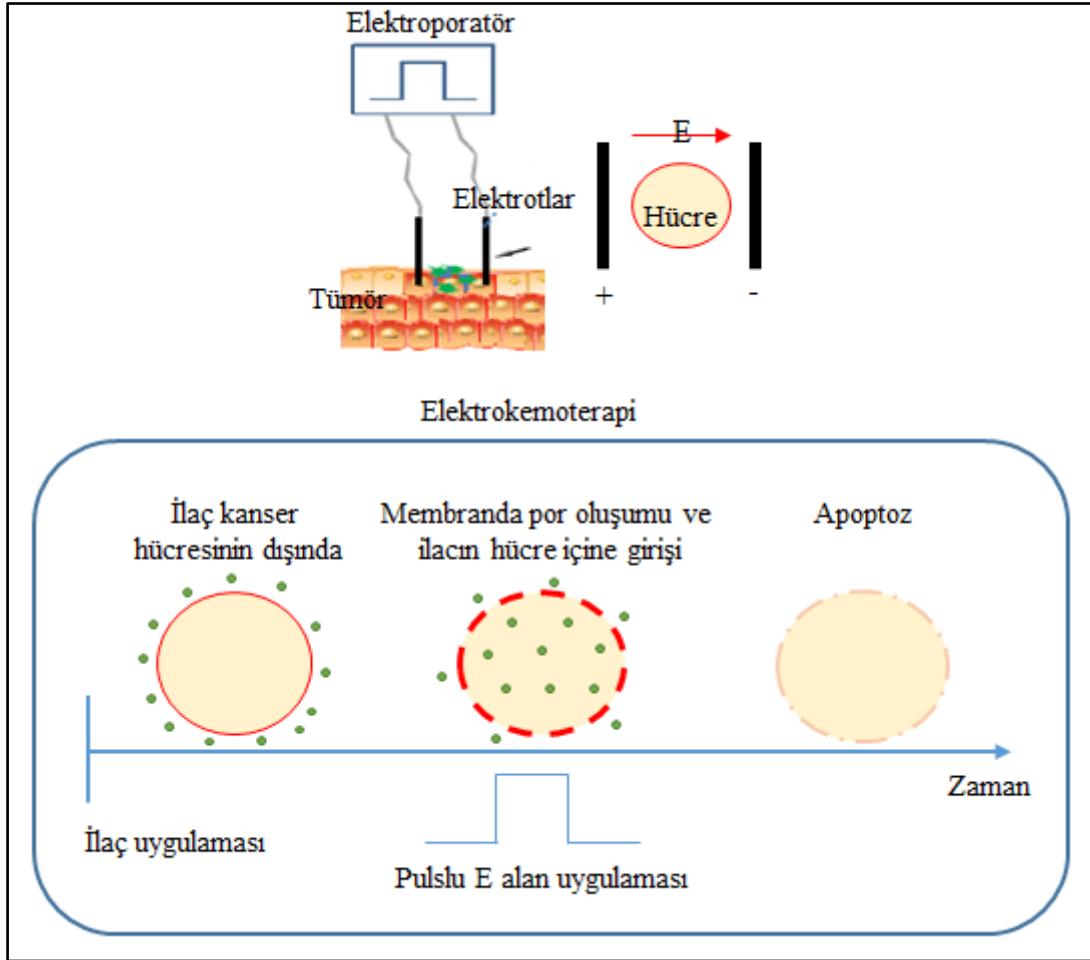
Kanser tedavisi multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Genel olarak kanser tedavisinde üç ana tedavi yöntemi vardır: Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi. Cerrahi ve radyoterapi lokal ablatif tedavileri temsil ederken, kemoterapi sistemik bir tedavi yöntemidir.

Kemoterapinin amacı kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlatmak, durdurmak ve hücreleri ölüme sürüklemektir. Kemoterapinin sistemik bir tedavi olması nedeniyle tedavide kullanılan kemoterapötik ilaçlar tüm vücudu etkiler. Kemoterapötik ilaçlar hızla büyüyen kanser hücrelerine saldırırlar, ancak bunun yanında hızla büyüyen sağlıklı hücreleri de önemli derecede etkilemektedir. Hücre membranının özelliğine bağlı olarak kemoterapötik ilaçların membranı geçememesi tedavi etkinliğini önemli derecede azaltmakta ve yan etkileri artırmaktadır. Kanser tedavisinde ilaç dozunun artırılması

tedavide olumlu sonuçlar ortaya çıkarsa da hastaların bağışıklık sisteminin zayıflamasına ve sağlıklı hücrelerin ölümüne yol açar. Mide bulantısı, kusma, iştah kaybı, saç dökülmeleri ve ağız yaraları kemoterapinin en sık görülen yan etkileri arasındadır. Kemoterapi, kemik iliği hücrelerine zarar vererek kan hücresi sayılarında düşümlere neden olmaktadır. Beyaz kan hücrelerinin yapımındaki yetersizlikten dolayı artan enfeksiyon olasılığı ve düşük kırmızı kan hücresi sayımı ile nefes darlığı gibi problemler kemoterapinin önemli yan etkileri arasındadır.

EP, biyokimyasal ve farmakolojik olayları incelemek amacıyla farklı moleküllerin hücre membranı boyunca taşınmasını kolaylaştırmak için kullanılır. Dış E alan uygulaması, hücre membranının transmembran potansiyelini değiştirir. Eşik değeri aşıldığında hücre membranında porlar oluşturularak membranın geçirgenliğinin artması sağlanır [31]. Kemoterapötik ilaçların varlığında oluşan porlar hücre içi ilaç birikimine ve sitotoksitenin artmasına neden olur. EP, bleomisin, sisplatin, melfalan, metotreksat, doksorubisin, vb. gibi çeşitli kemoterapötik ilaçların hücre içi konsantrasyonunu sağlamak ve artırmak için etkili bir uygulama yöntemidir [32, 33].

EKT, zayıf nüfuzlu bir sitotoksik madde uygulaması ile geri dönüşümlü elektroporasyon uygulamasını birleştirerek ilaç difüzyonunu geliştiren lokal ve termik olmayan bir tümör tedavi yöntemidir. Hücre dışı ilaç konsantrasyonunun en yüksek olduğu zamanda gerçekleştirilen geri dönüşümlü EP uygulaması kemoterapötik ilaçların hücre içine alımını kolaylaştırarak iyi bir anti-tümör etkinlik sağlamaktadır [34]. EKT alternatif bir tedavi yaklaşımı olarak veya standart tedaviler (cerrahi, kemoterapi, radyoterapi) sonrasında palyatif tedavi olarak kullanılabilir. Dolayısıyla EKT ile kemoterapötik ajanın dozu düşürülürken ve yan etkilerin şiddeti azaltılabilir. Elektrokemoterapi yönteminin etkinliği, pulslu E alan uygulamasından sonra oluşan vasküler kilit, vasküler bozulma ve organizmada gelişen immün yanıt ile artmaktadır [35, 36].



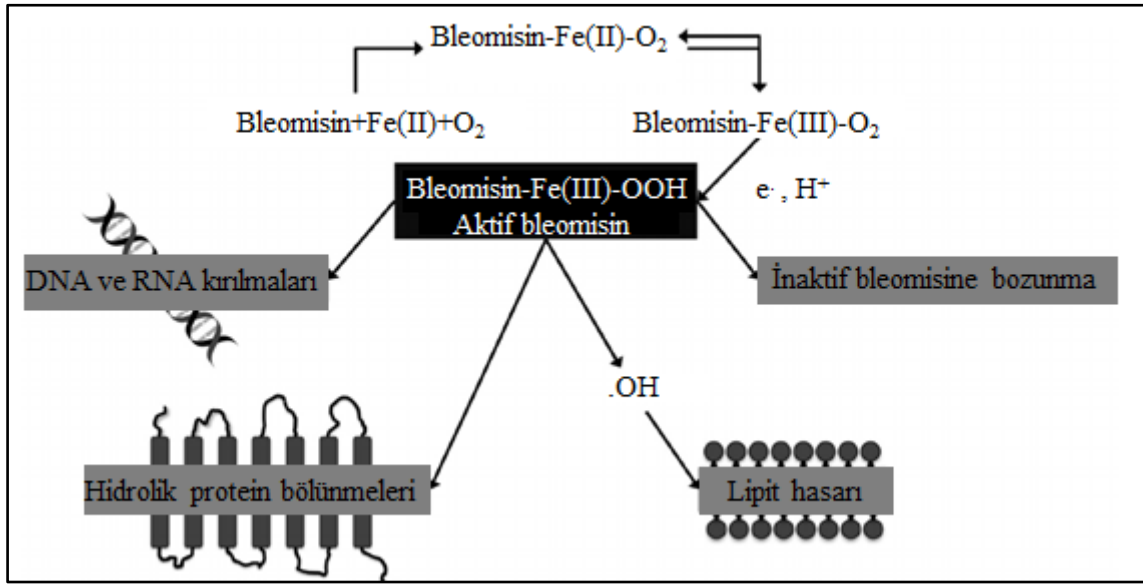
Şekil 2.7. Elektrokemoterapi Uygulaması

### 2.2.1. Bleomisin

Bleomisin, 1966 yılında Japonya'da bir kömür madenindeki topraktan toplanan *streptomyces verticillus* mantarının kültüründen izole edilen suda çözünür yapıda bir glikopeptit antibiyotığıdır [37, 38].

Bleomisinin sitotoksitesi, uzun hücre döngüsünü durdurmasına, apoptoza ve mitotik hücre ölümüne neden olan, DNA fragmantasyonu olarak görülen tek ve çift zincirli DNA kırıkları yapabilme yeteneğinden kaynaklanır [39-42]. DNA kırıklarının oluşması çok hızlı gerçekleşir. Hücre içerisine bleomisin girişinden itibaren 30 sn içinde DNA'nın parçalandığı gösterilmiştir [43, 44]. Bleomisin, zincir kırıkları olmaksızın serbest nükleik bazların salınımı, RNA'nın oksidatif bozunması ve lipid peroksidasyonu gibi hücre hasarına neden olan başka etkilere sahip olabileceği ifade edilmiştir [41, 45].

Antineoplastik bir ajan olarak bleomisin, Hodgkin hastalığı, Hodgkin dışı lenfoma, testis kanseri ve serviks kanseri gibi birçok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak klinikte kullanılmaktadır. Bleomisin, intrasellüler olarak aşırı derecede toksik etkiler gösterir. Ancak bu çok yüksek içsel sitotoksosite, bleomisinin hücre zarından serbestçe geçememesiyle sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda hücre dışı ortama eklenen bleomisin'in %0,1'den daha azının hücrelerle ilişkili hale geldiği ve bleomisinin sitotoksitesinin elektroporasyon ile 300-700 kat artırılabilceği görülmektedir [40, 41, 43, 46-48].



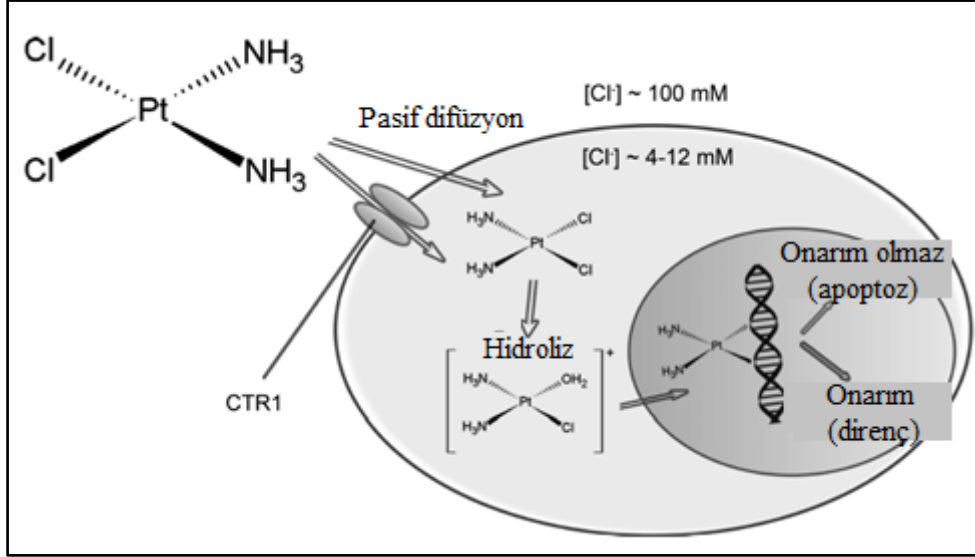
Şekil 2.8. Bleomisin etki mekanizması

### 2.2.2. Sisplatin

Kimyasal adıyla cisdiamminedichloroplatinum (II) olarak bilinen sisplatin, platin (Pt) ağır metalini içeren güçlü bir antineoplastik ajandır. Sisplatin, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde daha geniş etkinliği nedeniyle en çok kullanılan sitotoksik anti-kanser ilaçları arasında yer almaktadır [49-51].

Sisplatin hücre döngüsünü S, G1 veya G2-M'de durdururken, DNA sarmalında çapraz bağlar oluşturarak kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi ile apoptozu indükler. Kanser hücrelerinin DNA replikasyonunun bozulması hücrelerin ölümünden sorumludur [52, 53]. Sisplatin, mesane, yumurtalık, baş ve boyun, akciğer, testis, serviks, özafagus, meme ve beyin kanserlerini tedavi etmek için sıklıkla kullanılan bir kemoterapi ilacıdır fakat başta nefrotoksosite olmak üzere, nörotoksosite, hepatotoksosite, anemi ve geçici lökopeni gibi

dozla ilişkili belirgin yan etkileri klinik kullanımını kısıtlamaktadır [54-56]. EP'nin sisplatin sitotoksitesini 2 ila 3 kat artırdığı çalışmalarla bildirilmektedir. Bu bağlamda EP ile sisplatin uygulaması, kullanılan ilaç dozunu azaltarak yan etkilerin azaltılması ve tedavi etkinliğini artırmada önemli bir yere sahiptir [48, 57].



Şekil 2.9. Sisplatin etki mekanizması

### 2.3. Kalsiyum ve Kalsiyum Elektroporasyon (CaEP)

#### 2.3.1. Kalsiyum homeostazı: Sağlıklı ve kanser hücrelerinde

Kalsiyum (Ca<sup>+2</sup>) esas olarak endoplazmik retikulum (ER), sarkoplazmik retikulum (SR, kas hücrelerinde) ve mitokondride depolanır. Sarko-endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz (SERCA), Ca<sup>+2</sup>'u ER ve SR'ye pompalar [58, 59]. Mitokondri içindeki Ca<sup>+2</sup>, organelin işlevini, hareketini ve canlılığını düzenlemektedir. Artmış bir mitokondriyal Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonu, ATP üretimini artırarak mitokondriyal metabolizmayı düzenleyebilir, ancak mitokondriyal membran geçirgenliği hücre ölümünü, apoptozu veya nekrozu da tetikleyebilir. Ca<sup>+2</sup>, ATP'ye bağımlı plazma membranı Ca<sup>+2</sup>ATPaz (PMCA) ve ATP'den bağımsız Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup>-değiştirici (NCX) ve Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup>/K<sup>+</sup>-değiştirici (NCKX) tarafından hücre içinden uzaklaştırılır [60-62].

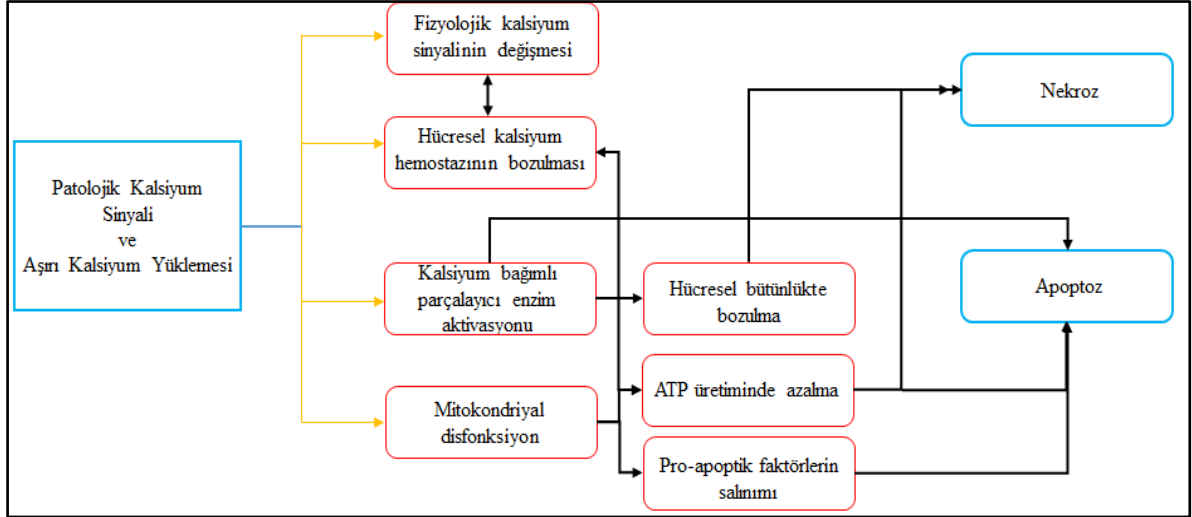
Kanser hücrelerinde Ca<sup>+2</sup> sinyallerini düzenlemede yer alan proteinler, çoğalmayı sürdürmek ve hücre ölümünü önlemek için normal hücrelere kıyasla daha sık kontrol

edilirler [63].  $Ca^{+2}$  kanalları, pompalar ve kalsiyum değiştiricilerin tümü, normal hücrelerde olduğu gibi kanser hücrelerinde de bulunur fakat bunların lokalizasyonu ve etkinliği daha farklı olabilmektedir. SERCA2 ve SERCA3 gen ekspresyonundaki azalma birkaç farklı kanser hücre hattında ve tümör örneklerinde gözlenmiştir. SERCA2 ve SERCA3'ü kodlayan genlerdeki değişiklikler kanser hücrelerinde  $Ca^{+2}$ 'un sitozolden ER'ye taşınmasının azaltılabileceğini gösterir [64-66].

Normal hücreler ve dokulara kıyasla kanser hücre hatlarında ve tümör dokularındaki anormal hücre farklılaşmasıyla birlikte PMCA4 ekspresyonunun arttığı ve en düşük PMCA4 ekspresyonunun gözlemlendiği PMCA değişiklikleri de gösterilmiştir [67-70].

### **2.3.2. CaEP'nin etki mekanizması**

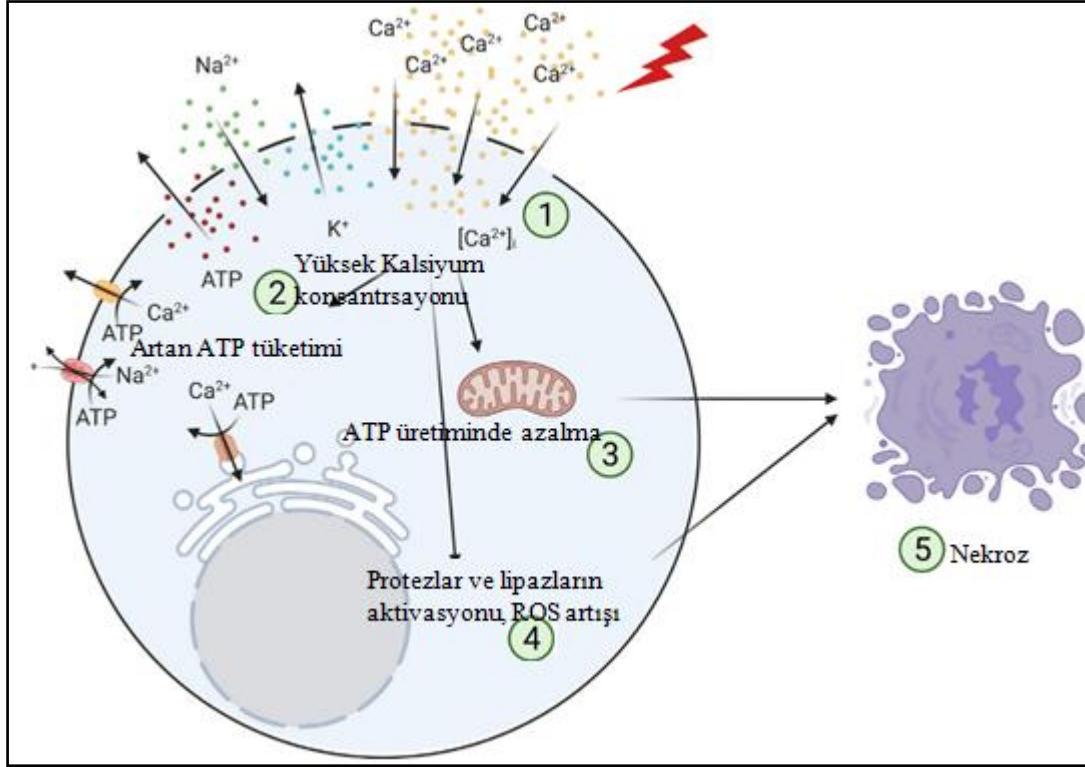
$Ca^{+2}$  her yerde bulunan hücre içi sinyallerin ikincil habercisidir.  $Ca^{+2}$ , zamana, yere, genliğe, sıklığa ve süreye bağlı olarak, hücre ölümü ve çoğalması, transkripsiyon, sinir iletimi ve kas kasılmaları dahil olmak üzere hücre döngüsünün düzenlenmesinden sorumludur. Bu yüzden  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu hücreler içinde sıkı bir şekilde düzenlenir.  $Ca^{+2}$ 'nin sitozolik konsantrasyonu yaklaşık  $10^{-7}$  M'dir ve bu konsantrasyon hücre dışı kalsiyum seviyesi olan  $10^{-3}$  M'den önemli ölçüde daha düşüktür [58, 71-73]. Hücre membranının  $Ca^{+2}$  geçirgenliği düşük olması ve hücrelerdeki  $Ca^{+2}$ 'un dengesi ve tamponlanması için güçlü mekanizmaların varlığı hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu düşük düzeyde kalmasını sağlar.  $Ca^{+2}$  homeostazındaki bozukluklar ve değişiklikler apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne yol açabilir.



Şekil 2.10. Kalsiyum etki mekanizması

Birçok anti-kanser uygulaması,  $Ca^{+2}$  sinyallerini etkileyerek kanser tedavisinde hedef olarak  $Ca^{+2}$  yollarını etkilemektedir. Bu bilgiler  $Ca^{+2}$ 'un EP tabanlı kanser tedavisi için yeni bir ajan olduğunu göstermektedir.  $Ca^{+2}$  varlığında hücre veya tümörlere EP uygulaması ile hücre içi  $Ca^{+2}$ 'un konsantrasyonu büyük ölçüde artar. Bu durumda;

- 1) Gelişen ATP üretimindeki kayıp ile  $Ca^{2+}$ -ATPaz ve diğer ATPazların artan aktivitesi nedeniyle ATP tükenmesine bağlı olarak,
- 2) Hücre içi kalsiyum iyonlarının konsantrasyonundaki artış, mitokondriyal membranda porların oluşmasını sağlayarak mitokondriyi yeni ATP üretmeye yönlendiren elektrokimyasal gradyan kaybıyla,
- 3) Lipazların, proteazların aktivasyonunun yanı sıra reaktif oksijen türlerinin üretimi de dahil olmak üzere diğer hücre içi mekanizmaların aktivasyonu ile CaEP uygulaması apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne yol açar [74-78].



Şekil 2.11. CaEP sonrası nekroz oluşumu [74, 79]

## 2.4. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, hücre bölünmesine hazırlık olarak bir hücrede meydana gelen sıralı olaylar dizisidir. Bu olaylar, genomunun kopyalanmasını, hücre organellerinin sentezini ve ardından sitoplazmanın bölünmesini içerir. İnsan hücreleri tipik ökaryotik hücre döngüsü sergiler ve bir büyüme-bölünme döngüsünü tamamlamak yaklaşık 24 saat sürer. Bununla birlikte, döngünün süresi organizmadan organizmaya ve hücreden hücreye değişiklik göstermektedir. Hücreler bölünme sinyali almadıkları sürece siklusunun istirahat fazı olan G<sub>0</sub> fazında beklerler. Tipik bir ökaryotik hücre döngüsü interfaz ve mitotik (M fazı) faz olmak üzere iki ana aşamaya ayrılır [80-84].

### 2.4.1. İnterfaz evresi

Hücreler bölünmek üzere sinyal aldığında, hücrenin hem hücre büyümesi hem de DNA replikasyonu geçirerek bölünmeye hazırlandığı evredir. İnterfaz, genel döngünün yaklaşık %95'ini kapsar ve kendi içinde G<sub>1</sub>, S ve G<sub>2</sub> olmak üzere 3 faz'dan oluşmaktadır.

### G1 Fazı

Bu faz, mitoz ile hücrenin genetik materyalinin replikasyonunun başlaması arasındaki dönemi kapsamaktadır. Bu aşamada hücre metabolik olarak aktiftir, RNA ve protein sentezlenir, organel sayısı artar, ATP sentezi hızlanır ve hücre DNA'sını kopyalamadan büyümeye devam eder. G1 evresi yaklaşık 11 saat sürer. Büyüme için şartlar uygunsa sentez evresine geçilir değilse, döngü geciktirilir ve hücre G0'a girer.

### S Fazı

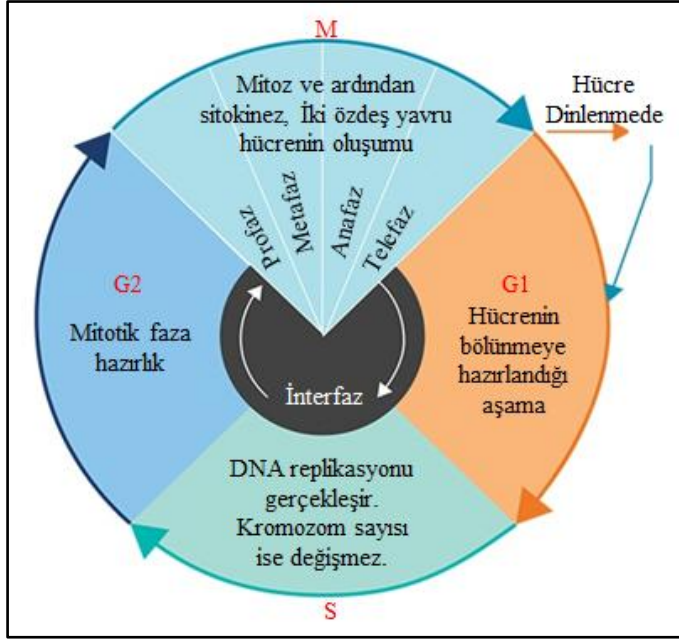
DNA replikasyonu bu fazda gerçekleşir ve yaklaşık 8 saat sürer. Protein sentezi en yüksek düzeye çıkar. Bu faz da hücredeki ilk DNA miktarı iki katına çıkar. Kromozom sayısı ise değişmez.

### G2 Fazı

Yaklaşık 4 saat süren G2 fazında, hücre mitotik faza girmeye hazırlanırken, hücre organellerinin çoğalması, iğ oluşumu ve hücre büyümesi için gerekli olan RNA, proteinler ve diğer makromoleküller üretilir. DNA sentezi bu fazda durur.

## **2.4.2. Mitotik faz**

Hücrenin aynı sayıda kromozoma sahip yeni bir hücre oluşturmak için tam bir yeniden yapılanma geçirdiği bölünme fazıdır. Bu fazda hücre, genetik materyalin iki kopyasını iki özdeş yavru hücreye böler. M fazı tamamlandıktan sonra hücre bölünmesi gerçekleşir ve geriye iki hücre kalır. M fazı, Profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere kendi içinde 4 evreden oluşur ve yaklaşık 1 saat sürer.



Şekil 2.12. Hücre döngüsü aşamaları

### 2.4.3. Hücre döngüsünün düzenlenmesi

Hücrelerin hücre döngüsü boyunca ilerlemesi, farklı aşamalardaki çeşitli kontrol noktaları tarafından denetlenir. Hücre döngüsünün kontrolü, siklin bağımlı kinaz (CDK)'lar, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) ve siklinler tarafından sağlanır. Bunlar, hücrenin DNA hasarı içerip içermediğini belirleyerek hücrelerin çoğalmasını ve büyümesini engeller. Önemli bir kontrol noktası olan kısıtlama noktası (R) G1'de bulunur. R noktasından geçen hücrelerin çoğu, tüm hücre döngüsünü tamamlamaktadır. Diğer kontrol noktaları G1-S ile G2-M arasındaki geçişlerde bulunur. Herhangi bir kontrol noktasında DNA hasarı tespit edilirse, kontrol noktasının aktivasyonu ve artan p53 proteini üretimi gerçekleşir. Bir tümör baskılayıcı gen olan p53, hücre döngüsünün ilerlemesini durdurur ve hasarlı DNA için onarım mekanizmalarını başlatır. Bu gen, DNA'nın onarılmadığı durumda hücrenin apoptoza girmesini sağlayarak çoğalmasını engeller. Hücre siklusunu etkileyen c-myc, Her2, lneu, ras gibi onkogenler ve Rb (retinoblastom), p53 gibi tümör baskılayıcı genler ve siklus regülatörlerinin aktivitelerinin yanlış düzenlenmesi, hücre çoğalmında artış ve tümör gelişiminde önemli rol oynayan faktörlerdir [84-86].

## 2.5. Hücre Ölümü

### 2.5.1. Apoptoz

Apoptoz sözcüğü ilk kez 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından yayınlanan bir makalede, morfolojik olarak farklı bir hücre ölüm tipini tanımlamak için kullanılmıştır [87]. Apoptoz, bir hücrenin proliferasyonunu ve bölünmesini durdurarak, hücre içeriğinin çevreye dağılmadan kontrollü hücre ölümüyle sonuçlanan bir süreçtir. Apoptoz, bazen programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılmaktadır. Apoptoz, canlılığın doğumundan ölüme kadar olan gelişen süreçte immün sistem mekanizmalarının ilerleyişi, hücre sayısının dengede tutulması ve malignitelere karşı koruyucu etki oluşturması gibi birçok önemli mekanizmanın ilerleyişinde aktif bir rol oynar. Hatalı apoptoz regülasyonu, AIDS, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, dejeneratif nöranal hastalıklar, otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyon, malformasyon ve yaşlanma etyolojisinde rol oynamaktadır [88-93]. Apoptotik aktivitenin düzenlenmesinde, sitokrom-c, kaspazlar, p53 ve c-myc gibi protein yapılar, Bcl-2 ailesi, seramid ve kalsiyum gibi moleküller ve mitokondri önemli bir rol oynar. Bcl-2 ailesi birbiri ile antagonist çalışan proapoptotik (Bax, Bad, Puma, Noxa, Bid, Bak, BclXs) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Ced-9) olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Hücrenin apoptoza eğilimli olması proapoptotik proteinlerin sitozoldeki miktarı ile ilişkilidir. Heterodimer olan Bcl-2/Bax oranı hemotolojik malignitelere prognostik faktör olarak kullanılmaktadır. Proapoptotik proteinlerin salınımı, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom-c miktarını arttırarak hücrede apoptotik aktiviteyi eksite eder. Çekirdek membranı, ER ve mitokondri dış membranında bulunan antiapoptotik üyeler, iyon geçişini özellikle de hücre içi  $Ca^{2+}$  miktarını kontrol ederler. Bazı kaspazlar ile birlikte sitokrom-c ve AIF salınımı engelleyerek apoptozu engellemektedir [94-97].

P53 geninin hem tümör baskılayıcı hem de apoptozis düzenleyici görevi vardır. P53 geni, DNA hasarı oluşması durumunda hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak, DNA onarımı için hücreye gerekli zamanın tanınmasını sağlar. DNA'da oluşan hasarın ortadan kaldırılamayacağı durumda Bax, apoptoz proteaz aktive faktörü (Apaf-1), ve Fas yapımını arttırarak antiapoptotik proteinlerin aktivasyonunu inhibe eder ve apoptozu indükler. P53 geninin mutasyona uğradığı durumlarda apoptozis gerçekleşmeden ya da DNA onarımı tamamlanmadan DNA çiftleşmesi ve sonucuda da neoplazi gelişebilmektedir. Mutasyona

uğradığı tespit edilen p53 geninin farklı tümör tiplerinin yarısından fazlasının oluşumunda rol oynadığı kabul edilmektedir [98-101].

Apoptoz sürecinde etkin bir role sahip olan sitokrom-c, mitokondri dış membranında yer alan elektron taşıma zincirinin bir proteindir. Sitokrom-c, sitoplazmik protein olan Apaf-1'e bağlanarak aktivasyonu gerçekleştirir. ATP katılımıyla birlikte apoptozom adı verilen kompleks bir yapı meydana gelir. Bu yapı, inaktif prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9'a dönüşümünü sağlar ve daha sonra efektör kaspazlardan prokaspaz-3 aktif kaspaz-9 ile aktive olur. Aktif kaspaz-3, deoksiribonükleaz inhibitörü(ICAD)'nü inaktifleştirerek kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz(CAD)'ı serbestleştirir. Bu durum apoptozis göstergelerinden olan oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna ve kromatin yoğunlaşmasına neden olmaktadır.

Bir sistein proteazı olan kaspazlar, inaktif olarak sitoplazmada bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler. Tanımlanan 14 tane kaspaz mevcut olup çoğu apoptozda rol oynar. Kaspazlar, başlatıcı (kaspaz 2, 8, 9, 10), efektör (kaspaz 3, 6, 7) ve inflamatuvar kaspazlar( kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) olmak üzere etki mekanizmalarına göre 3 tiptir. Başlatıcı kaspazlar, apoptotik uyarı ile başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara aktarırlar. Efektör kaspazlar, hücre iskeleti proteinleri, nükleer membran proteini laminin A ve DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz (PARP)'ı parçalayarak apoptotik hücre yapısının oluşmasına neden olmaktadır. Kaspazların moleküler ve sinyalizasyon bozuklukları, kanser, otoimmün hastalıklar ve nörofizyolojik patolojilerin nedeni olarak gösterilmektedir [102-105].

### **2.5.2. İntrinsik ve ekstrinsik yol: Apoptoz mekanizması**

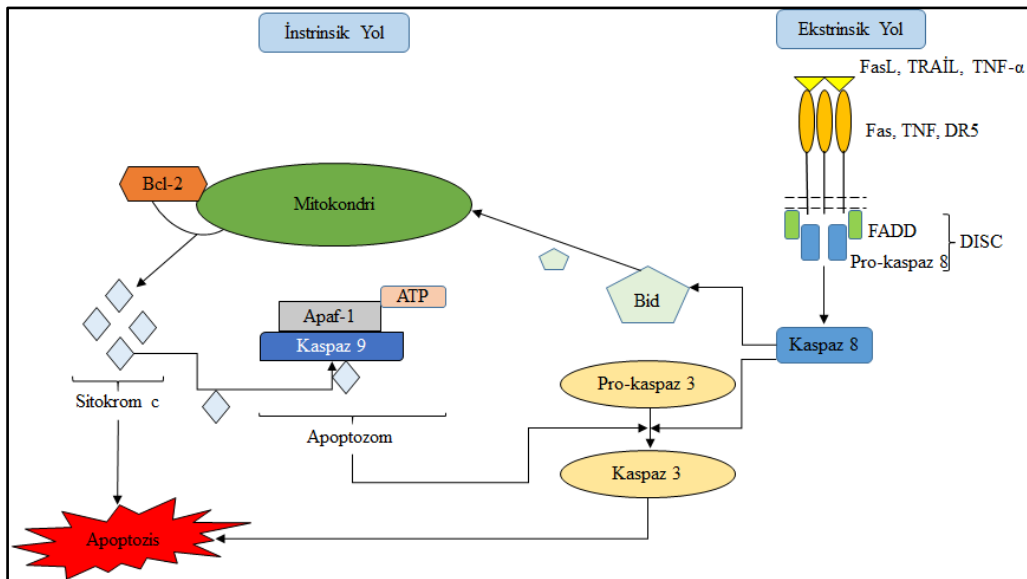
Apoptoz temelde intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (dışsal) olmak üzere 2 yol ile gerçekleşmektedir. DNA hasarı, metabolik ve hücre döngüsü bozuklukları, hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonundaki artış ve hipoksi gibi hücre içi sinyaller intrinsik yol ile apoptozu indükler. Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfosit, iskele, toksin varlığı, kemoterapötik ajanlar, UV radyasyon gibi hücre dışı sinyaller dışsal yol ile apoptoz mekanizmasını aktive eder.

### İnstrinsik (Mitokondriyal) yol

Proapoptotik ve antiapoptotik aktiviteye sahip Bcl-2 protein ailesi instrinsik apoptotik yolda önemli bir yere sahiptir. Hücre içi kaynaklı apoptotik sinyaller Apaf-1'i serbestleştirir ve mitokondri dış membran permeabilizasyonu artırır. Permeabilizasyonun artması ile birlikte mitokondri dış membranında bulunan sitokrom-c sitozole salınır. Serbest sitokrom-c, Apaf-1, kaspaz-9 ve ATP den oluşan apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozom oluşumu ile kaspaz kaskad'ı başlar. Apoptozom oluşumu, inaktif olarak bulunan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Kaspaz-9'un aktive olması prokaspaz-3'ü aktive eder (Şekil 2.13). Aktif kaspaz-3, deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir ve apoptoz gerçekleşir [106].

### Ekstrinsik yol

Ekstrinsik apoptotik yol hücre ölüm sinyallerinin (FasL, TRAIL, TNF- $\alpha$ ) ölüm reseptörlerine (Fas, TNF, DR5) bağlanması ile başlar. Fas ve TNF (tümör nekroz faktör) reseptörü integral proteinlerdir. Sinyal-reseptör kompleksinin oluşması ile reseptörler trimerik bir yapı kazanır. Trimerik yapıdaki reseptör, uyarlayıcı moleküller ve prokaspaz ile bileşerek ölüm indükleyen sinyal kompleksi (DISC) yapısını oluşturur ve aktif kaspaz 8'in oluşmasını sağlar. Aktif kaspaz-8 direkt olarak kaspaz-3'ü aktive ederek ya da endirekt olarak Bid'i kesip instrinsik yol olan kaspaz-9 aktivitesi ve kaspaz-3 aktivesi ile apoptozisi gerçekleştirir (Şekil 2.13), [96, 97, 107].



Şekil 2.13. İnstrinsik ve ekstrinsik yol: apoptozis mekanizması

### 2.5.3. Apoptozun belirlenmesi

Apoptozisin belirlenmesinde, morfolojik görüntüleme yöntemleri, histokimyasal yöntemler, biyokimyasal yöntemler, immunolojik yöntemler, moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmaktadır.

