

Rose Bengal Kullanılarak Sonodinamik Tedavinin *Leishmania tropica* Promastigotları Üzerindeki Etkisinin *in vitro* Değerlendirmesi

In vitro Evaluation of the Effect of Sonodynamic Therapy Using Rose Bengal on *Leishmania tropica* Promastigotes'

● Serçin Özlem Çalışkan¹, ● Cem Aslan², ● Ömer Furkan Duran², ● İlayda Kaya², ● Hüsne Özen²

¹Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Uşak, Türkiye

²Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrencisi, Uşak, Türkiye

Cite this article as: Çalışkan SÖ, Aslan C, Duran ÖF, Kaya İ, Özen H. *In vitro* Evaluation of the Effect of Sonodynamic Therapy Using Rose Bengal on *Leishmania tropica* Promastigotes'. Türkiye Parazitol Derg 2022;46(3):172-9.

ÖZ

Amaç: Leishmaniasis tedavisinde yan etkisi az olan standart bir tedavi şeması bulunmaması sebebiyle yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Sonodinamik tedavi (SDT) de bu seçeneklerden biri olmaya adaydır. SDT, düşük yoğunluklu ultrason ve bir sonosensitif ajanın eş zamanlı kombinasyonu ile moleküler oksijen varlığında hücrelerde reaktif oksijen türlerinin üretilmesine dayanan bir tedavi yöntemidir. Sonosensitizer, ultrason ve moleküler oksijen bireysel olarak toksik değildir, ancak bu bileşenler bir araya getirildiklerinde sitotoksik reaktif oksijen türleri oluşturur. Bu çalışmada rose bengal (RB) aracılı SDT'nin *Leishmania tropica* (*L. tropica*) promastigotlarına etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: SDT, RB'nin farklı konsantrasyonları (20, 40 ve 80 µM) ve 1 MHz frekansta 1, 1,5 ve 2 W/cm² yoğunluklu 10, 20 ve 30 dakika boyunca ultrases kullanılarak gerçekleştirilmiştir. On sekiz saatlik inkübasyondan sonra, *L. tropica* promastigotlarının proliferasyonu XTT testi ile, morfolojileri ise Giemsa boyama ile belirlenmiştir.

Bulgular: Tek başına uygulanan farklı RB konsantrasyonları ile inkübasyon *L. tropica* promastigotlarında etki göstermemiştir. *L. tropica* promastigotlarının tek başına ultrases uygulama süresi 10 dakika olarak tespit edilmiştir. Ultrases uygulama yoğunluğu 2 W/cm²'de daha etkili sonuçlar vermiştir. RB (80 µM) ile birlikte 10 dakika boyunca 1 MHz frekansta 2 W/cm²'de yoğunlukta ultrasese maruz kaldıktan sonra, promastigotların sayısının, kontrol grubununkinden düşük olduğu belirlenmiştir. Morfolojik olarak ise parazitin yuvarlak, şişmiş çekirdeği ayırt edilemeyecek atipik formları gözlenmekle birlikte tipik dar hücre gövdesi formları da tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu sonuçlar *L. tropica* üzerinde RB aracılı SDT'nin aday bir tedavi yaklaşımı olabileceğini göstermiştir. Bu yaklaşım hem yüzeysel hem de derin yerleşimli lezyonlar için kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Bu çalışma, *L. tropica* promastigotları üzerinde RB aracılı SDT'nin biyofiziksel mekanizmalarını, ultrasese maruz kalma stratejilerini, güvenilirliğini ve klinik çeviri yolundaki zorlukları vurgulamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Leishmania tropica*, rose bengal, sonodinamik tedavi

ABSTRACT

Objective: There is a need for new treatment options for treating Leishmaniasis, since there is no standard treatment scheme with few side effects. Sonodynamic therapy (SDT) is also a candidate to be one of these options. SDT is a treatment method based on the simultaneous combination of low-intensity ultrasound and a sonosensitizer, and the generation of reactive oxygen species in cells in the presence of molecular oxygen. Sonosensitizer, ultrasound, and molecular oxygen individually, these components are not toxic, but when combined form cytotoxic reactive oxygen species. In this study, we evaluated the effect of rose bengal (RB)-mediated SDT on *Leishmania tropica* (*L. tropica*) promastigotes.

Methods: SDT was performed using different concentrations of RB (20, 40, and 80 µM) and ultrasound at a frequency of 1 MHz with an intensity of 1, 1.5, and 2 W/cm² for 10, 20, and 30 min.

Results: Incubation with different RB concentrations applied alone had no effect on *L. tropica* promastigotes. Ultrasound application time for *L. tropica* promastigotes alone was determined as 10 min. Ultrasound application intensity showed more significant results at 2 W/cm². It was determined that the number of promastigotes was lower than that of the control group after 10 min of exposure to ultrasound at 2 W/cm² at 1 MHz frequency for 10 min with RB (80 µM). Morphologically, round, swollen, atypical forms of the parasite with indistinguishable nuclei are observed, but typical narrow cell body forms have also been detected.



