Özgün Araştırma / *Original Article*

Bezmialem Science 2017; 5: 168-74
DOI: 10.14235/bs.2017.1417

Ehrlich Asit Karsinomu Oluşturulmuş Farelerde Yüksek Yoğunluklu Odaklanmış Ultrason Dalgaları (HIFU) Etkinliğinin in vivo Araştırılması

In vivo Efficacy of HIFU (High Intensity Focused Ultrasound) on Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma

Mustafa HASBAHÇECİ[1], Tuğba KİRİŞ[2], Gökhan ÇİPE[3], Rasul SHARIFOV[4], Zuhal GÜCİN[5], Sadık KARA[6], Öykü ONARAN[7], Mahmut MÜSLÜMANOĞLU[8]

[1]Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye
[2]İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye
[3]Medicana International Hastanesi, İstanbul, Türkiye
[4]Radyoloji Anabilim Dalı, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye
[5]Patoloji Anabilim Dalı, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye
[6]Emekli Öğretim Üyesi, İstanbul, Türkiye
[7]Tıp Fakültesi Öğrencisi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye
[8]Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrasonun (HIFU) fokal bir alana uygulanması ile yüksek ısı ve sonrasında koagülasyon nekrozu ve kavitasyon oluşmaktadır. HIFU'nun bu özelliği kanserli dokuların yıkımında kullanılmasına imkan tanımaktadır. Farklı kanser çeşitlerinde HIFU' nun etkin kullanımı ve klinik uygulamaları ile ilgili verilere ulaşılabilmesi için, Balb/c fareler üzerinde oluşturulmuş Ehrlich asit karsinom modelindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Donör farenin periton boşluğundan elde edilen taze Ehrlich asit tümör hücreleri, çalışma grubundaki farelerin flank bölgesine enjekte edildi. Toplam 24 deney hayvanı tümör oluşumu sonrası kontrol (Grup 1), SHAM tedavi (Grup 2) ve HIFU tedavi (Grup 3) olarak belirlenmiş üç gruba eşit olarak dağıtıldı. HIFU uygulaması (frekans 1,5 MHz), ultrason görüntüsü altında hipoekoik tümör dokusu hiperekoik olana kadar, her 10 sn'de bir 1000 milisaniye olacak şekilde gerçekleştirildi. Tedavi etkinliğinin belirlenmesi için tedavi öncesi (Hacim 1) ve sonrası tümör çapı ölçümleri ve tümör hacmi hesaplamaları (Hacim 2) yapıldı. İkinci haftanın sonunda, geride kalan tümör dokusunun histopatolojik incelemesi için hayvanlar sakrifiye edildi.

Bulgular: Her üç grupta tedavi sonrası tümör boyut ve hacimlerinde artış görüldü. Patolojik olarak tümörler ekspansif büyüme paternine sahip solid karsinom şeklinde idi. Nekroz yüzdesi Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 için sırası ile 70±9,6, 70±9,4 ve 75,6±4,17 olarak bulundu. Grup 1 ve grup 3'e ait Hacim 2 değerleri ile grup 2'e ait Hacim 2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü (sırası ile p=0,004 ve p=0,0001).

Sonuç: Yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason, tümör hacmindeki artışı azaltıcı etkisi ve patolojik olarak nekroz oluşturması nedeniyle, Ehrlich asit tümör modelinde etkili bir yöntemdir. Tümör hacminde bir küçülmenin sağlanabilmesi için, HIFU'nun tedavi süresinin arttırılması, tedavinin tekrarlı olarak uygulanması veya tedaviye tümör oluşum sürecinde erken dönemde başlanmasının etkili olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason, Ehrlich asit karsinomu, balb/c fare, kanser

ABSTRACT

Objective: Cavitation and coagulation necrosis due to high temperature caused by application of the high intensity focused ultrasound (HIFU) to a focal area occurs. This feature makes HIFU possible to use in the destruction of cancerous tissue. In this study, it was aimed to determine the effect of HIFU on Balb/c mice with Ehrlich ascites tumor model to reach effective usage of HIFU with its clinical and experimental applications in various types of cancer.

Methods: Ehrlich ascites tumor cells were obtained from the intraperitoneal region of a donor mouse. Fresh ehrlich ascites tumor cells were injected into 24 mice that were randomly distributed after tumor formation as a control (Group 1), sham treatment (Group 2) and HIFU treatment (Group 3). HIFU application was performed under ultrasound image until conversion of the hypoechoic tumor tissues to hyperechoic appearances. Tumor size and volumes were measured

Results: Tumor sizes and volumes in all groups showed an increase after the treatment. Pathologically all tumors were solid carcinoma with an expansive growth pattern. Necrosis percentages in Group 1, Group 2 and Group 3 were 70±9.6, 70±9.4 and 75.6±4.17, respectively. With regard to Volume 2, there were significant differences between Group 2 and both Group 1 and 3 (p=0.004 and p=0.0001, respectively).

Discussion: High intensity focused ultrasound is an effective method in Ehrlich ascites tumor model via prevention of tumor growth and production of necrosis. To achieve a reduction in tumor volume, increasing the duration of HIFU treatment and/or repeatedly application of the treatment is thought to be effective.