Çizelge 2.1. Apoptoz belirleme yöntemleri

Yöntem	Uygulamalar
Morfolojik görüntüleme yöntemler	1) Işık mikroskobu <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hematoksilen boyama</li> <li>• Giemsa boyama</li> </ul> 2) Floresan mikroskobu/Lazerli konfokal mikroskop <ul style="list-style-type: none"> <li>• Propidium iyodür (PI)</li> <li>• Hoechst Dye</li> </ul> 3) Elektron mikroskobu 4) Faz kontrast mikroskobu
İmmunohistokimyasal yöntemler	1) Annexin V yöntemi 2) TUNEL yöntemi 3) M30 yöntemi 4) Kaspaz 3 yöntemi
Biyokimyasal yöntemler	1) Ageroz jel elektroforezi <ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA fragmentasyonu</li> </ul> 2) Western Blotting <ul style="list-style-type: none"> <li>• Substrat kırılmaları</li> <li>• Aktif kaspazın belirlenmesi</li> </ul> 3) Flow sitometri
İmmünolojik yöntemler	1) ELISA <ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA fragmentasyonu</li> <li>• M30 düzeyi</li> </ul> 2) Florimetrik yöntem <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kaspaz aktivasyonu</li> </ul>
Moleküler biyoloji yöntemleri	1) DNA microarrays

### 2.5.4. Nekroz

Nekroz, normal koşullardan farklı olarak hücrelerin ekstrasellüler ortamdan gelen kimyasal ve fiziksel etkilere, hipoksi ve çeşitli toksinlere yüksek oranda maruz kalmaları nedeniyle, genler tarafından kontrol edilemeyen ve düzensiz olarak gelişen bir başka hücre ölümü türüdür. Mekanik travma, kan damarlarındaki hasar, iskemi, hipoksi, hipotermi veya hipertermi, toksik maddeler ve ağır metaller gibi etkiler nekroza neden olmaktadır. Nekroz sırasında mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) artarken, non-apoptik proteazlar

aktive olur ATP üretimi azalır ve  $Ca^{+2}$  kanalları açılır. Nekroz sırasında, hücresel içerik hücre dışı ortama salınır ve komşu hücreler üzerinde zararlı etkiler yaratır.

Morfolojik olarak tanımlanmış altı tip farklı nekroz türü mevcuttur. Koagülasyon nekrozu, likefaksiyon nekroz (erime nekrozu), kangrenli nekroz, kazeöz nekroz, yağ nekrozu, fibrinoid nekrozdur [108-110].

### 2.5.5. Apoptoz ve nekroz farklılıkları

Çizelge 2.2. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü arasındaki farklar

<b>Apoptoz</b>	<b>Nekroz</b>
Programlanmış hücre ölümüdür.	KontROLSÜZ hücre ölümüdür.
Sitoplazmanın küçülmesi ve ardından çekirdeğin yoğunlaşması yoluyla oluşur.	Mitokondri ile birlikte sitoplazmanın şişmesi ve ardından hücre lizisi yoluyla oluşur.
Doğal olarak meydana gelen fizyolojik bir süreçtir.	Toksinler, travma ve enfeksiyonlar gibi dış etkenlerin neden olduğu patolojik bir süreçtir.
Plazma zarının bütünlüğünü kaybetmeden kabarması gözlenir.	Zar bütünlüğü bozulur.
Kromatin, apoptoz sırasında toplanır.	Kromatinde yapısal değişiklik gözlenmez
Mitokondri zarı üzerinde por oluşur. Hücredeki organeller, hücre ölümünden sonra bile işlev görür.	Organeller şişerek parçalanır. Nekrotik bir hücredeki organeller, hücre ölümünden sonra işlev görmez.
Lizozomların bütünlüğü korunur	Lizozomal enzimler salınır.
Apoptotik cisimcikler olarak adlandırılan zara bağlı veziküller, hücrenin küçük cisimlere parçalanmasıyla apoptoz ile oluşur.	Vezikül oluşmaz, ancak tam hücre lizisi meydana gelir ve nekroz sırasında hücre içeriğini hücre dışı sıvıya bırakır.
Kaspaz bağımlı bir yoldur.	Kaspazdan bağımsız bir yoldur
Aktif bir süreç olduğundan 4°C'de gerçekleşmez.	4°C'de meydana gelir.
Preolitik dna parçalanması apoptozda meydana gelir.	Postolitik dna sindirimi nekrozda meydana gelir.
ATP gereksinimi vardır.	ATP ihtiyacı yoktur.
Enflamasyon ve doku hasarına neden olmaz.	Enflamasyon neden olur

### 2.5.6. Mitokondri membran potansiyeli ( $\Delta\Psi_m$ ) ve hücre ölümü ilişkisi

Proton pompaları (Kompleks I, III ve IV) ve elektron taşıma sistemleri tarafından kontrol edilen  $\Delta\Psi_m$ , osidatif fosforilasyon, ATP sentezi ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu kontrol eden biyoenerjik bir parametrelerdir.  $\Delta\Psi_m$  (negatif iç ve pozitif dış), elektron taşıma zinciri ve  $F_0F_1$ -ATPaz kompleksi iki taşıma sistemi tarafından sağlanan elektrokimyasal gradyanın bir sonucudur [111]. Hücrede  $\Delta\Psi_m$  ve ATP seviyeleri nispeten sabit tutulmaktadır. Bununla birlikte, her iki faktördeki sürekli değişiklikler zararlı olabilir. Normal seviyelere kıyasla  $\Delta\Psi_m$ 'nin uzun süreli düşüşü veya yükselişi, istenmeyen hücre canlılığı kaybına ve çeşitli patolojilere neden olmaktadır. Mitokondriyal disfonksiyonun apoptoz indüksiyonuna katıldığı gösterilmiş ve hatta apoptotik yolun merkezinde olduğu öne sürülmüştür [112].  $\Delta\Psi_m$  depolarizasyonunun, apoptoza neden olan moleküllerin salınımını ve osidatif fosforilasyon kaybını indüklediği gösterilmiştir. Diğer taraftan mitokondri membran hiperpolarizasyonu,  $\Delta\Psi_m$ 'yi bozan ve iç mitokondriyal zarın bütünlüğüne zarar veren osidatif fosforilasyonun ayrılmasına yol açar.  $\Delta\Psi_m$ 'nin bozulması, hücre ölümü sinyalinde geri dönüşü olmayan nokta olarak görülmektedir. Bu durumda sitokrom-c'yi ve diğer hücre ölümünü indükleyen faktörleri mitokondriden sitozole bırakır [113].

### 2.6. Serviks Kanseri

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser önemi giderek artan bir sağlık sorunudur. Kanser, beraberinde getirdiği sağlık sorunlarının yanı sıra, maddi ve manevi yönden uzun süreli mücadele gerektiren bir hastalıktır. Ölüm nedeni olarak kanser, kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünya çapında yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyon kanser kaynaklı ölüm vardır [114].

Serviks kanseri, rahim ağzında meydana gelen ve iki histolojik tipte sınıflandırılan malign bir serviks tümörüdür; adenokarsinom (AC) ve skuamöz hücreli karsinom (SCC); SCC daha yaygındır ve tüm vakaların %70'ini oluşturur. AC, servikal kanalını (endoserviks) çevreleyen glandüler hücrelerden kaynaklanırken, SCC, ektoservikse açılan serviksin dış kısmını kaplayan skuamöz hücrelerden kaynaklanır [115]. Serviks kanserinin en yaygın nedeni olarak, cinsel yolla bulaşan insan papilloma virüsünün (HPV) kalıcı enfeksiyonu

dur. HPV, özellikle 35 yaş altı kadınlar arasında serviks kanseri vakalarının %90 ile %100'ünden sorumludur. Serviks kanseri insidansına katkıda bulunan diğer faktörler coğrafya, geleneksel uygulamalar, inançlar, tarama seviyeleri, sosyoekonomik durum, sağlık hizmetlerine erişim, halkın bilinçlendirilmesi, oral kontraseptif kullanımı, sigara ve HIV ile birlikte görülen enfeksiyon'dur [116].

Serviks kanseri, 2020'de dünya çapında yaklaşık 604.000 yeni vaka ve 342.000 ölümlle kadınlarda en sık en sık görülen dördüncü malignitedir. 2020 yılında Türkiye'de yaklaşık 233.834 yeni kanser vakası bildirilmiştir [114].

Serviks kanserinin önlenmesinde etkili birincil önlem HPV aşısıdır. Diğer önlemler; cinsel hayata başlama yaşının daha geç olması, yüksek koruma sağlayan prezervatif gibi bariyer yöntemlerin kullanımının artırılması ve tekeşlilik [117]. Sağlık çalışanları tarafından kadınlara yönelik serviks kanserinin erken teşhisi için düzenli olarak jinekolojik muayene ve pap smear taramaları yaptırmaları konusunda eğitici danışmalık hizmetleri vermektedirler. Bu sayede olası kanser vakalarının erken saptanması sağlanarak tedavi etkinliği artırılır.

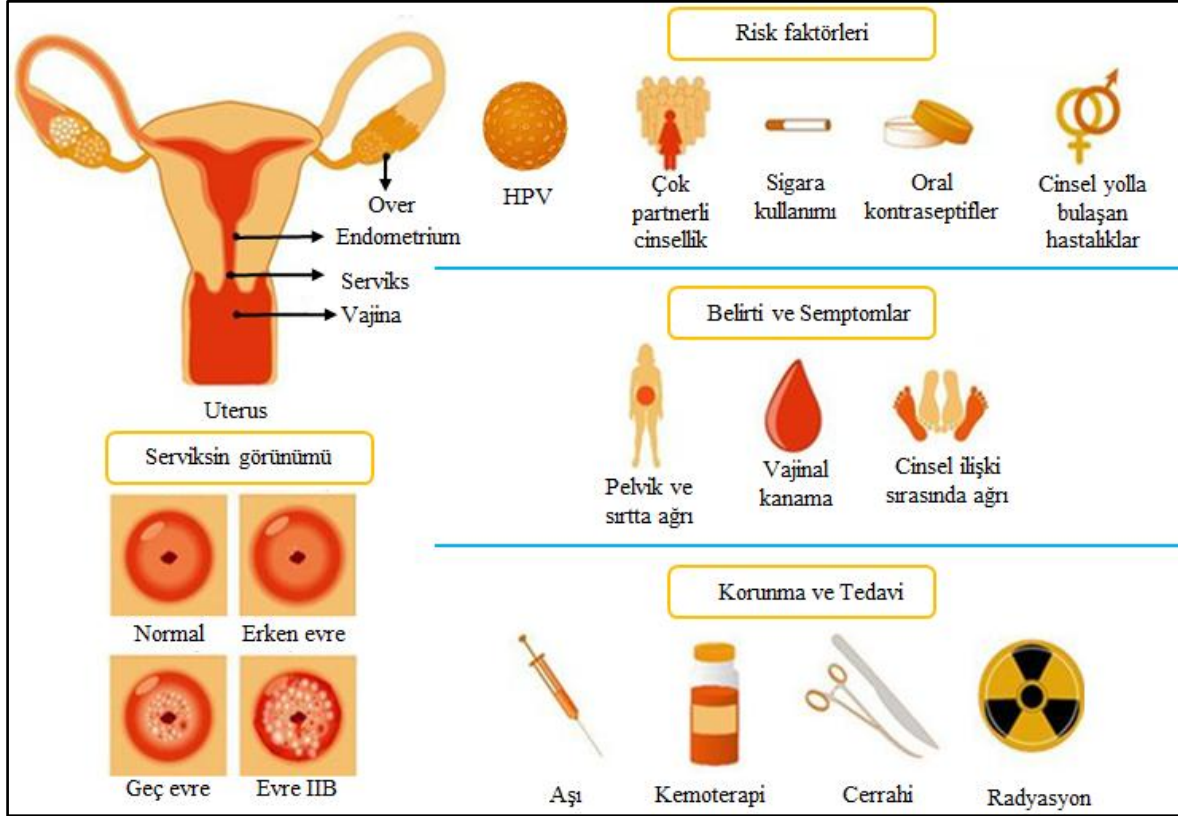
Serviks kanserin tanısı, servikal biyopsinin histopatolojik değerlendirmesine dayanmaktadır. Serviks kanseri semptomları olan kadınlarda pelvik muayene, serviks ve vajinal mukozanın görüntülenmesi ve servikal sitoloji gerekir. Spekulum muayenesi ile serviks ve vajinal mukoza görüntülenmelidir. Hastalık mikroinvaziv olduğunda veya endoservikal kanaldaysa serviks normal görünebilir. Serviks kanseri lenfatik damarlar yoluyla pelvik, para-aortik, mediastinal, supraklaviküler ve inguinal lenf nodlarına metastaz yapabilir. Semptomatik hastalarda veya sitolojisi invazyonu düşündüren, görünür lezyonları olmayan kadınlarda kolposkopi ve biyopsi yapılmalıdır [118]. Serviks kanserinin evrenmesinde tümör-nod-metastaz (TNM) sistemi ve Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu (The International Federation of Gynecology and Obstetric (FIGO)) değerlendirmesi kullanılır [119].

Çizelge 2.3. Serviks kanseri TNM sınıflandırması ve FIGO evrelemesi

TNM	FIGO	Açıklama
<b>TX</b>	-	Primer tümör değerlendirilemiyor
<b>T0</b>	-	Primer tümör bulgusu yok
<b>T1</b>	<b>I</b>	Servikal karsinom uterusda sınırlı (korpusa uzanım ihmal)
T1a	IA	Sadece mikroskopi ile invaziv karsinom tanısı alır. Epitel tabanından ölçülen stromal invazyonun maksimum derinliği 5,0 mm ve horizontal yayılımı 7,0 mm veya daha az
T1a1	IA1	Ölçülen stromal invazyon 3 mm veya daha az derinlikte ve 7 mm veya daha az horizontal yayılım
T1a2	IA2	Ölçülen stromal invazyon 3 mm'den fazla ve 5 mm'den fazla değil ve horizontal yayılım 7 mm veya daha az
T1b	IB	Servikte sınırlı klinik görülebilen lezyon veya T1a2/IA2'den büyük mikroskobik lezyon. Bütün makroskobik görülebilen lezyonları içerir, hatta yüzeysel invazyonlar dahil.
T1b1	IB1	Klinik görülebilen lezyon, en büyük çapı 4 cm veya daha az
T1b2	IB2	Klinik görülebilen lezyon, en büyük çapı 4 cm'den büyük
<b>T2</b>	<b>II</b>	Pelvik duvar veya vajen alt üçte biri hariç uterus dışında servikal karsinom invazyonu
T2a	IIA	Parametrial invazyon yapmayan tümör
T2a1	IIA1	Klinik görülebilen lezyon, en büyük çapı 4 cm veya daha az
T2a2	IIA2	Klinik görülebilen lezyon, en büyük çapı 4 cm'den büyük
T2b	IIB	Tümöral parametrial invazyon mevcut
<b>T3</b>	<b>III</b>	Tümör pelvik yan duvara uzanıyor* ve/veya vajen alt üçte bir tutulumu mevcut ve/veya hidronefroz veya nonfonksiyone böbreğe yol açıyor
T3a	IIIA	Tümör vajen alt üçte birini tutuyor fakat pelvik yan duvara uzanmıyor
T3b	IIIB	Tümör pelvik yan duvara uzanıyor ve/veya hidronefroz veya nonfonksiyone böbreğe yol açıyor
<b>T4</b>	<b>IVA</b>	Tümör rektum veya mesane mukozasını invaze ediyor ve/veya gerçek pelvise uzanıyor
	<b>IVB</b>	Tümör uzak organlara uzanıyor

Serviks kanserinin tedavisi kanserin evresine bağlıdır. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi en sık kullanılan serviks kanseri tedavi yöntemleridir. Cerrahi tedavi, nüksü önlemek için uterusun alınmasını (histerektomi) kapsamaktadır. Sadece erken evre serviks kanseri ameliyatla tedavi edilir. Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini öldürmek için X ışınları veya protonlar gibi yüksek enerjili ışınlar kullanılarak uygulanır. Radyasyon tedavisi, bir tümörü küçültmek için cerrahi işlemden önce veya kalan kanser hücrelerini öldürmek için cerrahi işlemden sonra kullanılabilir. İleri evre serviks kanserini tedavi etmek için radyasyon tedavisi kullanılamaz. Kemoterapi sistemik tedavide uygulanmaktadır. Düşük doz kemoterapi, ilerlemiş serviks kanserinin tedavisinde olumlu yanıt vermemektedir. Yüksek doz kemoterapötik ilaç, ilerlemiş serviks kanserini tedavi etmek için kullanılır. Bleomisin, sisplatin, carboplatin, bevacizumab ve gemcitabine serviks kanserinde kabul

gören kemoterapötik ilaçlardır. Bu ilaçlar daha yüksek dozlarda uygulandıklarında ciddi yan etkilere neden olurlar ve hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedirler [120, 121].



Şekil 2.14. Serviks kanseri risk faktörleri, semptomlar ve tedavi yöntemleri

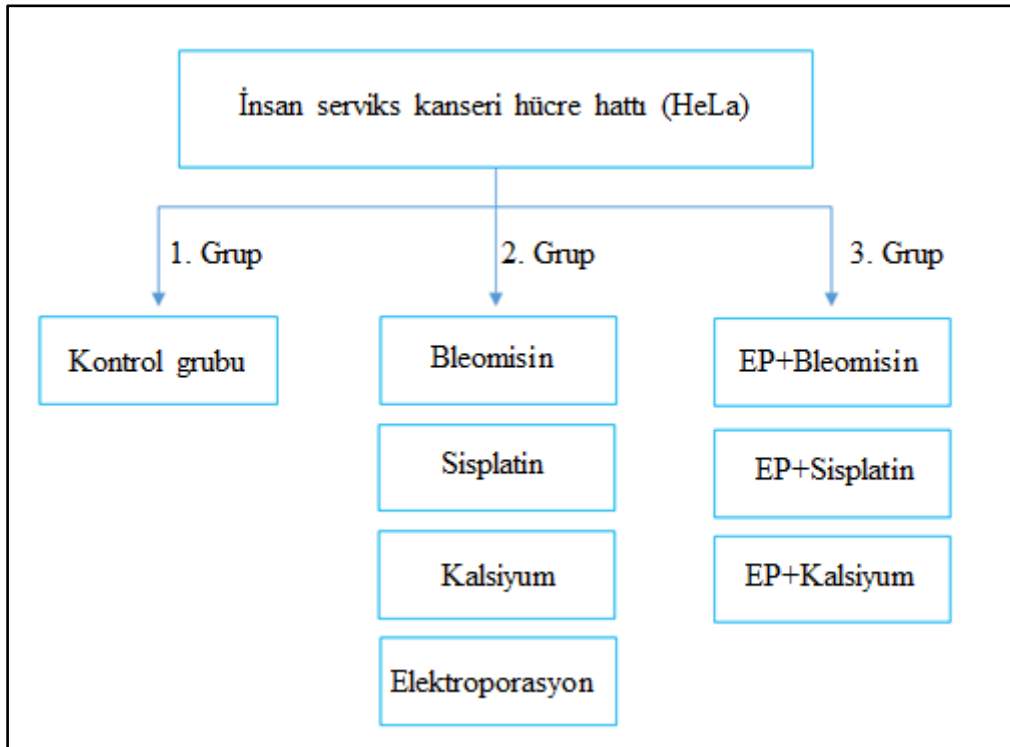


### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, kemoterapi tedavisinde kullanılan bleomisin ve sisplatin ile  $\text{CaCl}_2$ 'nin EP ile birlikte serviks kanseri hücrelerinde (HeLa<sup>1</sup>) hücre canlılığı,  $\text{IC}_{50}$  değerleri, mitokondri membran potansiyeli, hücre döngüsü, apoptotik aktiviteleri, p53, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyonları üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla in-vitro koşullarında deneysel olarak yapıldı. Çalışmanın tüm aşamaları Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında yapıldı.

#### 3.1. Deney Çalışma Planı ve Uygulamalar

HeLa hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen araştırmada çalışma grupları şekil 3.1.'de verildiği gibi planlandı. EP, İlaç ve EP+ilaç uygulama dozları ve deneyler çizelge 3.1.-3.3'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Çalışma grupları planı

<sup>1</sup> HeLa hücreleri 1951 yılında 30 yaşındaki Henrietta Lacks isimli bir kadından alınan servikal biyopsiden kültüre edilmiştir. İlk insan kanser hücre hattı olan HeLa hücreleri kanser araştırmaları ve hücre biyoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çizelge 3.1. Elektroporasyon uygulaması analiz türü ve örnek sayıları

Uygulama Adı	Uygulama Dozları	Analiz Türü ve Örnek Sayıları
EP uygulaması	Kontrol	9 Grup 9x3=27 Örnek 30 Dakika İnkübe WST-8 Hücre Canlılığı Analizi
	0,4 kV/cm	
	0,8 kV/cm	
	1,2 kV/cm	
	1,6 kV/cm	
	2,0 kV/cm	
	2,4 kV/cm	
	2,8 kV/cm	
	3,2 kV/cm	
EP uygulaması	Kontrol	9 Grup 9x3=27 Örnek 24 Saat İnkübe WST-8 Hücre Canlılığı Analizi
	0,4 kV/cm	
	0,8 kV/cm	
	1,2 kV/cm	
	1,6 kV/cm	
	2,0 kV/cm	
	2,4 kV/cm	
	2,8 kV/cm	
	3,2 kV/cm	
EP uygulaması	Kontrol	9 Grup 9x3=27 Örnek 5 Dakika İnkübe PI boyaması yöntemiyle Flow Sitometri ile Permeabilizasyonun Belirlenmesi
	0,4 kV/cm	
	0,8 kV/cm	
	1,2 kV/cm	
	1,6 kV/cm	
	2,0 kV/cm	
	2,4 kV/cm	
	2,8 kV/cm	
	3,2 kV/cm	
EP uygulaması	Kontrol	9 Grup Hücre Siklusu  9 Grup Annexin V/FITC-PI
	0,4 kV/cm	
	0,8 kV/cm	
	1,2 kV/cm	
	1,6 kV/cm	
	2,0 kV/cm	
	2,4 kV/cm	
	2,8 kV/cm	
	3,2 kV/cm	

Çizelge 3.2. Kemoterapötik ilaç ve kalsiyum uygulaması analiz türü ve örnek sayıları

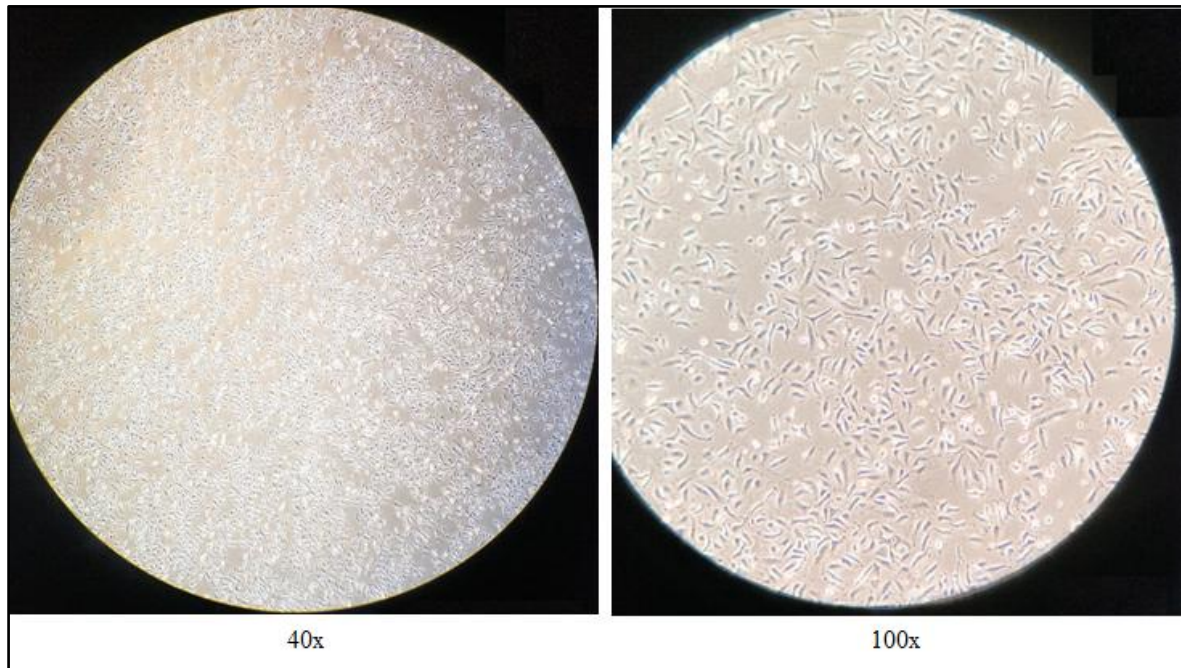
Uygulama Adı	Uygulama Dozları	Analiz Türü ve Örnek Sayıları	
Kemoterapötik ilaç uygulaması	Kontrol	*26 Grup 26x3=78 Örnek 24 Saat İnkübe WST-8 Hücre Canlılığı Analizi	
	10 µM Bleomisin		
	100 µM Bleomisin		
	200 µM Bleomisin		
	400 µM Bleomisin		
	800 µM Bleomisin		
	10 µM Sisplatin		
	25µM Sisplatin		
	50µM Sisplatin		
	75 µM Sisplatin		
	100 µM Sisplatin		
	1 mM CaCl <sub>2</sub>		*16 Grup 48 Örnek JC-1
	2 mM CaCl <sub>2</sub>		
	3 mM CaCl <sub>2</sub>		
	4 mM CaCl <sub>2</sub>		
	5 mM CaCl <sub>2</sub>		
	10 µM Bleomisin + 1 mM CaCl <sub>2</sub>	* 6 Grup Hücre Siklusu	
	10 µM Bleomisin + 2 mM CaCl <sub>2</sub>		
	10 µM Bleomisin + 3 mM CaCl <sub>2</sub>		
	10 µM Bleomisin + 4 mM CaCl <sub>2</sub>	* 4 Grup 12 Örnek PCR analizleri (Bax, Bcl- 2, P53)	
	10 µM Bleomisin + 5 mM CaCl <sub>2</sub>		
10 µM Sisplatin + 1 mM CaCl <sub>2</sub>			
10 µM Sisplatin + 2 mM CaCl <sub>2</sub>			
10 µM Sisplatin + 3 mM CaCl <sub>2</sub>			
10 µM Sisplatin + 4 mM CaCl <sub>2</sub>			
10 µM Sisplatin + 5 mM CaCl <sub>2</sub>			

Çizelge 3.3. EKT ve CaEP uygulaması analiz türü ve örnek sayıları

Uygulama Adı	Uygulama Dozları	Analiz Türü ve Örnek Sayıları
EP + Kemoterapötik ilaç uygulaması	Kontrol	<p>*27 Grup 27x3=81 Örnek 24 Saat İnkübe WST-8 Hücre Canlılığı Analizi</p> <p>*16 Grup 48 Örnek JC-1</p> <p>*6 Grup Hücre Siklusu</p> <p>*4 Grup 12 Örnek PCR analizleri (Bax, Bcl-2, P53)</p>
	Sadece EP	
	10 µM Bleomisin + EP	
	100 µM Bleomisin + EP	
	200 µM Bleomisin + EP	
	400 µM Bleomisin + EP	
	800 µM Bleomisin + EP	
	10 µM Sisplatin + EP	
	25 µM Sisplatin + EP	
	50 µM Sisplatin + EP	
	75 µM Sisplatin + EP	
	100 µM Sisplatin + EP	
	1 mM CaCl <sub>2</sub> + EP	
	2 mM CaCl <sub>2</sub> + EP	
	3 mM CaCl <sub>2</sub> + EP	
	4 mM CaCl <sub>2</sub> + EP	
	5 mM CaCl <sub>2</sub> + EP	
	10 µM Bleomisin + 1 mM CaCl <sub>2</sub> + EP	
	10 µM Bleomisin + 2 mM CaCl <sub>2</sub> + EP	
	10 µM Bleomisin + 3 mM CaCl <sub>2</sub> + EP	
	10 µM Bleomisin + 4 mM CaCl <sub>2</sub> + EP	
	10 µM Bleomisin + 5 mM CaCl <sub>2</sub> + EP	
	10 µM Sisplatin + 1 mM CaCl <sub>2</sub> + EP	
10 µM Sisplatin + 2 mM CaCl <sub>2</sub> + EP		
10 µM Sisplatin + 3 mM CaCl <sub>2</sub> + EP		
10 µM Sisplatin + 4 mM CaCl <sub>2</sub> + EP		
10 µM Sisplatin + 5 mM CaCl <sub>2</sub> + EP		

### 3.2. Hücre Kültürü

Hücreler in-vitro koşullarda yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için gerekli olan optimal çevre koşullarının oluşturulması hücre kültürü ortamı ile gerçekleştirilir. Çalışmada kullanılan HeLa hücre hattı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Kök Hücre Araştırma laboratuvarından temin edildi. Hücrelerin üretilmesinde besiyeri olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), % 10 fetal bovin serum (FBS) ve %1 penisilin streptomisin antibiyotiği (PSA) kullanıldı.

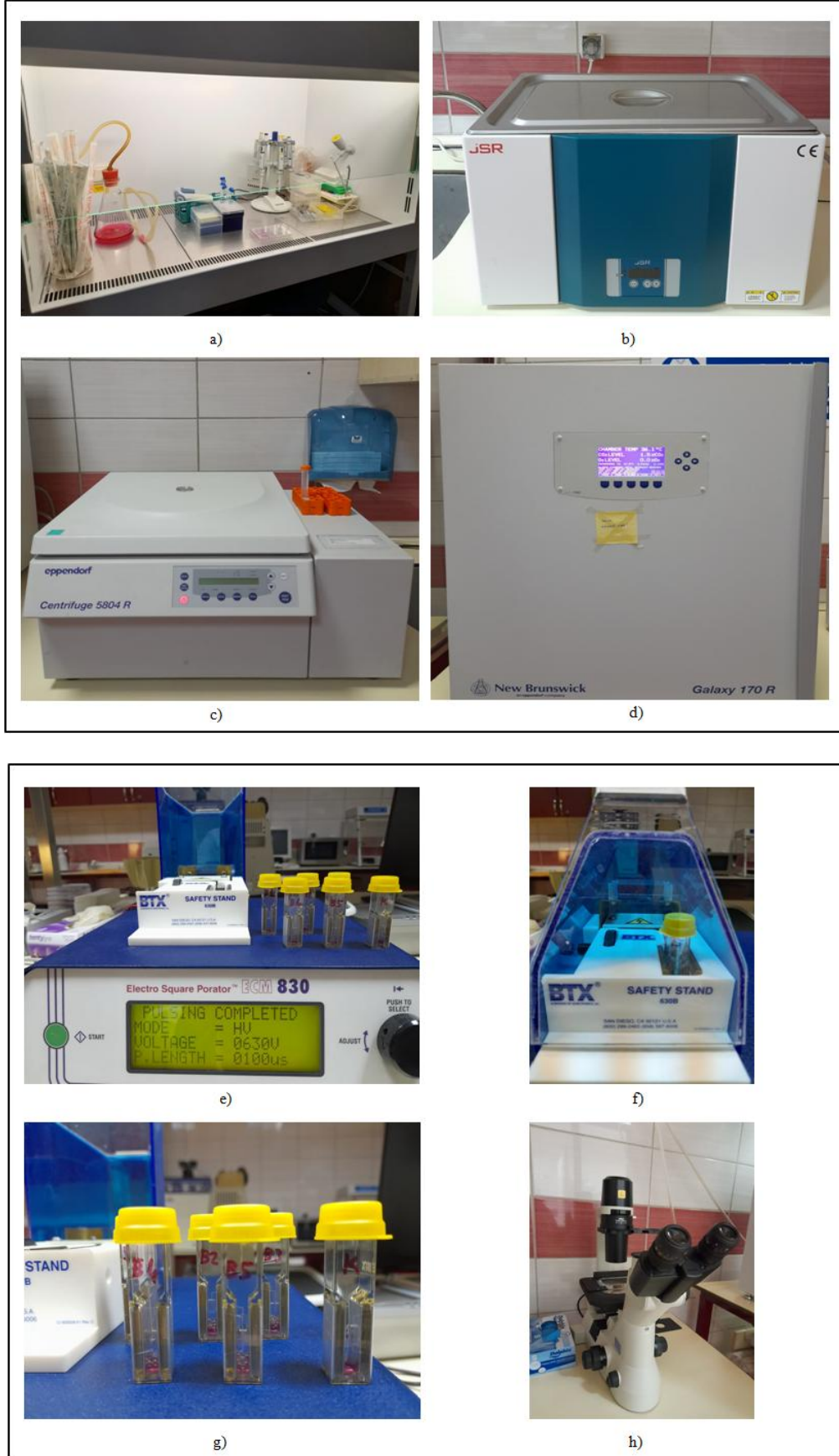


Resim 3.1. HeLa hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri.

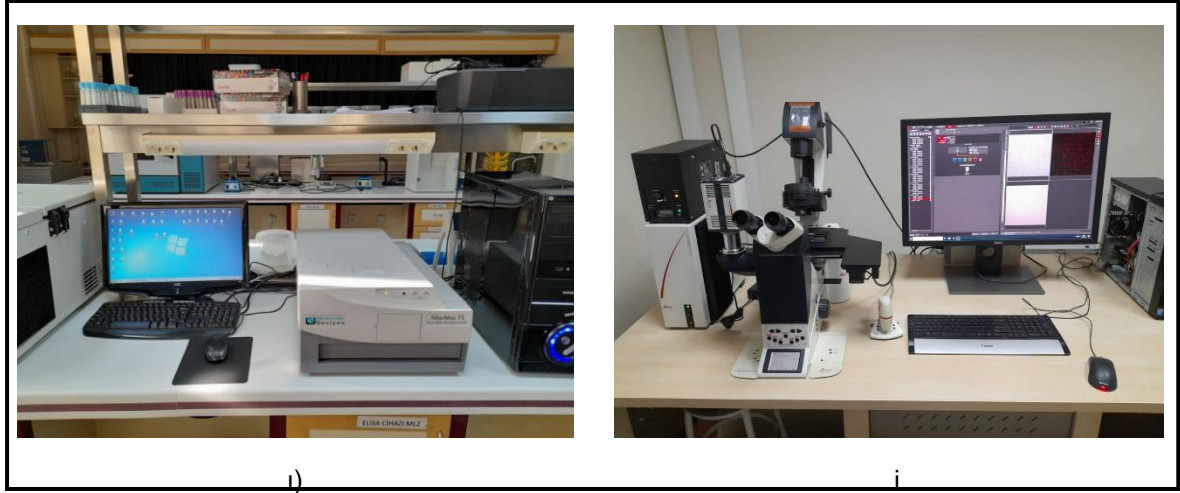
#### 3.2.1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar, kimyasal maddeler ve sarf malzemeler

- ✓ Hücre kültürü kabini-laminar hava akımı kabini (Nüve MN120),
- ✓ İvert ışık mikroskobu (Nikon Eclipse TS100),
- ✓ Işık mikroskobu (Nikon)
- ✓ Floresan mikroskobu (Leica)
- ✓ Santrifüj cihazı (Eppendorf 5804R),
- ✓ Elektroporator cihazı BTX ECM 830
- ✓ Hücre sayım lamı (Neubauer Haemocytometry)

- ✓ CO<sub>2</sub>'li inkübatör (New Brunswick Galaxy 170R),
- ✓ Elektrikli puar (Boeco 02M54),
- ✓ Multiplak okuyucu spektrofotometre (Molecular Devices Filter Max F5),
- ✓ Vortex (Heidolf REAX top),
- ✓ Sıcak Su Banyosu (JSR SWB-30T),
- ✓ Hassas terazi (AND HR200),
- ✓ Azot Tankı (Taylor-Wharton XT-20),
- ✓ Derin dondurucu -80 °C (SANYO MDF 440865),
- ✓ Otomatik pipetler (Eppendorf)
- ✓ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Capricorn DMEM-HA),
- ✓ Fetal Bovine Serum (FBS) (Capricorn FBS-11A),
- ✓ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Capricorn PBS-1A),
- ✓ Penisilin Streptomisin Antibiyotik (PSA, HyClone),
- ✓ Tripsin EDTA (Capricorn TRY-3B),
- ✓ Dimetil Sülfoksit (Sigma, D8418),
- ✓ Bleomisin (Bleomisin sülfat (Sigma, Cas No: 9041-93-4))
- ✓ Sisplatin (Sigma, Cas No: 15663-27-1)
- ✓ Kalsiyum klorür (Sigma, Cas No:10043-52-4)
- ✓ Trypan Blue Staining Solution (Sigma)
- ✓ Cell Counting Kit-8 (CCK-8, WST-8),Catalog Number: A014-1, A014-2,
- ✓ Propidium Iodide Dead Cell Stain, Catalog Number: FP028,
- ✓ Andy Fluor 488 Annexin V and PI apoptosis Kit, Catalog Number: A027
- ✓ JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit,Catalog Number: A048
- ✓ CellCycle PI/RNase Staining Solution, Catalog Number: A056
- ✓ Electroporasyon küvetleri, (0,4 cm) (Thermofisher)
- ✓ Hücre kültür kabı (T-25 ve T-75 cm<sup>2</sup> flask) (Biologix,Corning),
- ✓ Mikropipet, 96 Kuyucuklu Plak (Well Plate) (Corning), 15 mL ve 50 mL kapaklı falkon tüp (ISOLAB) ve tek kullanımlık 2, 5, 10 mL steril pipet (Costar)



Resim 3.2. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar



Resim 3.2. (Devam) Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar a) Laminar hava akımı kabini, b) Su banyosu, c) Santrifüj cihazı, d) CO<sub>2</sub>'li İnkübatör, e) Elektroporator, f) EP uygulama alanı, g) Elektroporasyon kuvvetleri, h) İvert ışık mikroskobu, i) Multi plak okuyucu spektrofotometre, j) Floresan mikroskobu

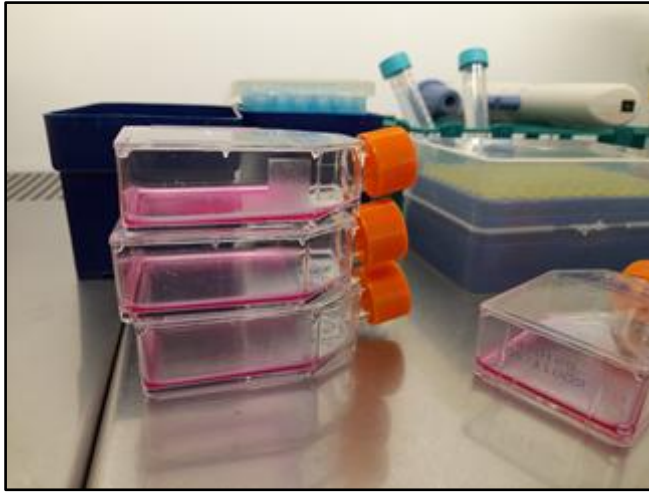
### 3.2.2. Hücrelerin çözülmesi ve ekilmesi

Çalışmaya başlamadan önce laminar flow kabin ve ortam UV lambası 15 dk boyunca çalıştırılarak hem kabin içi hem de ortam sterilizasyonu sağlandı. Süre sona erdiğinde tüm UV lambalar kapatılarak çalışmaya başlandı. Hücre medyumunu ve gerekli malzemeler 37°C'de bulunan su banyosunda beklemeye bırakıldı. Sıvı azot tankında bulunan kriyovial tüp alınarak su banyosunda kriyovial tüpün ağzı suyun içine girmeyecek şekilde dairesel hareketlerle hücre süspansiyonu tamamen çözünmesi sağlandı. Laminar flow kabin içerisinde çalışılacak yüzey ve kabin içerisine alınacak malzemelerin dış kısmı %70 etanol ile temizlendi. Kriyovial tüp içerisindeki hücre süspansiyonu ve 2 katı miktarda olacak şekilde yeni hücre medyumundan 3 mL eklenerek hücrelere zarar vermeden pipetaj yapıldı ve falkon tüpe konuldu. Sonrasında 1200 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak falkon tüpün tabanındaki pellet 5-6 mL hücre medyumuyla alınarak yaklaşık  $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  hücre  $25 \text{ cm}^2$ 'lik flaska ekildi.