Geliş Tarihi/Received: 08.02.2022 Kabul Tarihi/Accepted: 24.06.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Serçin Özlem Çalışkan, Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Uşak, Türkiye
Tel/Phone: +90 536 859 12 22 E-Posta/E-mail: srn.ozlem@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0001-8464-5487

Conclusion: These results showed that RB-mediated SDT on *L. tropica* could be a candidate treatment approach. This approach can be used for both superficial and deeply located lesions. This study emphasized the biophysical mechanisms, ultrasound exposure strategies, reliability and difficulties in the clinical practice of RB-mediated SDT on *L. tropica* promastigotes

Keywords: *Leishmania tropica*, rose bengal, sonodynamic therapy

GİRİŞ

Leishmaniasis, parazitik faktörler ve konakçının immün yanıtı arasındaki etkileşime bağlı olarak visceral, mukozal ve kutanöz olmak üzere üç ana klinik durum içeren vektör kaynaklı protozoan bir hastalıktır (1). Hastalığa dünyanın birçok coğrafi bölgesinde bulunan 20'den fazla *Leishmania* türü neden olmaktadır (2,3). Kutanöz leishmaniasis (KL) ise çeşitli deri lezyonları ile karakterize önemli bir halk sağlığı sorunudur. Çeşitli yerel ve küresel faktörlerin etkisiyle tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de artan bir eğilim göstermiştir (4,5). KL tedavisinde, lezyonun yeri, sayısı, şiddeti, leishmania türü ve kişinin immün durumuna bağlı olarak, topikal tedavi, sistemik ilaç tedavisi, intralezyoner tedavi yöntemlerinden biri ya da birkaçı birlikte uygulanmaktadır (6). Ülkemizde tedavide ilk tercih edilen ilaç meglumin antimonat bileşikleridir. Fakat meglumin antimonata karşı direncin arttığı çalışmalarda bildirilmiştir. Ayrıca yan etkileri bulunan amfoterisin B, yan etkileri düşük ancak maliyeti pahalı olan lipozomal amfoterisin B ve gebelerde teratojenik etkiler gösterdiği bilinen miltefosinde tedavide kullanılan diğer ilaçlardandır (7,8).

Günümüzde uygulanan tedavi yöntemleri kişinin klinik tablosuna, immün sistemine, etken olan *Leishmania* türüne bağlı olarak değişmektedir. Leishmaniasis tedavisinde halen yan etkisi standart bir tedavi şeması bulunmamaktadır. Alternatif tedavi arayışları devam etmekte ve bu nedenle, ışık ve ultrason gibi fiziksel mekanizmalara dayalı alternatif anti-leishmanial tedaviler araştırılmaktadır.

Fotodinamik tedavi (FDT), apoptoz veya nekroz ile hücre ölümünü hedefleyen serbest oksijen radikalleri üretmek için ışık ve moleküler oksijen varlığında aktive olan bir fotosensitizer kullanan alternatif bir tedavi yöntemidir. Ayrıca FDT'nin KL üzerinde yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır (9-11). Sonodinamik tedavi (SDT) de FDT'den türetilmiş bir tedavi yöntemidir. FDT'ye benzer şekilde, SDT hedef dokuları toksik olmayan bir sonosensitizer ve düşük yoğunluklu ultrasona maruz bırakmayı içeren güncel bir terapötik yaklaşımdır (12).

SDT'nin biyolojik etkileri ısı, mekanik etkiler ve akustik kaviteasyon olmak üzere üç farklı mekanizmadan biriyle ilişkilidir. Kaviteasyon ultrasesin doku sıvısında ilerlemesi sırasında meydana gelen basınç değişimlerinden kaynaklanan mikrobalonculukları tarif etmektedir (13). Bu etkiler ultrasonun yoğunluğuna ve frekansına bağlıdır. Yüksek yoğunluklu sonikasyon ısı üretimine yol açarken düşük frekanslı tedavi kaviteasyona neden olur. Biyolojik dokuların ultrasona maruz kalması sonucunda, hücrelerde hem yapısal hem de fonksiyonel değişiklikler meydana gelebilmektedir (14).

SDT'nin mekanizması ile ilgili araştırmacılar farklı düşüncelere sahiptir. Bir grup SDT'nin biyolojik etkilerinin, I. termal etkiler: Ultrason enerjisinin emilmesi ve dağıtılması; II. hücre zarı geçirgenliği değişiklikleri veya hücre zarı yırtılması (değişen akustik basınç tepki olarak önceden var olan gaz kütellerinin salınımları veya mikro baloncukların büyüüp, kritik bir boyuta ulaştıktan sonra şiddetli bir şekilde patlamasından kaynaklanan kesme kuvvetleri nedeniyle uygulamalar arasında hücre zarı bozulması ve büyük moleküllerin zar ötesi taşınmasına izin veren

sonoforez) ve III. serbest radikal oluşumu (çöken kaviteasyon mikro-baloncukların içinde bulunan moleküllerin pirolizi ile serbest radikallerin oluşumu) olduğunu düşünmektedir (15). Başka bir grup ise sonodinamik etkiyi moleküllerin sonolüminesans ile elektronik olarak uyarılmasıyla (yani harici aydınlatma uygulaması olmaksızın), ultrason enerjisi ile üretilen sıvılarda akustik kaviteasyon sırasında üretilen ışık parlamaları ile açıklar. Sonolüminesans, sitotoksik singlet oksijen oluşumuyla sonuçlanan fotokimyasal süreçleri başlatır (13,16,17).