Keywords: High intensity focused ultrasound, Ehrlich ascites carcinoma, balb/c mice, cancer

Cite this article as: Hasbahçeci M, Kiriş T, Çipe G, Sharifov R, Gücin Z, Kara S, et al. In vivo Efficacy of HIFU (High Intensity Focused Ultrasound) on Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. Bezmialem Science 2017; 5: 168-74.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Mustafa Hasbahçeci; Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye E-mail: hasbahceci@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 21.03.2016
Kabul Tarihi / Accepted: 24.10.2016

©Telif Hakkı 2017 Bezmialem Vakif Üniversitesi - Makale metnine www.bezmialemscience.org web sayfasından ulaşılabilir.
©Copyright 2017 by Bezmialem Vakif University - Available online at www.bezmialemscience.org

Giriş

Yüksek enerjili ve düşük frekanslı ultrason (US) dalgalarının küçük fokal bir alana uygulanması ile oluşan yüksek ısının oluşturduğu koagülasyon nekrozu ve kavitasyon, yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrasonun (high-intensity focused ultrasonography, HIFU) etki mekanizmasıdır (1, 2). HIFU'nun dışardan uygulanması ile deride herhangi bir etki oluşmaksızın, US dalgalarının fokal uzunluk alanının ulaştığı dokularda cigar şekilli ablasyon bölgeleri oluşmaktadır (3). Kavitasyon oluşumu ile görülen hava damlacıklarının boyutlarında artış olmakta, patlama ve yırtılma ile ısı artışı yanında büyük gerilim basınçları görülmektedir (2). Koagulasyon nekrozuna bağlı hızlı hücre ölümü gerçekleşmesi için, 1 saniyede canlı doku ısısının 56°C'nin üzerine çıkarılması yeterli olmakta, HIFU ile dokularda 80-90°C'ye ulaşan ısı artışları görülmektedir (1, 4). Bu patolojik olaylar hücreler için ölümcül olmakta ve kanserli dokuların yıkımında kullanılmaktadır.

Son yıllarda HIFU birçok benign ve malign hastalıkta kullanılmaktadır. Tekniğin gelişim sürecinde odaklanma ve tedavi zamanı ile ilgili elde edilen iyileşmeler sayesinde, HIFU giderek daha yaygın bir şekilde kullanılır hale gelmiştir (1). Lokal ileri prostat kanseri hastalarının tedavisinde transrektal yoldan 3 MHz frekansında kullanılmış ve başarılı sonuçlar rapor edilmiştir (5). Maestroni ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, prostat kanserinin lokal kontrolünde %84 başarı oranı elde edilmiştir. Blana ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise HIFU'nun prostat kanserinde %66 oranında hastalıksız sağ kalım sağladığı gösterilmiştir (6). Aynı şekilde HIFU uygulanan meme kanserli hastaların işlem sonrası patolojik incelemelerinde koagülasyon nekrozu geliştiği gösterilmiştir (7, 8). Hepatoselüler karsinom, renal hücreli karsinom, benign tiroid nodülleri, uterus myomları, lokal ileri rektum ve pankreas kanserleri üzerinde HIFU'nun etkili olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (1, 9-13).

HIFU tekniğinin çeşitli kanser çeşitlerinde etkin kullanımının bilinebilmesi ve klinik uygulanımı ile ilgili teknik verilere ulaşılabilmesi için, kolon ve pankreas kanseri hayvan modellerinde kısıtlı sayıda deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir (2, 14). Erken prostat kanserinin cerrahi dışı tedavisinde yaygın klinik kullanım alanına sahip olan HIFU'nun, gastrointestinal sistem kanserlerinde de uygulama alanı bulabilmesi için daha çok sayıda deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır.

Tedavi edici özellikteki US'un Ehrlich asit tümör modelinin kullanıldığı kısıtlı sayıda deneysel çalışma vardır (15-17). Kesme kuvveti ve oksijen radikallerinin yol açtığı hücre zarı hasarı ile geçirgenlikte bir artış ve buna bağlı akustik kavitasyona sayesinde tümör gelişiminin engellendiği gösterilmiştir (16). Deneysel çalışmalarda US'un kemoterapötik özellikteki ajanların etkisini artırdığı tespit edilmekle birlikte, tedavi edici US'un Ehrlich asit modelinde tek başına etkisi çalışılmamıştır (15, 17).

Bu çalışmada, HIFU'nun Balb/c fareler üzerinde oluşturulmuş Ehrlich asit tümör modelindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler

Çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2013/205 proje numarasıyla onaylandı. Deney hayvanları, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi Laboratuvarı tarafından temin edildi ve deney süresince aynı laboratuvarda 23°C sıcaklık ve 12 saatlik gece-gündüz döngüsünde gözetim altında tutuldu. Çalışmada ağırlıkları 25-30 gr arası değişen toplam 5-7 haftalık 24 erkek Balb/c fare kullanıldı.