### 3.2.3. Hücrelerin pasajlanması

Pasajlama işlemine başlamadan önce flask içindeki medyum aspire edildi. Flask içerisine 5 mL PBS eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilerek tekrar aspire edildi. Flask tabanındaki adhere hücreleri kaldırmak için  $25 \text{ cm}^2$ 'lik flaslara 2 mL ( $75 \text{ cm}^2$ 'lik flaslara 4 mL)

tripsin ilavesi ile hücreler %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37 °C'de 1-2 dakika inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı invert mikroskop ile kontrol edildi ve hücrelerin yüzeyde yüzdüğü yuvarlak şekil aldığı tespit edildikten sonra tripsinin inaktivasyonu için tripsin miktarının iki katı miktarda hücre medyumu (25 cm<sup>2</sup> flask için 2 mL tripsinin üzerine 4 mL hücre medyumu, 75 cm<sup>2</sup> flask için 4 mL tripsinin üzerine 8 mL hücre medyumu) eklendi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu falkona alınarak 1200 rpm'de 3 dakika santirifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Falkon içerisine 5 mL hücre medyumu eklendi ve pipetaj yapıldı. Hücre yoğunluğuna göre istenilen boyutlardaki flaslara pasajlama yapıldı (Resim 3.3.).



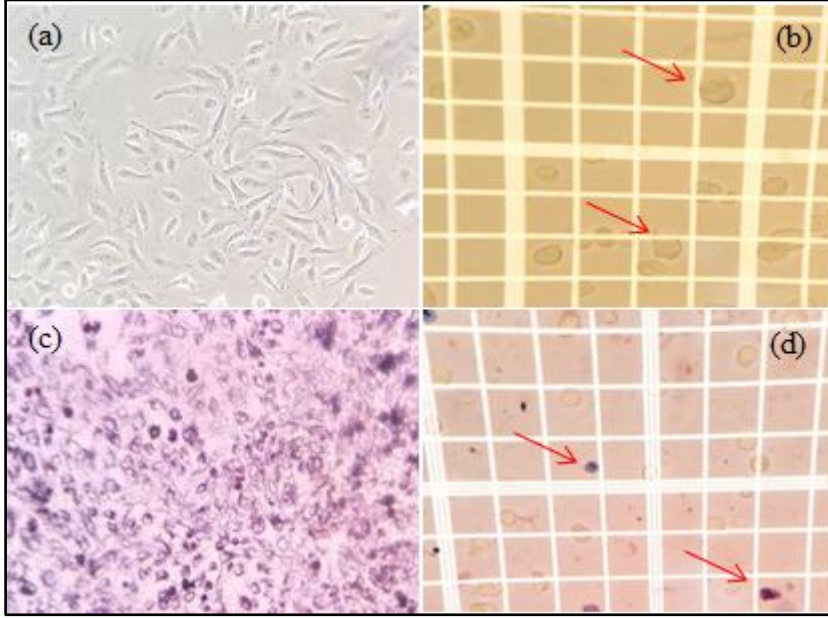
Resim 3.3. Hücrelerin 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara pasajlanmış görüntüsü

#### 3.2.4. Hücre sayımı

PBS içerisinde %0,4 tripan mavisi (100 mL PBS'de 0,4 gr tripan blue tozu) olacak şekilde tripan mavisi solüsyonu hazırlandı. Daha sonra 20 µL hücre süspansiyonu, 20 µL tripan mavisi solüsyonu ile karıştırıldı. Karışım içerisinde 10 µL alınarak thoma lamı üzerine damlatıldı. Işık mikroskobu ile 10x ve 20x objektifler kullanılarak hücreler sayıldı. Maviye boyanan membranları parçalanmış ve boyayı sitoplazmasına almış hücreler ölü olarak belirlendi. Canlı hücrelerin ise, şeffaf görünümde olduğu, membran bütünlüğünü koruduğu ve boyayı sitoplazmalarına almadığı tespit edildi (Resim 3. 4.).

Canlı hücre yüzdesi (%) = Canlı hücre sayısı/toplam hücre sayısı \* 100, formülü kullanılarak hesaplandı. Hücre canlılığının %95 ve üzeri olduğu değerlerde deney çalışmalarına başlandı.

Hücre/mL = (Sayılan toplam canlı hücre) \*2 (Dilüsyon katsayısı) \*10<sup>4</sup> (Tüm alan faktörü)/Sayılan kare sayısı formülü kullanılarak hesaplandı.



Resim 3.4. HeLa hücrelerinin 200x büyütmedeki invert mikroskop görüntüleri, (b) Thoma lamında HeLa hücrelerinin görünümü, (c) HeLa hücrelerinin proliferasyon testinde (WST-8) oluşan mor renkli formazan kristallerinin görünümü, (d) Thoma lamında tripan mavisi ile boyanan ölü HeLa hücrelerinin görünümü

### 3.3. Analiz Protokolleri

#### 3.3.1. WST-8 (CCK-8) Hücre canlılığı test protokolü

Hücre sayım kiti (WST-8) hücre proliferasyonunu ve sitotoksisiteyi değerlendirmek için kullanılan kolorimetrik bir test kitidir. Kitte, WST-8 [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülföfenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu ] tetrazolyum tuzu kullanır. WST-8, doku ve hücre kültürü ortamında çözünür olan sarı renkli bir ürün (formazan) verecek şekilde hücrelerdeki dehidrojenazlar tarafından indirgenir. Hücrelerdeki dehidrojenazların aktivitesi ile oluşan formazan boyanın miktarı ve rengin derecesi, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. WST-8'in hücre canlılığı/sitotoksistede deney hassasiyeti, MTT, XTT, MTS veya WST-1 gibi diğer tetrazolyum tuzlarından daha yüksektir.

WST-8 testinin deney aşamasında deney prosedürüne göre uygulamalar yapılarak inkübatörde 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda bekletilir ( 30 dakika, 24 saat ). Her kuyuda 100

$\mu\text{L}$  hücre süspansiyonu olan ve yaklaşık  $10^4$  hücre bulunan 96 kuyulu plakada her kuyucuğa 10  $\mu\text{L}$  WST-8 solüsyonu eklenerek plakalar inkübatörde 1-4 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda ELISA okuyucu spektrofotometre ile 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülür.

### 3.3.2. JC-1 Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi protokolü

Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, apoptoz için bir belirteçdir. JC-1 mitokondriyal membran potansiyel tespit kiti, hücrelerdeki mitokondriyal membran potansiyelini ölçer. JC-1 test kitinde, mitokondriyal membran potansiyelindeki azalmayı belirlemek için bir katyonik boya (5,5',6,6'- tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür) kullanır. JC-1, yeşilden (529 nm) kırmızıya (590 nm) bir floresan emisyon kayması ile gösterilen, mitokondrideki potansiyele bağlı olarak birikim gösterir. Sonuç olarak, mitokondriyal depolarizasyon, kırmızı/yeşil floresan yoğunluk oranındaki bir azalma ile gösterilir. Sağlıklı hücrelerde, JC-1 mitokondride birikir ve kırmızı floresan haline gelen J-agregatları oluşturur. Apoptotik hücrelerde, JC-1 mitokondri içinde birikmez ve yeşil floresanı göstermek için monomerik formda sitoplazmada kalır. Yeşilin floresanın, kırmızı floresansa oranı tek bileşenli floresans sinyallerini etkileyebilecek mitokondriyal boyut, şekil ve yoğunluk gibi diğer faktörlere değil, yalnızca membran potansiyeline bağlıdır. Bu nedenle floresans oranı tespitinin kullanılması, mitokondri membran potansiyelinin karşılaştırmalı ölçümünün yapılmasına ve uygulanan uyarana yanıt veren bir popülasyon içindeki mitokondri yüzdesini belirlemeye olanak sağlar.

Hücreler 96 kuyulu plakaya ekilerek çalışma protokolüne uygun olarak kimyasal uygulamalar yapılır ve 24 saat boyunca  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilir. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyum pipetle alınır ve 200  $\mu\text{L}$  PBS eklenir. Her kuyuya 2  $\mu\text{L}$  JC-1 stok solüsyonu eklenerek  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'de 15-30 dakika inkübe edilir. Daha sonra hücreler 200  $\mu\text{L}$  PBS ile iki kez yıkanır ve ardından her kuyucuğa 200  $\mu\text{L}$  PBS eklenir. Spektrofluorometrik okuyucuyla kırmızı floresan (eksitasyon 550 nm, emisyon 600 nm) ve yeşil floresan (eksitasyon 485 nm, emisyon 535 nm) ölçülerek, kırmızı floresan/yeşil floresan oranı belirlenir.

### 3.3.3. Annexin V/FITC ve PI apoptosis kit ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi protokolü

Kit, apoptotik hücreleri tespit etmek için parlak florofor andy fluor 488 boyasına konjuge edilmiş rekombinant ek V ve ölü hücreleri tespit etmek için kırmızı floresan propidyum iyodür (PI) nükleik asit bağlayıcı boyanın kullanıma hazır bir solüsyonu halindedir.

Hücre popülasyonunu Andy Fluor 488 annexin V ve PI ile boyadıktan sonra, apoptotik hücreler yeşil floresan gösterir, ölü hücreler kırmızı ve yeşil floresan gösterir ve canlı hücreler çok az floresan gösterir veya hiç göstermez. Emisyon ışınları 488 nm dalga boyuna sahip bir akış sitometresiyle tespit edilirken ve hücreler immünfloresan mikroskopla görüntülenerek kolayca ayırt edilebilmektedir. Akış Sitometrisi ile apoptoz analizi aşağıdaki işlem basamaklarını içerir.

- Çalışmaya uygun yöntem kullanarak hücrelerde apoptozu indüklenir ve inkübasyona bırakılır, negatif kontrol grubu yapılacak hücreler indüksiyon ajanı eklenmeden hazırlanır.
- İnkübasyon sonrasında hücreler elde edilir ve soğuk PBS ile yıkanır.
- 1x Annexin bağlama tamponu hazırlanır (10 örnek için; 2 mL 5xAnnexin bağlama tamponu (Bileşen C) + 8 mL distile su).
- PBS ile yıkanmış hücreler santrifüjlenerek süpernatantları uzaklaştırılır ve hücreler anneksin bağlama tamponunda yeniden süspanse edilir. 100 µL'lik hücre süspansiyon solüsyonu hazırlanır.
- Her 100 µL hücre süspansiyonuna 5 µL Andy Fluor 488 Annexin V (Bileşen A) ve 1~2 µL PI (Bileşen B) eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edilir.
- İnkübasyon süresi sonunda 400 µL 1xAnnexin bağlayıcı tampon eklenerek mümkün olan en kısa sürede, 488 nm eksitasyonunda, 530 nm ve 575 nm (veya eşdeğeri) floresan emisyonu akış sitometrisiyle ölçülerek, hücreler analiz edilir.

### 3.3.4. PI/RNase ile hücre döngüsünün belirlenmesi protokolü

DNA içeriğinin ölçülmesi, hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında hücre popülasyonlarının araştırılmasına olanak sağlar. G0/G1 fazı: Hücre başına bir dizi eşleştirilmiş kromozom, S

fazı: DNA sentezi, G2/M fazı: Hücre başına iki dizi eşleştirilmiş kromozom, hücre bölünmesi öncesi dönemlerini ifade etmektedir. DNA içeriği, DNA kütlesiyle orantılı emisyon sinyalleri sergileyen floresan, DNA seçici boyalar kullanılarak ölçülebilir. Bu boyanmış popülasyonların akış sitometrik analizi çeşitli hücre döngüsü aşamalarını ortaya çıkaran bir frekans histogramı üretmek için kullanılır. Tek değişkenli DNA içerik analizi, yerleşik bir yöntemdir ve onkoloji, hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji alanındaki çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre döngüsü analizi aşağıdaki basamaklarla yapılır.

- Hücreler tripinizasyonla kaldırılarak elde edilir.
- Fiksasyon işlemi yapılır (24 saat -20 °C’de bekletilmiş mutlak etanolde 15dk.).
- Fiksasyon sonunda hücreler PBS ile yıkanır.
- Süspansiyon  $\sim 1 \times 10^6$  hücre içerecek şekilde akış sitometrisi numuneleri hazırlanır
- 0,5 mL CellCycle PI/RNase boyama solüsyonu eklenir ve iyice karıştırılır.
- 37 °C’de 30 dk. karanlık bir ortamda inkübe edilir.

Numuneler yıkanmadan 488 veya 532 nm dalga boylarında eksite edilerek 585/542nm floresan emisyonunu toplayan filtrelerle ölçülerek analiz edilir.

### 3.4. Elektroporasyon Uygulaması ve Etkin Elektrik Alan Değerinin Belirlenmesi

$1 \times 10^6$  hücre/mL yoğunlukta 100  $\mu$ L HeLa hücre süspansiyonu 4 mm aralıklı çelik elektrotlara sahip EP kuvvetlerine konuldu. BTX elektroporator sistemi ile her bir elektroporasyon kuvvetine 1Hz’lik tekrarlama frekansında 0,4 – 3,2 kV/cm şiddetinde 100  $\mu$ s süresince 8 adet kare dalga E pulsusu uygulandı. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak çalışıldı. EP uygulaması ile gerçekleşen hücre ölümünü belirlemek için 100  $\mu$ L hücre süspansiyonu ( $10^4$  hücre/kuyu) 96 kuyulu plakalara yerleştirildi ve 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem ortamında kısa süreli (30 dakika) ve uzun süreli (24 saat ) olarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her bir kuyuya 10  $\mu$ L hücre proliferasyon reaktifi WST-8 ilave edildi. 3 saat sonra ELISA okuyucusu ile absorbans değerleri ölçüldü ve hücre canlılığı (hücre sayısı, çoğalması, sitotoksitesi) kontrole kıyasla yüzde olarak hesaplandı.

EP uygulamasında önce  $1 \times 10^6$  hücre/mL yoğunlukta 100  $\mu$ L hücre süspansiyonuna 10  $\mu$ L propidyum iyodür (PI) ilave edildi. Daha sonra EP uygulaması yapılarak hücreler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Permeabilize hücrelerin yüzdesi ve ortalama floresan

yoğunluğu, akış sitometrisi kullanılarak elde edildi. Boyanmış hücrelerin yüzdesi, EP uygulanmamış kontrol hücrelerine kıyasla belirlendi.

Etkin E alan değeri, hücre ölümünün minimum ve permeabilizasyonun en yüksek olduğu değerdir. Etkin E alan değerinde hücreler hem permeabilize olmakta hemde canlılığını devam ettirmektedir. Bu nedenle permeabilizasyon ve hücre canlılığı grafiklerinin kesişiminden HeLa hücrelerine uygulanacak EKT ve CaEP için gerekli etkin E alan değeri belirlendi.

### **3.5. Kemoterapötik İlaçların Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi**

Bleomisin ve sisplatin kemoterapötik ilaçların HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri belirlendi.  $1 \times 10^5$  hücre/mL yoğunlukta 100  $\mu$ L HeLa hücre süspansiyonu 96'lık kuyucuklara ekildi. Farklı konsantrasyonlardaki bleomisin (kontrol, 10, 100, 200, 400, 800  $\mu$ M) ve sisplatin (kontrol, 10, 25, 50, 75, 100  $\mu$ M) hücrelere ayrı ayrı uygulanıp 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem ortamında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her bir kuyuya 10  $\mu$ L hücre proliferasyon reaktifi WST-8 ilave edildi ve absorbans değerleri ELISA okuyucu ile ölçülerek hücre canlılıkları kontrol grubuna kıyasla yüzde olarak belirlendi. Sonuçların güvenilirliği açısından her bir deney üç kez tekrarlandı.

### **3.6. Kalsiyumun Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi**

$1 \times 10^5$  hücre/mL yoğunlukta 100  $\mu$ L HeLa hücre süspansiyonu 96'lık kuyucuklara ekildi. Farklı konsantrasyonlarda CaCl<sub>2</sub> (kontrol, 1, 2, 3, 4, 5 mM (1000, 2000, 3000, 4000, 5000  $\mu$ M)) uygulandı. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra, her bir kuyuya 10  $\mu$ L hücre proliferasyon reaktifi WST-8 ilave edildi ve ELISA okuyucu ile absorbans değerleri ölçülerek hücre canlılıkları kontrol grubuna kıyasla yüzde olarak belirlendi. Sonuçların güvenilirliği açısından her bir deney üç kez tekrarlandı.

### **3.7. EKT Uygulamasının Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi**

HeLa hücreleri için belirlenen etkin E alan değeri (1,6 kV/cm) kullanılarak kemoterapötik ilaçlarla birlikte EKT uygulaması gerçekleştirildi.  $1 \times 10^6$  hücre/mL yoğunluktaki 100  $\mu$ L hücre süspansiyonu 4 mm'lik elektroporatör küvetlerine alındı. Farklı

konsantrasyonlardaki kemoterapötik ilaç dozları (Bleomisin için; 10, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{M}$  ve Sisplatin için; 10, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{M}$ ) hazırlandı. Her bir doz, 3 tekrarlı çalışılacak şekilde kuvet içindeki hücre süspansiyonuna uygulandı. İlaç uygulamasını takiben BTX elektroporator ile 1,6 kV/cm olarak belirlenen Etkin E alan değeri uygulandı. Daha sonra kuvet içerisindeki hücre süspansiyonları 96'lık kuyucuklara ekildi. 24 saat  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde inkübe edildikten sonra her bir kuyuya 10  $\mu\text{L}$  hücre proliferasyon reaktifi WST-8 ilave edildi ve ELISA okuyucu ile hücre canlılıkları kontrol grubuna kıyasla yüzde olarak belirlendi. Sonuçların güvenilirliği açısından her bir deney üç kez tekrarlandı.

### **3.8. CaEP Uygulamasının Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi**

HeLa hücreleri için belirlenen etkin E alan değeri kullanılarak  $\text{CaCl}_2$  ile birlikte CaEP uygulaması gerçekleştirildi.  $1 \times 10^6$  hücre/mL yoğunluktaki 100  $\mu\text{L}$  hücre süspansiyonu 4 mm'lik elektroporator kuvetlerine alındı. Farklı konsantrasyonlardaki  $\text{CaCl}_2$  (1, 2, 3, 4, 5 mM) dozları hazırlandı. Her bir doz, 3 tekrarlı çalışılacak şekilde kuvet içindeki hücre süspansiyonuna uygulandı.  $\text{CaCl}_2$  uygulamasını takiben BTX elektroporator ile 1,6 kV/cm olarak belirlenen etkin E alan değeri uygulandı. Daha sonra kuvet içerisindeki hücre süspansiyonları 96'lık kuyucuklara ekildi. 24 saat  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde inkübe edildikten sonra her bir kuyuya 10  $\mu\text{L}$  hücre proliferasyon reaktifi WST-8 ilave edildi ve ELISA okuyucu ile hücre canlılıkları kontrol grubuna kıyasla yüzde olarak belirlendi. Sonuçların güvenilirliği açısından her bir deney üç kez tekrarlandı.

### **3.9. Kemoterapötik İlaçların ve Kalsiyumun Mitokondri Membran Potansiyeline Etkisinin Belirlenmesi**

100  $\mu\text{L}$  HeLa hücre süspansiyonu  $1 \times 10^5$  hücre/mL yoğunlukta olacak şekilde 96'lık kuyucuklara ekildi ve farklı konsantrasyonlar da bleomisin, sisplatin ve  $\text{CaCl}_2$  doz uygulamaları yapıldı. Hücreler 24 saat boyunca  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki hücre medyumunu aspire edilerek 200  $\mu\text{L}$  PBS eklendi. Her kuyuya 2  $\mu\text{L}$  JC-1 stok solüsyonu eklenerek  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler 200  $\mu\text{L}$  PBS ile iki kez yıkandı ve tekrar her kuyucuğa 200  $\mu\text{L}$  PBS eklendi. Kırmızı floresan (eksitasyon 550 nm, emisyon 600 nm) ve yeşil floresan (eksitasyon 485 nm, emisyon 535 nm) bir spektrofotometrik plaka okuyucu kullanılarak

ışımaya sonuçları alındı. Kırmızı floresan/yeşil floresansa oranı belilendi. Sonuçların güvenilirliği açısından her bir deney üç kez tekrarlandı.

### **3.10. EKT ve CaEP Uygulamalarının Mitokondri Membran Potansiyeline Etkisinin Belirlenmesi**

$1 \times 10^6$  hücre/mL yoğunlukta 100  $\mu$ L HeLa hücre süspansiyonu 4 mm'lik elektroporator küvetlerine alındı. Farklı konsantrasyonlardaki kemoterapötik ilaçların dozları (Bleomisin için; 10, 100, 200, 400, 800  $\mu$ M ve Sisplatin için; 10, 25, 50, 75, 100  $\mu$ M) ve  $\text{CaCl}_2$  (1, 2, 3, 4, 5mM) hazırlanarak küvet içindeki hücre süspansiyonuna uygulandı. İlaç uygulamasın takiben BTX elektroporator ile 1,6 kV/cm E alan değeri uygulandı. Daha sonra küvet içerisindeki hücre süspansiyonları 96'lık kuyucuklara ekildi. 24 saat inkübe edildikten sonra hücre kültürü ortamı aspire edilerek 200  $\mu$ L PBS eklendi. Her kuyuya 2  $\mu$ L JC-1 stok solüsyonu eklenerek 37°C, %5  $\text{CO}_2$ 'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücreler 200  $\mu$ L PBS ile iki kez yıkandı ve tekrar her kuyucuğa 200  $\mu$ L PBS eklendi. Kırmızı floresan (eksitasyon 550 nm, emisyon 600 nm) ve yeşil floresanı (eksitasyon 485 nm, emisyon 535 nm) spektrofotometrik plate okuyucu kullanarak emisyon ışımaya değerleri ölçüldü. Kırmızı floresan/yeşil floresan oranı belilendi. Sonuçların güvenilirliği açısından her bir deney üç kez tekrarlandı.

### **3.11. EP, EKT, CaEP Uygulamalarının Hücre Döngüsüne Etkisinin Belirlenmesi**

$1 \times 10^6$  hücre/mL yoğunluktaki 100  $\mu$ L HeLa hücre süspansiyonu 4 mm aralıklı çelik elektrotlara sahip elektroporasyon küvetlerine konuldu. BTX elektroporator sistemi ile her bir elektroporasyon küvetine 1Hz'lik tekrarlama frekansında 0,4 – 3,2 kV/cm şiddetinde 100  $\mu$ s süresince 8 adet kare dalga E pulsu uygulandı. Bleomisin (10 ve 100  $\mu$ M), sisplatin (10 ve 25  $\mu$ M) ve  $\text{CaCl}_2$ (1 ve 5 mM) önceden belirlenen dozlarının uygulamaları EP ile birlikte ve EP'siz olarak yapıldı. Uygulamalar sonrası hücre döngüsü analizi için hücreler 200  $\mu$ L süspansiyon şeklinde 6 kuyulu hücre plakalarına yerleştirildi ve 37 °C'de %5  $\text{CO}_2$ , %95 nem ortamında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler tripsinize edildi ve santrifüj edilerek süpernatantları atıldı. Hücreler -20 °C'de bir gün beklemiş saf etanol ile 15 dk fiksasyon işlemine tabi tutuldu ve tekrar santrifüj edilerek etanol uzaklaştırıldı. Fikse hücreler, 2 kere PBS ile yıkandı. Son olarak 0,5 mL PI/RNase solüsyonu eklendi ve akış sitometrisinde hücre döngüsü analizi yapıldı.

### **3.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi ile Bax, Bcl-2 ve P53'ün Belirlenmesi**

PCR yöntemi ile Bax, Bcl-2 ve p53 gen ekspresyonlarını belirlemek üzere HeLa hücrelerinde belirlenen deney gruplarının uygulamaları gerçekleştirildi. Hücreler 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Hücreler inkübasyon sonrasında tripsinizasyonla ile flask yüzeyinden kaldırıldı. Tripsin uzaklaştırılarak, hücreler yeni medyumla yıkandı ve deney grupları PCR analizinin yapılacağı birime uygun koşullar altında teslim edildi. RNA izolasyonu ve Cdna sentezi uygun primerler ile Real Time (RT) PCR analizi Sağlık Bilimleri Üniversitesi Moleküler Araştırma ve Uygulama Birimi tarafından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. mRNA izolasyonu için QIAGEN marka Kat.No.74104 RNeasy mini kiti kullanıldı. mRNA molekülünden gen ekspresyon çalışması yapılabilmesi için öncelikli olarak tek zincirli RNA molekülünün revers transkriptaz enzimi ile çift zincirli hale getirilmesi gerekmektedir. Bu işlem için ELK Biotechnology EntiLink 1st Strand cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Total RNA her bir örneğe 2 ug\ uL olacak şekilde hesaplandı. cDNA sentezini takiben yapılan kantitatif RT-PCR yöntemi gen ekspresyon analizlerinde en fazla tercih edilen yöntemdir. Florosan ışımalar için SYBR Green boyası kullanıldı. Bu işlem için TOMBO syber green kit ve ABI 7500 PCR cihazı kullanıldı. Analizde "GAPDH" geni referans gen olarak kullanıldı.

### **3.13. İstatistiksel Analiz**

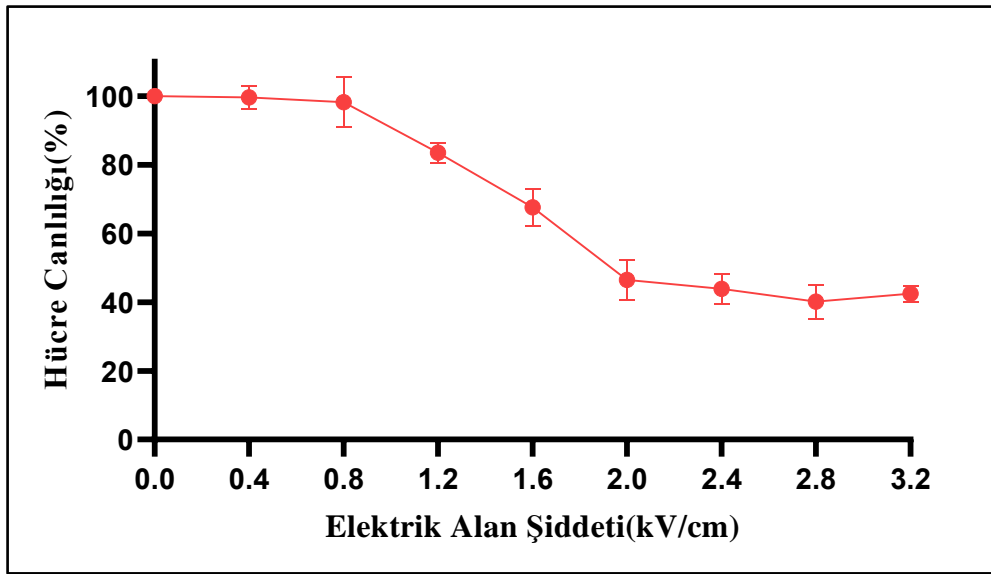
İstatistiksel analizler, GraphPad Prism 9 programı kullanılarak yapılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak çalışıldı ve veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (ort $\pm$ SD) şeklinde ifade edildi. Verilerin dağılımı Shapiro-Wilk testiyle belirlenirken, varyans analizi ise Levene testiyle belirlendi. Kontrole göre karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA testi kullanılarak yapıldı. Çoklu gruplar arasındaki farklılığı değerlendirmek için varyans analizi (İki Yönlü ANOVA) yapılırken, post hoc olarak Tukey testi kullanıldı. Önem düzeyi,  $p < 0.0001$  alınarak istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. EKT ve CaEP için Belirlenen Etkin Elektrik Alan Değeri

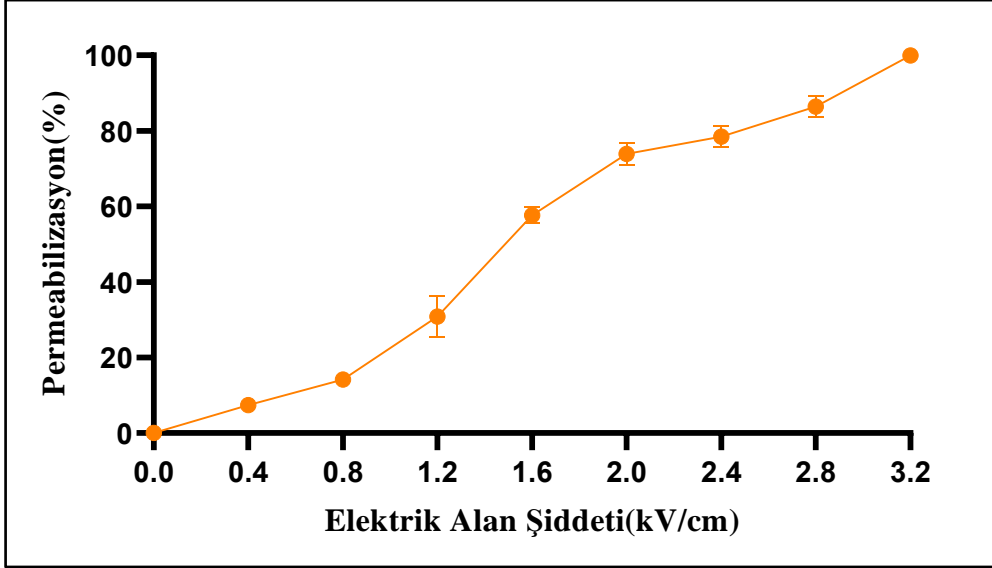
HeLa hücrelerine 1 Hz tekrarlama frekansında 100  $\mu$ s süresince 0-3,2 kV/cm aralığında E alan değerleri uygulandı. Kısa süreli inkübasyon sonrası (30dk) hücre canlılıkları WST-8 yöntemi ile belirlendi. HeLa hücrelerinin E alan ile değişen hücre canlılıkları şekil 4.1.'de verildi.



Şekil 4.1. HeLa hücrelerinde 1 Hz tekrarlama frekansında 100  $\mu$ s süresinde 0-3,2 kV/cm E alan şiddeti artışına bağlı 30dk inkübasyon sonrası hücre canlılığı

HeLa hücrelerine uygulanan 0,4 kV/cm E alan şiddetinde hücre canlılığı %99,65, 0,8 kV/cm'de %98,20, 1,2 kV/cm'de %83,54, 1,6 kV/cm'de %67,58 iken 2,4 kV/cm'de %43,9 ve 3,2 kV/cm'de %42,44 olarak belirlendi.

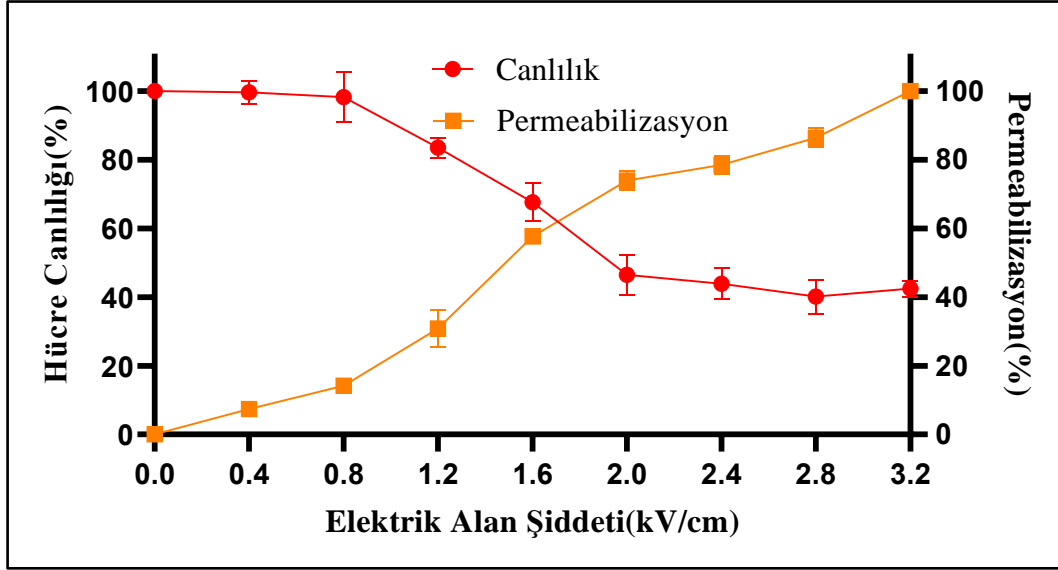
E alan değişimine bağlı olarak hücrelerde meydana gelen permeabilizasyon PI yöntemi ile belirlendi. E alanla permeabilizasyon değişimi şekil 4.2.'de gösterildi.



Şekil 4.2. HeLa hücrelerinde 1 Hz tekrarlama frekansında 100  $\mu$ s süresinde 0-3,2 kV/cm E alan şiddeti artışına bağlı permeabilizasyon

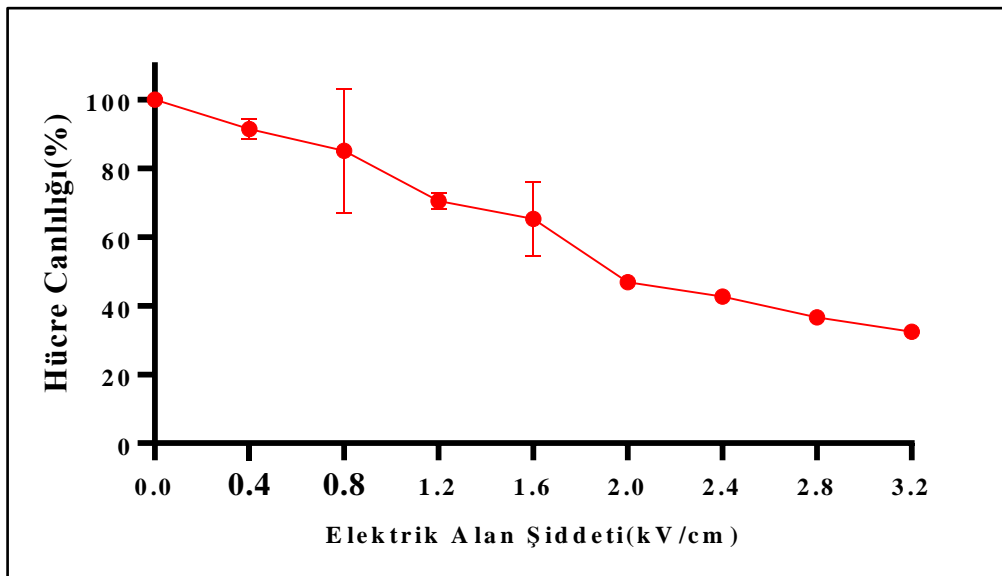
1 Hz tekrarlama frekansında 100  $\mu$ s süresince E alan değişimine bağlı olarak membran permeabilizasyonu 0,4 kV/cm'de %7,43, 0,8 kV/cm'de %14,21 iken 1,6 kV/cm'de %57,65 ve 2,4 kV/cm'de %78.51 olarak bulundu.

EP'nin uygulanması için en uygun durum permeabilizasyonun ve hücre canlılığının yüksek olduğu durum olarak kabul edilmektedir. Bu kritik nokta etkin E alan değerini ifade etmektedir. Bunu belirlemek için hücre canlılığı ve permeabilizasyon grafikleri şekil 4.3.'de gösterildiği gibi GraphPad prism 9 programı kullanılarak karşılaştırıldı.



Şekil 4.3. HeLa hücrelerinde 1 Hz tekrarlama frekansında 100 µs süresinde 0-3,2 kV/cm E alan şiddeti artışına bağlı hücre canlılığı ve permeabilizasyon eğrilerinin kesişimi

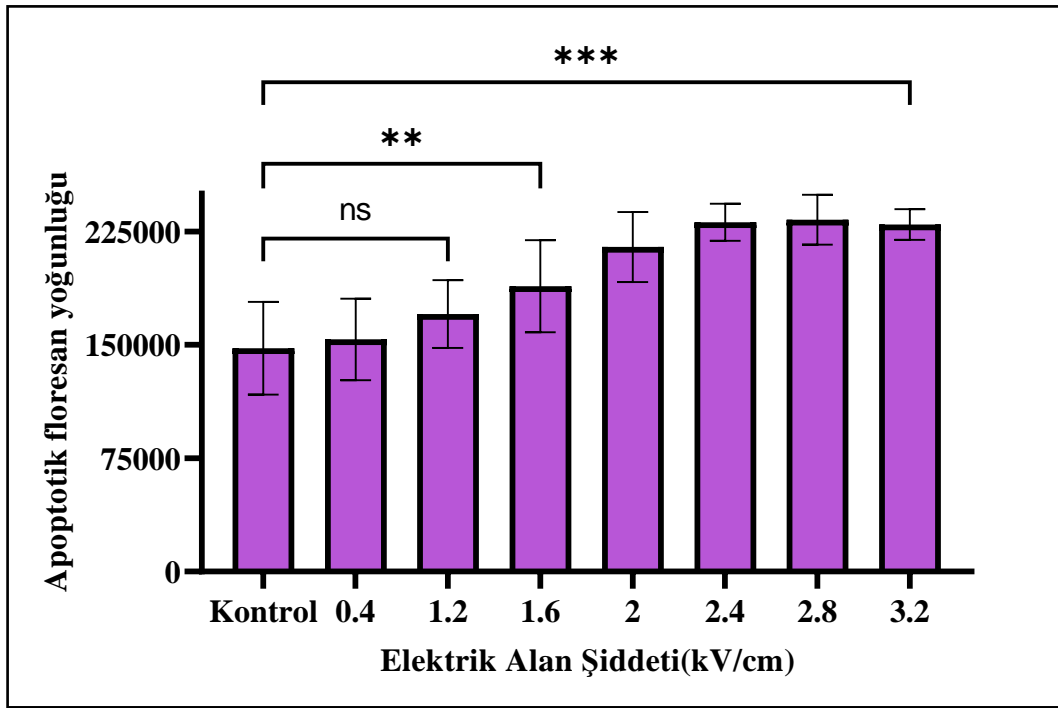
HeLa hücrelerine uygulanan E alan arttıkça hücre canlılıklarında azalma görülürken, permeabilizasyonda ise orantılı olarak artışın meydana geldiği gözlemlendi. EKT ve CaEP uygulaması için gerekli etkin E alan değeri 1,6 kV/cm olarak belirlendi. HeLa hücrelerine 1 Hz tekrarlama frekansında 100 µs süresince 0-3,2 kV/cm aralığında E alan değerleri uygulandı. Uzun süreli inkübasyon sonrası (24 saat) hücre canlılıkları WST-8 yöntemi ile belirlendi. HeLa hücrelerinin E alan ile değişen hücre canlılıkları şekil 4.4.'de verildi.