Sonosensitizerler, bleomisin, adriamisin, amfoterisin B, mitomisin C, daunomisin, diazikuon ve 5-florourasil gibi yaygın olarak kullanılan anti-kanser ilaçları ve hematoporfirin, fotofrin, mezoporfirin, çinko (II)-ftalosiyenin, protoporfirin, ATX-70 [7,12-bis(1-desiloksietil)-Ga (III)-3,8,13,17-tetrametil-porfirin-2,18-dipropionil diaspartik asit], feoforbida ve rose bengal (RB) gibi birkaç fotosensitizeri içerir (18-24). RB, ksanten türevi bir ışığa duyarlılaştırıcıdır ve görünür ışığa maruz kalma ile yaklaşık %100'lük bir kuantum verimiyle singlet oksijen ürettiği bilinmektedir (25). Ayrıca, RB'nin 514 nm'de ışıktaki plazma zarı hasarını ve ayrıca ultrason ile aktive edildiğinde *in vitro* hücre hasarını indüklemektedir (26,27). Çok sayıda ciddi çalışma kanser hücrelerinin SDT'sine adanmıştır ve bildiğimiz kadarıyla bu teknik, leishmaniasis tedavisi için uygulanmamıştır. RB, SDT için sonosensitizer olarak yüksek potansiyele sahip olmasına rağmen anti-leishmanial etkisi henüz gösterilmemiştir.

Bu çalışmada RB aracılı SDT'nin *Leishmania tropica* (*L. tropica*) promastigotlarına etkisi sitotoksik ve morfolojik açıdan gösterilmesinin yanında ultrases uygulama optimizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Parazitin Elde Edilmesi ve Üretilmesi

L. tropica promastigotları Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Hatice Ertağlar'ın koleksiyonundan temin edilmiştir. Promastigotlar kullanılıncaya kadar sıvı azotta saklanmıştır. Promastigotlar sıvı azottan alınıp hızlı bir şekilde çözündürüldükten sonra %10 FCS içeren RPMI-1640 besiyerinde kültüre alınmıştır. Ekim yapılan flasklar 26 °C'lik etüvde inkübe edilmiştir.

RB'nin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

RB stok sulu solüsyonu (Sigma-Aldrich, ABD) 320 µM konsantrasyonlarında PBS içinde hazırlanmış ve 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Stok 320 µM RB solüsyonu RPMI 1640 hücre kültürü solüsyonu ile ½ seri dilüsyon olacak şekilde hazırlandı. Parazitler dilüsyonlar oluşturulduktan sonra kuyucuklara 1x10⁷ hücre olacak şekilde inoküle edilmiştir ve 80, 40, 20 µM'lik RB konsantrasyonları oluşturulmuştur.

Deney Grupları

Grup 1: Kontrol grubu RB ya da ultrases uygulanmamıştır.

Grup 2: 1x10⁷ promastigot/mL olan parazit örnekleri 20 40 ve 80 µM dozlarda bir saat boyunca karanlıkta 26 °C'de RB'ye maruz bırakılmış ve ultrases uygulanmamıştır.

Grup 3: 1×10^7 promastigot/mL olan parazit örnekleri 20 40 ve 80 μM dozlarda bir saat boyunca karanlıkta 26 °C'de RB'ye maruz bırakılmış ve daha sonra serbest RB ortamdan uzaklaştırılıp, örnekler 1 MHz frekansta 1, 1,5, 2 W/cm^2 yoğunlukta örnekler 2 cm mesafeden 10-20-30 dk boyunca ultrases uygulanmıştır.

Grup 4: 1×10^7 promastigot/mL olan parazit örnekleri 1 MHz frekansta 1, 1,5, 2 W/cm^2 yoğunlukta örnekler 2 cm mesafeden 10-20-30 dk boyunca ultrases uygulanmıştır.

Sonodinamik Tedavinin *in vitro* Etkinliğinin Belirlenmesi

RB aracılı SDT için deneysel kurulum Şekil 1'de gösterilmiştir. 1×10^7 olan *L. tropica* promastigotları hücre proliferasyonunu belirlemek için değişik dozlarda 1 saat boyunca RB'ye maruz bırakıldıktan sonra örnekler 1500 devirde 5 dakika boyunca santrifüjlenip, dipte kalan çökelti PBS ile 3 kez yıkanmış ve RB uzaklaştırılarak üzerine PBS eklenmiştir. Hücreler 15 mL'lik falconlara aktarılacak suyun içerisinde 1 MHz frekansta 2 cm mesafeden 1, 1,5, 2 W/cm^2 yoğunlukta ultrasese maruz bırakılmıştır. Bütün ultrases uygulamaları sırasında ultrasesin termal etkisi gözlemlenmiş ve sıcaklık artışı izlenmiştir. Ultrases uygulamasından sonra örnekler taze besiyeri eklenmiş, 18 saat boyunca 26 °C'de inkübe edilmiştir.

XTT [2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolium-5- kaboksanilit tuzu] Testi

XTT yöntemi kullanılarak RB, RB aracılı SDT ve ultrasesin sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Örnekler 96'lık mikrotiplerde XTT solüsyonu kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı yüzdesi,

$$\% \text{Hücre Canlılığı} = \frac{(\text{Örneğin OD değeri} - \text{Blank})}{(\text{Kontrol OD değeri} - \text{Blank})} \times 100$$

formülüne göre hesaplanmıştır.