Çalışmada Ehrlich tümör hücresi eldesi için öncelikle, donör farenin periton boşluğuna 1 ml -$1.5x10^7$ Ehrlich asit tümör hücreleri enjekte edildi (Şekil 1-a). Her dört günde bir kontrol edilerek karın bölgesinde şişlik oluşup oluşmadığı gözlemlendi. 7-10. gün sonunda karın şişliği gelişen donör farede Ehrlich asit tümörü hücrelerinin bulunduğu asit sıvısı alınarak (Şekil 1-b), deney grubu farelerin sol yan bölgesine subkutan yolla içerisinde -$1.5x10^5$ tümör hücresi olacak şekilde 0,5 ml olarak enjekte edildi. İnokülasyonu takiben 7-10 gün içerisinde enjeksiyon bölgelerinde şişkinlik ve kızarıklıklar oluşmaya başlayan hayvanlar, ortalama 2-3 hafta sonunda, dijital kaliper yardımıyla ölçülen tümör büyüklük çapı 5-6 mm'ye (tümör çapı yaklaşık 1 cm^3) ulaştıktan sonra deneye dahil edildi (Şekil 2).

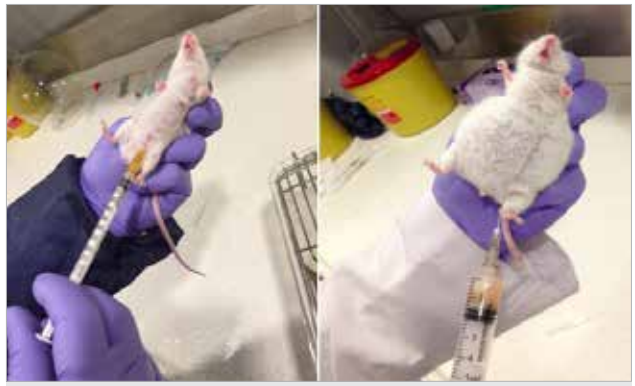
Tümör çapı 5-6 mm olduğunda US cihazı (3,5 MHz) ile tümör hacmi ölçümü yapıldı.

Çalışmada her bir grupta randomize olarak belirlenmiş sekizer deney hayvanı olmak üzere toplam 24 deney hayvanı kullanıldı. Gruplar kontrol (Grup 1), Sham tedavi (Grup 2) ve HIFU tedavi (Grup 3) olarak belirlendi.

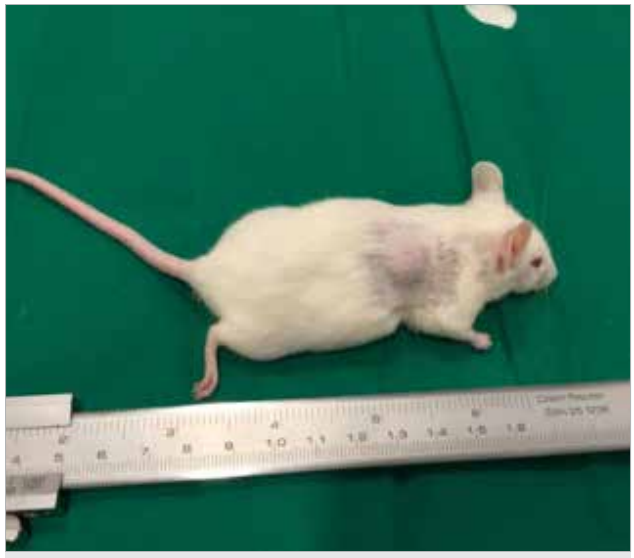
Grup 1 - Kontrol Grubu

Bu gruptaki deneklerde, tümör enjeksiyonundan sonra kitle oluşumu gözlemlenip, sonrasında herhangi bir tanısal ve tedaviye yönelik işlem yapılmadı.

Grup 2 - Sham Tedavi Grubu



Şekil 1. Periton içerisinde Ehrlich asit tümör solüsyonu enjeksiyonu (a); Karında belirgin distansiyon gelişen farede, intraperitoneal tümör içeren solüsyonun perkütan yolla alınması (b)



Şekil 2. Subkütan bölgede tümör oluşmuş denek fare görüntüsü



Şekil 3. HIFU tedavisi esnasında fareye pozisyon verilmesi ve tedavi uygulaması

Deneklere, tümör hücresi enjeksiyonu sonrası sadece tanısal US (frekans 3,5 MHz) yapıldı.

Grup 3 - HIFU Tedavi Grubu

Deneklere işlem öncesi intraperitoneal ketamin hidroklorid (35mg/kg) (Ketalar®, Pfizer, NY, USA) ve %2'lik ksilazin (5mg/kg) (Rompun®, Bayer; Leverkusen, Germany) ile anestezi verildi. Gerektiğinde dozlar tekrarlandı. Yeterli sedasyon sağlandıktan sonra, cihazın probu ile denek arasındaki hava ortamını önlemek için bölge traşlanıp koruyucu jel uygulandı. Daha sonra denekler lateral dekübit pozisyonda yatırılıp ve HIFU uygulaması (Wuxi Haiying Techonology, China, frekans 1,5 MHz), US görüntüsü altında hipoekoik tümör dokusu hiperekoik olana kadar, her 10 sn' de bir 1000 milisaniye olacak şekilde gerçekleştirildi (Şekil 3).