Şekil 4.4. HeLa hücrelerinde 1 Hz tekrarlama frekansında 100 µs süresinde 0-3,2 kV/cm E alan şiddeti artışına bağlı 24 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı

HeLa hücrelerine uygulanan 0,4 kV/cm E alan şiddetinde hücre canlılığı %91,47, 0,8 kV/cm'de %85,11, 1,6 kV/cm'de %65,3 iken 2,4 kV/cm'de %42,6 ve 3,2 kV/cm'de %32,4 olarak bulundu.

1 Hz tekrarlama frekansında 100µs süresince 0-3,2 kV/cm aralığında E alan uygulanan HeLa hücrelerinin uzun süreli inkübasyon sonrası (24 saat) apoptotik aktiviteleri Annexin V/FITC-PI yöntemi ile belirlendi ve E alan ile değişen apoptotik floresan yoğunluğu şekil 4.5'de verildi.

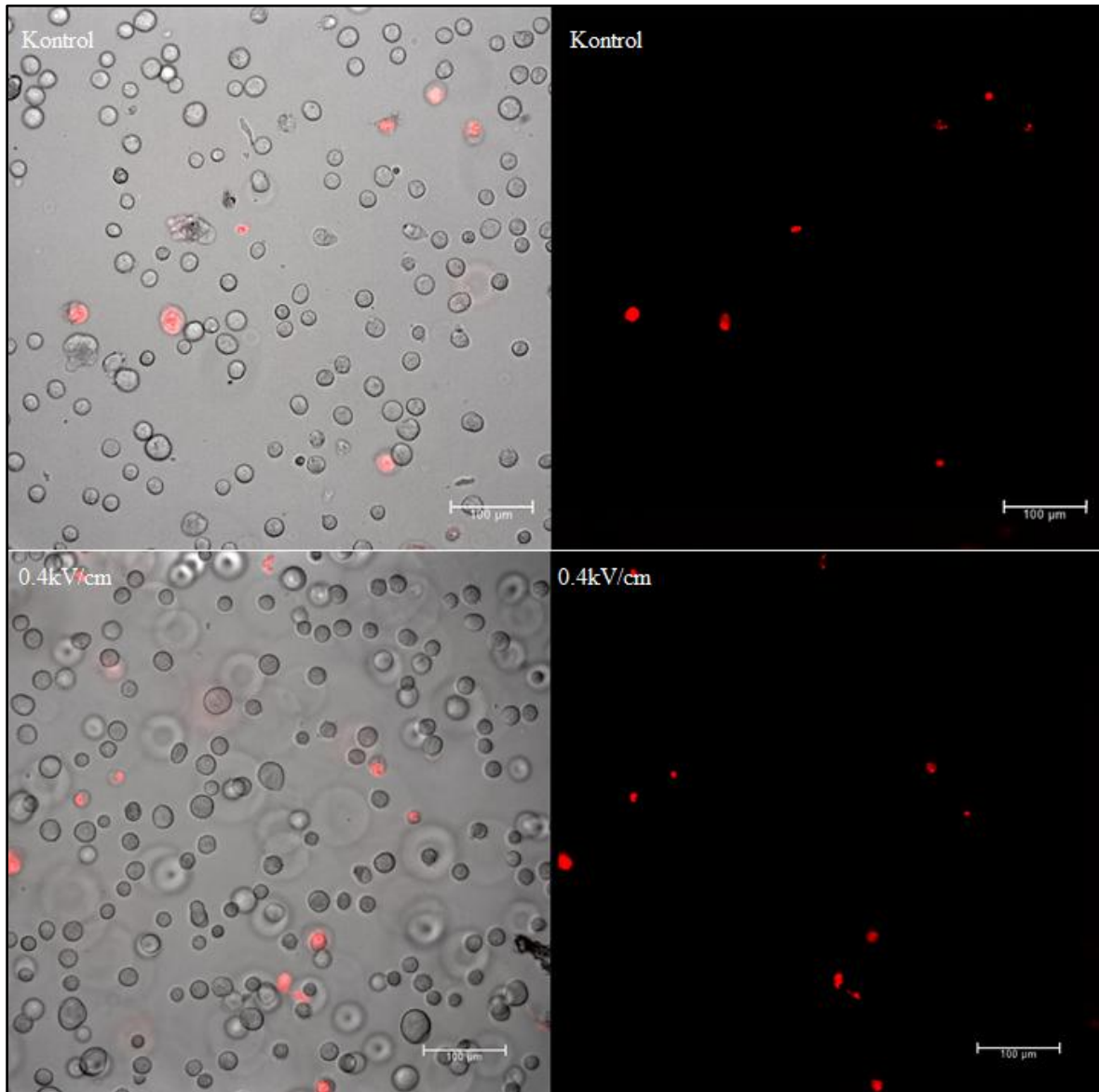


Şekil 4.5. 1 Hz tekrarlama frekansında 100 µs süresinde 0-3,2 kV/cm E alan şiddeti artışına bağlı HeLa hücrelerinin apoptotik floresan yoğunluğu

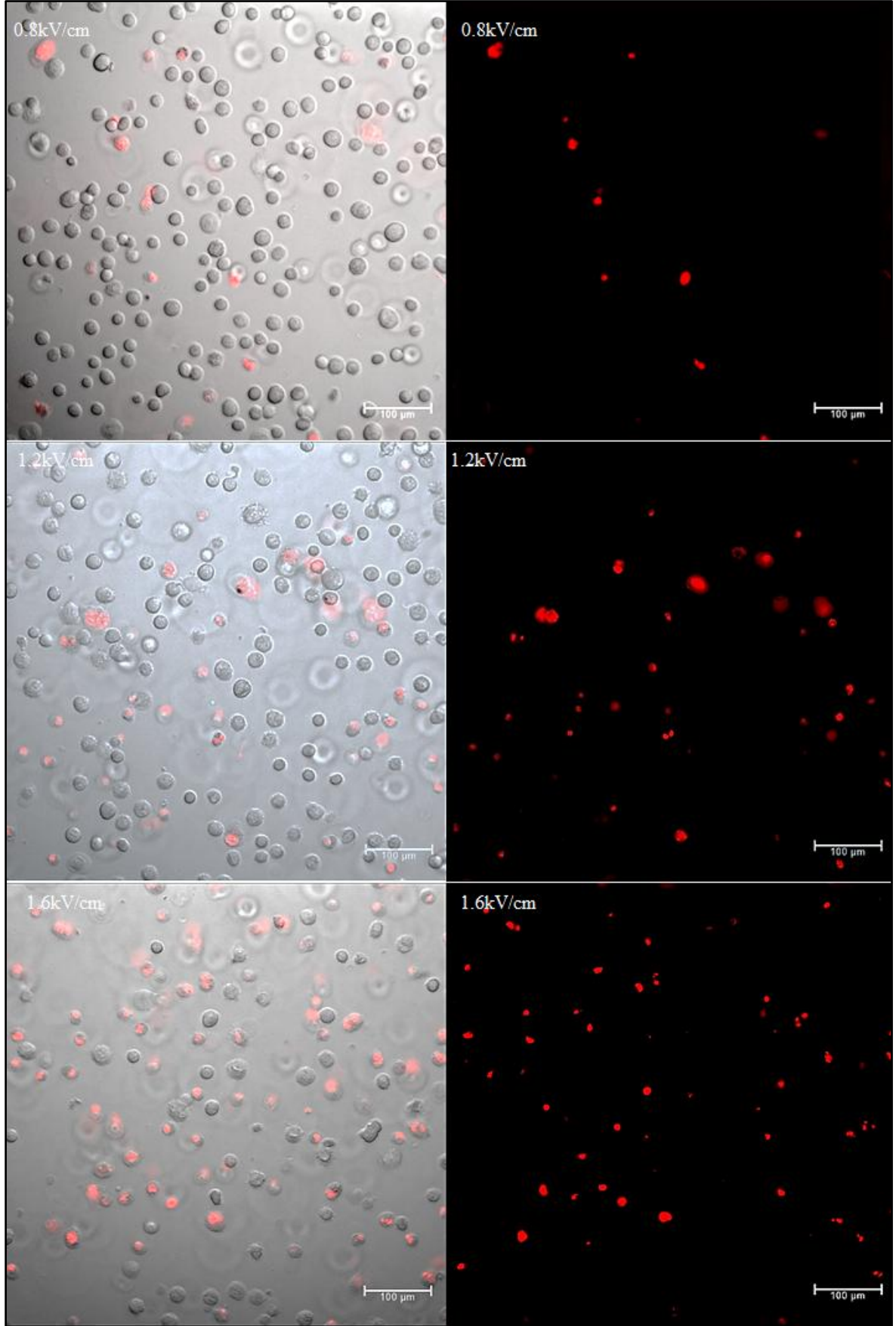
HeLa hücrelerine uygulanan dış E alanın artması ile birlikte hücrelerdeki apoptotik floresan yoğunluğunun arttığı belirlendi. EP uygulamasından sonra tüm E alan parametrelerinde sağlıklı hücre sayısı azaldı. 0,4-1,2 kV/cm E alan şiddetlerinde apoptotik floresan yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmedi ( $p > 0.01$ ). Fakat 1,6-3,2 kV/cm E alan maruziyetlerinde ise apoptotik floresan yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlendi (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## 4.2. Faz Konstrast ve İmmünfloresan Mikroskop Görüntüleri

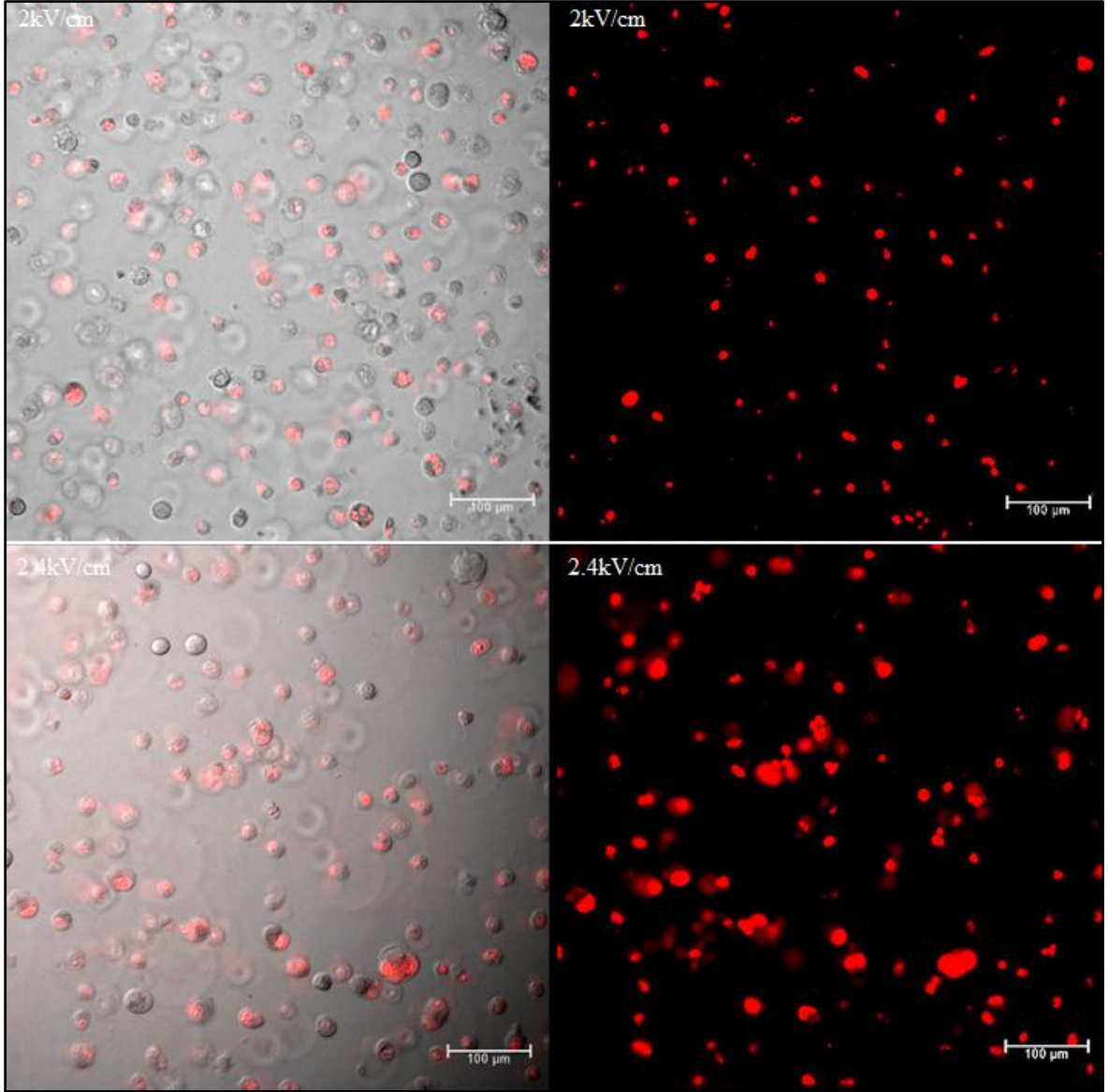
HeLa hücrelerine 1 Hz tekrarlama frekansında 100  $\mu$ s süresinde 0-2,4 kV/cm E alan uygulandıktan sonra PI ile immünfloresan mikroskop görüntüleri alındı. E alan şiddeti arttıkça permeabilize hücre sayısı artmakta bununla orantılı olarak PI ile boyanmış hücre sayısı da artmaktadır. 0-2,4 kV/cm aralığında E alan şiddetlerine bağlı olarak değişen floresan mikroskop görüntüleri resim 4.1.'de verildi.



Resim 4.1. E alan uygulanan HeLa hücrelerinin PI ile boyanmış immünfloresan mikroskop görüntüleri (20x Objektif)



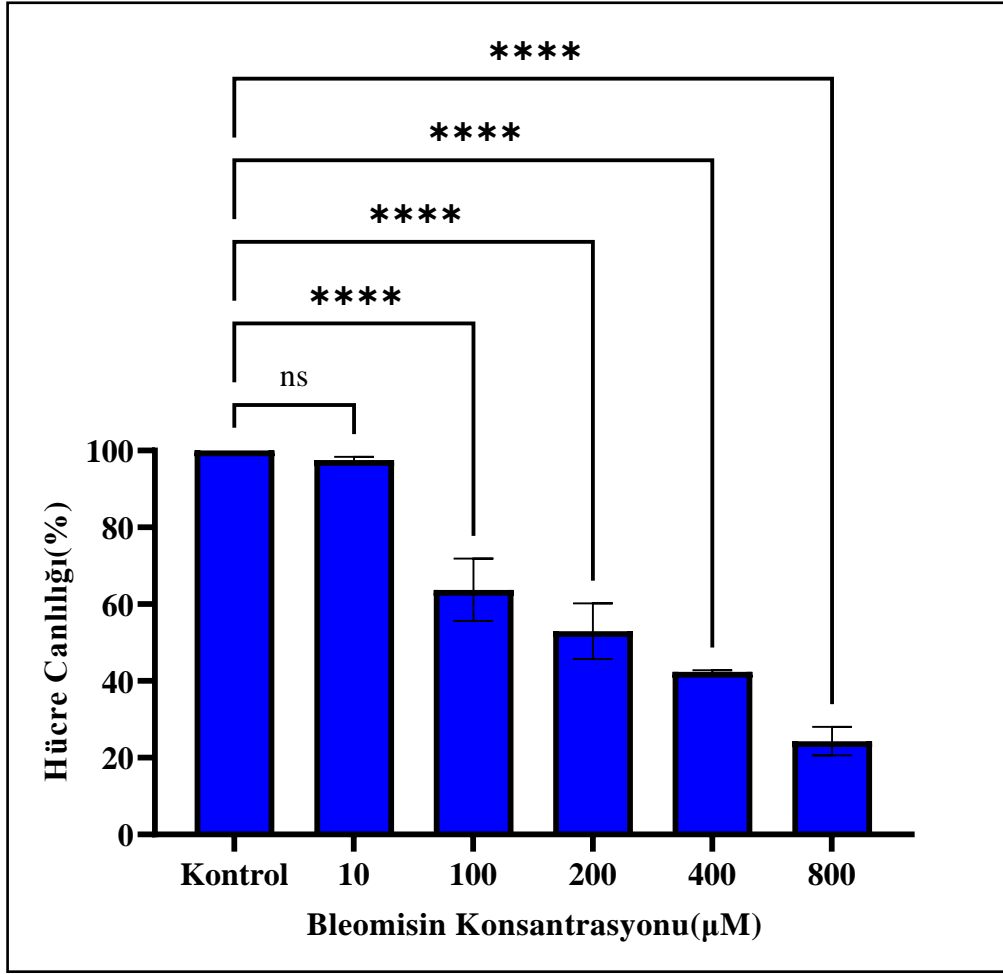
Resim 4.1. (Devam) E alan uygulanan HeLa hücrelerinin PI ile boyanmış immünfloresan mikroskop görüntüleri (20x Objektif)



Resim 4.1. (Devam) E alan uygulanan HeLa hücrelerinin PI ile boyanmış immünfloresan mikroskop görüntüleri (20x Objektif)

### 4.3. Kemoterapötik İlaçlar ve Kalsiyumun Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri ve IC<sub>50</sub> Doz Değerinin Belirlenmesi

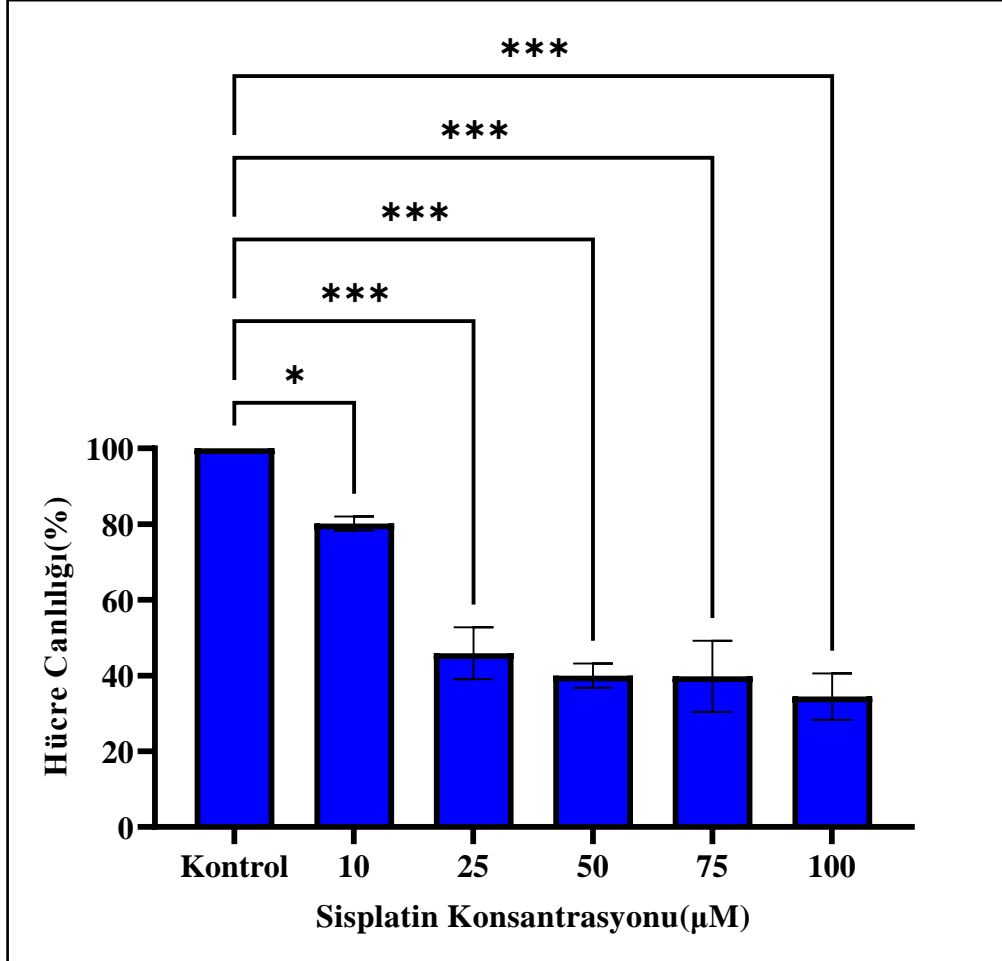
Bleomisin'in belirlenen konsantrasyonlarında HeLa hücrelerinin canlılıklarındaki değişim şekil 4.6.'da gösterildi.



Şekil 4.6. Bleomisin dozuna bağlı olarak HeLa hücrelerinin canlılık değişimleri

HeLa hücrelerinde bleomisin'in artan dozuna bağlı olarak hücre proliferasyonunda azalmanın meydana geldiği belirlendi. İlaç uygulanmayan kontrol grubunda hücre canlılığı değişmez iken 10 µM bleomisin konsantrasyonunda hücre canlılığı %97,57, 100 µM ilaç konsantrasyonunda %63,73, 200 µM'da %52,99 iken 400 µM'da %42,34 ve 800 µM'da %24,32 olarak bulundu. Kontrol grubuna göre, 10 µM bleomisin dozu hariç diğer tüm dozlarda hücre canlılığında doza bağlı olarak değişen istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (\*\*\*\*p<0.0001). HeLa hücreleri için bleomisin kemoterapötik ilacının IC<sub>50</sub> değeri 214,11±4,7 µM olarak hesaplandı.

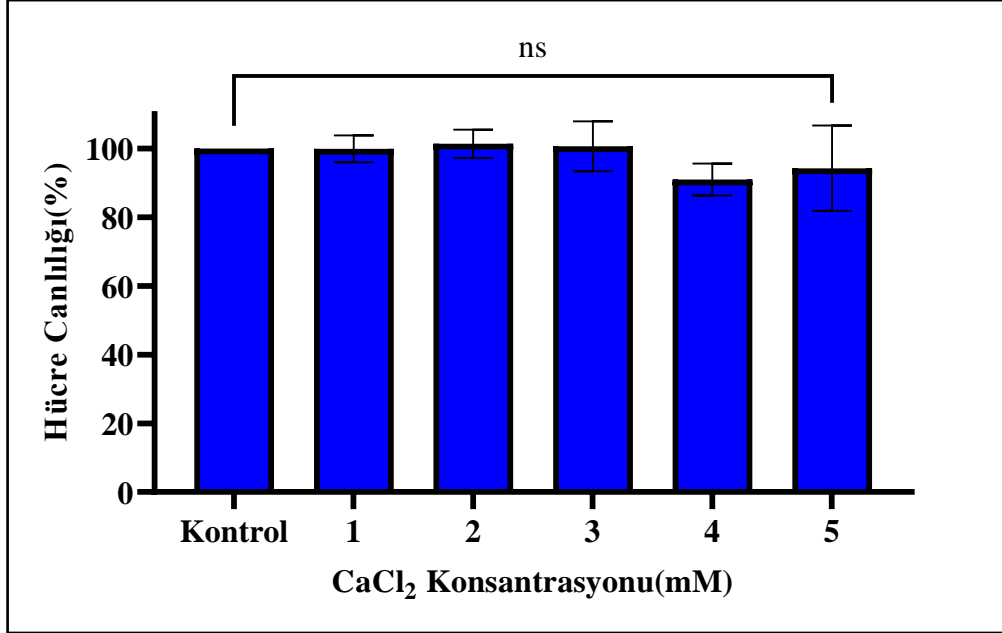
Şekil 4.7.'de HeLa hücrelerinin, sislptinin farklı konsantrasyonlarına bağı olarak hücre canlılığındaki değışim gösterildi.



Şekil 4.7. Sislptin dozuna bağı olarak HeLa hücrelerinin canlılık değışimleri

Sislptinin artan dozuna bağı olarak HeLa hücrelerinin proliferasyonunda azalmanın meydana geldiğı görüldü. İlaç uygulanmayan kontrol grubunda hücre canlılığı değışmedi ve kontrol grubuna oranla 10 µM sislptin konsantrasyonunda hücre canlılığı %80.17 iken 25 µM'da %45,92, 50 µM'da %39,9, 75 µM'da %39,8 ve 100 µM sislptin konsantrasyonunda % 34,45 olarak bulundu. Hücre canlılığındaki azalmanın 10, 25, 50, 75 ve 100 µM sislptin dozlarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğı saptandı (\*p<0.05, \*\*\*p<0.001). Sislptin kemoterapötik ilacının HeLa hücrelerinde IC<sub>50</sub> değıeri 35,16±3,3 µM olarak hesaplandı.

HeLa hücreleri üzerine 1, 2, 3, 4 ve 5 mM konsantrasyonlarında  $\text{CaCl}_2$  uygulandı ve doza bağlı hücre proliferasyonundaki değişim şekil 4.8.'de gösterildi.

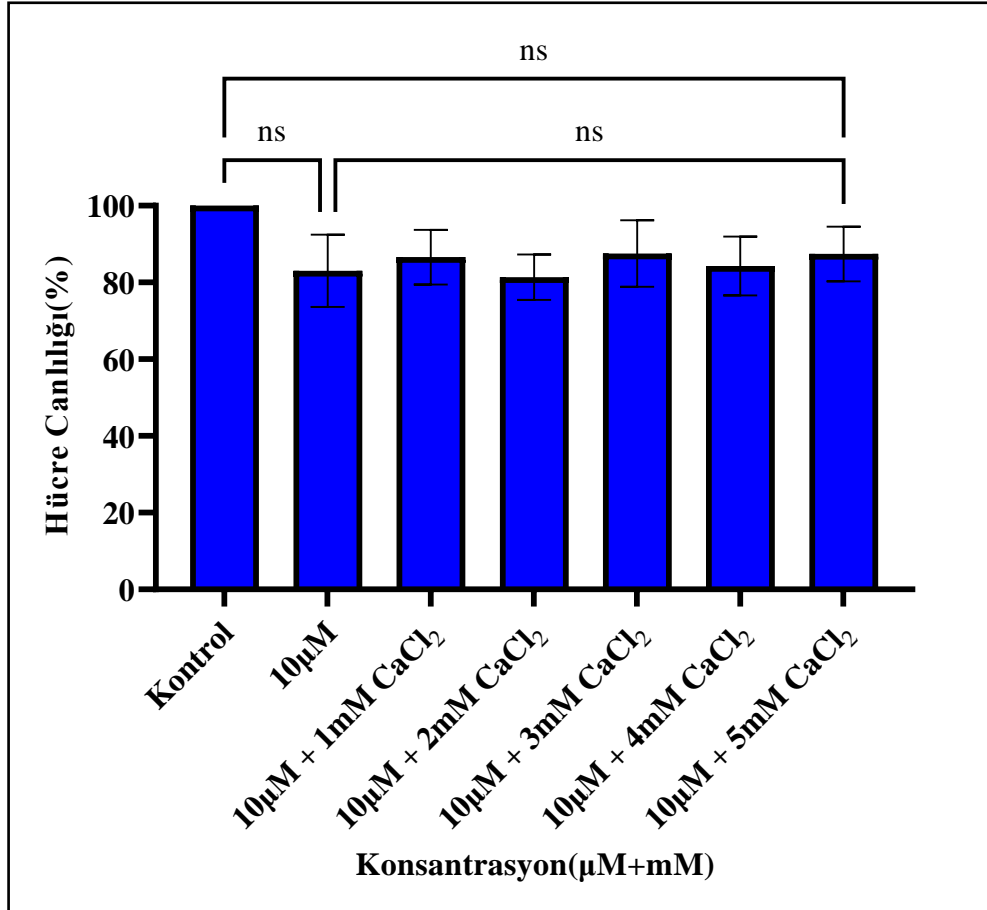


Şekil 4.8.  $\text{CaCl}_2$  dozuna bağlı olarak HeLa hücrelerinin canlılık değişimleri

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $\text{CaCl}_2$  dozuna bağlı olarak HeLa hücrelerinin canlılığında ve proliferasyonunda anlamlı bir değişim görülmedi. Uygulama yapılmayan kontrol grubunda hücre canlılığında değişim meydana gelmediği görüldü. Kontrol grubuna göre 1 mM  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyonunda hücre canlılığı %99,9 iken 2 mM ve 3 mM'da %101,35 ve %100,62 olarak proliferasyonda nispi bir artış gözlemlendi. Hücre canlılığında 4 mM  $\text{CaCl}_2$  %90,98 ve 5 mM  $\text{CaCl}_2$ 'da %94,24 olarak nispi bir azalma saptandı.  $\text{CaCl}_2$ 'ün tüm dozları için belirlenen canlılık oranları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği görüldü ( $p > 0.0001$ ).

#### 4.4. Kemoterapötik İlaçlar İle Kalsiyumun Kombine Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

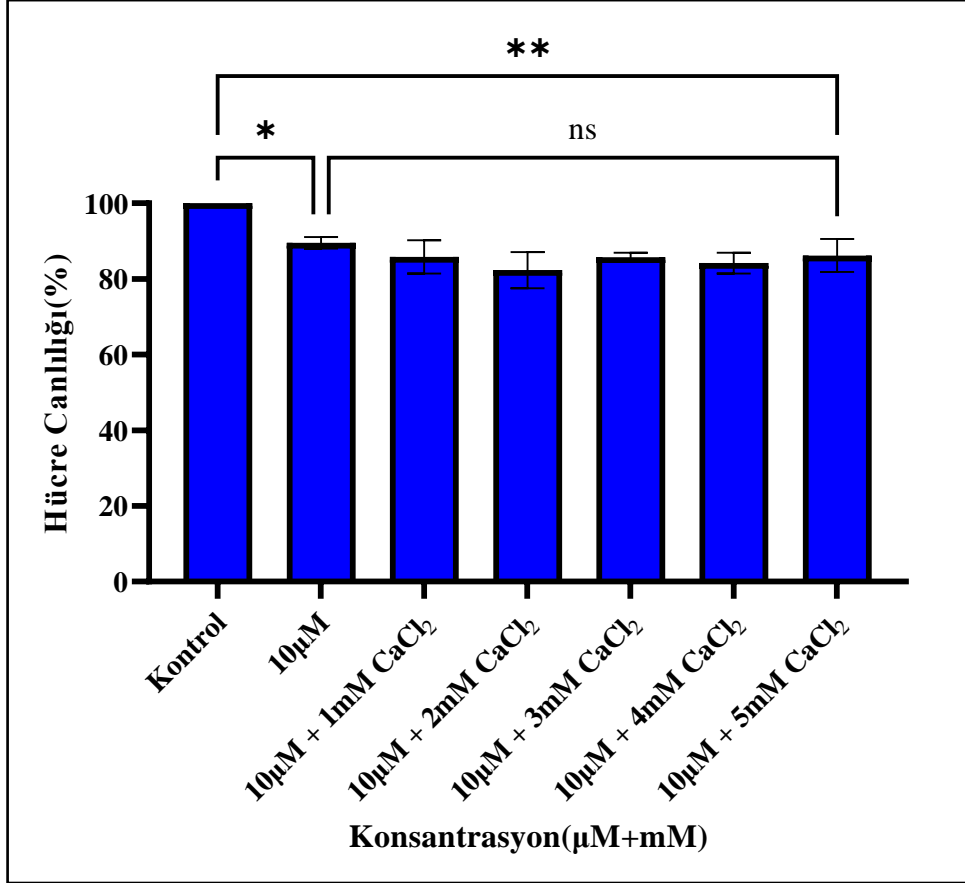
Bleomisin'in en düşük dozu olarak belirlenen 10  $\mu\text{M}$  ilaç konsantrasyonu ile  $\text{CaCl}_2$  'nin 1, 2, 3, 4 ve 5 mM dozlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri şekil 4.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Bleomisin ile  $\text{CaCl}_2$  kombine dozlarının HeLa hücrelerinin canlılıklarına etkisi

HeLa hücrelerine 10  $\mu\text{M}$  bleomisin ile farklı  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyon dozları kombine halinde uygulandı. Tek başına uygulanan 10  $\mu\text{M}$  bleomisin dozunda hücre canlılığı %83,02 olarak belirlendi. 10  $\mu\text{M}$  bleomisin + 1 mM  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyonunda hücre canlılığı %86,59, 10  $\mu\text{M}$  bleomisin + 2 mM  $\text{CaCl}_2$  dozunda %81,39 ve 10  $\mu\text{M}$  bleomisin + 5 mM  $\text{CaCl}_2$ 'de % 87.43 olarak belirlendi. Kombine doz uygulamalarının, kontrol ve yalnız 10  $\mu\text{M}$  bleomisin uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde sinerjik bir etkisinin olmadığı görüldü ( $p > 0.0001$ ).

10  $\mu\text{M}$  Sisplatin ilaç konsantrasyonu ile kalsiyumun 1, 2, 3, 4 ve 5 mM dozlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri şekil 4.10.'da gösterildi.

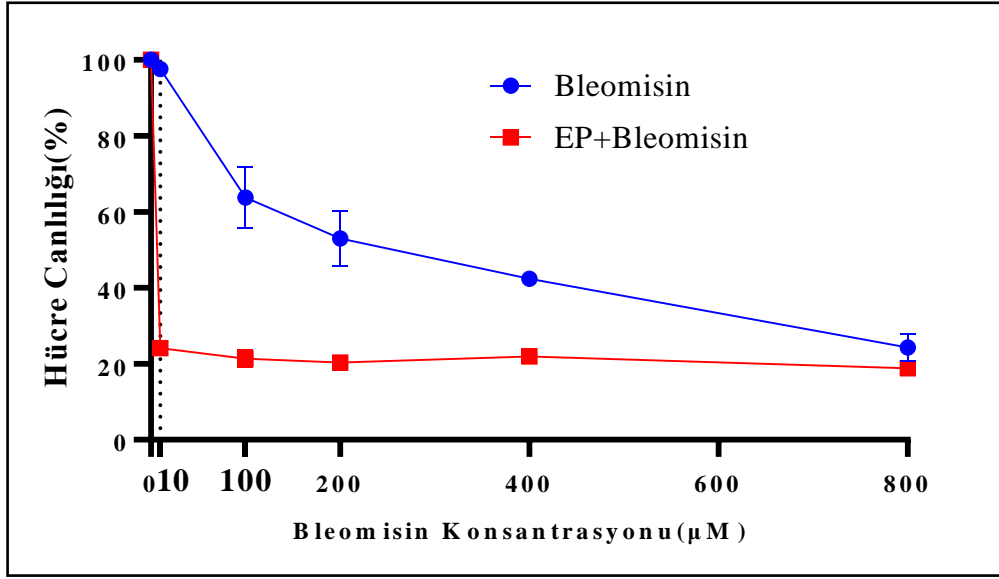


Şekil 4.10. Sisplatin ile CaCl<sub>2</sub> kombine dozlarının HeLa hücrelerinin canlılıklarına etkisi

10  $\mu\text{M}$  sisplatin ile farklı CaCl<sub>2</sub> konsantrasyon dozları kombine şeklinde HeLa hücrelerine uygulandı. Yalnız 10  $\mu\text{M}$  sisplatin dozunda hücre canlılığı %89,54 olarak bulundu. 10  $\mu\text{M}$  sisplatin + 1 mM CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda hücre canlılığı %85,82, 10  $\mu\text{M}$  sisplatin + 2 mM CaCl<sub>2</sub> dozunda %82,32 ve 10  $\mu\text{M}$  sisplatin + 5 mM CaCl<sub>2</sub>'de %86,21 olarak bulundu. Kombine doz uygulamalarının, kontrol grubuna göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmanın meydana geldiği görüldü (\*\* $p < 0.01$ ). Fakat kombine uygulamaların yalnız 10  $\mu\text{M}$  sisplatin uygulanan gruba göre hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisinin olmadığı görüldü ( $p > 0.0001$ ).

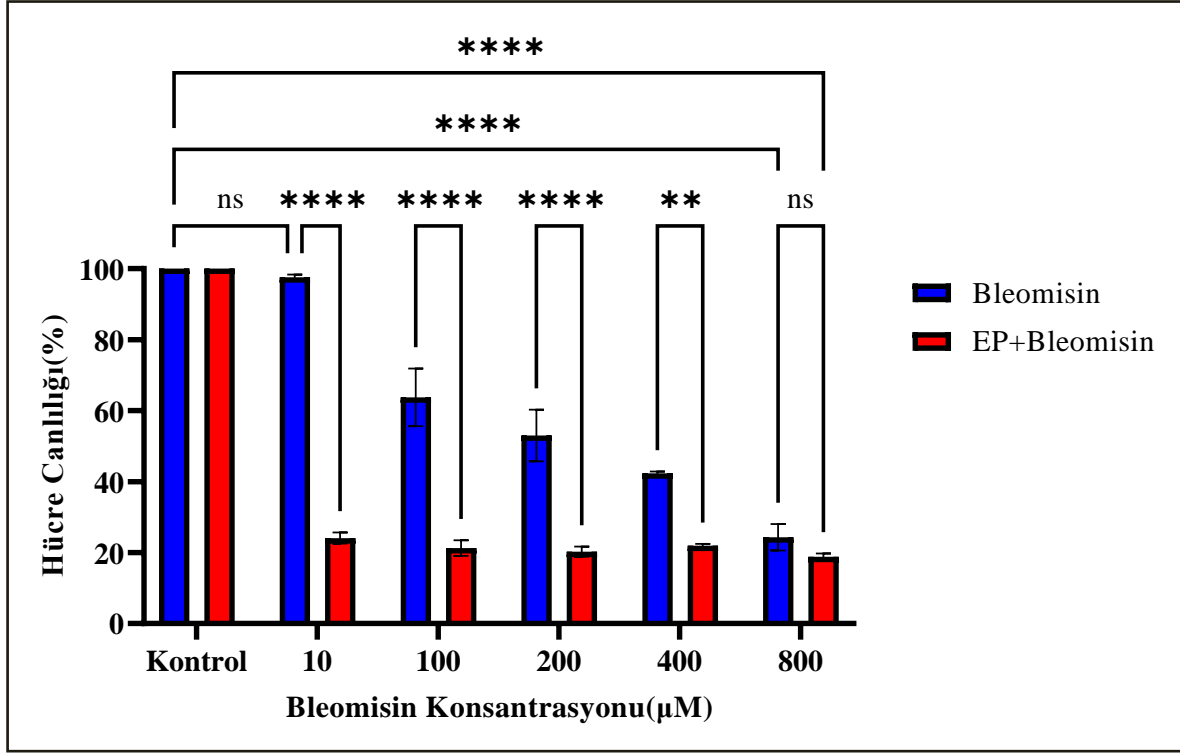
#### 4.5. EKT Uygulaması ve IC<sub>50</sub> Değeri Bulguları

HeLa hücrelerine belirlenen 1,6 kV/cm etkin E alan değeri ile birlikte 0-800  $\mu$ M bleomisin dozları uygulandı. EP ile birlikte bleomisin dozlarına bağlı olarak değişen hücre canlılığı şekil 4.11.'de verildi.