Giemsa Boyama

Kontrol, ultrases kontrol, RB ve RB aracılı SDT grupları için üçer preparat hazırlanmıştır. Her bir gruptan bir miktar parazit örneği alınıp lam üzerine yayılıp kuruması beklenmiş, kuruyan hücrelere metanol damlatılmıştır. Preparatların üzerine bire bir oranında hazırlanan boya damlatılıp 20 dakika boyunca beklenmiş ve ışık mikroskopunda hücre morfolojileri incelenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler, üçlü kuyucuklar da en az üç kez tekrarlanmıştır. Tüm veriler, SPSS 25.0 programı kullanılarak analiz edilmiş ve veri analizi için tek yönlü ANOVA varyans analizi ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılmıştır. P-değeri 0,05'ten küçük çıkan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

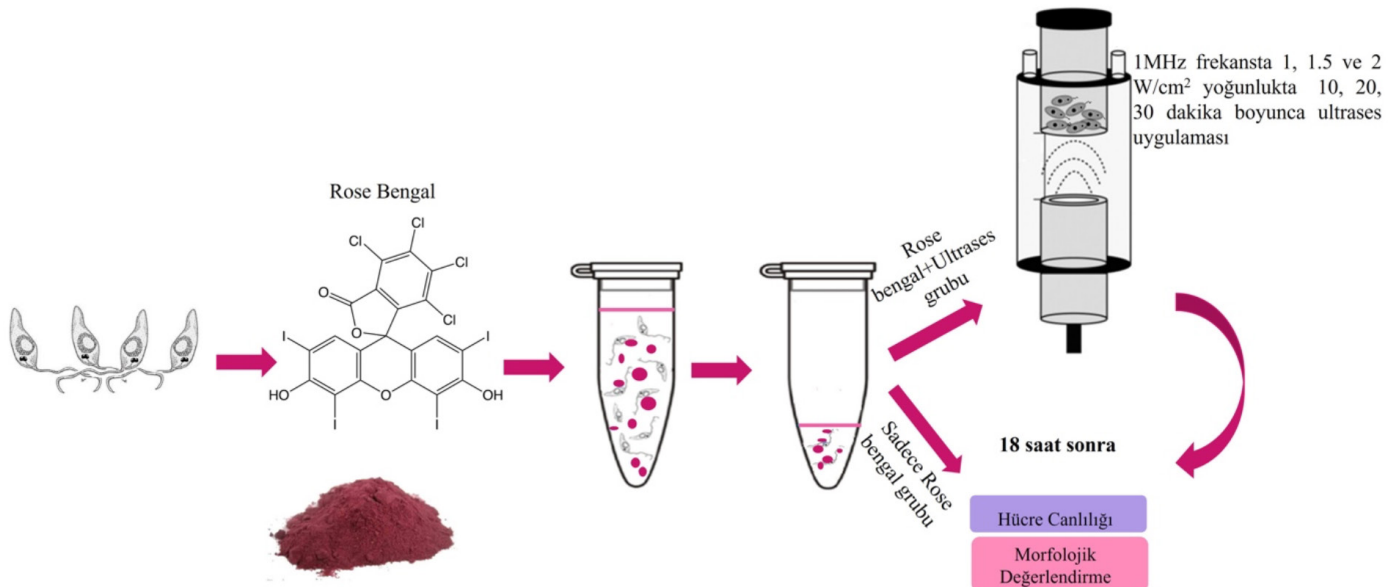
BULGULAR

Farklı Konsantrasyonlarda Tek Başına RB Uygulamasının *L. tropica* Promastigotlarının Proliferasiyonuna Etkisi

SDT uygulamasına geçmeden önce *L. tropica* promastigotlarında tek başına RB'nin farklı konsantrasyonlardaki etkisine bakılmıştır. Bunun amacı tek başına RB uygulaması ile *L. tropica* promastigotlarının etkilenmemesidir. Rose bengal'in 20 μM konsantrasyon uygulamasında kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,152$). Diğer konsantrasyonlar 40 μM ve 80 μM RB uygulaması sonrası hücre canlılığında kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma olsa da RB uygulanan tüm gruplarda hücre canlılığı %85'in altına düşmemiştir ($p=0,001$; $p=0,008$). Tek başına RB uygulamasının *L. tropica* promastigotlarına etkisi saptanamamıştır (Şekil 2A).

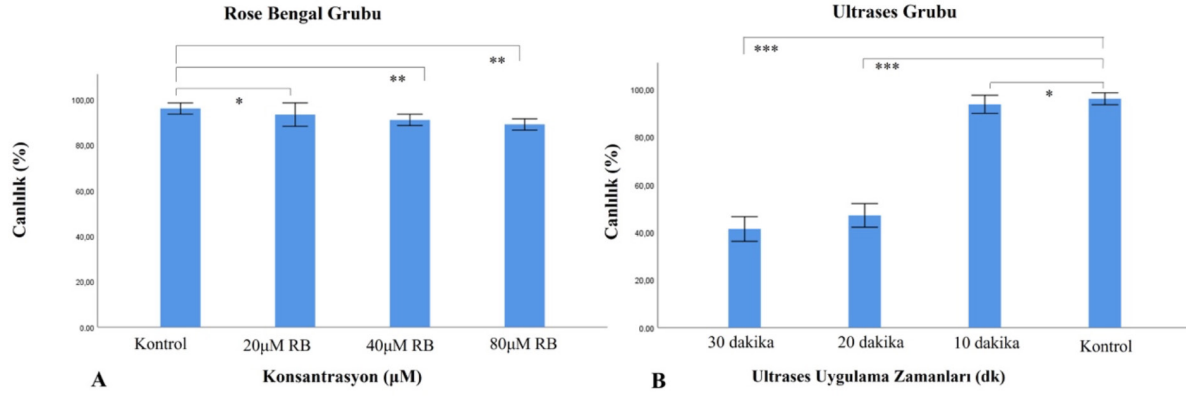
Ultrases Uygulama Süresinin *L. tropica* Promastigotlarına Etkisi