İşlem öncesi ve sonrası US ekran görüntüleri kaydedildi. Kullanılan HIFU cihazı, klinikte prostat kitlelerinin tedavisinde kullanılmak üzere US ünitesi ile birlikte işlemci ünitesi şeklinde geliştirilmiştir. US cihazının başlığı elipsoid şeklinde olup, boyutları ışıma ekseninde 20 mm ve transvers yönde 1,9 mm idi. Tedavi uygulama süresi saniye olarak kaydedildi.

Tedavi uygulamasının ardından US cihazı ile 1 hafta boyunca tümör hacimleri ölçüldü. Tedavi etkinliğinin belirlenmesi için tedavi öncesi ve sonrası tümör çapı ölçümleri (tedavi öncesi dönem için Çap1 1, Çap 1 2; tedavi sonrası dönem için Çap 2 1 ve Çap 2 2) ve tümör hacmi hesaplamaları (tedavi öncesi dönem için Hacim 1 ve tedavi sonrası dönem için Hacim 2) yapıldı. Bunun için bir dijital kaliper yardımıyla en büyük iki tümör çapı (cm) ölçüldü. Bu değerlerden yararlanılarak tedavi öncesi ve sonrası tümör hacmi hesaplaması [(çapXçap)/2 cm^3] gerçekleştirildi. İkinci haftanın sonunda, geride kalan tümör dokusu çevresinde en az 2 mm sağlam doku içerecek şekilde sakrifikasyonun (70 mg/kg ketamine) hemen ardından çıkartılarak histopatolojik inceleme için patoloji laboratuvarına formol içerisinde gönderildi. Patoloji laboratuvarında gönderilen spesmenler, parafin bloklar hazırlandıktan sonra, hemotoksilen-eozin boya kullanılarak, ışık mikroskopu altında nekroz varlığı ve yüzdesi, tümör boyutu, histolojik grade, büyüme tipi ve varsa diğer özellikleri bakımından değerlendirildi.

İstatistiksel Değerlendirme

Veriler Statistical Package for Social Sciences 12.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) programında işlendi. Sürekli değişkenler ortalama±standart sapma, süreksiz değişkenler frekans ve yüzde olarak verildi. Grup varyanslarının homojenliğinin belirlenmesi için Levene testi uygulandı. Her bir grupta, grup içi iki farklı değişken olan hacim 1 ve hacim 2'nin karşılaştırılması amacıyla t testi yapıldı. Her bir grup için hacim 1 ile hacim 2 arası anlamlılık, Hacim 1 için gruplar arası anlamlılık ve Hacim 2 için gruplar arası anlamlılık belirlendi. Her üç grubu Hacim 1 ve Hacim 2 değişkenleri bakımından karşılaştırmak için tek faktörlü varyans analizi (One-way Anova) testi, bir fark tespit edildiğinde bu farkın hangi gruplar arasındaki farktan kaynaklandığını bulmak amacıyla post-hoc Tukey testi ile çoklu karşılaştırma yapıldı. P değerleri %95 güven aralığında 0,05'den küçük bulunduğunda karşılaştırmalar anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Deneklerde tümör oluşumundan sonra tedavi öncesi dönemdeki tümörlere ait çapı ve hacimleri, bu tümörlerin tedavi sonrası değişimleri Tablo 1'de verildi. Yüksek enerjili ve düşük frekanslı ultrason tedavi grubunda (Grup 3) ortalama tedavi süresi 26±2,82 saniye olarak gerçekleşti.

Bütün gruplarda eksize edilen tümörlerin tamamı makroskopik olarak ekspansif büyüme paternine sahipti. Aynı şekilde mikroskopik olarak yüksek histolojik dereceli solid karsinom idi (Şekil 4). Tümörlerin boyutları ve nekroz yüzdeleri Tablo 2'de

verildi. Nekroz yüzdeleri açısından gruplar arası farklılık saptanmadı (p>0,05). Yüksek enerjili ve düşük frekanslı ultrason grubunda bir denekte sarkomatoid iğsi hücre gelişimi, beş denekte parsiyel bağ dokusu oluşumu saptandı.

Her bir grup için Hacim 2 ile Hacim 1 arasındaki değişimlerin [Δ(hacim 2-hacim 1)] istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (her bir grup için sırası ile p=0,0001, p=0,0001, p=0,006). Hacim 2 ve hacim 2 ile hacim 1 değişimleri arasında da anlamlı bir fark olduğu tespit edildi (Tablo 3).

Hacim 2 değeri için grup 1 bağımsız değişken olarak kabul edildiğinde, grup 2 ve grup 3'e ait Hacim 2 değerleri ile grup 1'e ait Hacim 2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü (sırası ile p=0,004 ve p=0,0001) (Tablo 4). Δ(hacim 2-hacim 1) için grup 2 bağımsız değişken kabul edildiğinde, grup 3 Δ(hacim 2-hacim 1) ile grup 1'e ait Δ(hacim 2-hacim 1) değerleri arasında (p=0,005); benzer şekilde Δ(hacim 2-hacim 1) için grup 1 bağımsız değişken kabul edildiğinde, grup 2 ve grup 3'ün her birine ait Δ(hacim 2-hacim 1) değerleri ile grup 1'e ait Δ(hacim 2-hacim 1) değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görüldü (sırası ile p=0,003 ve p=0,0001).