Şekil 4.11. HeLa hücrelerine elektroporasyon ile bleomisin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi

EP ile bleomisin uygulaması HeLa hücreleri üzerinde doza bağlı olarak hücre canlılığında önemli ölçüde bir azalma meydana getirdi. 1,6 kV/cm E alan ile birlikte 10  $\mu$ M bleomisin konsantrasyonda hücre canlılığı %24,11, 100  $\mu$ M'da %21,30, 200  $\mu$ M'da %20,29 ve 800  $\mu$ M'da %18,8 olarak bulundu.

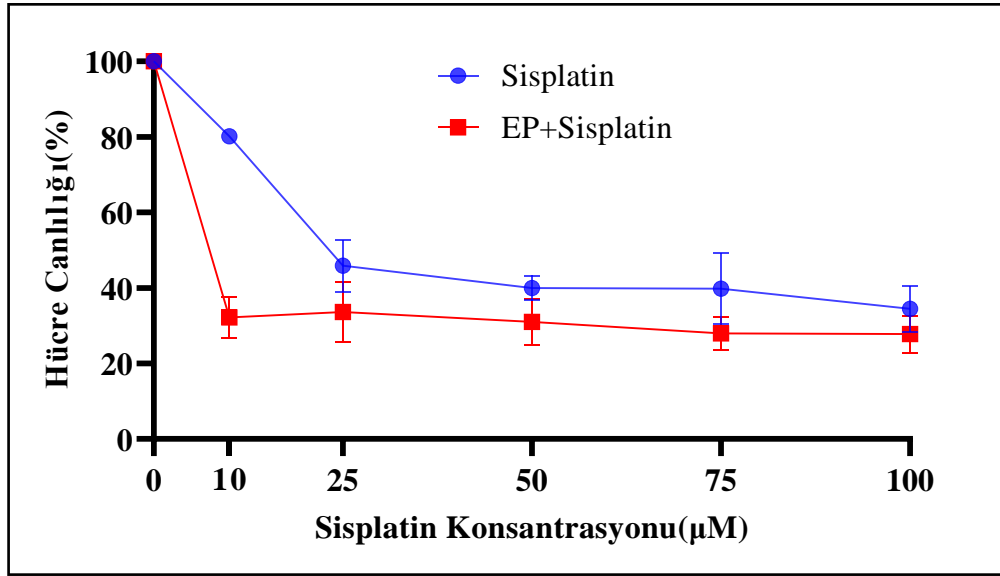


Şekil 4.12. EP+bleomisin ile bleomisin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Şekil 4.12.'de yalnız bleomisin uygulaması ile EP+bleomisin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisi verildi. Yalnız bleomisin uygulamasında 10 µM konsantrasyonda hücre canlılığı %97,57, 100 µM'da %63,73, 200 µM'da %52,98 ve 400 µM'da %42,34 iken EP ile birlikte uygulandığında EP+10 µM'da hücre canlılığı %24,11, EP+100 µM'da %21,30, EP+200 µM'da %20,29 ve EP+400 µM'da %21,9 olarak belirlendi. EP+bleomisin uygulamasının yalnız bleomisin uygulaması ile karşılaştırıldığında EP ile birlikte hücre canlılığında 10, 100, 200 ve 400 µM bleomisin konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu görüldü (\*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001). EP+bleomisin uygulamasının kontrol grubuna göre ise tüm bleomisin dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana getirdiği saptandı (\*\*\*\*p<0.0001). HeLa hücrelerinde EP ile birlikte bleomisin %50 hücre canlılığını azaltan konsantrasyon değeri; IC<sub>50</sub>: 0,44±0,3 µM olarak hesaplandı.

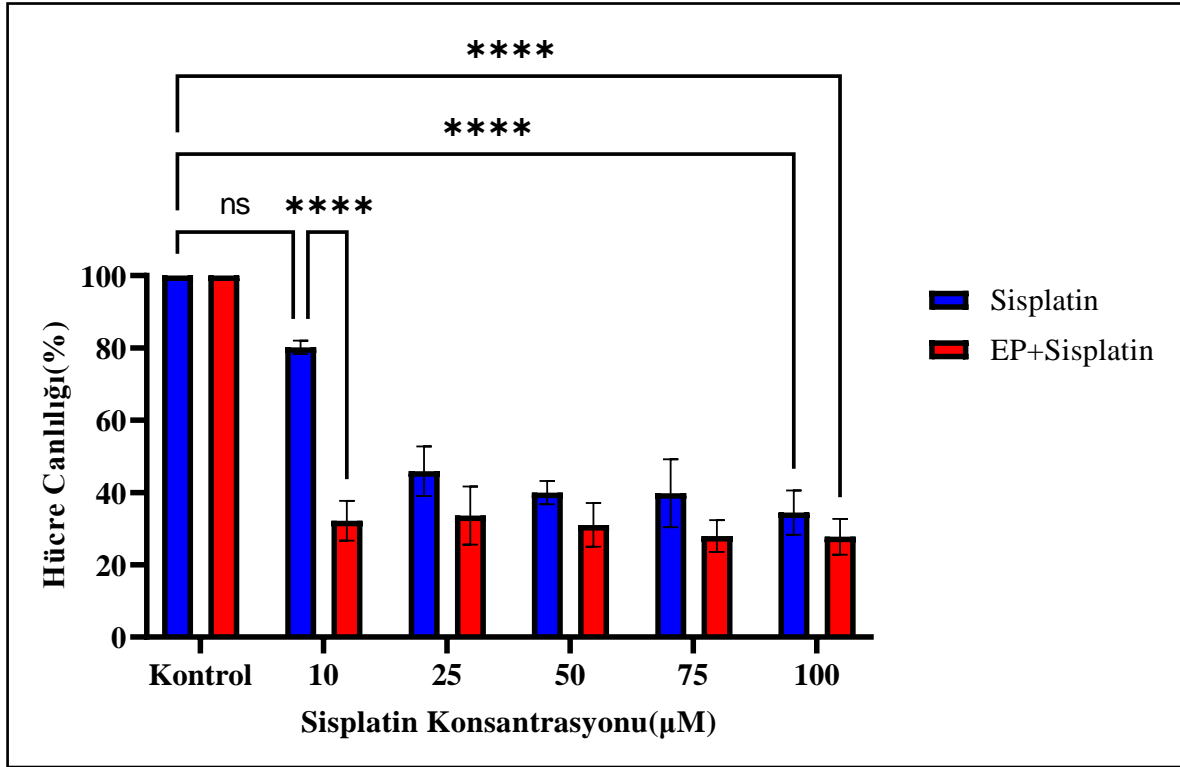
Yalnız bleomisin uygulanan grup ile EP+bleomisin'in birlikte uygulandığı grubun IC<sub>50</sub> değerleri oranlandığında elektroporasyon ile bleomisin uygulamasının sitotoksitesiyi 487 kat artırdığı belirlendi. EP+bleomisin uygulamasının daha düşük bleomisin dozlarında serviks kanserinde etkili bir tedavi yöntemi olabileceği gösterildi.

EKT uygulaması için belirlenen 1,6 kV/cm etkin E alan değeri ile birlikte 0-100  $\mu\text{M}$  sisplatin dozları uygulandı. EP ile birlikte sisplatin dozlarına bağı olarak değişen hücre canlılığı şekil 4.13.'de verildi.



Şekil 4.13. HeLa hücrelerine elektroporasyon ile sisplatin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi

HeLa hücrelerine sisplatin ile birlikte uygulanan EKT uygulamasının hücre canlılığı üzerinde önemli ölçüde azalma meydana getirdiği belirlendi. 1,6 kV/cm etkin E alan değeri ile birlikte uygulanan 10  $\mu\text{M}$  sisplatin konsantrasyonda hücre canlılığı %32,16, 25  $\mu\text{M}$ 'da %33,6, 50  $\mu\text{M}$ 'da %31,04, 75  $\mu\text{M}$ 'da %27,98 ve 100  $\mu\text{M}$ 'da % 27,76 olarak hesaplandı.



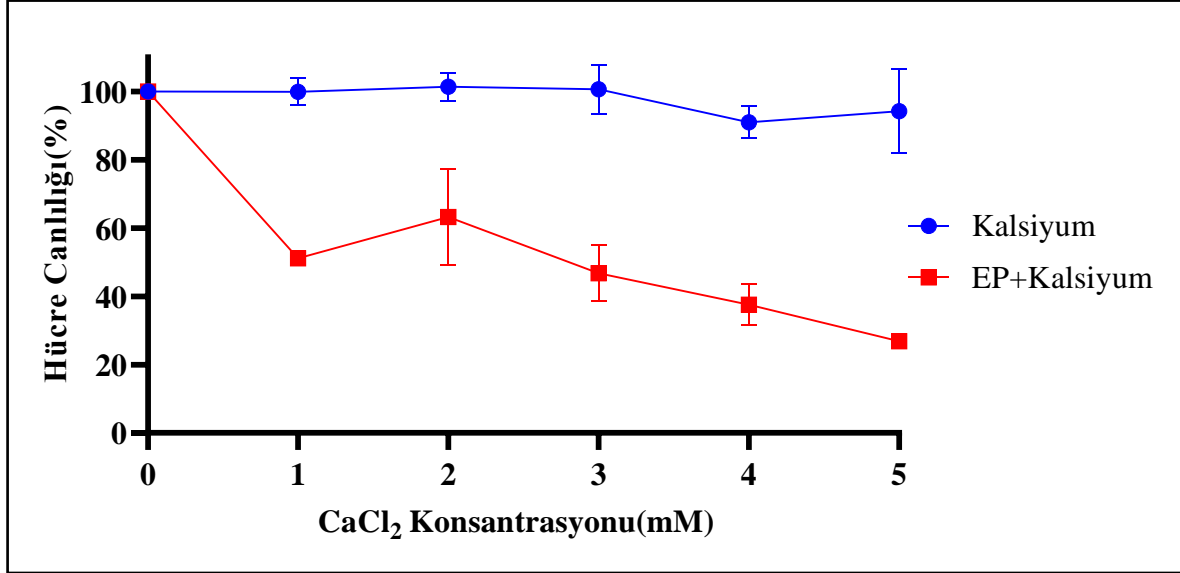
Şekil 4.14. EP+sisplatin ile sisplatin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Şekil 4.14.'de yalnız sisplatin uygulaması ile EP+sisplatin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisi verildi. Yalnız sisplatin uygulamasında 10 µM konsantrasyonda hücre canlılığı %80,17, 25 µM'da %45,92, 50 µM'da %39,9, 75µM'da %39,8 ve 100 µM'da %34,45 iken sisplatin ile EP birlikte uygulandığında EP+10 µM'da hücre canlılığı %32,16, EP+25 µM'da %33,6, EP+50 µM'da %31,04, EP+75 µM'da %27,98 ve EP+100 µM'da %27,76 olarak belirlendi. EP+sisplatin uygulamasının kontrol ile karşılaştırıldığında EP ile birlikte hücre canlılığında 10, 25, 50, 75 ve 100 µM sisplatin konsantrasyonlarının tümünde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş meydana getirdiği görüldü (\*\*\*\*p<0.0001). EP+10 µM sisplatin dozu, yalnız 10 µM sisplatin dozu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana getirdiği saptandı (\*\*\*\*p<0.0001). HeLa hücrelerinde EP ile birlikte sisplatinin inhibe edici konsantrasyon değeri; IC<sub>50</sub>:20,55±4,3µM olarak hesaplandı.

HeLa hücrelerine uygulanan yalnız sisplatin grubu ile EP+sisplatinin birlikte uygulandığı grubun IC<sub>50</sub> değerlerinin oranlaması ile EP ile sisplatin uygulamasının sitotoksisiteyi 1,71 kat artırdığı belirlendi. EP+sisplatin uygulamasının daha düşük sisplatin dozlarında serviks kanserinde etkili bir tedavi yöntemi olabileceği belirlendi.

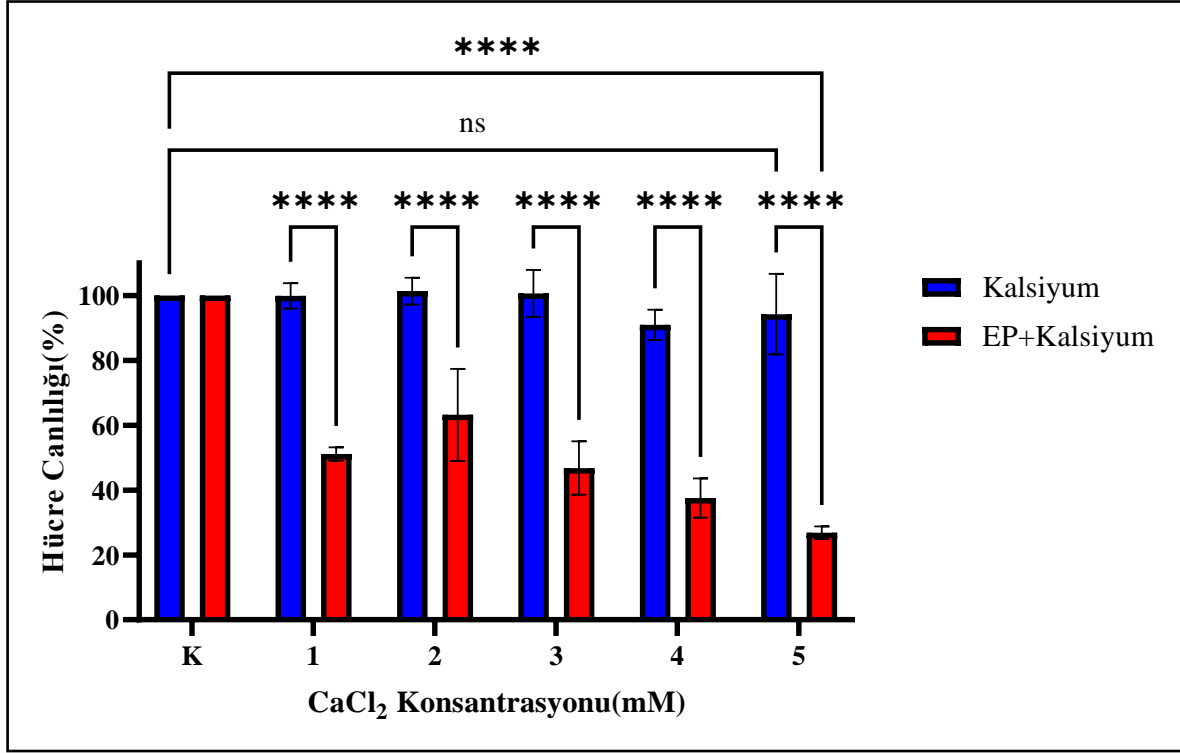
#### 4.6. CaEP Uygulaması Bulguları

HeLa hücrelerine belirlenen etkin E alan değeri ile birlikte 1-5 mM konsantrasyonlarda  $\text{CaCl}_2$  uygulandı. CaEP uygulaması ile hücre canlılığındaki değişim şekil 4.15.'de verildi.



Şekil 4.15. CaEP'nin HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi

CaEP uygulamasının HeLa hücreleri üzerinde  $\text{CaCl}_2$  dozuna bağlı olarak hücre canlılığında önemli ölçüde bir azalma meydana getirdi. Etkin E alan ile birlikte 1mM  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyonunda hücre canlılığı %51,13, 2 mM'da %63,19, 3 mM'da %46,77, 4mM'da %37,55 ve 5 mM  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyonunda %26,82 olarak hesaplandı.

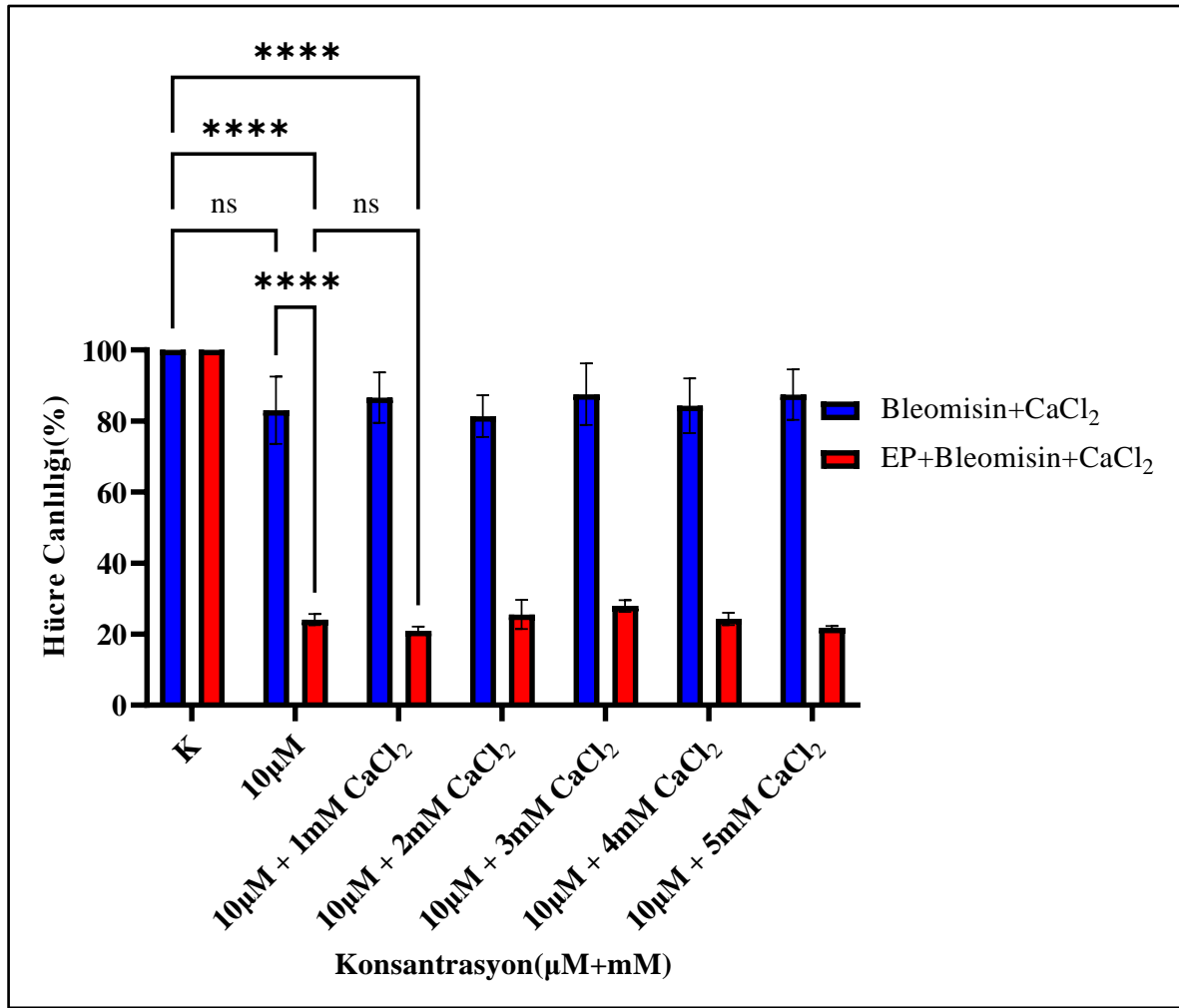


Şekil 4.16. CaEP ile yalnız CaCl<sub>2</sub> uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Şekil 4.16.'da yalnız CaCl<sub>2</sub> uygulaması ile CaEP uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi karşılaştırılmalı olarak verildi. Yalnız CaCl<sub>2</sub> uygulamasında CaCl<sub>2</sub>'nin tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığında önemli bir değişim gözlenmez iken CaEP uygulaması ile 1mM CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda hücre canlılığı %51,13, 2 mM'da %63,19, 3 mM'da %46,77, 4 mM'da %37,55 ve 5 mM CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda %26,82 olarak belirlendi. CaEP'nin yalnız CaCl<sub>2</sub> uygulaması ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EP ile birlikte CaCl<sub>2</sub>'nin tüm konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu görüldü (\*\*\*\*p<0.0001).

#### 4.7. Elektroporasyon ile Birlikte Kemoterapötik İlaçlar ve Kalsiyumun Kombine Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Bleomisin'in en düşük dozu olarak seçilen  $10 \mu\text{M}$  ilaç konsantrasyonu ile  $\text{CaCl}_2$ 'nin 1,2,3,4 ve 5 mM dozlarının EP ile birlikte hücre canlılığı üzerindeki etkileri şekil 4.17.'de gösterildi.

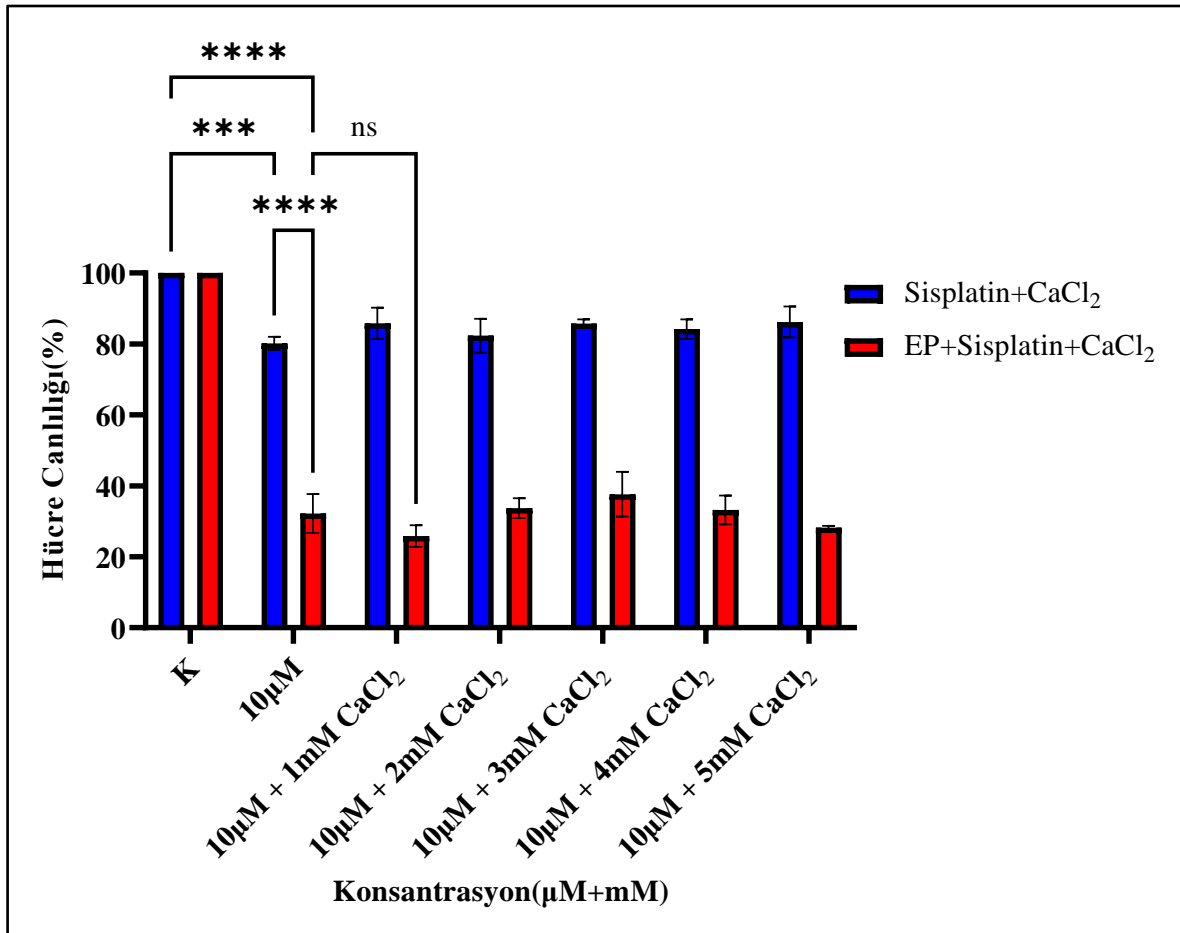


Şekil 4.17. EP ile birlikte bleomisin ve  $\text{CaCl}_2$  kombinasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Yalnız  $10 \mu\text{M}$  bleomisin varlığında hücre canlılığı %83,2 olarak belirlendi.  $10 \mu\text{M}$  bleomisin ile birlikte 1, 2 3, 4 ve 5 mM  $\text{CaCl}_2$  kombinasyonunda hücre canlılıkları sırasıyla %86,59, %81,39, %87,5, %84,29 ve %87,43 olarak belirlendi. EP ile birlikte  $10 \mu\text{M}$  bleomisin varlığında hücre canlılığı %24,11 olarak belirlenirken EP ile birlikte  $10 \mu\text{M}$  bleomisin + 1, 2 ,3, 4 ve 5 mM  $\text{CaCl}_2$  varlığında ise hücre canlılıkları sırasıyla %20,95, %25,54, %27,94, %24,29 ve %21,77 olarak belirlendi. Sadece 1mM  $\text{CaCl}_2$  ile kombine

ilaç uygulamasının EP ile birlikte hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlendi. Bu azalma EP ile birlikte 10  $\mu\text{M}$  bleomisin uygulamasına oranla istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.0001$ ).

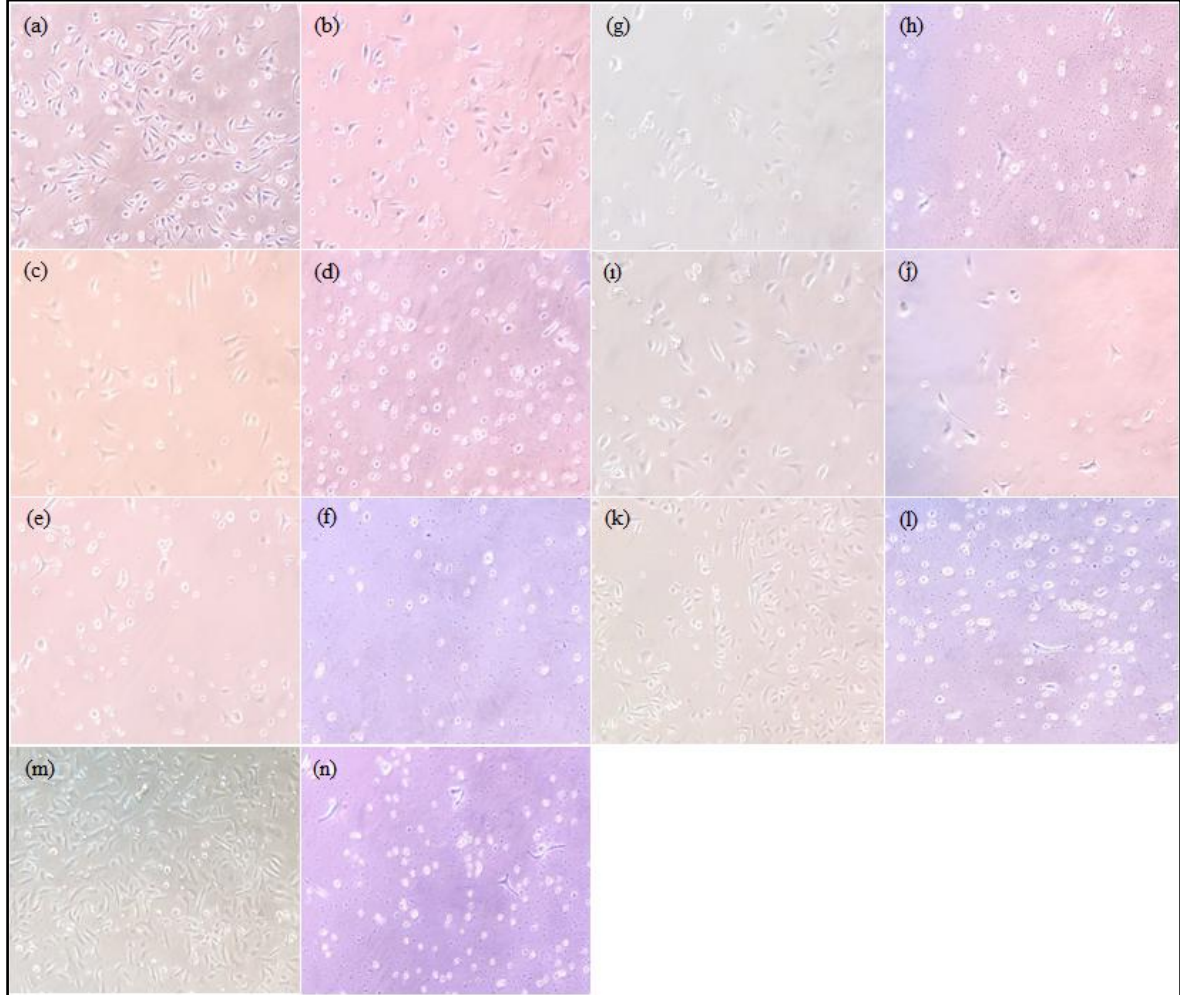
10  $\mu\text{M}$  sisplatin ile  $\text{CaCl}_2$  'nin 1,2,3,4 ve 5 mM dozlarının EP ile birlikte hücre canlılığı üzerindeki etkileri şekil 4.18.'de gösterildi.



Şekil 4.18. EP ile birlikte sisplatin ve  $\text{CaCl}_2$  kombinasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisinin karşılaştırılması

Yalnız 10  $\mu\text{M}$  sisplatin varlığında hücre canlılığı %80,17 olarak belirlendi. 10  $\mu\text{M}$  sisplatin ile birlikte 1, 2 3, 4 ve 5 mM  $\text{CaCl}_2$  kombinasyonunda hücre canlılıkları sırasıyla %85,82, %82,32, %85,71, %84,19 ve %86,21 olarak belirlendi. EP ile birlikte 10  $\mu\text{M}$  sisplatin varlığında hücre canlılığı %32,16 olarak belirlenirken EP ile birlikte 10  $\mu\text{M}$  sisplatin + 1, 2 ,3, 4 ve 5 mM  $\text{CaCl}_2$  varlığında ise hücre canlılıkları sırasıyla %25,85, %33,72, %37,63, %33,23 ve %28,22 olarak belirlendi. Sadece 1mM  $\text{CaCl}_2$  ile kombine ilaç uygulamasının

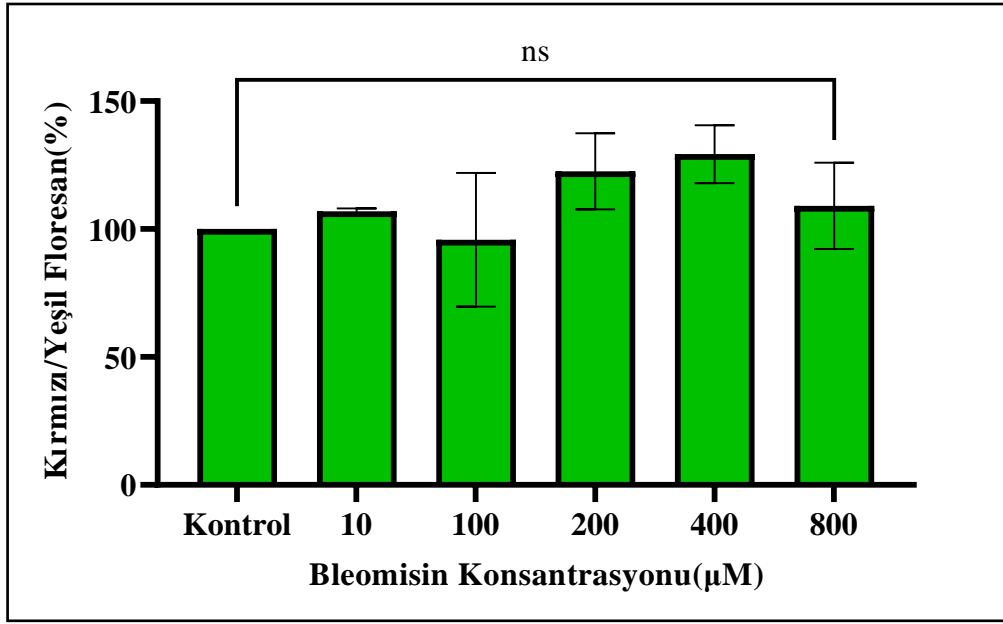
EP ile birlikte hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlendi. Bu azalma EP ile birlikte 10  $\mu$ M sisplatin uygulamasına göre istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0,0001$ ).



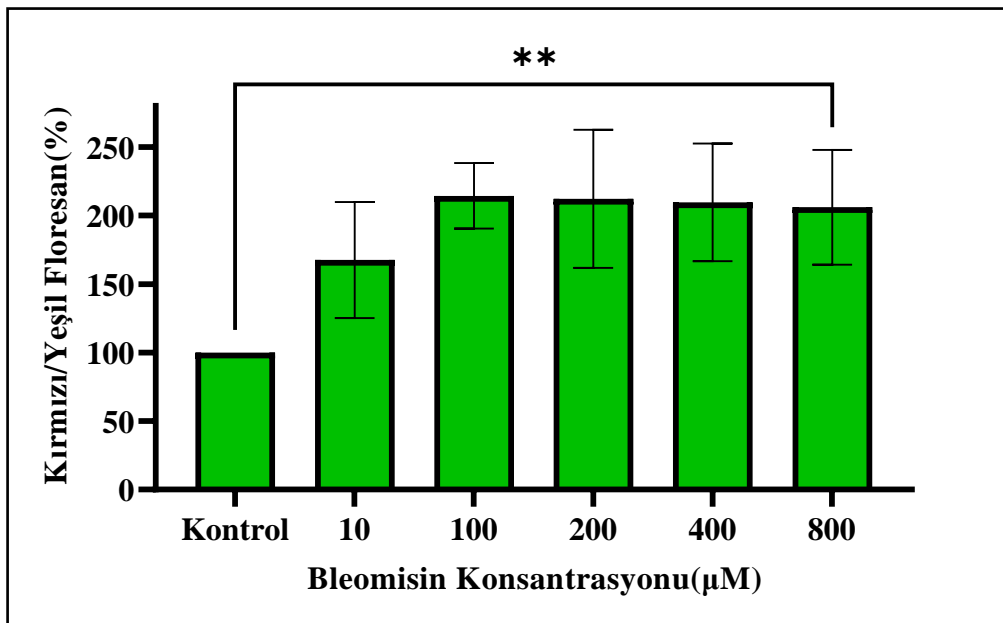
Resim 4.2. HeLa hücre hattında, Bleomisin, Sisplatin,  $\text{CaCl}_2$  ile birlikte EP uygulamalarının 24 saat sonrasındaki 100x büyütmedeki invert mikroskop görüntüleri, (a) Kontrol, (b) 1,6 kV/cm EP, (c) Bleomisin 10  $\mu$ M, (d) EP+Bleomisin 10  $\mu$ M, (e) Bleomisin 100  $\mu$ M, (f) EP+Bleomisin 100  $\mu$ M, (g) Sisplatin 10  $\mu$ M, (h) EP+Sisplatin 10  $\mu$ M, (i) Sisplatin 25  $\mu$ M, (j) EP+Sisplatin 25  $\mu$ M, (k)  $\text{CaCl}_2$  1 mM, (l) EP+ $\text{CaCl}_2$  1 mM, (m)  $\text{CaCl}_2$  5 mM, (n) EP+ $\text{CaCl}_2$  5 mM

#### 4.8. EKT ve CaEP Uygulamasının $\Delta\Psi_m$ 'e Etkisi

10, 100, 200, 400 ve 800  $\mu\text{M}$  bleomisin dozlarının tek başına ve EP ile birlikte maruziyetinin  $\Delta\Psi_m$ 'e etkisi JC-1 floresan boyaması kullanılarak kırmızı/yeşil floresan oranı hesaplanarak bulundu. Yalnız bleomisin ile EP+bleomisin maruziyeti sonrası  $\Delta\Psi_m$  sonuçları şekil 4.19. ve şekil 4.20.'de verildi.