SDT uygulamasına geçmeden önce belirlenmesi gereken bir diğer basamak ise sadece ultrases uygulaması ile *L.*



Şekil 1. Rose bengal aracılı SDT için deneysel kurulum

SDT: Sonodinamik tedavi



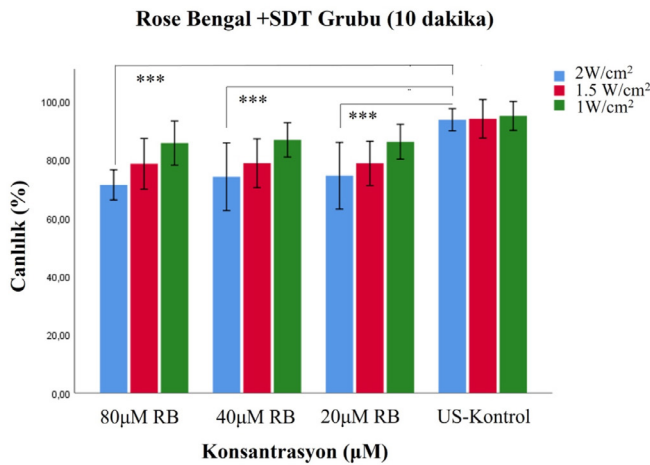
Şekil 2. A) Sadece RB uygulanan *L. tropica* promastigotlarının % canlılık dağılımı. **B)** *L. tropica* promastigotlarının farklı sürelerde ultras ses optimizasyonu (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$, $p > 0,05$, hata çubukları %95 güven aralığı)

RB: Rose bengal

tropica promastigotlarının etkilenmemesidir. Yani ultras ses uygulamasının herhangi bir toksik etkisi olmaması gerekmektedir. Daha önce literatürde *L. tropica* promastigotlarına SDT uygulama çalışmaları olmadığından sadece ultras ses uygulamasının *L. tropica* promastigotlarına etkisinin belirlenmesi için süre denemeleri yapılmıştır. Ultras ses optimizasyonu için 2 W/cm² yoğunluğunda 10, 20 ve 30 dk boyunca parazitlere ultras ses uygulanmıştır. Süre ne kadar artar ise ultras sesin termal etkisinin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Özellikle 30 ve 20 dk ultras ses uygulamalarının hücre canlılığını sırasıyla %41,3 ve %47'ye düşürdüğü tespit edilmiştir. 10 dk uygulamasında ise hücre canlılığı %93,6 bulunduğundan ve tek başına ultras ses uygulamasının *L. tropica* promastigotlarını etkilememesi üzerine tüm çalışmaya 10 dk ile devam edilmiştir (Şekil 2B).

RB Aracılı SDT Uygulamasının Farklı Konsantrasyonlarının *L. tropica* Promastigotları Proliferasyonuna Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda (80 µM 40 µM 20 µM) RB ve farklı yoğunluklarda (2 W/cm², 1,5 W/cm², 1 W/cm²) 10 dakika ultras ses uygulamasının 18 saatlik inkübasyon sonuçlarına göre



Şekil 3. On dakika boyunca RB + SDT uygulamasının farklı konsantrasyonlarının ve farklı yoğunluklarının XTT sonuçları (** $p < 0,001$, hata çubukları %95 güven aralığı)

RB: Rose bengal, SDT: Sonodinamik tedavi

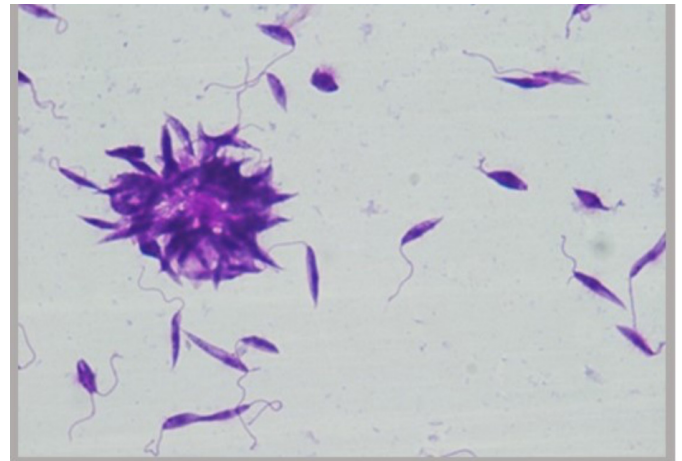
80 µM 40 µM 20 µM RB ile 2 W/cm² yoğunluklu ultras ses birlikte uygulanmasının ultras ses-kontrol grubundaki hücre sayısına göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0,001$). 80 µM RB ardından 1 MHz frekansta 2 W/cm² yoğunlukta ultras ses uygulama sonrası *L. tropica* promastigot canlılığı %71,3'e düşmüştür. 80 40 ve 20 µM RB ardından 1 MHz frekansta 1,5 W/cm² yoğunluklu ultras ses uygulama sonrası hücre canlılığı sırasıyla %78,5 %78,7 %79 olarak belirlenmiştir. 1 W/cm² yoğunluklu ultras ses uygulamasının *L. tropica* promastigot canlılığı 80 40 ve 20 µM konsantrasyonda sırasıyla %85,6 %86,1 ve %86,7 bulunmuştur. Ultras ses kontrol grubunda 2 W/cm² 1,5 W/cm² 1W/cm² yoğunluklu uygulama sonrası ise canlılık sırasıyla; %93,6 %94 ve %94,8 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3).