Tablo 1. Tedavi öncesi ve sonrası tümör çap ve hacim değerleri

Grup	Çap 1 1 (cm)	Çap 1 2 (cm)	Hacim 1 (cm^3)	Çap 2 1 (cm)	Çap 2 2 (cm)	Hacim 2 (cm^3)
Grup 1	1,22±0,19	0,54±0,06	0,16±0,02	1,47±0,18	0,75±0,07	0,30±0,05
Grup 2	1,37±0,06	0,48±0,04	0,18±0,03	1,58±0,06	0.61±0,05	0,40±0,06
Grup 3	1,24±0,18	0,51±0,07	0,17±0,04	1,33±0,04	0,6±0,08	0,23±0,06

Tablo 2. Histopatolojik değerlendirme sonuçları

	Boyut (cm)	Nekroz (%)
Grup 1	2,38±0,35	70±9,4
Grup 2	2,44±0,56	70±9,6
Grup 3	2,13±0,51	75,6±4,17

Tartışma

Bu çalışmada, Ehrlich asit tümör modeli ile subkutan tümör oluşturulmuş Balb/c fare modelinde, HIFU'nun etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, HIFU tedavisi ile tümör büyümesinin yavaşlatıldığı, patolojik olarak nekroz gelişiminin oluştuğu gösterildi.

Literatürde HIFU ile ilgili gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda, özellikle kolon ve pankreas adenokarsinom hücrelerinin yer aldığı modeller kullanılmıştır (2, 14, 18). Bu çalışmada,

Tablo 3. ANOVA analizi

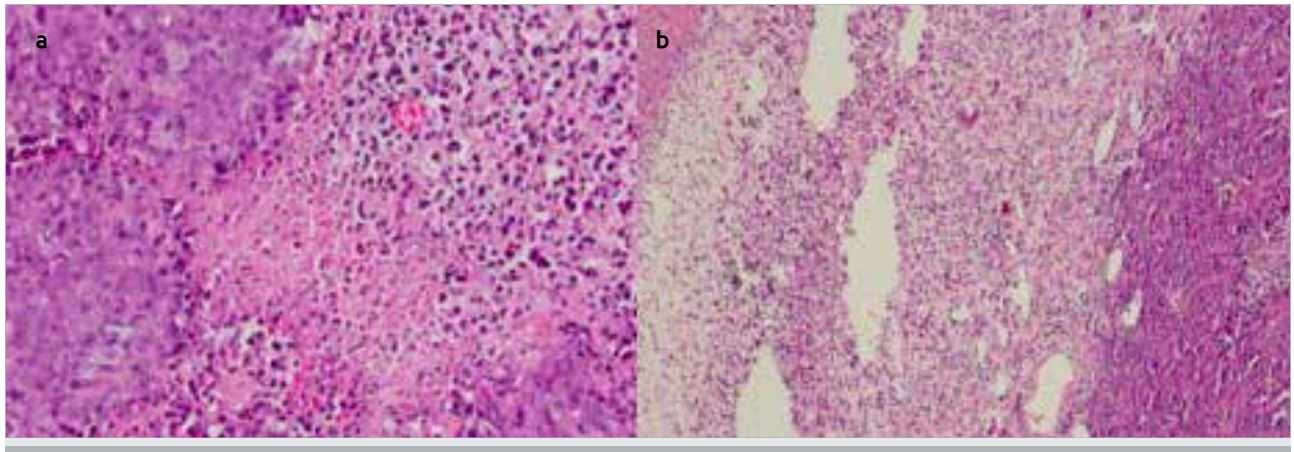
	F	p
Hacim 1	0,819	0,454
Hacim 2	19,126	0.0001
Δ(hacim 2-hacim 1)	26,572	0.0001

ANOVA: analysis of variance

Tablo 4. Post-Hoc Tukey HSD testi ile gruplar arası anlamlılık analizi

Parametre	Bağımsız değişken		p
Hacim 2	Grup 1	Grup 2	0,004
		Grup 3	0,051
	Grup 2	Grup 1	0,004
		Grup 3	0,0001
Δ(hacim 2-hacim 1)	Grup 1	Grup 2	0,003
		Grup 3	0,005
	Grup 2	Grup 1	0,003
		Grup 3	0.0001

HSD: honest significant difference



Şekil 4. (a, b.) Yüksek dereceli solid karsinom ve nekroz alanı (H&E x400) (a); sol üstte merkezinde bağ dokusu oluşumu görülen yaygın nekroz alanı (H&E x100) (b)

kolon kanseri hücre hattı (HT-29 (HTB-38™)) kullanılarak yapılaninokülasyon neticesinde solid tümör elde etmek mümkün olmamıştır. Bu yüzden Ehrlich asit tümör modeline geçiş yapılmıştır. Literatür taraması yapıldığında, HIFU'nun Ehrlich asit tümör modelinde kullanımı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Dolayısıyla, bu hücre modeli temel alındığında HIFU' nun ilk kullanımı gerçekleşmiştir.