Şekil 4.19. Bleomisin maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi

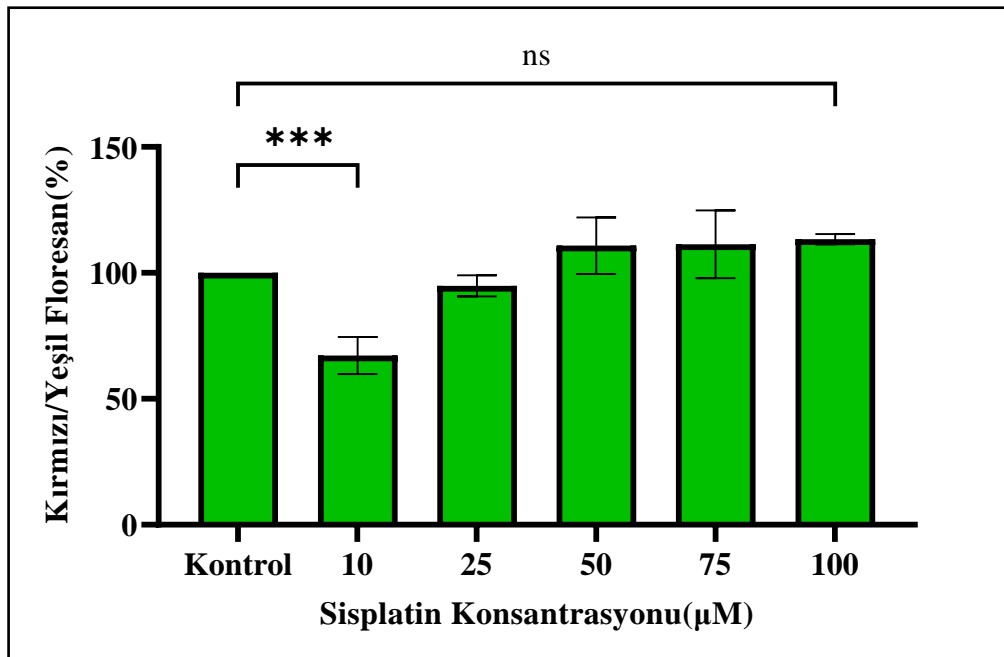


Şekil 4.20. EP+Bleomisin maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi

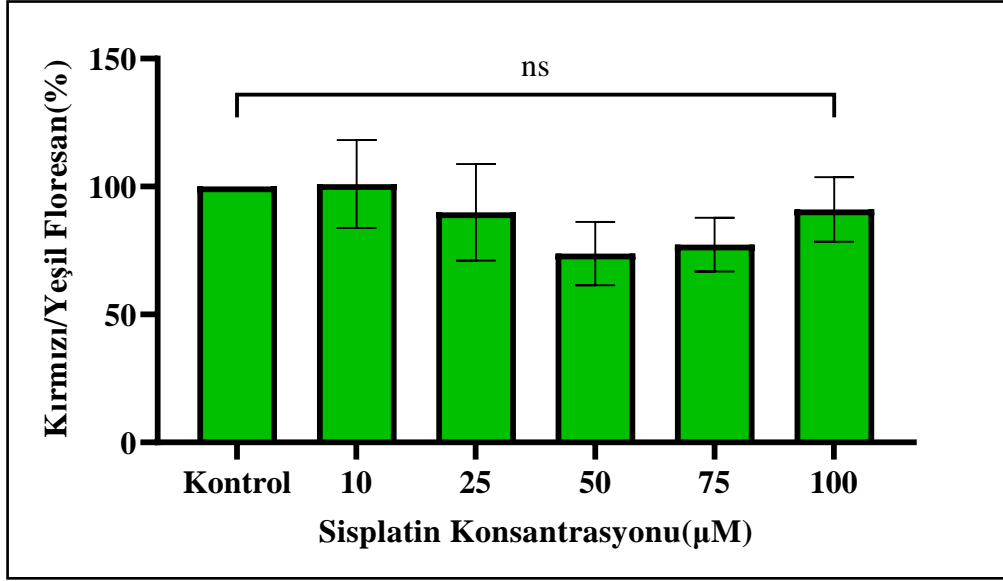
$\Delta\Psi_m$ 'de meydana gelen depolarizasyon ya da hiperpolarizasyon apoptozun önemli göstergelerindendir. Farklı dozlarda bleomisin uygulanan hücrelerin kırmızı/yeşil flüoresans oranı kontrol hücrelerine kıyasla bir miktar artış göstermektedir.  $\Delta\Psi_m$ 'deki bu artış 10  $\mu\text{M}$  bleomisin varlığında %6,2, 200  $\mu\text{M}$ 'da %22,61 ve 400  $\mu\text{M}$ 'da %29,25 olarak bulundu (Şekil 4.19). Fakat,  $\Delta\Psi_m$  kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.01$ ).

EP ile birlikte farklı dozlarda bleomisin uygulanan hücrelerin kırmızı/yeşil floresan oranının, kontrol hücrelerine kıyasla tüm bleomisin dozlarında önemli ölçüde arttığı belirlendi (\*\* $p<0.01$ ).  $\Delta\Psi_m$ 'de artış EP+10  $\mu\text{M}$ 'da %67,54, EP+100  $\mu\text{M}$ 'da %114,4, EP+200  $\mu\text{M}$ 'da%112,19 ve EP+400  $\mu\text{M}$ 'da %109,62 olarak saptandı (Şekil.4.20). Bu sonuçlar EKT uygulaması ile artan hücre içi sitotoksitenin  $\Delta\Psi_m$ 'de artışa neden olarak mitokondri membranında hiperpolarizasyona neden olduğunu göstermektedir.

JC-1 sağlıklı hücrelerde kırmızı renkte gözlenir. Hücreler depolarize oldukça JC-1 floresan kırmızıdan yeşile doğru kayar. Kırmızı/yeşil floresan oranı  $\Delta\Psi_m$ 'deki bağıl değişimi ifade eder. Yalnız 10, 25, 50, 75 ve 100  $\mu\text{M}$  sisplatin dozlarının ve EP ile birlikte maruziyetinin  $\Delta\Psi_m$  etkisi kırmızı/yeşil floresan oranı hesaplanarak bulundu. Yalnız sisplatin ile EP+sisplatin maruziyeti sonrası  $\Delta\Psi_m$  sonuçları şekil 4.21 ve şekil 4.22'de verildi.



Şekil 4.21. Siplatin maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi

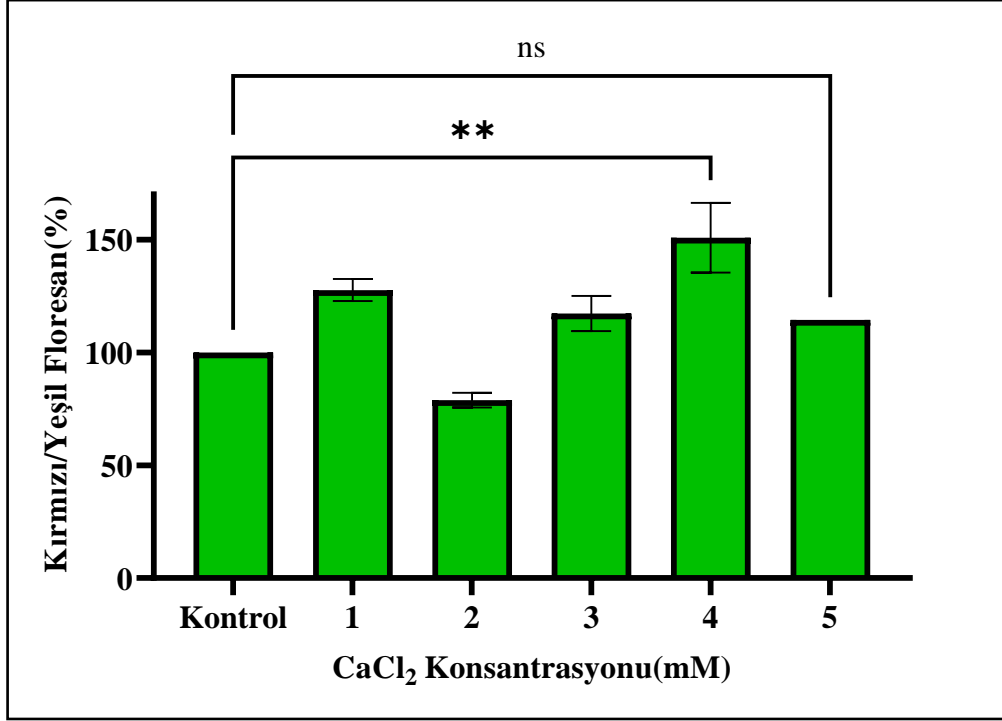


Şekil 4.22. EP+Sisplatin maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi

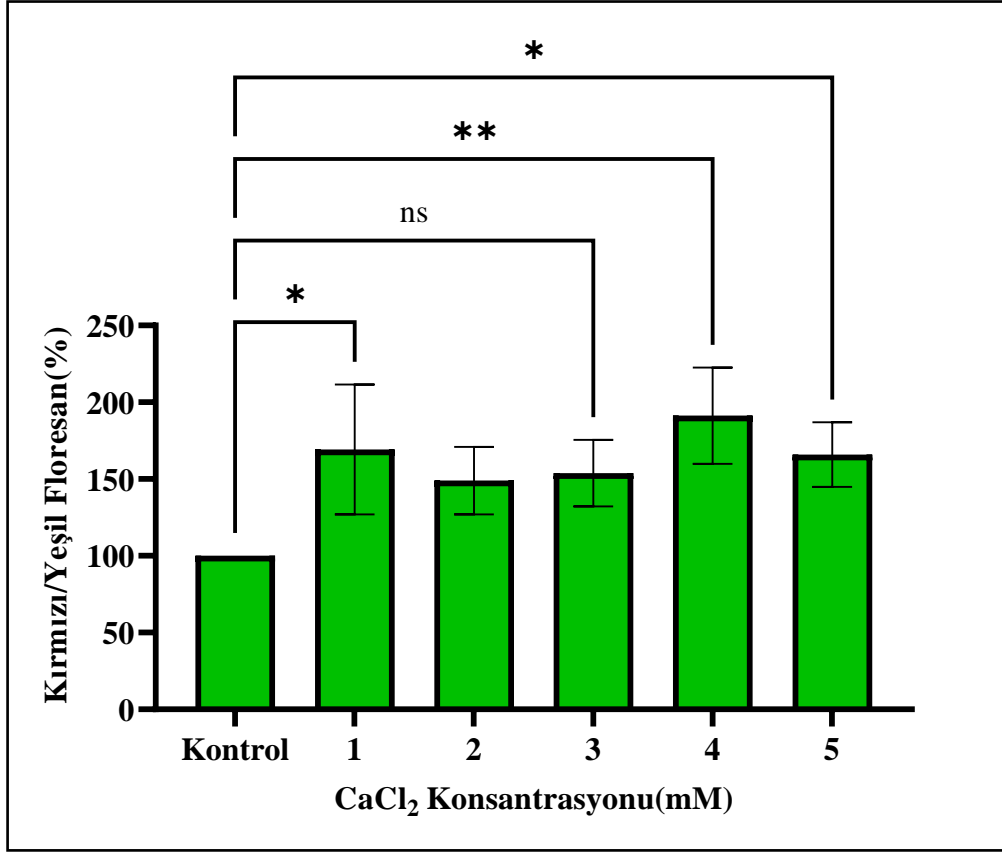
Tek başına 10 µM sisplatin varlığında  $\Delta\Psi_m$ 'de %32,8'lik azalma belirlenirken ve bu azalmanın kontrol grubuna kıyasla anlamlı olduğu görüldü (\*\*p<0.001). Bu sonuç, 10 µM sisplatin maruziyetinin mitokondri membranında depolarizasyon meydana getirdiğini göstermektedir. Diğer sisplatin dozlarında ise 25 µM'da %5,1'lik azalma görülürken, 50 µM'da %10,79, 75 µM %11,35 ve 100 µM'da ise %13,38'lik artış saptandı. Diğer sisplatin dozlarındaki kırmızı/yeşil floresan oranında değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.01), (Şekil 4.21).

Sisplatin ile EKT uygulaması sonrası  $\Delta\Psi_m$ 'de 10 µM konsantrasyonda %0,9'luk bir artış belirlenirken 25 µM %10, 50 µM'da %26,2 75 µM %22,7 ve 100 µM'da %8,3'lük bir azalma belirlendi. Tüm dozlardaki EKT uygulamasında  $\Delta\Psi_m$ 'de kontrole grubuna kıyasla anlamlı bir değişim görülmedi (p>0.01). Bunun yanında yalnız 10µM sisplatin uygulamasında meydana gelen mitokondri membran depolarizasyonu EP varlığında azalma göstermektedir (Şekil 4.21., Şekil 4.22.). Sadece 50 µM sisplatin dozunda mitokondri membranı az miktar hiperpolarizasyon gösterirken, bu durum EP varlığında depolarizasyon olarak belirlendi.

1, 2, 3, 4 ve 5 mM  $\text{CaCl}_2$  uygulaması ve CaEP sonrası  $\Delta\Psi_m$  sonuçları kırmızı/yeşil floresan oranı hesaplanarak bulundu. Sonuçlar şekil 4.23 ve şekil 4.24'de sunuldu.



Şekil 4.23.  $\text{CaCl}_2$  maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi



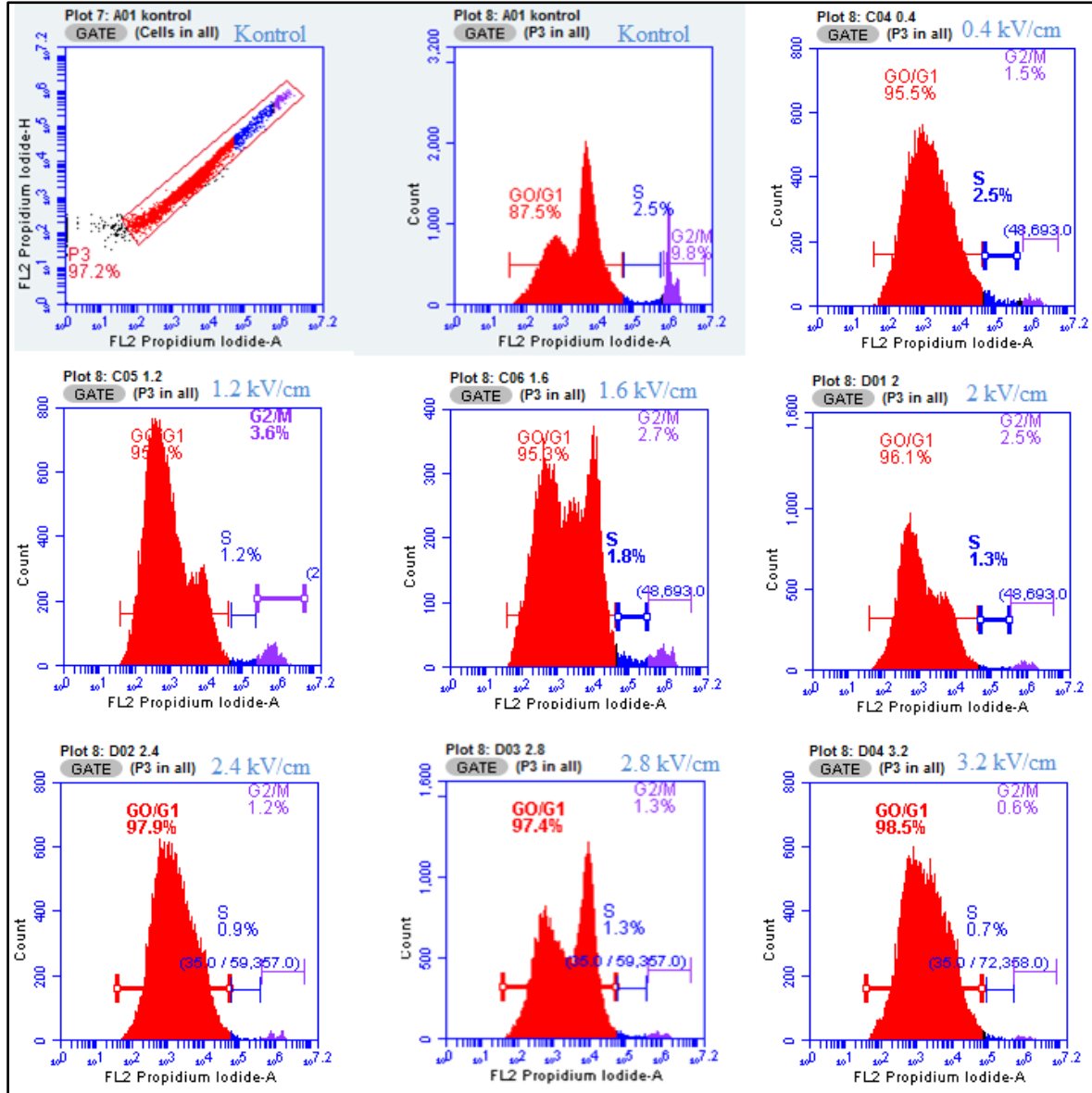
Şekil 4.24. CaEP maruziyetinde mitokondri membran potansiyeli değişimi

CaCl<sub>2</sub> uygulaması sonrası kırmızı/yeşil floresan oranında 1 mM konsantrasyonda %27,6, 3 mM'da %17,24, 4 mM'da %50,85 ve 5 mM'da %14,46'lık artış görülürken, 2 mM konsantrasyonda ise %11,2'lik bir azalmanın meydana geldiği görüldü (Şekil 4.23). Sadece istatistiksel olarak 4 mM'daki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (\*\*p<0.01). 1, 3, 4 ve 5 mM CaCl<sub>2</sub> maruziyetinde mitokondri membranının hiperpolarize olduğu belirlendi. 2 mM CaCl<sub>2</sub>'nin kırmızı/yeşil floresan oranında ise azalma meydana geldiği mitokondri membranında depolarizasyon oluşturduğu saptandı, ancak bu değişim kontrol grubuna kıyasla anlamlı değildi (p>0.01).

EP ile birlikte 1, 2, 3, 4 ve 5 mM CaCl<sub>2</sub> uygulaması sonrası  $\Delta\Psi_m$ 'de sırasıyla %69,24, %48,99, %53,90, %91,33 ve %65,89'luk önemli bir artış meydana getirdi. 1, 4 ve 5 mM'daki  $\Delta\Psi_m$ 'deki artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (\*p<0.05, \*\*p<0.01).  $\Delta\Psi_m$ 'deki artışın sonucu 1, 4 ve 5 mM CaEP uygulamasının mitokondri membranında hiperpolarizasyona neden olduğu görülmektedir.

#### 4.9. Hücre Döngüsü Bulguları

HeLa hücrelerine 1 Hz tekrarlama frekansında 100  $\mu$ s puls süresince 8 kare darbe ve 0,4-3,2 kV/cm E alan şiddetinde EP uygulaması ile hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki dağılım şekil 4.25.'de verildi.

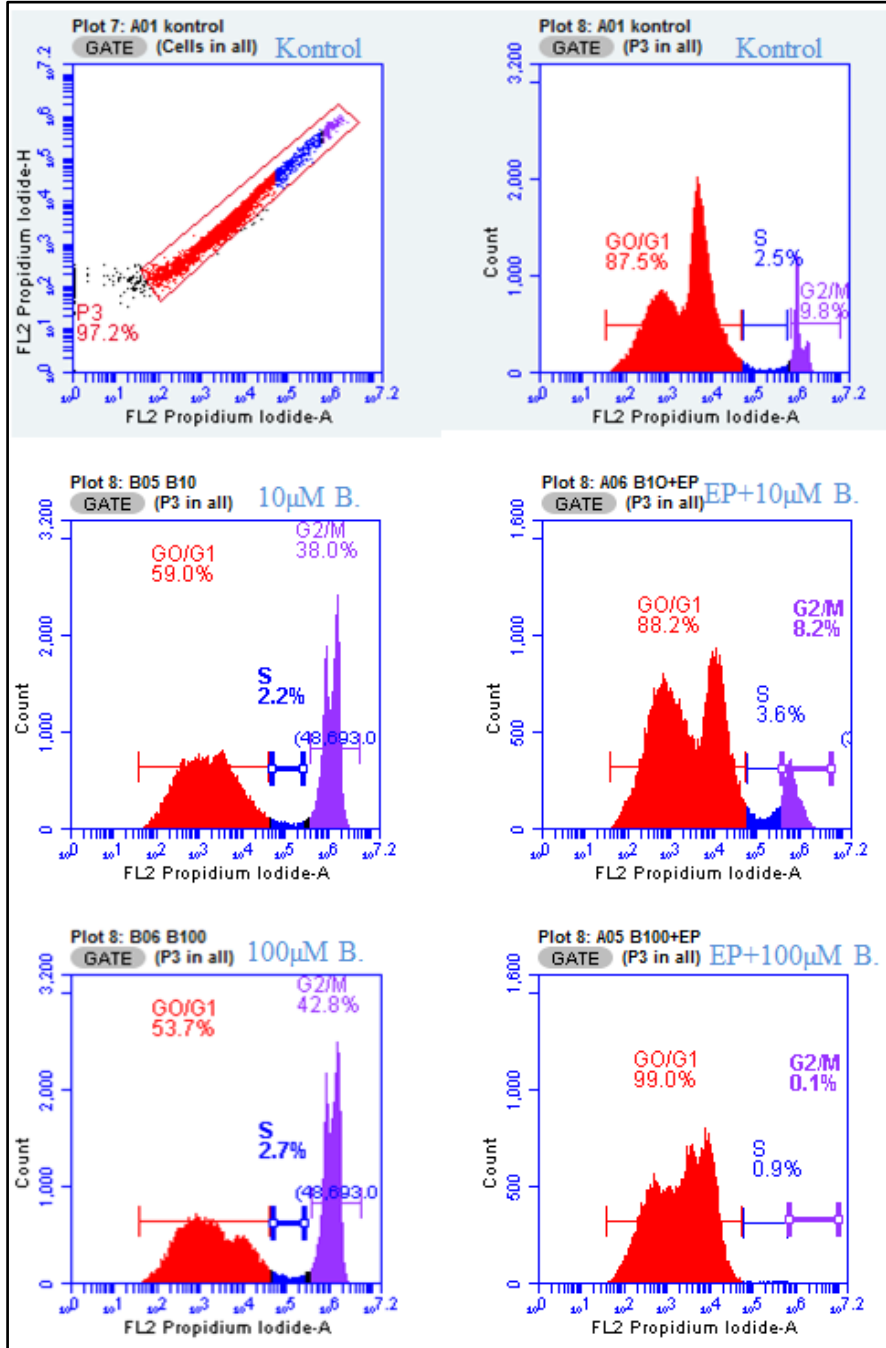


Şekil 4.25. EP maruziyetinde hücre döngüsü

HeLa hücrelerinin kontrol grubundaki hücre döngüsü dağılımı G0/G1 fazında %87,5, S fazında %2,5 ve G2/M fazında %9,8 olarak belirlendi. Hücreler 0,4 kV/cm E alan şiddetine maruz bırakıldığında döngüdeki dağılımın G0/G1 fazında %95,5, S fazında %2,5 ve G2/M fazında %1,5 olduğu bulundu. 1,2 kV/cm E alan şiddeti uygulanan grupta G0/G1 fazında

%95,2, S fazında %1,2 ve G2/M fazında %3,6'lık bir dağılım belirlendi. E alan şiddetinin 1,6 kV/cm olduğu EP uygulamasında ise G0/G1 fazı %95,3, S fazı %1,8 ve G2/M fazı %2,7 olarak belirlendi. Seçilen en yüksek E alan şiddeti 3,2 kV/cm maruziyetinde ise G0/G1 fazı %98,5, S fazı %0,7 ve G2/M fazı ise %0,6 olarak belirlendi. HeLa hücrelerinde uygulanan tüm E alan şiddetlerindeki EP maruziyetlerinin kontrol grubuna göre hücre döngüsünde G0/G1 arreste neden olduğu görüldü.

HeLa hücrelerine yalnız 10 ve 100  $\mu\text{M}$  bleomisin maruziyeti ve aynı konsantrasyonlardaki EKT uygulamasının hücre döngüsü üzerindeki etkileri şekil 4.25.' da sunuldu.

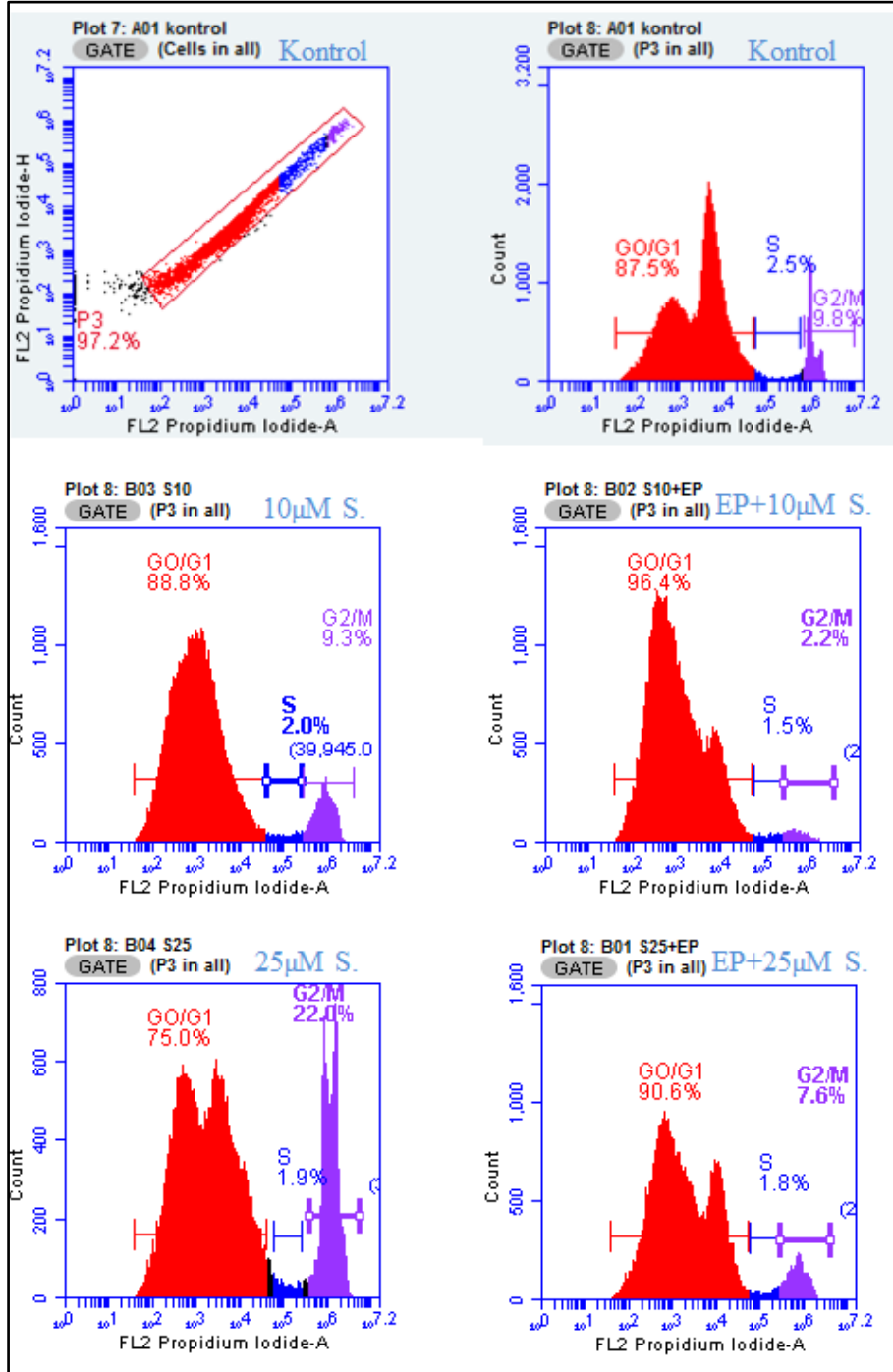


Şekil 4.26. Bleomisin ve EP+Bleomisin uygulamalarında hücre döngüsü

Kontrol grubundaki hücrelerin %87,5'i G0/G1 fazında %2,5'i S fazında ve %9,8'i G2/M fazında olduğu belirlendi. 10 ve 100  $\mu\text{M}$  bleomisin maruziyetinde hücre döngüsündeki dağılım sırasıyla G0/G1 fazında %59 - %53,7, S fazında %2,2 - %2,7 ve G2/M fazında %38 - %42,8 olarak belirlendi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bleomisin

maruziyetinde G2/M fazında hücrelerde birikme olduğu ve dozun artması ile birlikte birikmede artışın daha fazla olduğu görüldü. EP ile birlikte 10 ve 100 µM bleomisin varlığında döngüdeki dağılım sırasıyla G0/G1 fazında %88,2 - %99, S fazında %3,6 - %0,9 ve G2/M fazında %8,2 - %0,1 olarak belirlendi. Kontrol grubuna göre EP+bleomisin maruziyetinin G0/G1 fazındaki hücrelerde yüksek bir artışa neden olduğu görüldü. EP+bleomisin uygulamasının yalnız bleomisin varlığındaki dağılımlara göre G2/M fazındaki hücrelerde önemli miktarda azalma meydana getirerek G0/G1 fazında artışa neden ve hücrelerin S fazına geçişine engel olduğu saptandı.

10 ve 25  $\mu\text{M}$  sisplatin maruziyeti ve aynı konsantrasyonlardaki EKT uygulamasının HeLa hücrelerinin hücre döngüsü üzerindeki etkileri şekil 4.27.'de verildi.

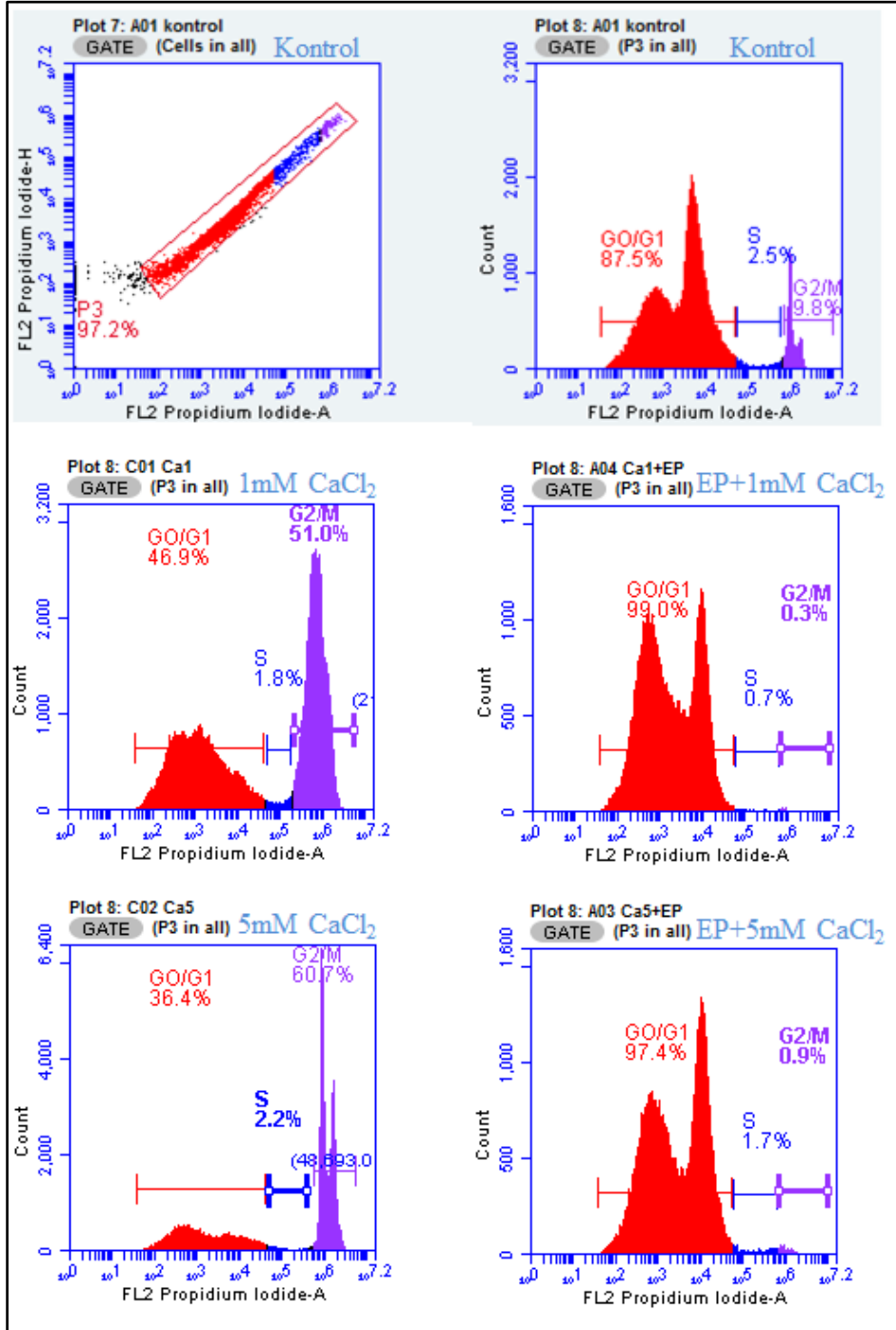


Şekil 4.27. Sisplatin ve EP+Sisplatin uygulamalarında hücre döngüsü

Kontrol grubundaki hücrelerde G0/G1 fazında %87,5, S fazında %2,5 ve G2/M fazında %9,8'lik bir dağılım belirlendi. 10 ve 25  $\mu\text{M}$  sisplatin maruziyetinde hücre döngüsündeki dağılım sırasıyla G0/G1 fazında %88,8 - %75, S fazında %2 - %1,9 ve G2/M fazında

%9,3- %22 olarak belirlendi. Kontrol grubuna göre 10  $\mu$ M sispaltin maruziyeti G0/G1 fazında artışa, fakat 25  $\mu$ M sispaltin maruziyeti ise azalmaya neden olduğu görüldü. Kontrol grubuna göre 25  $\mu$ M sispaltin varlığı G2/M fazındaki hücre yüzdesinde artış meydana getirdiği belirlendi. EP ile birlikte 10 ve 25  $\mu$ M sispaltin varlığında döngüdeki dağılım sırasıyla G0/G1 fazında %96,4 - %90,6, S fazında %1,5 - %1,8 ve G2/M fazında %2,2 - %7,6 olarak belirlendi. Kontrol grubuna göre EP+sispaltin maruziyetinin G0/G1 fazındaki hücrelerde artışa neden olduğu görüldü. EP+sispaltin uygulamasının yalnız sispaltin varlığındaki dağılımlara göre G0/G1 fazında artışa neden olduğu hücrelerin S fazına geçişine engelediği ve G2/M fazındaki hücrelerde önemli miktarda azalma meydana getirdiği gözlemlendi.

HeLa hücrelerine yalnız 1 ve 5 mM  $\text{CaCl}_2$  maruziyeti ve aynı konsantrasyonlardaki CaEP uygulamasının hücre döngüsü üzerindeki etkileri şekil 4.28.'de verildi.



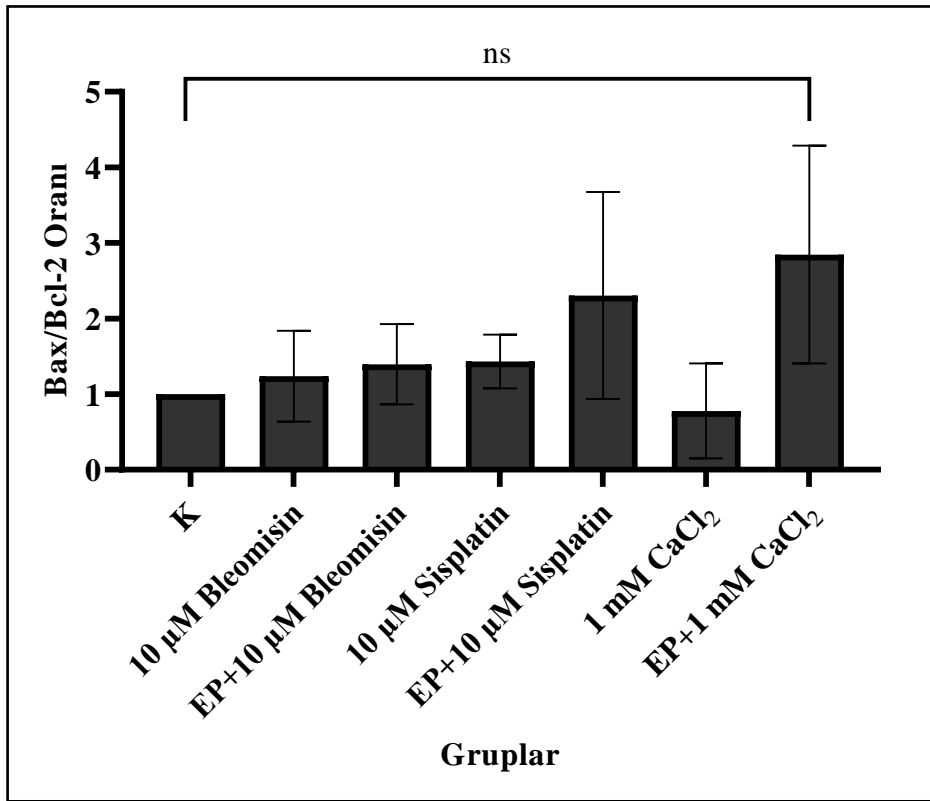
Şekil 4.28.  $\text{CaCl}_2$  ve EP+  $\text{CaCl}_2$  uygulamalarında hücre döngüsü

Kontrol grubunda hücrelerin döngüsel dağılımı G0/G1 fazında %87,5, S fazında %2,5 ve G2/M fazında %9,8 olarak belirlendi. 1 mM  $\text{CaCl}_2$  varlığında hücrelerde G0/G1 fazında 46,9, S fazında %1,8 ve M fazında %51'lik bir dağılım belirlendi. 5 mM  $\text{CaCl}_2$  varlığında

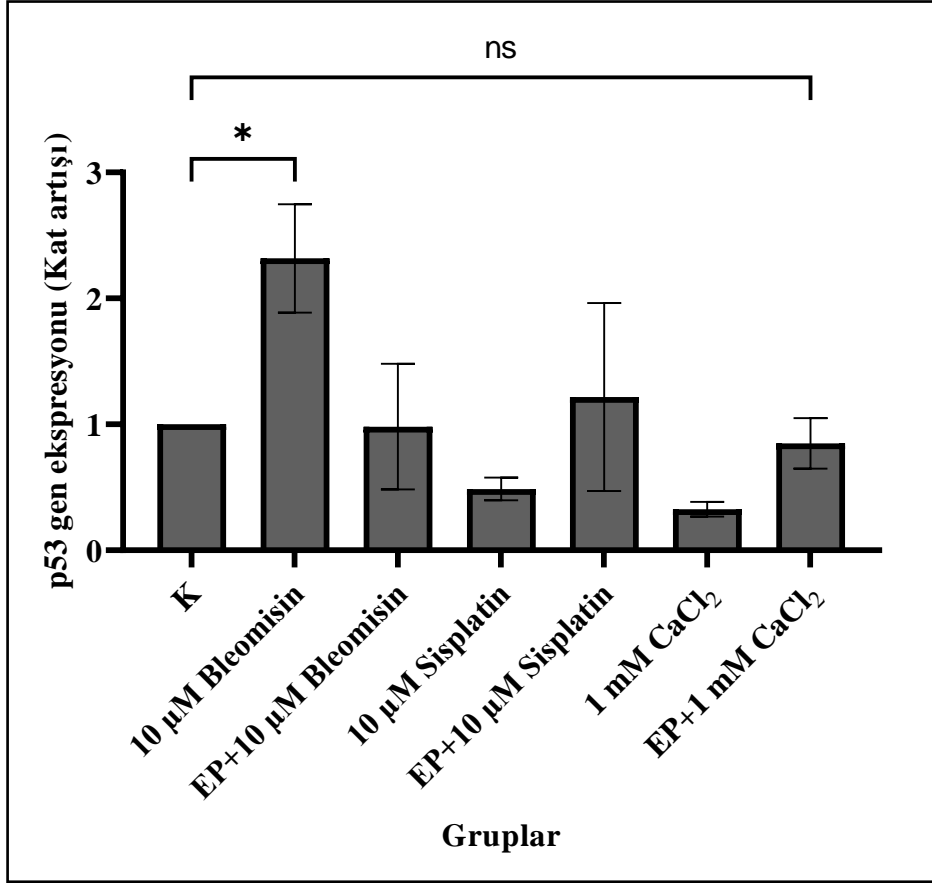
ise döngüsel dağılım G0/G1 fazında %36,4, S fazında %2,2 ve G2/M fazında %60,7 idi. Kontrol grubuna göre yalnız 1 ve 5 mM CaCl<sub>2</sub> varlığının G2/M fazında hücrelerde birikmeye neden olduğu görülür. CaEP uygulamasının 1 ve 5 mM CaCl<sub>2</sub> varlığındaki hücre döngüsündeki dağılımları sırasıyla G0/G1 fazında %99 - %97,4, S fazında %0,7 - %1,7 ve G2/M fazında %0,3 ve %0,9 olarak belirlendi. Yalnız 1 ve 5 mM CaCl<sub>2</sub> uygulamalarına göre CaEP uygulamasının iki doz değeri içinde G2/M fazındaki hücre dağılımını önemli bir biçimde azalttığı ve G0/G1 arreste neden olduğu görüldü.