Hücrel Morfolojik Değerlendirme Bulgular

Giemsa boyama bulguları

Giemsa boyama sonuçlarına göre RB ya da ultras ses uygulanmamış kontrol grubundaki parazitlerde tek çekirdek, kamçı, kinetoplast ve dar hücre gövdesi ile tipik morfolojik özellikler tespit edilmiştir (Şekil 4).

Sadece ultras ses uygulamasının *L. tropica* promastigotları üzerinde Giemsa boyama sonuçlarına göre, uygulama süresinin artması



Şekil 4. Kontrol grubu. Herhangi bir sonosensitif ajan veya ultras ses uygulanmamıştır

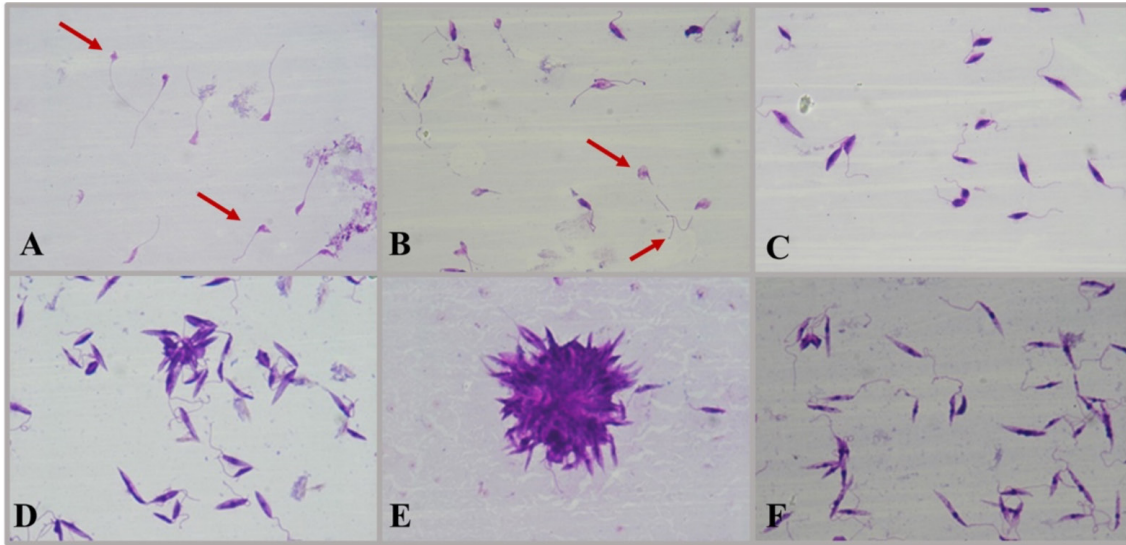
parazitler üzerinde morfolojik olarak etkilere yol açmıştır. Ultrases süresinin 20 ve 30 dk uygulanmasıyla parazitlerin çekirdeklerinin ve kinetoplastlarının birbirinden ayırt edilemedikleri parazitin tipik formundan uzaklaştıkları kamçıların kaybettikleri gözlemlenmiştir (Şekil 5A, B). Bu da XTT sonuçları ile uyumluluk göstermiştir. Ultrases süresinin 10 dk uygulanmasının ise parazitleri morfolojik olarak etkilemediği gözlemlenmiştir. Parazitlerde tek çekirdek, kamçı, kinetoplast ve dar hücre gövdesi ile tipik morfolojik özellikler görülmüştür (Şekil 5C). Sadece 80, 40 ve 20 μM konsantrasyonlarında RB uygulamasında da parazitlerin tek çekirdek, kamçı, kinetoplast ve dar hücre gövdesi ile tipik morfolojik özellikleri koruduğu gözlemlenmiştir. Parazitler üzerinde tek başına RB uygulamasının hem XTT hem de morfolojik sonuçlara göre bir etkisine rastlanmamıştır (Şekil 5D-F).

Giemsa ve XTT sonuçlarına göre sadece ultrases uygulama süresi *L. tropica* promastigotlarının etkilenmediği süre olan 10 dakika olarak belirlenmiştir. Farklı RB konsantrasyonları ve farklı ultrases yoğunlukları arasında morfolojik olarak farklar gözlenmiştir. RB'nin 80 μM konsantrasyonda, 2 W/cm^2 yoğunlukta, 10 dk boyunca ultrases uygulamasının parazitlerde çoğunlukla yuvarlak, şişmiş, çekirdeği ayırt edilemeyecek atipik formları gözlenmekle birlikte tipik dar hücre gövdesi formları da tespit edilmiştir (Şekil 6A). RB'nin 40 μM ve 20 μM konsantrasyonda, 2 W/cm^2 yoğunlukta, 10 dk ultrases uygulamasında ise herhangi bir morfolojik değişikliğe rastlanmamıştır. Kontrol grubu hücreleri ile uyumlu morfoloji göstermişlerdir (Şekil 6B, C). RB'nin 80, 40 ve 20 μM konsantrasyonlarında, 1,5 W/cm^2 yoğunlukta 10 dk ultrases uygulamasından sonra parazitlerin kontrol grubundaki gibi tipik morfolojik özelliklerini koruduğu gözlemlenmiştir. Gruplar arasında morfolojik olarak farklılık gözlenmemiştir (Şekil 6D-F). RB'nin 80, 40 ve 20 μM konsantrasyonlarında, 1 W/cm^2 yoğunlukta 10 dk ultrases uygulamasında da herhangi bir atipik parazit morfolojisine rastlanmamıştır. Kontrol grubundaki gibi tek çekirdek, kamçı, kinetoplast ve dar hücre gövdesi tipik morfolojik özellikler tespit edilmiştir (Şekil 6G, I).