Son yıllarda US teknolojisinin tanısal işlemler yanında, değişik patolojik özellikteki tümörlerde tedavi amaçlı kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Bu kapsam dahilinde HIFU'nun özellikle küçük solid tümörlerde kullanımına yönelik deneysel ve klinik uygulamalar bulunmaktadır (2). Bu tür tedaviler gerek radikal cerrahinin bir parçası ve gerekse palyatif amaçlı olarak kullanılabilmektedir. Buna rağmen, US dalgalarının malign dokular üzerindeki biyolojik etkileri halen araştırılmaktadır. Her ne kadar malign özellikte olmayan dokuların US enerjisine biyolojik cevapları farklı olabilmekle birlikte, kanserli doku ve hücrelerin daha hassas olduğu, tedavi ile hücre proliferasyonunun ve kolon tümör oluşumunun baskılanabildiği ve kemoterapötik ilaçların etkisinin artırılabildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (19, 20). Fakat bu çalışmada, HIFU'nun normal dokular üzerindeki etkisi çalışılmamış, sadece kanserli dokular üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu yüzden, çalışmadan elde edilen verilerle HIFU'nun normal ve kanserli dokular üzerindeki etkisi hakkında bir karşılaştırma yapmak olmamıştır.

Kanserli dokuların US enerjisi ile karşılaştırıldığında görülen biyolojik etkiler arasında ısı, mekanik etkileşim ve akustik kavitasyon bulunmaktadır (2). Bu mekanizmalar arasında akustik kavitasyonun en etkili mekanizma olduğu düşünülmektedir (21). Kollaps olan dokularda açığa çıkan kısa süreli yüksek ısı ve yüksek basınç, havacıkların oluşmasına ve basınç artışının devam etmesine yol açmaktadır. Bu zaman diliminde oluşan patolojik olaylar, "sonoluminescence" olarak tanımlanan ses enerjisinin ışık enerjisine dönüşümüne açmakta ve bu durum US altında görülebilmektedir. Çalışmada HIFU uygulanırken, tümörlü dokuların hiperekoik olana kadar tedaviye devam edilmesi bu mekanizmaya dayanmaktadır (18). Deney süresince, HIFU tedavisi yapılan deneklerde, US altında karakteristik bir görünüm elde edilmiştir. Dolayısıyla, işlem esnasında tanısal US'un kullanılması önemli bir yardımcı unsurdur (22, 23).

Literatürde yapılan çalışmalarda, HIFU yapılan tedavi gruplarında tümör hacminde anlamlı azalmalar tespit edilip, kontrol ve sham gruplarında tümör büyümesinin devam ettiği gösterilmiştir (15, 24, 25). Bu çalışma da ise, kontrol, sham ve HIFU tedavi gruplarında tümör büyümesi devam etmiştir. Kontrol (Grup 1) ve sham (Grup 2) gruplarında Hacim 1 ve Hacim 2 verileri arasında istatistiksel anlamlı fark olması, tedavi edilmediği takdirde tümörlerin büyümeye devam ettiğini göstermektedir. HIFU tedavi grubunda (Grup 3) tedavi öncesi (Hacim 1) ve tedavi sonrası (Hacim 2) verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Grup 1 ve grup 2 dikkate alındığında, grup 3 için Hacim 1 değerine göre Hacim 2 değerinde bir artış olmasına rağmen, rakamsal değer olarak anlamlı bir etkinin olduğu sonucuna ulaşılabilir. Çünkü grup 1 ve grup 2 için tümör hacminde ortalama değer üzerinden sırası ile %87,5 ve %122,2'lik artış görülmekle birlikte, grup 3 için bu artış oranı % 35,3'tür. Tedavi edici US'un Ehrlich asit modelinde kombine kullanımı ile tümör büyümesini azalttığı daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (15, 17). Dolayısıyla uygun teknik özelliklerin kullanımı ile etkin bir tümör hacim azalması ya da tümör dokusunun tamamen ortadan kaldırılması mümkün olabilir.

Anova varyans analizi ile yapılan üçlü analizde Hacim 2 değerleri ile Δ(hacim 2-hacim 1) değişiminde anlamlı farkların olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu farkın hangi gruplar arasındaki farklılıktan kaynaklandığının tespit edilmesi için yapılan post-hoc Tukey testinde, grup 3'e ait Hacim 2 değerinin grup 2'ye ait Hacim 2 değerine göre anlamlı olarak daha az olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Fakat grup 1 ve grup 3'e ait Hacim 2 değerleri arasında bir farklılık bulunamamıştır. Dolayısıyla HIFU tedavisinin tümör hacmi üzerindeki etkisi sadece sham grubuna göre anlamlılık göstermiştir. Fakat Δ(hacim 2-hacim 1) incelendiğinde, grup 1 ve grup 2 bağımsız değişken olarak kabul edildiğinde, grup 3 için geçerli olan Δ(hacim 2-hacim 1) istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir. Bu Δ(hacim 2-hacim 1) değere göre HIFU' nun sham ve kontrol gruplarına göre tümör hacmi değişimi üzerinde anlamlı etkisi gösterilmiştir. Dolayısıyla, HIFU' nun tümör hacmindeki artışı azaltıcı etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Tümör hacminde bir küçülmenin sağlanabilmesi için, HIFU'nun uygulama süresi ile ilgili teknik düzenlemelerin gerekebileceği kanaatine ulaşılabilir. Bunun gösterilebilmesi için süre ile ilişkili teknik farklılıkların olduğu deney modellerine gereksinim vardır.