#### 4.10. PCR Analizi: Bax/Bcl-2 ve p53 Gen Ekspresyonu Bulguları

Hücrelere uygulanan 10 µM bleomisin, 10 µM sisplatin ve 1 mM CaCl<sub>2</sub> ile aynı dozların EP ile birlikte kombine uygulamalarının Bax/Bcl-2 gen ekspresyon oranları ve p53 gen ekspresyonu kat artışı değerleri şekil 4.29. ve 4.30.'da verildi.



Şekil 4.29. EKT ve CaEP Uygulamalarının Bax/Bcl-2 oranına etkisi



Şekil 4.30. EKT ve CaEP Uygulamasının p53 düzeyine etkisi

HeLa hücrelerine kemoterapötik ve CaCl<sub>2</sub>'ün en düşük doz değerleri ve bu dozların EP ile birlikte uygulamaları sonucu Bax/Bcl-2 oranındaki değişimler belirlendi (Şekil 4.29.). 10 M bleomisin ve 10 µM sisplatin uygulamalarında Bax/Bcl-2 gen ekspresyon oranında sırasıyla 1,2 ve 1,4 kat artış gözlenirken, EP ile kombine kullanımında ise artışın sırasıyla 1,4 ve 2,3 kat olduğu belirlendi. Ancak belirlenen artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p>0.01$ ). Hücelere uygulanan 1 mM CaCl<sub>2</sub> dozunda Bax/Bcl-2 gen ekspresyon oranında kontrol grubuna göre azalma gözlenirken CaEP uygulaması ile 2,8 kat arttığı belirlendi. Fakat belirlenen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p>0.01$ ).

HeLa hücrelerine kemoterapötik ve CaCl<sub>2</sub>'ün en düşük doz değerleri ve bu dozların EP ile birlikte uygulamaları sonucu p53 gen ekspresyonunda meydana gelen değişimler belirlendi (Şekil 4.30.). 10 µM bleomisin uygulamasında p53 ekspresyonunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ( $*p<0.05$ ). EP+10 µM bleomisin maruziyetinde ise bir miktar azalma olduğu belirlendi fakat bu değişim istatistiksel olarak

anlamli değildi ( $p>0.01$ ). 10  $\mu\text{M}$  sisplatin uygulamasında kontrol grubuna göre p53 ekspresyonunda kısmi bir azalma belirlenirken EP ile kombine uygulamasında ise 1,2 kat artış olduğu görüldü ancak bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p>0.01$ ). 1 mM  $\text{CaCl}_2$  varlığında kontrol grubuna göre p53 ekspresyonunda azalma bulundu. CaEP uygulamasında ise p53 ekspresyon değerinde tek başına 1 mM  $\text{CaCl}_2$  uygulamasına göre 2,5 kat artış belirlenirken, kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim olmadığı görüldü ( $p>0.01$ ).

## 5. TARTIŞMA

Kanser dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en yüksek mortaliteye sahip önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kanser morbitide ve mortalitesindeki artış araştırmacıların kanser tedavisi üzerine yapılan çalışmalara olan ilgisini arttırmaktadır. Serviks kanseri, meme kanserinden sonra dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Serviks kanseri tedavisinde kemoterapi tek başına ya da diğer tedavi seçenekleri ile kombine olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bleomisin ve sisplatin gibi antineoplastikler hastalığın tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır. Hücre membranının fosfolipit yapısı gereği membrandan kolay geçemeyen bu kemoterapötik ajanların etkinliği önemli oranda azaltılmaktadır. Etkinliği artırmak için ilaç dozunun artırılması gerekir, ancak bu durum da önemli yan etkileri beraberinde getirmektedir. Kemoterapi tedavisindeki bu kısıtlayıcı durum, tedavide yeni yöntem ve ilaçların bulunmasına yönelik araştırmaların artırılması ve geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

EP, hücre membranında hidofilik porlar oluşturarak, büyük moleküllerin membrandan geçişini sağlayan fiziksel bir yöntemdir. EKT uygulamasında, EP ile birlikte kemoterapötik ajanların membrandan geçisi sağlanarak daha az ilaç dozu ile daha fazla sitotoksik etki sağlanabilmektedir. Böylelikle, kemoterapide kullanılan ilaç dozları düşürülebilirken, yan etkiler de önemli oranda azaltılabilir.

$Ca^{+2}$  hücre ölümü dahil olmak üzere birçok hücresel faaliyetde önemli bir rol oynamaktadır. İntrasellüler ortamdaki  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu ekstrasellüler ortamdan oldukça azdır ve bu denge hücrede sıkı bir şekilde düzenlenir. Hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarının suprafizyolojik artışı mitokondride por oluşumunu sağlayarak bir takım hücre ölümü mekanizmalarının aktivasyonunu sağlar. CaEP yöntemi ile hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarının artmasıyla birlikte, bu intrasellüler yolların uyarılması sağlanarak kanserli hücrelerin ölümü gerçekleşmektedir.

EKT ve CaEP'nin etkili bir şekilde uygulanabilmesi için membran permeabilizasyonun ve maksimum ve hücre ölümünün minimum olduğu etkin E alan değerini belirlemek oldukça

önemlidir. Bu amaçla, biz de öncelikli olarak çalışmamızda kullandığımız HeLa hücreleri için etkin E alan değerini belirledik.

Çalışmamızda, EKT ve CaEP uygulaması için HeLa hücrelerine uygulanacak etkin E alan değeri, hücre canlılığı ve permeabilizasyon değerlerinden yararlanarak 1,6 kV/cm olarak bulundu. Literatürde farklı hücre hatları için belirlenen etkin E alan değeri ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Jaroszeski ve arkadaşları tarafından yapılan in-vitro çalışmada EKT için belirlenen etkin E alan değerleri, insan yumurtalık kanseri (LN1) hücre hattı için 1100 V/cm, sıçan hepatosellüler karsinoma (N1-S1) hücreleri için 1250 V/cm, insan endometriyal adenokarsinoma (İshikawa) hücreleri için 1200V/cm, fare melanom hücreleri (B16) için 1200 V/cm olarak bildirilmiştir [32].

İnsan dermal mikrovasküler endotel hücreleri (HMEC-1) ile yapılan bir diğer EKT çalışmasında ise, 1000 V/cm E alanda HMEC-1 hücrelerinin elektro-geçirgenliğinin, %30 olduğunu, 1800 V/cm'lik E alan maruziyetinde hücrelerin sadece %85'inin permeabilize olduğu ve hücre canlılığının %57'ye düştüğünü bu durumun elektroporasyona karşı nispeten yüksek bir hücresel direnci ifade ettiğini, elektrokemoterapi deneyleri için ise hücrelerin sadece %60'ının permeablize olduğu 1400 V/cm E alan parametresi seçildiği bildirilmiştir [122].

Eşmekaya ve arkadaşlarının tamoksifenin EKT ile insan meme karsinoma (MCF-7) hücrelerinde etkilerinin belirlenmesi için yaptıkları in-vitro çalışmada optimal EP parametrelerini 1 Hz, 100 µs puls süresi ve 1750 V/cm E alan şiddeti olarak rapor etmişlerdir. İnsan neuroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) ile yaptıkları bir diğer başka çalışmada, sispilin elektroporasyonu için etkin EP parametreleri 1 Hz, 100 µs puls süresi ve 1500 V/cm E alan şiddeti olarak tespit edilmiştir [123, 124].

Literatürdeki çalışmalarda farklı hücre hatları için farklı etkin E alan değerlerinin bulunduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar, farklı hücre tiplerine göre geniş spektrumlu bir etkin E alan değeri sunmaktadır. Literatürdeki veriler ışığında, çalışmamızda bulunan etkin E alan değerinin mevcut çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda HeLa hücreleri için yalnız bleomisin varlığında  $IC_{50}$  değeri  $214,11 \pm 4,7 \mu M$  olarak bulunurken, bleomisin ile EKT uygulaması sonrasında ise  $0,44 \pm 0,3 \mu M$  olarak hesaplandı. EKT uygulamasında bleomisin düşük dozlarında dahi etkili hücre ölümünün gerçekleştiği saptandı. Elde edilen veriler neticesinde, EKT uygulamasının HeLa hücrelerinde bleomisin sitotoksitesini 487 kat arttırdığı görüldü. Yalnız sisplatin kemoterapötik ilacı varlığında ise HeLa hücreleri için  $IC_{50}$  değeri  $35,16 \pm 3,3 \mu M$  olarak bulunurken, sisplatin ile EKT uygulaması sonrasında ise  $IC_{50}$  değeri  $20,55 \pm 4,3 \mu M$  olarak hesaplandı. EKT uygulamasının HeLa hücrelerinde sisplatin sitotoksitesini 1,71 kat arttırdığı belirlendi. Literatürde farklı hücre hatları için farklı EP parametreleri ile yapılan EKT uygulamalarında bulunan sitotoksite artışı ve  $IC_{50}$  değerleri mevcuttur.

Jarozeski ve arkadaşları tarafından yapılan in-vitro çalışmada EKT ile bleomisin uygulanan yedi farklı hücre hattının tamamında sitotoksik etkilerin arttığı ve bleomisin pulslu E alan ile birleştirildiğinde, tek başına ilaç uygulamasına göre 100 ila 5000 kat artış meydana geldiği gösterilmiştir [32].

Eşmekaya ve arkadaşlarının insan neuroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) ile yaptıkları bir diğer çalışmada, tek başına sisplatin uygulanan grubun  $IC_{50}$  değeri  $5,03 \mu g/mL$  olarak belirlenirken, EKT sonrası sisplatin  $IC_{50}$  değeri,  $0,51 \mu g/mL$  olarak rapor edilmiştir [123].

Fare melanom B16F1 hücrelerinde yapılan diğer bir çalışmada ise, 1 Hz tekrarlama frekansı 100  $\mu s$  puls süresi ve 160V'luk EP parametreleri kullanılmıştır. Rutenyum kompleksi NAMI-A kullanılarak yapılan çalışmada yalnız  $1 \mu M$  NAMI-A uygulamasında hücre canlılığının %90 iken EP ile birlikte uygulandığında canlılığın %10 olduğu bildirilmiştir [125].

Saczko ve arkadaşlarının insan yumurtalık şeffaf hücreli karsinom (OvBH-1) ve epitelyal yumurtalık karsinomu hücreleri üzerinde (SKOV-3) yaptıkları çalışmada, OvBH-1 hücrelerine 24 saatlik tek başına sisplatin uygulamasında  $IC_{50}$ 'yi  $34,97 \mu M$ , SKOV-3 hücrelerinde ise  $62,59 \mu M$  olarak bildirilmiştir. 1,5 kV/cm E alan ile birlikte bleomisin maruziyetinde ise  $IC_{50}$  değerini OvBH-1 hücrelerinde  $4,74 \mu M$ , SKOV-3 hücrelerinde  $84,25 \mu M$  olarak rapor edilmiştir. 2 kV/cm E alan ile birlikte uygulamada ise,  $IC_{50}$  değeri OvBH-1 hücreleri için  $0,12 \mu M$ , SKOV-3 hücrelerinde ise  $3,09 \mu M$  olarak verildi.

Çalışmada 24 saatlik inkübasyon uygulamalarında EP'nin 2 kV/cm'ye kadar güvenli olduğunu rapor edilmiştir [126].

Gehl ve arkadaşları da çin hamster akciğer fibroblast (DC-3F) hücrelerinde 1 Hz, 99 µs puls süresi ve 1200V/cm olarak belirledikleri EP parametreleri ile yaptıkları in-vitro çalışmada EP uygulaması ile bleomisin sitotoksik etkisini 300 kat, sisplatinin ise 2,3 kat artırdığı bildirilmiştir [47].

Jaroszeski ve arkadaşları tarafından yedi farklı hücre hattı ve 44 farklı kemoterapik ilaç üzerinde yapılan in-vitro çalışmada, EP ile birlikte sisplatin ve carboplatinin altı farklı hücre hattı üzerinde 3-13 kat daha etkili olduğu, EP ile birlikte bleomisin uygulamasının yalnız bleomisin uygulamasına göre IC<sub>50</sub> değerini 100-5000 kat arasında artırdığı, bir diğer kemoterapötik ajan olan vinkristinin ise çeşitli hücre hatlarında 1,3-3,4 katlık bir sitotoksik artış gösterdiği tespit edilmiştir [32].

Orlowski ve arkadaşlarının in vitro koşullarda çin hamster akciğer fibroblast (DC-3F) hücrelerinde yaptıkları çalışmada EP ile birlikte netropsin ve bleomisin için sitotoksitenin sırasıyla 200 ve 700 kat arttığını, lipofilik bir ilaç olan aktinomisin D kullanımında ise sitotoksitenin artışı 3 kat olarak bildirilmiştir [48].

Scuderi ve arkadaşlarının fare melanom (B16-F1) hücreleri üzerinde yaptıkları in vitro çalışmada 1 Hz tekrarlama frekansı 8x100 µs puls süresi ve 1,2 kV/cm E alan şiddetli monopolar puls parametreleri ile sisplatin maruziyetinde IC<sub>50</sub> değerini 85 µM, 1 Hz tekrarlama frekansı, 1 µs'lik 8 puls ve 3 kV/cm şiddetindeki bipolar pulslar (HF-EP) ile sisplatin maruziyetinde ise IC<sub>50</sub>'yi 45 µM olarak bildirilmiştir [127].

Todorovic ve arkadaşlarının murin kolorektal karsinom hücrelerinde (CMT-93) yapılan çalışmada 1 Hz tekrarlama frekansı 100 µs puls süresi ve 1300 V/cm EP parametreleri kullanılmıştır. EP ile birlikte hücrelerin, IC<sub>50</sub> değeriyle belirlendiği üzere sisplatine 2,8 kat bleomisine 500 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir [128].

Maczynska ve arkadaşlarının yumurtalık adenokarsinom hücre hattı (SW626) ve melanom hücre hattı (Me45) üzerinde yaptıkları çalışmada 50 µM sisplatin ve 1 µM betulinik asit (BTA) dozlarında 1200 V/cm E alan maruziyetinde göre, EKT uygulanan ilacın etkinliğini

biraz arttırdığı ve hücre canlılığında aynı konsantrasyonda tek başına sisplatin için elde edilen seviyenin %30'un altına düştüğü rapor edilmiştir [129].

Vasquez ve arkadaşlarının mesane kanseri hücrelerinde (SW780) yaptıkları çalışmada yalnız mitomisin C için  $IC_{50}$  değerini 400  $\mu$ M, EP (99  $\mu$ s, 1,2 kV/cm, 8 puls 1 Hz) ile birlikte, bu değer 350  $\mu$ M olduğunu ve sonuçların iki durumda da benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada yalnız sisplatin uygulaması için  $IC_{50}$  değeri 590  $\mu$ M, EP ile birlikte ise 90  $\mu$ M olarak rapor edilmiştir [130].

Ramachandran ve arkadaşlarının insan promiyelositik lösemi (HL60), insan akut miyeloid lösemi (KG1) ve insan servikal (ME180) kanser hücreleri üzerinde yaptıkları vitro çalışmada, EP (1200 V/cm, 100  $\mu$ s) ile birlikte 10  $\mu$ M bleomisin varlığında HL60 hücrelerinde %39,2, KG1 için %35,8 ve ME180 için ise %35,5 mortalite oranı bildirilmiştir [131].

Cemazar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada insan yumurtalık karsinomu (IGROV1) hücreleri ve bunların sisplatin dirençli alt klonu (IGROV1/DDP), büyüklükleri 100 ila 1800 V/cm arasında değişen ve 100  $\mu$ s'lik darbe süresi olan 8 kare dalga E darbesine maruz bırakıldı. Hücreler, yalnız elektroporasyon uygulaması nedeniyle 740 V/cm (IGROV1) ve 1600 V/cm'de (IGROV1/DDP)  $IC_{50}$  değerlerine sahip olduğu belirtildi. Diğer taraftan, hücreler elektrokemoterapi ile tedavi edildikten sonra IGROV1 ve IGROV1/DDP hücreleri için sırasıyla 0,6  $\mu$ g/mL ve 3,2  $\mu$ g/mL sisplatin konsantrasyonlarında  $IC_{50}$  değerleri rapor edilmiştir [57].

Literatürdeki birçok çalışma sonuçlarını incelediğimizde farklı hücre tipleri için EKT uygulamasının bleomisin ve sisplatin sitotoksitesini farklı oranlarda arttırdığı görülmektedir. Artış oranındaki bu farklılıklar hücre tipine, kullanılan EP parametrelerine (E alan şiddeti, puls süresi) göre değişiklik gösterdiği görülmektedir. Fakat kesin olarak ifade edilen bir şey varki o da EKT uygulamasının bleomisin ve sisplatin kemoterapötik ilaçların  $IC_{50}$  değerini önemli oranda azaltmakta ve tedavi için ihtiyaç duyulan doz miktarını düşürmektedir. Ayrıca çalışmamızda, sisplatin ve bleomisin uygulamalarında, sisplatinin EP ile birlikte uygulamasında  $IC_{50}$  dozu değişim oranı yalnız sisplatinle karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, sisplatinin tek başına uygulamalarında daha düşük dozlarında HeLa hücrelerine daha toksik etki göstermesi

nedeniyle olabilir. Bleomisin ise sisplatin uygulamasına göre daha yüksek IC<sub>50</sub> dozu değişim oranına sahiptir. Bu durum, tek başına bleomisin daha yüksek dozlarının, HeLa hücrelerine daha toksik etki göstermesiyle gerçekleşiyor olabilir. Bu bağlamda çalışmamızda HeLa hücreleri için bulduğumuz sitotoksisite artış oranlarının ve IC<sub>50</sub> sonuçlarının literatürdeki mevcut bilgilerle uyumlu olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda kanser tedavisinde kemoterapötik ajanlara alternatif olabilceği düşünölen CaCl<sub>2</sub> tek başına ve EP ile birlikte kombine uygulamaları gerçekleştirildi. Tek başına CaCl<sub>2</sub> dozlarının uygulaması HeLa hücrelerinin canlılıkları üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Fakat CaEP yöntemi ile CaCl<sub>2</sub>'ün HeLa hücrelerinde önemli sitotoksik etki oluşturduğu bulundu. 1 mM ve 5 mM CaCl<sub>2</sub> ile yapılan CaEP uygulamasında sırasıyla % 48,87 ve % 73,18'lik mortalite oranı bulundu.

Ayrıca, 10 µM bleomisin ve siplatin konsantrasyonları ile CaCl<sub>2</sub> tüm dozlardaki kombine uygulamalarının ise hücre canlılığı üzerinde sinerik bir etki göstermediği saptandı. CaEP uygulaması üzerine yapılan çalışmalar oldukça yenidir. Bu bağlamda çalışmamızın literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

İn-vitro ve in-vivo CaEP'nin kanser hücreleri üzerindeki etkilerini gösteren ilk klinik öncesi çalışmada, CaEP uygulaması ile artan hücresel ATP kullanımının mitokondriyal değişikliklere sebep olarak ATP üretiminin azaldığı bildirilirken, ayrıca geçirgenliği artırılmış hücre membranı yoluyla ATP kaybı nedeniyle akut ATP tükenmesine neden olduğu ifade edilmiştir [74].

Frandsen ve arkadaşlarının insan lösemi hücresi (K-562), murin akciğer karsinom hücresi (Lewis Lung Carcinoma) ve Çin hamsteri akciğer fibroblast hücresi (DC-3F) üzerinde yaptıkları çalışmada, artan 1, 2, 3, 4 ve 5 mM kalsiyum konsantrasyonu varlığında 1 Hz tekrarlama frekansında 99 µs'lik 8 kare dalga puls parametrelerinde 1,2 kV/cm ila 1,4 kV/cm E alan şiddetlerinde EP uygulanmıştır. Uygulamadan sonra 1 ve 2 günlük inkübasyonun ardından hücre canlılığında doza bağlı bir azalma olduğu, CaEP ve bleomisin ile birlikte EKT uygulamasının hücre canlılıkları üzerinde benzer etkiler gösterdiği ve bleomisin ile kalsiyum kombine uygulamasının sinerjik bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, CaEP'nin etkisinin, molar düzeyde karşılaştırıldığında kalsiyum bileşiminden (kalsiyum klorür veya kalsiyum glubiyonat) bağımsız olduğunu ve

bu nedenle, klinik olarak mevcut her iki kalsiyum bileşiminin de CaEP'de uygulanabilir olduğu araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir [132].

CaEP'nin etkilerini belirlemek için yapılan bir diğer çalışmada ise 1 Hz tekrarlama frekansında 8 kare puls ve 99 µs süresince 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 veya 1,6 kV/cm E alan şiddeti ve 1, 3 ve 5 mM kalsiyum konsantrasyonları kullanılmıştır. Küçük hücreli akciğer kanseri (H69), mesane kanseri (SW780 ) ve lösemi hücreleri (U937) ile yapılan çalışmada, H69 ve SW780 hücrelerinde hücre içi ATP miktarında kalsiyum konsantrasyonu ve E alan şiddetine bağlı olarak azalma ve düşük canlılık değerleri bulunmuştur [133].

Zielichowska ve arkadaşlarının normal sıçan iskelet kası hücreleri (L6) ve kanser kas hücrelerinde (Wehi-164-Fibrosarkom) CaEP'nin etkinliğini ve güvenilirliğini belirlemek amacıyla 1000 V/cm, 1200 V/cm ve 1500 V/cm E alan şiddetleri kullanarak 0,5 mM ve 5mM CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonu ile yapılan çalışmada CaEP'nin Wehi-164 hücrelerinde sitotoksik etkili olduğu, bunun yanında normal kas hücreleri için güvenli olduğunu ve 0,5 mM Ca<sup>+2</sup> içeren EP'nin normal kas hücreleri L6'nın proliferasyonunu artırdığı belirlenmiştir [134].

CaEP'nin in-vivo etkilerini belirlemek için yapılan çalışmada insan küçük hücreli akciğer kanseri nakledilen bir fare modeli kullanılmıştır. Ortalama tümör çapı 6,2 mm olan fareler 168 mmol/L CaCl<sub>2</sub> enjeksiyonu ve 1,0 kV/cm'de 100 ms'lik 8 darbe kare puls elektroporasyon parametrelerinde 6 mm plaka elektrot kullanılarak tedavi edildi. Uygulamayla birlikte tedavi edilen tümörlerin %89'unun nekroz ile elimine ederek önemli bir anti-tümör etkiyi indüklediği belirlenmiştir [74].

Metformin ile CaEP'nin tümör boyutu, hayatta kalma ve hücre içi ATP üzerine etkilerinin belirlendiği, *NMRI-Foxn1<sup>tm</sup>* farelerinde in-vivo yapılan bir diğer çalışmada, CaEP'nin tedavi edilen mesane kanseri tümör boyutunu ve ATP seviyesini önemli ölçüde azalttığı, fakat CaEP ile birlikte metforminin, tümör boyutu, hayatta kalma ve ATP seviyesi üzerinde bir etki artışı yapmadığı belirlenmiştir [75].

Çalışmamızda HeLa hücrelerinde elde edilen CaEP sonuçları değerlendirildiğinde, literatürdeki farklı hücre hatları ve EP parametreleri ile yapılan çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda EP, EKT ve CaEP'nin HeLa hücrelerinde etki mekanizmalarını belirlemek için hücre döngüsü analizleri yapıldı. HeLa hücrelerine 0,4-3,2 kV/cm arası uygulanan tüm E alan şiddetlerinin hücre siklusunda G0/G1'de arreste neden olduğu görüldü. HeLa hücrelerine 10 ve 100 µM bleomisin doz uygulamaları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre siklusu yüzdelерinin G2/M fazında artışa neden olduğu saptandı. Uygulanan bleomisin dozu artışına bağlı olarak hücre döngüsünü G2'de durdurduğu görüldü. Bleomisin ile birlikte EKT uygulaması ile G2/M fazındaki hücre yüzdelерinde azalma gözlenirken, artışın G0/G1 fazına doğru kaydığı görüldü. Benzer durum 10 ve 25 µM sisplatin uygulamaları içinde geçerliydi. Doz artışına bağlı olarak tek başına ilaç uygulamasında G2/M fazındaki hücre yüzdesinde artış saptandı. Artan konsantrasyon ile orantılı olarak sisplatin maruziyetinin HeLa hücrelerinde hücre döngüsünü G2 fazında durdurduğu belirlendi. EP+sisplatin uygulaması ile birlikte ise, G2/M fazındaki hücre yüzdesi azalarak G0/G1 fazındaki hücre yüzdesinde artış olduğu görüldü. EP+sisplatin uygulaması hücre döngüsünde G0/G1 arrestine neden olduğu saptandı. Yalnız 1 ve 5 mM CaCl<sub>2</sub> uygulamasının hücre döngüsünde G2/M fazında hücre yüzdesinde sırasıyla %51 ve %60,7'lik bir yığılma meydana getirdiği belirlendi. Bu durumun CaEP uygulaması ile değiştiği ve hücre yüzdelерinin G0/G1 fazında yoğunlaştığı görüldü.

Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ölümsüzleştirilmiş keratinosit (HaCaT) hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada 0,5 µM bleomisin maruziyetinde hücre döngüsünün G1 fazında %21,2, S fazında %24,4 ve G2/M fazında %54,4'lık dağılım olduğu belirtilmiştir. İnsan serviks kanseri (HeLa) hücrelerine 2 µM bleomisin maruziyetinde ise hücre döngüsü fazlarındaki dağılım, G1 fazında %38,3, S fazında %21,1 ve G2/M fazında ise %40,6 olarak rapor edilmiştir [135].

Linge ve arkadaşlarının insan akciğer adenokarsinom hücrelerinde (A549) yaptıkları çalışmada kontrol grubundaki hücrelerin %50,83'ü G0/G1 fazındayken, %12,24'ünün G2/M fazında olduğu belirtilmektedir. A549 hücrelerine 50 mU/mL bleomisin maruziyeti ve 24 saatlik inkübasyon sonrası hücrelerin %18,00'i G0/G1 fazındayken %62,91'i G2/M fazında olduğu bleomisin ile tedavi edilen grupta G2/M fazındaki hücrelerde birikme olduğu bildirilmiştir [136].

Liu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada osteoblast hücreleri (MC3T3-E1) deksametazon (DEX)'na maruz bırakılmıştır. DEX'in MC3T3-E1 hücrelerinde G0/G1 arrestine neden

olduğu, 1 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarda DEX, G0/G1 fazındaki hücre sayısında anlamlı bir artış meydana getirdiği ( $p<0.05$ ), ancak S fazındaki hücre sayısını azalttığı ( $p<0.05$ ) böylece DEX'in hücre döngüsü ilerlemesini inhibe ettiği rapor edilmiştir [137].

Mrkovicova ve arkadaşlarının sodyum butiratın (NaBu) ve sisplatin kullanarak sisplatine duyarlı ve sisplatine dirençli yumurtalık hücreleri (A2780-A2780cis) üzerinde yaptıkları çalışmada yalnız 5 mM NaBu maruziyetinde A2780 hücrelerinde G1'den S fazına hücre döngüsü geçişini engellediğini, G1 fazındaki hücrelerin yüzdesi, kontrol hücrelerinde  $60,9 \pm 4,0$ 'dan tedavi edilen hücrelerde  $72,5 \pm 0,8$ 'e önemli ölçüde arttığı, bu artışın S fazı popülasyonunda ise (kontrolde  $27,6 \pm 3,1$ 'e, tedavi edilen hücrelerde  $9,4 \pm 1,3$ 'e) eşlik eden azalma ile iyi uyum sağladığı bildirilmiştir. Aynı konsantrasyon NaBu A2780cis hücrelerinde, G1 fazındaki hücrelerin yüzdesinde hafif bir artış (kontrolde  $54,3 \pm 2,6$ 'ya tedavi edilen hücrelerde  $61,3 \pm 0,4$ 'e) ve S fazında azalmanın (kontrolde  $31,5 \pm 1,5$  tedavi sonrası  $23,6 \pm 2,7$ ) eşlik ettiği rapor edilmiştir. Hem A2780 hem de A2780cis hücrelerinde 5  $\mu$ M sisplatin uygulamasının hücre döngüsünü G2 fazında durduğu (kontrolde  $11,5 \pm 0,9$  ve  $14,1 \pm 1,8$  tedavi edilen hücrelerde  $48,1 \pm 5,7$  ve  $28,1 \pm 4,9$ ) bildirilmiştir [138].

Asgar ve arkadaşlarının iki kolanjiokarsinom hücrelerinde (KKU-100, zayıf farklılaşmış ve KKU-M214, orta derecede farklılaştırılmış) yaptıkları çalışmada 10  $\mu$ M sisplatin maruziyetinin KKU-100 hücrelerinde G1 kontrol noktasında büyüme arresti gerçekleştiği ve bu durumun G0/G1'de daha yüksek hücre yüzdesine ( $57,9 \pm 3,3$ ) yol açtığını bildirmişlerdir. Aynı doz sisplatin uygulaması KKU-M214 hücrelerinde hücre döngüsü profili, kontrol ile karşılaştırıldığında belirli bir aşamada büyüme arresti göstermediği rapor edilmiştir [139].

Bu çalışmada sisplatin ve bleomisin uygulamalarının artan ilaç dozuyla birlikte hücre siklusunda G2/M fazında artış görüldü. Bulduğumuz bu sonuçların literatürdeki çalışmalarla uyumlu olduğu belirlendi. Ancak, EP ile birlikte kombine uygulamalarına ait sonuçların karşılaştırılacağı literatür bilgisi mevcut değildir. Bu sebeple, elde ettiğimiz bu sonuçların ileri de yapılacak diğer başka çalışmalara kaynak niteliğinde olması ve literatüre özgün katkı sağlaması açısından önemlidir.

Literatürdeki çalışmaların çoğunda,  $\Delta\Psi_m$  azalmasının (mitokondrinin depolarizasyonu) apoptotik hücre ölümünü indüklediği bildirilmiştir. Ancak son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar apoptozun artan  $\Delta\Psi_m$ 'den de kaynaklanabileceğini göstermiştir [140]. Literatürde bazı kanser hücrelerinde mitokondriyal hiperpolarizasyon gösterilmiştir [140, 141]. FoF<sub>1</sub>-ATPaz, ATP'yi sentezlemek için ekstrüde edilmiş protonları kullanır ve daha sonra protonlar, hiperpolarizasyonu önlemek için iç zara yeniden girmektedir. FoF<sub>1</sub>-ATPaz'daki işlev bozukluğunun, mitokondrinin hiperpolarizasyonuna yol açabildiği bildirilmiştir [142].

Eşmekaya ve arkadaşlarının MCF-7 hücrelerinde 2.1 GHz WCDMA modülasyonlu mikrodalga (MW) radyasyonunun apoptotik aktivite ve mitokondriyal membran potansiyeli ( $\Delta\Psi_m$ ) üzerindeki etkilerini belirlemek için yaptıkları çalışmada, MW radyasyonuna maruziyetin, mitokondride hiperpolarizasyona neden olduğu ve bunun da MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklediği rapor edilmiştir [143].

Perl ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada mitokondriyal hiperpolarizasyon ve ATP tükenmesi, T hücre aktivasyonu ve apoptozda erken ve geri dönüşümlü süreçleri göstermişlerdir. Sistemik lupus eritematozuslu hastaların T hücrelerinde de, kalıcı mitokondriyal hiperpolarizasyon, sitoplazmik alkalinizasyon, ROS üretimi artışı ve ATP miktarının azaldığı ifade edilmiştir [113].

Çalışmamızda, bleomisin kemoterapötik ilacının belirlenen dozlarında yapılan uygulamalarda  $\Delta\Psi_m$ 'nde anlamlı bir değişim meydana getirmediği belirlenirken, EP ile birlikte bleomisin tüm doz uygulamalarında  $\Delta\Psi_m$ 'nde hiperpolarizasyona neden olduğu görüldü. Sisplatin kemoterapötik ilacı için ise durum biraz farklıydı. 10  $\mu$ M sisplatin varlığında  $\Delta\Psi_m$ 'nde depolarizasyon belirlenirken diğer sisplatin dozlarında ise  $\Delta\Psi_m$ 'nde önemli bir değişiklik belirlenmedi. EP ile birlikte tüm sisplatin dozlarındaki uygulamalarda da  $\Delta\Psi_m$ 'nde anlamlı bir değişiklik görülmedi. CaCl<sub>2</sub> tek başına uygulamalarında ise, sadece 4 mM CaCl<sub>2</sub> varlığında  $\Delta\Psi_m$ 'nde hiperpolarizasyon belirlenirken diğer dozlarda önemli bir değişiklik belirlenirken, CaEP uygulamasında ise 1, 3, 4 ve 5 mM CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonların da  $\Delta\Psi_m$ 'nde hiperpolarizasyon belirlendi. Aldığımız bu sonuçlar, EP ile birlikte bleomisin ve CaCl<sub>2</sub> uygulamalarının  $\Delta\Psi_m$ 'nde oluşan hiperpolarizasyon kaynaklı hücre ölümünü indüklediğini göstermektedir. Elde ettiğimiz bu veriler,

literatürdeki birçok çalışmada belirtilen mitokondri hiperpolarizasyonu kaynaklı gerçekleşen apoptozu destekler niteliktedir.

Jan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada DNA'ya zarar veren kemoterapötik ajanlar (sisplatin, mitomisin, metotreksat, mitoksantron, doksorubisin ve bleomisin), histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, proteazom inhibitörleri, siklooksijenaz-2 inhibitörleri ve bir dizi antikör gibi ekstrinsik yolaktaki DR'lerin ve ligandların apoptotik fonksiyonunu uyarmak için önerilen çeşitli ajanlar olduğunu ve Fas (DR2) ekspresyonunu hedeflediğini bildirmişlerdir [144].

Mungunsukh ve arkadaşlarının pulmoner endotel hücrelerinde yaptıkları çalışmada bleomisin kaspaz-8'in proteolitik aktivasyonunun ile içsel apoptotik yolun değil, dışsal apoptotik yolun erken aktivasyonunu indüklediğini rapor edilmiştir [145].

Sharifi ve arkadaşlarının paklitaksel dirençli MCF-7 hücrelerinde yaptıkları çalışmada Bcl-2/Bax oranında artış meydana gelirken kaspaz-9 seviyelerinde azalma, kaspaz-8'de ise artış görüldüğü bildirilmiştir [146].

Çalışmamızda HeLa hücrelerine 10 µM bleomisin ve 10 µM sisplatin uygulamalarında Bax/Bcl-2 gen ekspresyon oranında kısmi bir artış gözlenirken, EP ile kombine kullanımında ise artışın daha fazla olduğu görüldü. 1 mM CaCl<sub>2</sub> dozunda Bax/Bcl-2 gen ekspresyon oranında kontrol grubuna göre azalma gözlenirken, CaEP uygulaması ile bu oranın arttığı belirlendi. Ancak belirlenen değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p>0.01). 10 µM bleomisin varlığında p53 gen ekspresyonunda kontrol grubuna istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p<0.05). 10 µM sisplatin ve 1 mM CaCl<sub>2</sub> varlığında kontrol grubuna göre p53 gen ekspresyonunda azalma belirlendi. EP ile kombine uygulamasında ise bir miktar artış olduğu görüldü ancak bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p>0.01).



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın ilk aşaması, EKT ve CaEP uygulaması için HeLa hücrelerine uygulanacak etkin E alan değerini belirlemektir.

HeLa hücrelerine 1 Hz tekrarlama frekansında 8 kare puls ve 100  $\mu$ s'lik puls süresi parametrelerinde 0,4-3,2 kV/cm değerler arasındaki E alan şiddetlerine maruz bırakıldı. Maruziyet sonrası hücre canlılığı ve permeabilizasyon değerlerinden yararlanarak HeLa hücreleri için etkin E alan değeri 1,6 kV/cm olarak bulundu.

Çalışmamızın ikinci ve üçüncü aşaması belirlenen dozlarda yalnız bleomisin (10, 100, 200, 400 ve 800  $\mu$ M), sisplatin (10, 25, 50, 75 ve 100  $\mu$ M) ve CaCl<sub>2</sub> (1, 2, 3, 4 ve 5 mM) uygulamaları ile EKT ve CaEP uygulamalarının, HeLa hücrelerinin canlılığı ve IC<sub>50</sub> değeri üzerindeki etkilerini belirleyerek EKT ve CaEP yöntemlerinin etkinliğini değerlendirmektir.

Yalnız bleomisin uygulamasında hücre canlılık yüzdeleri 10  $\mu$ M'da %97,57, 100  $\mu$ M'da %63,73, 200  $\mu$ M'da %52,99, 400  $\mu$ M'da %42,34 ve 800  $\mu$ M'da % 24,32 olarak belirlendi. HeLa hücrelerinde bleomisin IC<sub>50</sub> değeri, 214,11 $\pm$ 4,7  $\mu$ M olarak hesaplandı. Bleomisin ile EKT uygulaması sonucu ise hücre canlılıkları 10  $\mu$ M'da %24,11, 100  $\mu$ M'da %21,30, 200  $\mu$ M'da %20,29, 400  $\mu$ M'da %21,9 ve 800  $\mu$ M'da %18,8 olarak belirlendi. EKT uygulaması ile bleomisin IC<sub>50</sub> değeri 0,44 $\pm$ 0,3  $\mu$ M olarak bulundu. Veriler neticesinde EKT uygulamasının HeLa hücrelerinde bleomisin sitotoksitesini 487 kat arttırdığı belirlendi.