TARTIŞMA

Leishmaniasis tedavisinde uygulanan yöntemler *Leishmania* türüne göre farklılık göstermektedir. Her *Leishmania* türü kendine özgü biyokimyasal ve moleküler özelliklere sahiptir. Bu hastalık grubunun tedavisinde kullanılabilecek, daha önce denenmemiş, yeni ilaçların geliştirilmesi, bitki ekstraktları ve bitkisel kaynaklı anti-leishmanial etken maddelerin araştırılmasının önemli olduğunu vurgulayan araştırmalar bulunmaktadır. Özbilgin ve ark.'nın (28) 2014 yılında Türkiye'nin belirli bölgelerinden topladıkları bitki ekstraktları ile yaptıkları bir çalışmada *Eryngium thorifolium* ve *Centaurea calolepis* ekstraktlarının *L. tropica* üzerinde hem *in vitro* hem de *in vivo* etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Kivçak ve ark.'nın (29) yaptıkları bir çalışmada *Arbutus unedo* L'nin yapraklarından elde edilen etanol, su ve n-hekzan özlerinin *L. tropica* promastigotlarına karşı *in vitro* test edilmiş ve A. unedo yapraklarının etanol ekstresinin diğer ekstraktlardan daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Limoncu ve ark. (30) *L. tropica* üzerine moksifloksasin ve linezolid ile kaspofunginin, potansiyel anti-leishmanial etkilerinin *in vitro* olarak araştırmışlardır. Moksifloksasin ile ilgili başarılı sonuçlar bildirmişlerdir. Görüldüğü üzere alternatif tedavi arayışları her geçen gün artmaktadır. SDT de ucuz ve toksik olmaması, kolay uygulanabilirliği ile Leishmaniasis'e aday olabilecek alternatif tedavi yöntemlerinden biridir.

RB, yeşil ışıkla birlikte kullanımının yanı sıra ultrases ile de kombine olarak tıp alanında uygulanmaktadır. Umumura ve ark. (27) RB gibi bazı ajanların, geri dönüşü olmayan hücre hasarına neden olabilen, nekroz veya apoptozu indüklemek için hücrelerin membran yapısını ve fonksiyonel özelliklerini değiştirebilen gaz kabarcıklarının oluşumu ve salınımı olarak tanımlanan ultrasonik kavitasyonu indükleyebildiğini bulmuştur. Bu nedenle, derin tümör hücreleri üzerinde ultrases ile aktiveleştirilmiş RB'nin sonodinamik etkisini araştırmışlardır. Işığa duyarlılaştırıcılardan olan hematoporfirinler ve ksanten boyalarının, ultrasesin anti-tümör etkisini artırabildiğini ve tümörlerin tedavisine için yeni bir modalite yani SDT'yi önerdiklerini bildirmişlerdir (27). Ayrıca, Sugita ve ark.'nın (31) yaptığı bir çalışmada sarkom hücreleri



Şekil 5. *L. tropica* promastigotları üzerine sadece ultrases ve sadece RB uygulaması. **A)** 30 dk ultrases grubu, **B)** 20 dk ultrases grubu, **C)** 10 dk ultrases grubu, **D)** 80 μM RB grubu, **E)** 40 μM RB grubu, **F)** 20 μM RB grubu