Bazı çalışmalarda ışık mikroskopisinin nekrozun belirlenmesinde yeterli olmayabileceği, bu yüzden elektron mikroskopisinin gerekebileceği önerilmektedir (18). HIFU tedavisine bağlı hücre ölümlerinin en çok ısı etkisi ile oluşan nekroz olduğu gösterilmekle birlikte, apoptozun hipertermiye bağlı nekrozlarda hücre ölümlerinden primer sorumlu mekanizma olduğu da düşünülmektedir (26). Çalışmada deneklerde sadece nekroz varlığı üzerine yoğunlaşılmış, nekrotik dokunun spesmenlerin büyük bir kısmını kapsadığından apoptoz dahil detaylı patolojik inceleme yapılamamıştır. HIFU tedavi grubu ile birlikte kontrol ve sham gruplarındaki deneklerde rastlanılan nekroz gelişimine tümör çapı 5-6 mm olana kadar beklenmesinin etkili olduğu düşünülmektedir. Tümör gelişiminin devam ettiği durumlarda, yeteri kadar damarlanmanın oluşamamasından dolayı nekrotik bölgelerin oluşması beklenebilir. Oluşan nekrozun sebebini bulabilmek için tedavi grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, bağ dokusu oluşumunun sadece tedavi grubunda olduğu görüldü. Dolayısıyla, bu tür patolojik değişimlerin sadece tedavi grubunda olması, HIFU'nun patolojik olarak bir etki gösterdiği lehine değerlendirildi. Tedavi grubunda görülen bağ dokusu oluşumları daha çok nekrotik dokunun rezorbe edilmesi, apse oluşumu, kalsifikasyon gelişimi ve rejenerasyon süreci ile ilişkili olarak

değerlendirilmektedir. Dolayısıyla, tedavi grubunda tespit edilen bu tür değişimlerin, HIFU'nun termal ya da mekanik etkisi ile oluşan nekroza ikincil olduğu söylenebilir.

Sonuç

Çalışmada elde edilen veriler ışığında, Ehrlich tümörü oluşturulmuş Balb/c farelerde HIFU tedavisine, tümör hacmi ve histopatolojik özellikler dikkate alındığında kısmi yanıt alındığı söylenebilir. Tedavisi süresinin arttırılması, tedavinin birkaç gün art arda tekrarlı olarak uygulanması veya tedaviye tümör oluşum sürecinde erken dönemde başlanmasının HIFU tedavisinden tam yanıt alınmasında etkili olabileceği düşünülmüştür.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Experimental Animals Application and Research Center of Bezmialem Vakıf University.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - G.Ç., T.K.; Design - G.Ç., M.H.; Supervision - M.H.; Resources - M.H., T.K.; Materials - Z.G., R.S.; Data Collection and/or Processing - T.K., Ö.O., M.H.; Analysis and/or Interpretation - Z.G., M.H.; Literature Search - M.H., Ö.O.; Writing Manuscript - M.H., T.K.; Critical Review - M.M., S.K.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was financially supported by the TÜBİTAK within the scope of 3001 program (Project No: 213S104).

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - G.Ç., T.K.; Tasarım - G.Ç., M.H.; Denetleme - M.H.; Kaynaklar - M.H., T.K.; Gereçler - Z.G., R.S.; Veri Toplama ve/veya İşleme - T.K., Ö.O., M.H.; Analiz ve/veya Yorum - Z.G., M.H.; Literatür Taraması - M.H., Ö.O.; Yazıyı Yazan - M.H., T.K.; Eleştirel İnceleme - M.M., S.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma TÜBİTAK 3001 programı çerçevesinde TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 213S104).

Kaynaklar

1. Monzon L, Wasan H, Leen E, Ahmed H, Dawson PM, Harvey C, et al. Transrectal high-intensity focused ultrasonography is feasible as a new therapeutic option for advanced recurrent rectal cancer: report on the first case worldwide. Ann R Coll Surg England 2011; 93: e119-21. [CrossRef]
2. Sazgarnia A, Shanei A, Taheri AR, Meibodi NT, Eshghi H, Attaran N, et al. Therapeutic effects of acoustic cavitation in the presence of gold nanoparticles on a colon tumor model. J Ultrasound Med 2013; 32: 475-83. [CrossRef]
3. Dubinsky TJ, Cuevas C, Dighe MK, Kolokythas O, Hwang JH. High intensity focused ultrasound: current potential and oncologic applications. Am J Roentgenol 2008; 190: 191-9. [CrossRef]
4. Kennedy JE, Ter Haar GR, Cranston D. High intensity focused ultrasound: surgery of the future. Br J Radiol 2003; 76: 590-9. [CrossRef]
5. Maestroni U, Ziveri M, Azzolini N, Dinale F, Ziglioli F, Campaniello G,et al. High Intensity Focused Ultrasound (HIFU): a useful alternativechoice in prostate cancer treatment. Preliminary results. Acta Biomed 2008; 79: 211-6.
6. Blana A, Rogenhofer S, Ganzer R, Lunz JC, Schostak M, Wieland WF, et al. Eight years experience with high intensity focused ultrasonography for treatment of localized prostate cancer. Urology 2008; 72: 1329-33. [CrossRef]
7. Wu F, Wang ZB, Cao YD, Chen WZ, Bai J, Zou JZ, et al. A randomised clinical trial of high intensity focused ultrasound ablation for the treatment of patients with localised breast cancer. Br J Cancer 2003; 89: 2227-33. [CrossRef]
8. Wu F, Wang ZB, Zhu H, Chen WZ, Zou JZ, Bai J, et al. Extracorporeal high intensity focused ultrasound treatment for patients with breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2005; 92: 51-60. [CrossRef]
9. Roussanka D Kovatcheva, Jordan D Vlahov, Julian I Stoinov, Katja Zaletel. Benign Solid Thyroid Nodules: US-guided High-Intensity Focused Ultrasound Ablation Initial Clinical Outcomes. Radiology 2015; 276: 597-605. [CrossRef]
10. Zhu J, Zhu H, Mei Z, Jin C, Ran L, Zhou K, et al. High-intensity focused ultrasound ablation for treatment of hepatocellular carcinoma and hypersplenism: preliminary study. J Ultrasound Med 2013; 32, 1855-62.
11. Klingler HC, Susani M, Seip R, Mauermann J, Sanghvi N, Marberger MJ. A novel approach to energy ablative therapy of small renal tumours: laparoscopic high intensity focused ultrasound. Eur Urol 2008; 53: 810-8. [CrossRef]
12. Chan AH, Fujimoto VY, Moore DE, Martin RW, Vaezy S. An image-guided high intensity focused ultrasound device for uterine fibroids treatment. Med Phys 2002; 29: 2611-20. [CrossRef]
13. Fruehauf JH, Back W, Eiermann A, Lang MC, Pessel M, Marlinghaus E, et all. High intensity focused ultrasound for the targeted destruction of uterine tissues: experiences from a pilot study using a mobile HIFU unit. Arch Gynecol Obstet 2008; 277: 143-50. [CrossRef]
14. Park MJ, Kim YS, Yang J, Sun WC, Park H, Chae SY, et al. Pulsed high intensity focused ultrasound therapy enhances targeted delivery of cetuximab to colon cancer xenograft model in mice. Ultrasound Med Biol 2013; 39: 292-9. [CrossRef]
15. Mohamed MM, Mohamed MA, Fikry NM. Enhancement of antitumor effects of 5-fluorouracil combined with ultrasound on Ehrlich ascites tumor in vivo. Ultrasound Med Biol 2003; 29: 1635-43. [CrossRef]
16. Hao Q, Liu Q, Wang X, Wang P, Li T, Tong WY. Membrane damage effect of therapeutic ultrasound on Ehrlich ascitic tumor cells. Cancer Biother Radiopharm 2009; 24: 41-8. [CrossRef]
17. Ghosh P, Sur P, Bag SP. Enhancement of antitumor effects of a new boron compound combined with ultrasound on the mouse ascites tumor. Med Chem 2012; 8: 1026-31. [CrossRef]
18. Lixin Jiang, Bing Hu, Qian Guo, Li Chen. Treatment of pancreatic cancer in a nude mouse model using high-intensity focused ultrasound. Exp Ther Med 2013; 5: 39-44. [CrossRef]

19. Hrazdira I, Skorikova J, Dolnikova M. Ultrasonically induced alterations of cultured tumor cells. Eur J Ultrasound 1999; 8: 43-9. [CrossRef]
20. Yu T, Wang Z, Jiang S. Potentiation of cytotoxicity of adriamycin on human ovarian carcinoma cell line 3AO by low level ultrasound. Ultrasonics 2001; 39: 307-9. [CrossRef]
21. Marmottant P, Hilgenfeldt S. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. Nature 2003; 423: 153-6. [CrossRef]
22. Miyoshi N, Igarashi T, Rieze P. Evidence against singlet oxygen formation by sonolysis of aqueous oxygen-saturated solutions of hematopor- phyrin and rose Bengal: the mechanism of sonodynamic therapy. Ultrason Sonochem 2000; 7: 121-4. [CrossRef]
23. Miyoshi N, Sostsric JZ, Rieze P. Correlation between sonochemistry of surfactant solution and human leukemia cell killing by ultrasound and porphyrins. Ultrasound Med Biol 2003; 34: 710-9. [CrossRef]
24. Keshavarzi A, Vaezy S, Noble ML, Chi EY, Walker C, Martin RW, et all. Treatment of uterine leiomyosarcoma in a xenograft nude mouse model using high intensity focused ultrasound: a potential treatment modality for recurrent pelvic disease. Gynecol Oncol 2002; 86: 344-50. [CrossRef]
25. Vaezy S, Fujimoto VY, Walker C, Martin RW, Chi EY and Crum LA. Treatment of uterine broid tumours in a nude mouse model using high-intensity focused ultrasound. Am J Obstet Gynecol 2000; 183: 6-11. [CrossRef]
26. Vykhodtseva N, McDannold N, Martin H, Bronson RT and Hynynen K. Apoptosis in ultrasound produced threshold lesions in the rabbit brain. Ultrasound Med Biol 2001; 27: 111-7. [CrossRef]