Yalnız sisplatin kemoterapötik ilaç varlığında HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri 10  $\mu$ M'da %80,17 iken 25  $\mu$ M'da %45,92, 50  $\mu$ M'da %39,9, 75  $\mu$ M'da %39,8 ve 100  $\mu$ M'da % 34,45 olarak belirlendi. HeLa hücrelerinde sisplatin IC<sub>50</sub> değeri, 35,16 $\pm$ 3,3  $\mu$ M olarak bulundu. Sisplatin ile EKT uygulaması sonrası ise hücre canlılıkları 10  $\mu$ M'da %32,16, 25  $\mu$ M'da %33,6, 50  $\mu$ M'da %31,04, 75  $\mu$ M'da %27,98 ve 100  $\mu$ M'da %27,76 olarak bulundu. EKT uygulaması ile sisplatin IC<sub>50</sub> değeri 20,55 $\pm$ 4,3 $\mu$ M olarak hesaplandı. EKT uygulamasının HeLa hücrelerinde sisplatin sitotoksitesini 1,71 kat arttırdığı bulundu.

Yalnız  $\text{CaCl}_2$  uygulamasında HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri, 1 mM'da %99,9, 2 mM'da %101,35, 3 mM'da, 4 mM'da %90,98 ve 5 mM'da %94,24 olarak belirlendi. Yalnız  $\text{CaCl}_2$  uygulamasının hücre canlılıkları üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü. Fakat CaEP yöntemi ile hücre canlılıkları, 1mM'da %51,13, 2 mM'da %63,19, 3 mM'da %46,77, 4mM'da %37,55 ve 5 Mm'da %26,82 olarak belirlendi. Yalnız  $\text{CaCl}_2$  uygulamasının HeLa hücrelerinin canlılığında bir değişim oluşturmadığı, fakat CaEP uygulaması ile hücre canlılıklarında önemli bir azalma meydana geldiği belirlendi. Özellikle 4 ve 5 mM  $\text{CaCl}_2$  varlığında, CaEP uygulamasında HeLa hücrelerinin mortalitesi yaklaşık %60 ile %70 olarak bulundu. Bu sonuçlar,  $\text{CaCl}_2$  ile CaEP uygulamasının kemoterapötik ilaçlar olmaksızın serviks kanserin tedavisinde etkili bir yöntem olarak kullanılabileceği fikrini desteklemektedir.

Çalışmanın son aşaması EKT ve CaEP uygulamaları ile meydana gelen hücre ölümünün ve sitotosisite artışını hücre mekanizmalar yönünden incelemektir. HeLa hücrelerine uygulanan bütün E alan şiddetlerinin hücre döngüsü G0/G1 fazında durduğu belirlendi. Yalnız bleomisin (10, 100  $\mu\text{M}$ ) ve siplatin (10, 25  $\mu\text{M}$ ) dozlarının maruziyetinde hücre yoğunluğu G2/M fazında artış eğilimi gösterirken, EKT uygulaması ile bu durumun G0/G1 fazında artışa neden olduğu görüldü. EKT uygulamasının, sitotoksositeyi artırması ile birlikte hücrelerin G2/M fazından G0/G1 fazına geçişine neden olduğu görülmektedir. Bu durum, EKT uygulamasının canlı kalan kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini ya da baskıladığını göstermektedir. Benzer durum,  $\text{CaCl}_2$  maruziyetinde de görüldü. Yalnız  $\text{CaCl}_2$  (1, 5 mM) maruziyetinde hücrelerin yarısında fazlası G2/M fazında yoğunlaşmış durumda iken, aynı dozlardaki CaEP uygulaması ile hücre döngüsü G0/G1 fazında arreste neden olduğu görüldü. CaEP uygulaması ile ortaya çıkan sonuç da  $\text{CaCl}_2$ 'ün EP ile birlikte uygulanmasını hücre ölümünü arttırdığı ve hücrelerin G0/G1 fazına yoğunlaştırdığı belirlendi. Bununla birlikte, HeLa hücrelerine uygulanan 10  $\mu\text{M}$  bleomisin ve 10  $\mu\text{M}$  sisplatin konsantrasyonlarında Bax/Bcl-2 oranında kısmi bir artış gözlenirken EP ile kombine kullanımında ise artışın daha fazla olduğu görüldü. 1 mM  $\text{CaCl}_2$  dozunda Bax/Bcl-2 oranında kontrol grubuna göre azalma gözlenirken CaEP uygulaması ile bu oranın arttığı saptandı. 10  $\mu\text{M}$  bleomisin uygulamasında p53 gen ekspresyonunda bir artış saptandı. 10  $\mu\text{M}$  sisplatin ve 1 mM  $\text{CaCl}_2$  varlığında, kontrol grubuna göre p53 gen ekspresyonunda azalma bulundu. EP ile kombine uygulamasında ise bir miktar artış olduğu görüldü.

Serviks kanserinde, EKT ve CaEP uygulamalarının etkinliğini değerlendirmek üzere yaptığımız bu tez çalışmasında EKT uygulamasının serviks kanseri hücrelerinde kemoterapötik ajanların sitotoksitesini önemli ölçüde artırarak kanser tedavisinde etkili bir yöntem olduğunu göstermiş bulunmaktayız. HeLa hücrelerinde yaptığımız in-vitro deneyler sonrasında, elde ettiğimiz CaEP sonuçları doğrultusunda serviks kanserinin tedavisinde uygulanan kemoterapötik ajanların yerine kullanılabilir alternatif yeni bir tedavi seçeneği olabileceği de çalışmamızda gösterilmiştir. Ayrıca kemoterapötik ajanların yerine  $\text{CaCl}_2$ 'nin EP ile birlikte uygulamasının serviks kanserinin tedavi maliyetlerini azaltması ve diğer organlar üzerine yan etkiler oluşturmaması yönünden de etkili bir yöntem olarak kullanılabilirliğini düşünmekteyiz. Aldığımız bu sonuçların in-vivo ve pre-klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca hücre içi ölüm mekanizmaları ile ilgili elde ettiğimiz sonuçların da farklı araştırmalar tarafından desteklenmesi ve daha başka hücre ölüm yollarının araştırılması gerekliliğini göstermektedir. Bununla birlikte, in-vivo yapılan çalışmalar in-vitro çalışmalarla desteklenerek aralarındaki farklılıklar ortaya konulmalıdır. Böylelikle, serviks kanserin fizyopatolojisinde gerçekleşen hücre içi moleküler mekanizmaların eksik yönlerinin tamamlanması sağlanacaktır.



## KAYNAKLAR

1. Chang, D.C. (1992). *1 - Overview of Electroporation and Electrofusion, in Guide to Electroporation and Electrofusion*. D.C. Chang, Editors., Academic Press: San Diego. p. 1-6.
2. Chen, C., Smye S.W., Robinson M.P. and Evans J.A. (2006). Membrane electroporation theories: a review. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 44(1-2): p. 5-14.
3. Coster, H.G. and Simmermann, U. (1975). The mechanism of electrical breakdown in the membranes of Valonai utricularis. *The Journal of Membrane Biology*, 22(1): p. 73-90.
4. Crowley, J.M. (1973). Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophysical Journal*, 13(7): p. 711-24.
5. Escoffre, J.M., Portet, T., Wasungu L., Tessie, J., Dean, D. and Rols, M.P. (2009). What is (Still not) Known of the Mechanism by Which Electroporation Mediates Gene Transfer and Expression in Cells and Tissues. *Molecular Biotechnology*, 41(3): p. 286-295.
6. Teissie, J., Golzio, M., and Rols M.P. (2005). Mechanisms of cell membrane electroporation: a minireview of our present knowledge. *Biochimica Biophysica Acta*, 1724(3): p. 270-80.
7. Polak, A., Bonhenry, D., Dehez, F., Kramar, P., Miklavcic, D. and Tarek, M. (2013). On the electroporation thresholds of lipid bilayers: molecular dynamics simulation investigations. *The Journal of Membrane Biology*, 246(11): p. 843-50.
8. Suehiro, J., Shutou, M., Hatano, T. and Hara, M. (2003). High sensitive detection of biological cells using dielectrophoretic impedance measurement method combined with electroporation. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 96(1-2): p. 144-151.
9. Yang, S.C., Huang, K.S., Chen, H.Y. and Lin Y.C. (2008). Determination of optimum gene transfection conditions using the Taguchi method for an electroporation microchip. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 132(2): p. 551-557.
10. Levine, Z.A. and Vernier, P.T. (2010). Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation. *The Journal of Membrane Biology*, 236(1): p. 27-36.
11. Vernier, P.T., Levine, Z.A., and Gundersen, M.A. (2013). Water Bridges in Electroporation of Phospholipid Bilayers. *Proceedings of the IEEE*, 101(2): p. 494-504.
12. Tarek, M. (2005). Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation. *Biophysical Journal*, 88(6): p. 4045-4053.
13. Batista Napotnik, T. and Miklavčič, D. (2018). In vitro electroporation detection methods – An overview. *Bioelectrochemistry*, 120: p. 166-182.
14. Pauly, H. and Schwan, H.P. (1959). Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale: Ein Modell für das dielektrische Verhalten von Zellsuspensionen und von Proteinlösungen. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 14(2): p. 125-131.

15. Kotnik, T., Bobanović, F., and Miklavčič, D. (1997). Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields—A theoretical analysis. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43(2): p. 285-291.
16. Schwan, H.P. (1994). Electrical properties of tissues and cell suspensions: mechanisms and models. *Proceedings of 16th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 1: p. A70-A71 vol.1.
17. Lee, S.W. and Tai, Y.C. (1999). A micro cell lysis device. *Sensors and Actuators A-Physical*, 73(1-2): p. 74-79.
18. Sukhorukov, V.L., Mussauer H., and Zimmermann U. (1998). The effect of electrical deformation forces on the electropermeabilization of erythrocyte membranes in low- and high-conductivity media. *The Journal of Membrane Biology*, 163(3): p. 235-45.
19. Gimsa, J. and Wachner, D. (2001). Analytical description of the transmembrane voltage induced on arbitrarily oriented ellipsoidal and cylindrical cells. *Biophysical Journal*, 81(4): p. 1888-96.
20. Teissié, J., Eynard, N., Gabriel, B. and Rols, M.P. (1999). Electropermeabilization of cell membranes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35(1): p. 3-19.
21. Zimmermann, U. (1982). Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochimica Biophysica Acta*, 694(3): p. 227-77.
22. Teissié, J. and Rols, M.P. (1993). An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophysical Journal*, 65(1): p. 409-13.
23. Kanduser, M. and Miklavcic, D. (2009). *Electroporation in Biological Cell and Tissue: An Overview*. Nikolai L., Eugene V. Editors., Press: Springer New York, NY. p. 1-37.
24. Neumann, E., Kakorin, S., and Toensing, K. (1999). Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 48(1): p. 3-16.
25. Meaking, W.S., Edgerton, J., Wharton, C.W. and Meldrum, R.A. (1995). Electroporation-induced damage in mammalian cell DNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1264(3): p. 357-362.
26. Hamilton, W.A. and Sale, A.J.H. (1967). Effects of high electric fields on microorganisms: II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 148(3): p. 789-800.
27. Chen, X., Ren, Z., Zhu, T., Zhang, X., Xie, H., Zhou, L., Yin, S., Sun, J. and Zheng, S. (2015). Electric Ablation with Irreversible Electroporation (IRE) in Vital Hepatic Structures and Follow-up Investigation. *Scientific Reports*, 5(1): p. 16233.
28. Chang, D.C. (1989). Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field. *Biophysical Journal*, 56(4): p. 641-52.
29. Chang, D.C. (1992). *Electroporation and Electrofusion, in Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. D.C. Chang, et al., Editors., Academic Press: San Diego. p. 1-6.

30. Chang, D.C. (2006). *Electroporation and Electrofusion, in Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. R.A. Meyers, Editors., doi.org/10.1002/3527600906.mcb.200300026
31. Yarmush, M.L., Golberg, A., Sersa, G., Kotnik, T. and Miklavcic, D. (2014). Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16: p. 295-320.
32. Jaroszeski, M.J., Dang, V., Pottinger, C., Hickey, J., Gilbert, R. and Heller, R. (2000). Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro. *Anticancer Drugs*, 11(3): p. 201-8.
33. Miklavčič, D., Mali, B., Kos, B., Heller, R. and Sersa, G. (2014). Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomedical Engineering Online*, 13(1): p. 29.
34. Sersa, G., Jarm, T., Kotnik, T., Coer, A., Podkrajsek, M., Sentjurc, M., Miklavcic, D., Kadivec, M., Kranjc, S., Seceroc, A. and Cemazar, M. (2008). Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *British Journal of Cancer*, 98(2): p. 388-98.
35. Jarm, T., Cemazar, M., Miklavcic, D. and Sersa, G. (2010). Antivascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 10(5): p. 729-746.
36. Zheng, E. and Zhong, N.Q. (2012). Electrochemotherapy: an Active Treatment for Chest Wall Metastases from Breast Cancer. *Gland Surgery*, 23: p. 131-131.
37. Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. and Okami, Y. (1966). New antibiotics, bleomycin A and B. *The Journal of Antibiotics*, 19(5): p. 200-9.
38. Scholar, E. (2007). *Bleomycin, in xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, S.J. Enna and D.B. Bylund, Editors. Elsevier: New York. p. 1-6.
39. Pron, G., Mahrou, N., Orłowski, S., Tounekti, O., Poddevin, B., Belehradec, J. and Mir, L.M. (1999). Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 57(1): p. 45-56.
40. Poddevin, B., Orłowski, S., Belehradec, J. and Mir, L.M. (1991). Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochemical Pharmacology*, 42 Suppl: p. S67-75.
41. Lazo, J.S., Sebt, S.M., and Schellens, J.H. (1996). Bleomycin. *Cancer Chemotherapy Biological Response*, 16: p. 39-47.
42. Murray, V., Chen, J.K. and Chung, L.H. (2018). The Interaction of the Metallo-Glycopeptide Anti-Tumour Drug Bleomycin with DNA. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5): 1372.
43. Mir, L.M., Tounekti, O. and Orłowski, S. (1996). Bleomycin: revival of an old drug. *General Pharmacology*, 27(5): p. 745-8.
44. Tounekti, O., Pron, G., Belehradec, J. and Mir, L.M. (1993). Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Research*, 53(22): p. 5462-9.
45. Burger, R.M. (1998). Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin. *Chemical Reviews*, 98(3): p. 1153-1170.

46. Roy, S.N. and Horwitz, S.B. (1984). Characterization of the association of radiolabeled bleomycin A2 with HeLa cells. *Cancer Research*, 44(4): p. 1541-6.
47. Gehl, J., Skovsgaard, T. and Mir, L.M. (1998). Enhancement of cytotoxicity by electroporation: an improved method for screening drugs. *Anticancer Drugs*, 9(4): p. 319-25.
48. Orlowski, S., Belehradek, J., Paoletti, C. and Mir, L.M. (1988). Transient electroporation of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochemical Pharmacology*, 37(24): p. 4727-33.
49. Borch, R.F. and Pleasants, M.E. (1979). Inhibition of cis-platinum nephrotoxicity by diethyldithiocarbamate rescue in a rat model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76(12): p. 6611-4.
50. Torres, L.S. (2007). *Cancer drug resistance research perspectives*. New York : Nova Biomedical Books.
51. Zhu, H., Luo, H., Zhang, W., Shen, Z., Hu, X. and Zhu, X. (2016). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Design Development and Therapy*, 10: p. 1885-95.
52. Singh, L., Aldosary, S., Saeedan, A.S., Ansari, M.N. and Kaithwas, G. (2018). Prolyl hydroxylase 2: a promising target to inhibit hypoxia-induced cellular metabolism in cancer cells. *Drug Discovery Today*, 23(11): p. 1873-1882.
53. Dasari, S. and Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740: p. 364-78.
54. Liu, J., Liu, Y., Habeabu, S.S. and Klaassen, C.D. (1998). Metallothionein (MT)-null mice are sensitive to cisplatin-induced hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 149(1): p. 24-31.
55. Goodman, L.S. (2001). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed.*, New York: McGraw-Hill. xxvii, 2148 p.
56. Zicca, A., Cafaggi, S., Mariggio, M.A., Vannozzi, M.O., Ottone, M., Bocchini, V., Caviglioli, G. and Viale, M. (2002). Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochloride in rats. *European Journal of Pharmacology*, 442(3): p. 265-72.
57. Cemazar, M., Sersa, G., and Miklavcic, D. (1998). Electrochemotherapy with cisplatin in the treatment of tumor cells resistant to cisplatin. *Anticancer Research*, 18(6a): p. 4463-6.
58. Brini, M. and Carafoli, E. (2000). Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(3): p. 354-70.
59. Lytton, J., Westlin, M., Burk, S.E., Shull, G.E. and MacLennan, D.H. (1992). Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(20): p. 14483-9.
60. Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6): p. 1047-58.
61. Armstrong, J.S. (2006). The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion*, 6(5): p. 225-234.

62. Decuyper, J.P., Monaco, G., Bultynck, G., Missiaen, L., Smedt, H.D. and Parys, J.B. (2011). The IP<sub>3</sub> receptor–mitochondria connection in apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(5): p. 1003-1013.
63. Roderick, H.L. and Cook, S.J. (2008). Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nature Reviews Cancer*, 8(5): p. 361-75.
64. Endo, Y., Uzawa, K., Mochida, Y., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H. and Tanzawa, H. (2004). Sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 110(2): p. 225-31.
65. Bergner, A., Kellner, J., Tufman, A. and Huber, R.M. (2009). Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-homeostasis is altered in Small and non-small Cell Lung Cancer cell lines. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 28(1): p. 25.
66. Gélébart, P., Kovacs, T., Brouland, J.P., Gorp, R.V., Grossman, J., Rivard, N., Panis, Y., Martin, V., Bredoux, R., Enouf, J. and Papp, B. (2002). Expression of Endomembrane Calcium Pumps in Colon and Gastric Cancer Cells: Induction Of Serca3 Expression During Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29): p. 26310-26320.
67. Aung, C.S., Kruger, W.A., Poronnik, P., Roberts Thomson, S.J. and Monteith, G.R. (2007). Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase expression during colon cancer cell line differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*, 355(4): p. 932-6.
68. Ribiczey, P., Tordai, A., Andrikovics, H., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., Enouf, J., Enyedi, A., Papp, B. and Kovacs, T. (2007). Isoform-specific up-regulation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>ATPase expression during colon and gastric cancer cell differentiation. *Cell Calcium*, 42(6): p. 590-605.
69. Aung, C.S., Ye, W., Plowman, G., Peters, A.A., Monteith, G.R. and Roberts Thomson, S.J. (2009). Plasma membrane calcium ATPase 4 and the remodeling of calcium homeostasis in human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 30(11): p. 1962-9.
70. Rüschoff, J.H., Brandenburger, T., Strehler, E.E., Filoteo, A.G., Heinmöller, E., Aumüller, G. and Wilhelm, B. (2012). Plasma membrane calcium ATPase expression in human colon multistep carcinogenesis. *Cancer Investigation*, 30(4): p. 251-7.
71. Carafoli, E., Santella, L., Branca, D. and Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36(2): p. 107-260.
72. Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (2011). Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium*, 50(3): p. 211-21.
73. Baylor, S.M. and Hollingworth, S. (2012). Intracellular calcium movements during excitation-contraction coupling in mammalian slow-twitch and fast-twitch muscle fibers. *The Journal of General Physiology*, 139(4): p. 261-72.

74. Frandsen, S.K., Gissel, H., Hojman, P., Tramm, T., Eriksen, J. and Gehl, J. (2012). Direct therapeutic applications of calcium electroporation to effectively induce tumor necrosis. *Cancer Research*, 72(6): p. 1336-41.
75. Frandsen, S.K. and Gehl, J. (2017). Effect of calcium electroporation in combination with metformin in vivo and correlation between viability and intracellular ATP level after calcium electroporation in vitro. *Plos One*, 12(7): p. e0181839.
76. Hojman, P., Gissel, H., Andre, F.M., Henrionnet, C.C., Eriksen, J., Gehl, J. and Mir, L.M. (2008). Physiological effects of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle. *Human Gene Therapy*, 19(11): p. 1249-60.
77. Cerella, C., Diederich, M. and Ghibelli, L. (2010). The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *International Journal of Cell Biology*, 2010: p. 546163.
78. Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P. and Rizzuto, R. (2008). Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondria and cell death. *Current Molecular Medicine*, 8(2): p. 119-30.
79. Batista Napotnik, T., Polajžer, T. and Miklavčič, D. (2021). Cell death due to electroporation – A review. *Bioelectrochemistry*, 141: p. 107871.
80. Cross, F., Roberts, J. and Weintraub, H. (1989). Simple and complex cell cycles. *Annual Reviews Cell Biology*, 5: p. 341-96.
81. Raff, M.C. (1996). Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell*, 86(2): p. 173-5.
82. Vermeulen, K., Berneman, Z.N. and Van Bockstaele, D.R. (2003). Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*, 36(3): p. 165-75.
83. Yuan, J. and Yankner, B.A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407(6805): p. 802-9.
84. Giacinti, C. and Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25(38): p. 5220-7.
85. Foster, I. (2008). Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14(2): p. 144-149.
86. Bennett, D.C. (2016). Genetics of melanoma progression: the rise and fall of cell senescence. *Pigment Cell Melanoma Research*, 29(2): p. 122-40.
87. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4): p. 239-57.
88. Öztürk, F., Apopitoz. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 9(2).
89. Gastman, B.R. (2001). Apoptosis and its clinical impact. *Head and Neck*, 23(5): p. 409-25.
90. Rodenburg, R.J., Raats, J.M., Pruijn, G.J. and Van Venrooij, W.J. (2000). Cell death: a trigger of autoimmunity? *Bioessays*, 22(7): p. 627-636.
91. Gobé, G., Zhang, X.J. Cuttle, L., Pat, B., Willgoss, D., Hancock, J., Barnard, R. and Endre, R.B. (1999). Bcl-2 genes and growth factors in the pathology of ischaemic acute renal failure. *Immunology and Cell Biology*, 77(3): p. 279-86.

92. LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., Bergeron, C. and Hammond, J. (1999). Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(33): p. 23426-36.
93. Kannan, K. and Jain, S.K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7(3): p. 153-163.
94. Adams, J.M. and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1): p. 61-6.
95. Adrain, C. and Martin, S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6): p. 390-7.
96. Spierings, D.C., Vries, E.G., Vellenga, E., Heuvel, F.A., Koornstra, J.J., Wesseling, J., Hollema, H. and Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(6): p. 821-31.
97. Vousden, K.H. and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8): p. 594-604.
98. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36(3): p. 131-49.
99. Bellamy, C.O. (1997). P53 and apoptosis. *British Medical Bulletin*, 53(3): p. 522-38.
100. Kirsch, D.G. and Kastan, M.B. (1998). Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *The Journal of Clinical Oncology*, 16(9): p. 3158-68.
101. Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiehac, E. and Los, M. (2007). Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 10(1-2): p. 13-29.
102. Smaili, S.S., Hsu, Y.T., Youle, R.J. and Russel, J.T. (2000). Mitochondria in Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 32(1): p. 35-46.
103. Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annual Reviews of Biochemical*, 69: p. 217-45.
104. Palmer, A.M., Greengrass, P.M. and Cavalla, D. (2000). The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News Perspect*, 13(6): p. 378-84.
105. Coşkun, G. ve Özgür, H. (2011). Apoptoz Ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3).
106. Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1): p. 99-163.
107. Curtin, J.F. and Cotter, T.G. (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal*, 15(11): p. 983-92.
108. Golstein, P. and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1): p. 37-43.

109. Nicotera, P. and Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis–necrosis switch. *Oncogene*, 23(16): p. 2757-2765.
110. Baines, C.P. (2010). Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Frontiers in Physiology*, 1: p. 156.
111. Zorova, L.D., Popkov, V.A., Plotnikov, E.Y., Silachev, D.N., Pevzner, I.B., Babenko, V.A., Zorov, S.D., Balakireva, A.V., Juhaszova, M., Sollot, S.J. and Zorov, D.B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 552: p. 50-59.
112. Ly, J.D., Grubb, D.R. and Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 8(2): p. 115-128.
113. Perl, A., Gergely, P., Nagy, G., Koncz, A. and Banki, K. (2004). Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends in Immunology*, 25(7): p. 360-7.
114. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 71(3): p. 209-249.
115. Waggoner, S.E. (2003). Cervical cancer. *Lancet*, 361(9376): p. 2217-25.
116. Bruni, L., Diaz, M., Castelsague, X., Ferrer, E., Bosch, F.X. and Sanjose, S. (2010). Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(12): p. 1789-99.
117. Crosbie, E.J., Einstein, M.H., Franceschi, S. and Kitchener, H.C. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, 382(9895): p. 889-99.
118. Cohen, P.A., Jhingran, A., Oaknin, A. and Denny, L. (2019). Cervical cancer. *Lancet*, 393(10167): p. 169-182.
119. Cibula, D., Pötter, R., Planchamp, F., Fischerova, D., Meder, C.H., Mathevet, P., Ponce, J. and Raspollini, M.R. (2018). The European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology Guidelines for the Management of Patients With Cervical Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 28(4): p. 641-655.
120. Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D.N. and Sankaranarayanan, R. (2018). Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynaecology Obstetrics*, 143 Suppl 2: p. 22-36.
121. Nayar, R. and Wilbur, D.C. (2015). The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathology*, 123(5): p. 271-81.
122. Cemazar, M., Parkins, J.S., Holder, A.L., Chaplin, D.J., Tozer, G.M. and Sersa G. (2001). Electroporation of human microvascular endothelial cells: evidence for an anti-vascular mechanism of electrochemotherapy. *British Journal of Cancer*, 84(4): p. 565-70.
123. Esmekaya, M.A., Kayhan H., Coskun, A. and Canseven A.G. (2016). Effects of Cisplatin Electrochemotherapy on Human Neuroblastoma Cells. *The Journal of Membrane Biology*, 249(5): p. 601-610.

124. Esmekaya, M.A., Kayhan, H., Yagci, M., Coskun, A. and Canseven A.G. (2017). Effects of Electroporation on Tamoxifen Delivery in Estrogen Receptor Positive (ER+) Human Breast Carcinoma Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 75(1): p. 103-109.
125. Bicek, A., Turel, I., Kanduser, M. and Miklavcic, D. (2007). Combined therapy of the antimetastatic compound NAMI-A and electroporation on B16F1 tumour cells in vitro. *Bioelectrochemistry*, 71(2): p. 113-7.
126. Saczko, J., Kaminska, I., Kotulska, M., Bar, J., Choromonska, A., Rembialkowska, N., Kusiak, K.B., Rossowska, J., Nowakowska, D. and Kulbacka, J. (2014). Combination of therapy with 5-fluorouracil and cisplatin with electroporation in human ovarian carcinoma model in vitro. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 68(5): p. 573-80.
127. Scuderi, M., Rebersek, M., Miklavcic, D. and Cerne, D.J (2019). The use of high-frequency short bipolar pulses in cisplatin electrochemotherapy in vitro. *Radiology and Oncology*, 53(2): p. 194-205.
128. Todorovic, V., Sersa, G., Flisar, K. and Cemazar, M. (2009). Enhanced cytotoxicity of bleomycin and cisplatin after electroporation in murine colorectal carcinoma cells. *Radiology and Oncology*, 43(4): p. 264-273.
129. Mączyńska, J., Choromanska, A., Kutkowska, J., Kotulska, M., Zalewski, M., Kulbacka, J. and Saczko, J. (2019). Effect of electrochemotherapy with betulinic acid or cisplatin on regulation of heat shock proteins in metastatic human carcinoma cells in vitro. *Oncology Reports*, 41(6): p. 3444-3454.
130. Vásquez, J.L., Ibsen, P., Lindberg, H. and Gehl, J. (2015). In vitro and in vivo experiments on electrochemotherapy for bladder cancer. *The Journal of Urology*, 193(3): p. 1009-15.
131. Electroporation-based therapies for cancer: From basics to clinical applications Introduction. *Electroporation-Based Therapies for Cancer: From Basics to Clinical Applications*, 2014(49): p. Xxxix-Xliii.
132. Frandsen, S.K., Gissel, H., Hojman, P., Eriksen, J. and Gehl, J. (2014). Calcium electroporation in three cell lines: a comparison of bleomycin and calcium, calcium compounds, and pulsing conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(3): p. 1204-8.
133. Hansen, E.L., Sozer, E.B., Romeo, S., Frandsen, S.K., Vernier, P.T. and Gehl, J. (2015). Dose-dependent ATP depletion and cancer cell death following calcium electroporation, relative effect of calcium concentration and electric field strength. *Plos One*, 10(4): p. e0122973.
134. Zielichowska, A., Daczewska, M., Saczko, J., Michel, O. and Kulbacka, J. (2016). Applications of calcium electroporation to effective apoptosis induction in fibrosarcoma cells and stimulation of normal muscle cells. *Bioelectrochemistry*, 109: p. 70-8.
135. Chen, J., Chen, Y. and He, Q. (2012). Action of bleomycin is affected by bleomycin hydrolase but not by caveolin-1. *International Journal of Oncology*, 41(6): p. 2245-52.
136. Linge, A., Weinhold, K., Blasche, R., Kasper, M. and Barth, K. (2007). Downregulation of caveolin-1 affects bleomycin-induced growth arrest and cellular

- senescence in A549 cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(10): p. 1964-74.
137. Liu, W., Zhao, Z., Na, Y., Meng, C., Wang, J. and Bai, R. (2018). Dexamethasone-induced production of reactive oxygen species promotes apoptosis via endoplasmic reticulum stress and autophagy in MC3T3-E1 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(4): p. 2028-2036.
138. Mrkvicova, A., Chmelarova, M., Peterova, E., Havalek, R., Baranova, I., Kazimirova, P., Rodolf, E. and Rezacova, M. (2019). The effect of sodium butyrate and cisplatin on expression of EMT markers. *Plos One*, 14(1): p. e0210889.
139. Asgar, M.A., Senawong, G., Sripa, B. and Senawong, T. (2015). Scopoletin potentiates the anti-cancer effects of cisplatin against cholangiocarcinoma cell lines. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(1): p. 69-77.
140. Kadenbach, B., Arnold, S., Lee, I. and Hüttemann, M. (2004). The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1655(1-3): p. 400-8.
141. Kadenbach, B., Ramzan, R., Moosdorf, R. and Vogt, S. (2011). The role of mitochondrial membrane potential in ischemic heart failure. *Mitochondrion*, 11(5): p. 700-6.
142. Iijima, T., Mishima, T., Tohyama, M., Akagawa, K. and Iwao, Y. (2003). Mitochondrial membrane potential and intracellular ATP content after transient experimental ischemia in the cultured hippocampal neuron. *Neurochemistry International*, 43(3): p. 263-9.
143. Esmekaya, M.A., Canseven, A.G., Kayhan, H., Tuysuz, M.H., Sirav, B. and Seyhan, N. (2017). Mitochondrial hyperpolarization and cytochrome-c release in microwave-exposed MCF-7 cells. *General Physiology and Biophys*, 36(2): p. 211-218.
144. Jan, R. and Chaudhry, G.E. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(2): p. 205-218.
145. Mungunsukh, O., Griffin, A.J., Lee, Y.H. and Day, R.M. (2010). Bleomycin induces the extrinsic apoptotic pathway in pulmonary endothelial cells. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 298(5): p. L696-703.
146. Sharifi, S., Barar, J., Hejazi, M.S. and Samadi, N. (2014). Roles of the Bcl-2/Bax ratio, caspase-8 and 9 in resistance of breast cancer cells to paclitaxel. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(20): p. 8617-22.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : GÜRSOY, Güney

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri

Medeni hali

e-mail

İletişim Bilgileri

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi /SBE/Biyofizik ABD	Devam ediyor
Yüksek lisans	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi / FBE/Fizik	2013
Lisans	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi / FEF/Fizik	2012
Lise	Muratpaşa Lisesi	2004

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2014-Devam ediyor	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

### Yabancı Dil

İngilizce

### Projeler

1. "Titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>) ve UV Radyasyonun Meme ve Deri Kanseri Hücreleri Üzerine Etkileri", Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, 01/2019-32, **Araştırmacı**, 2019-2022
2. "Öğrenci Danışmanlar Projesi: Servis Öğrenme Deneyimleri", Ahi Evran Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri, EGT.A3.16.001, **Araştırmacı**, 2016-2017
3. "Köy Okullarındaki Ortaokul Öğretmenlerinin Temel İlk Yardım ve KBRN Farkındalık Bilgi Düzeyinin Belirlenmesi ve Eğitim Etkinliğinin Değerlendirilmesi", Ahi Evran Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri, TIP.A3.16.004, **Araştırmacı**, 2016-2017

4. “Tokat ili ve çevresinde bulunan mermer yatakları ve topraklardaki radyasyonun belirlenmesi”, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri, **Araştırmacı**, 2013-2014

### **Yayınlar**

1. **G. Gürsoy**, M.A. Eşmekaya, Z. Çiçek, “Evaluation Of Calcium Electroporation In Cancer Treatment With In Vitro, In Vivo And Clinical Studies”, **Black Sea Journal of Health Science**, (2022)

2. M. Gokbulut, **G. Gursoy**, Ş. Aşçı, E. Eser, “ Study On Specific Heat Capacity and Thermal Conductivity of Uranium Nitride”, **Kerntechnik**, **86 (2021) 6**

3. M. Gürler, **G. Gürsoy**, H. Çiftçi, A. Salar, “Evaluation of Educational Activities in Raising Awareness Against Chemical, Biological, Radiation and Nuclear Risks and Basic Emergency Training”., **Black Sea Journal of Health Science**, doi:10.19127/bshealthscience.789761, (2021)

4. **G.Gursoy**, E. Eser,i. Yiğitoğlu, H. Koç, F.Ç. Kahraman, S. Yamçıçier “Assessment of the influence of a carbon fiber tabletop on the depth-dose for megavoltage photon beams”. **International Journal of Radiation Research**, (2018)

5. I. Yigitoglu, E. Eser, B. Çetin, S. Kılıçaslan, F. Oner, S. Yamcicier, **G. Gursoy**, and H. Koç, “Determination of Natural Radioactivity Levels in Soil and Travertine of the Region of Tokat-Sivas, Turkey”. **Arabian Journal of Geosciences**, (2018)

6. E.Eser, H. Koc, M. Gokbulut, **G. Gursoy**, “Estimations of heat capacities for actinide dioxide: UO<sub>2</sub>, NpO<sub>2</sub>, ThO<sub>2</sub>, and PuO<sub>2</sub>”, **Nuclear Engineering And Technology**, Vol.46, No.6, (2014)

### **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler**

1. **G.Gursoy**, M.A. Esmekaya, “Use of Electrochemotherapy in Cancer Treatment”, **I. International Ahi Evran Medicine and Health Science Congress, 11-14 April 2019, Kırşehir/TURKEY**

2. **G.Gursoy**, M.Gurler, A.Salar, H. ÇİFTÇİ “KBRN Farkındalık Düzeyinin Belirlenmesi Ve Eğitim Etkinliğinin Değerlendirilmesi” **International CBRN Congress, 5-7 NOVEMBER, 2017, Ankara/TÜRKİYE**
3. I. Yigitoglu, E. Eser, B. Çetin, S. Kılıçaslan, F. Oner, S. Yamcicier, **G. Gursoy**, and H. Koç, “Determination of Natural Radioactivity Levels in Soil and Travertine of the Region of Tokat-Sivas, Turkey”. **4th International Conference On Computational And Experimental Science And Engineering, 2017**
4. E. Eser, H. Koc, M. Gokbulut, **G. Gürsoy** and A. Yalcin, “ An investigation of thermodynamic properties of actinide dioxide  $\text{ThO}_2$ ”, **VI. International Workshop on Nuclear Structure Properties, 18-20 SEPTEMBER, 2013, Karabük / TURKEY.**
5. **G.Gursoy**, I.Yığıtoğlu, E. Eser, S. Yıldırım, S. Kılıçaslan, B. Mavi, F. Oner, I. Akkurt “Natural Radiactivity Measurements in Marble and Traverten Mines in the Region of Tokat –Sivas”, **VII. International Workshop on Nuclear Structure Properties, 27-29 October,2014 Sinop/TURKEY**
6. A. Yalcin , M. Gokbulut, **G. Gursoy**, I. Yigitoglu , E. Eser and H. Koc, “Investigation of neutron densities of some even-even Sn isotopes”, **NUFRA 2013 / Antalya.**
7. H. Koç, I. Yigitoglu, M. Gökbulut, **G. Gürsoy** and E. Eser, “Calculations of thermodynamic properties of some nuclear fuels”, **NUFRA 2013 / Antalya.**
8. E. Ozer, I. Yigitoglu, D. Isler, M. Danchev, D. Balabanski, B. Akkus, C.W. Beausang, M. Bostan, R.F. Casten, M.K. Djangolov, M.N. Erduran, S. Erturk, K.A. Vladnishki, G.Gurdal, **G. Gursoy**, J.TM. Goon, E. Eser, ND.J. Hartley, A.A. Hecht, H. Koc, R. Krucken, J.R. Novak, Y. Oktem, G. Rainovski, I.I. Riedinger, S. Yildirim, N.V. Zamfir, and O.Zeidan, “The investigation of high spin states of  $^{187}\text{Ir}$ ”, **NUFRA 2013 / Antalya.**
9. D. Bonatsos, D. Lenis, D. Petrellis, P. A. Terziyev, I. Yigitoglu, S. Yıldırım, E. Eser, H. Koc, **G. Gursoy**, „ $\gamma$ -rigid solutions of the bohr hamiltonian for  $\gamma=30^0$  and  $\gamma=0^0$ ”, **NUFRA 2013 / Antalya.**
10. A. Yalcin, M. Gokbulut, **G. Gursoy**, H. Koc and E. Eser, “ A review of the distribution of density of tin isotopes”, **VI. International Workshop on Nuclear Structure Properties, 18-20 SEPTEMBER, 2013, Karabük / TURKEY**

**Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler**

- 1. G. Gürsoy, M.A. Eşmekaya, Z. Çiçek, M. Özler, “Serviks Kanseri Hücrelerinde (HeLa) Elektroporasyon Parametrelerinin Belirlenmesi”, 1. Ulusal Biyolojik Bilimler Kongresi, 16-18 Aralık, 2021, Ankara/TÜRKİYE**
- 2. M.Gurler, G.Gursoy, A.Salar, “Öğrenci Danışmalar Projesi: Servis Öğrenme Deneyimleri”, 9. Ulusal Yaşlılık Kongresi, 4-6 Mayıs, 2017, Kırşehir/TÜRKİYE**

**Yazılan ulusal/uluslararası kitaplardaki bölümler**

- 1. Ambulans ve Acil Bakım Teknikerleri (Paramedik) İçin Temel Konular ve Tedavi Yaklaşımları, Hasta/Yaralı Taşıma Teknikleri Bölümü, 2016**



*GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..*



ՀԱՅԿԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ