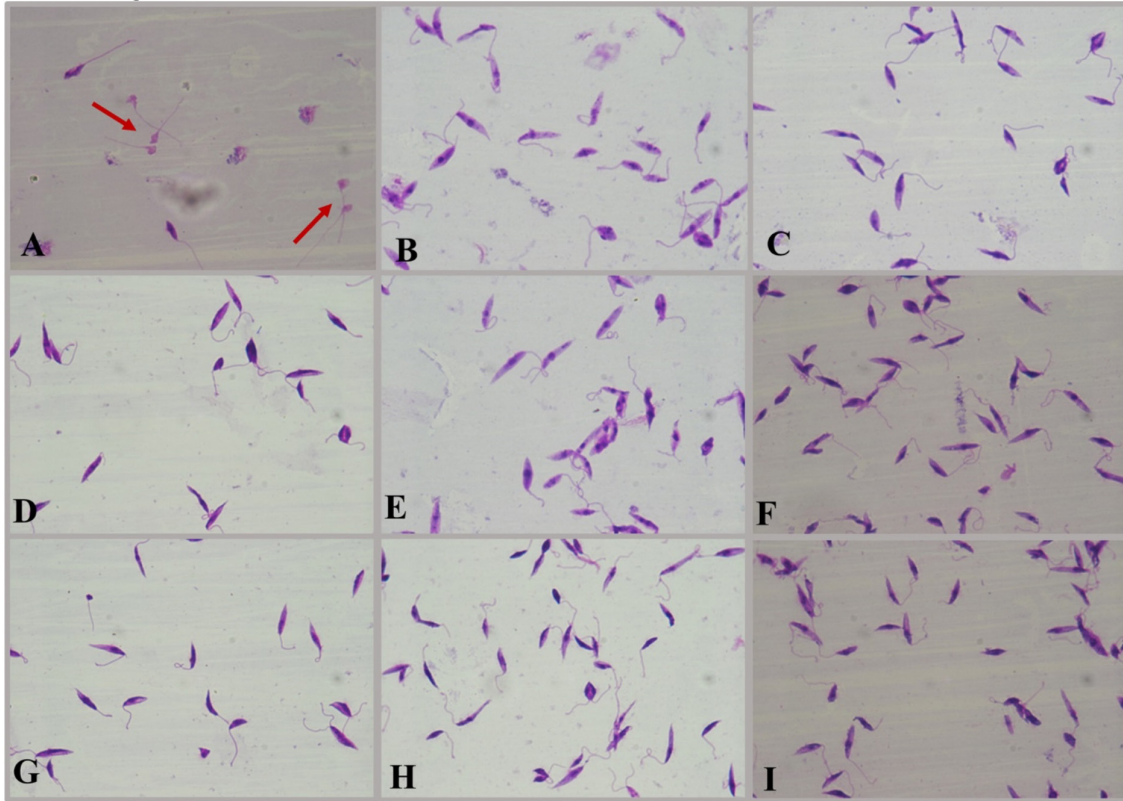
RB: Rose bengal

üzerine RB'nin ultrases ile birlikte uygulanması, sadece ultrases uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığında, RB ve türevleri aracılı ultrasesin sarkom 180 hücrelerinde artan *in vitro* hücre hasarını indüklediği gösterilmiştir

SDT üzerine rapor edilen çalışmaların çoğu kanser tedavisine odaklanmıştır (13,32,33). Bununla birlikte 2009 yılında SDT'nin antibakteriyel etkinliğe sahip olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (34). Sonodinamik tedavinin *in vitro* antibakteriyel etki için ilk kullanımı 2011 yılında Liu ve ark. (35) tarafından *Escherichia coli* (*E. coli*) üzerinde gösterilmiştir. Sonosensitizer özelliğe sahip bir antibiyotik olan florokinolon ve 40 kHz ultrasesin *E. coli* üzerine birlikte uygulanmasının, ilacın kendisinden daha iyi bir terapötik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (35). Pourhajbagher ve ark.'nın (36) *S. mutans* üzerinde Kurkumin aracılı SDT'nin etkisini inceledikleri çalışmada 1 MHz 1,56 W/cm² yoğunluklu 1 dk ultrases uygulamasının bakteri canlılığında azalma meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Bunun yanında, Zhang ve ark.'nın (37) *Porphyromonas gingivalis* üzerinde HMME aracılı SDT'yi araştırdıkları çalışmada, 40 g/mL sonosensitizer uygulamasının ardından 10 dakika 1 MHz 3 W/cm² yoğunluklu ultrases uygulamasının ROS üretiminde artışa neden olduğu, bakteri sayısında ise azalma meydana geldiğini göstermişlerdir. Li ve ark. (38) bir antibiyotik olan levofloksasini bir nano partikülle konjuge ederek *Mycobacterium smegmatis* ve *E.coli* üzerinde yaptıkları SDT çalışmasında 0,67 W/cm² yoğunlukta ve 42 kHz frekansta ultrason uyarımının bakteriyel enfeksiyonu *in vitro* ve *in vivo* olarak etkili bir şekilde ortadan kaldırdığını bildirilmiştir.

Şimdiye kadar yapılan antibakteriyel SDT çalışmalarının çoğu *in vitro* ve *in vivo* olarak bakterilerin öldürülmesi ile ilgiliyken, SDT ile mantar ve mayaların inaktivasyonu hakkında sadece iki çalışma rapor edilmiştir (39,40). Ayrıca virüsler üzerinde henüz SDT çalışmaları bulunmamaktadır.

Literatürde leishmaniasis üzerine SDT çalışmaları bulunmadığından paraziter organizmaya en yakın olan bakteri hücresinde yapılan ultrases çalışmaları referans alınarak ultrases optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Nakonechny ve ark.'nın (41) RB'nin *E. coli* ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) üzerindeki sonodinamik etkisini inceledikleri çalışmada *E. coli* üzerine 15 µM RB, 1-2 saat boyunca 28 kHz frekansta ve 0,5 W/cm² yoğunluklu ultrases uygulamasının ardından, bakterilerin kontrole kıyasla inhibe olduğunu bildirmişlerdir. *S. aureus*'ların ise SDT'ye *E. coli*'den daha duyarlı olduğunu ve 5 µM RB aracılı ultrasesin kontrole kıyasla azaldığını göstermişlerdir (41). Alves ve ark. (40) *Candida albicans* üzerinde RB aracılı ultrases (1 MHz frekansta, 2,5 W/cm² yoğunlukta, 5 dakika) uygulaması ile bakterilerin proliferasyonunu önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Costley ve ark. (42) RB aracılı SDT'nin etkinliğini daha da artırmak için RB'yi antimikrobiyal peptit ile konjuge etmişlerdir. Konjugat ile tedavi ve ardından 1 MHz frekansta, 3 W/cm² yoğunlukta, 10 dakika ultrases uygulaması ile sırasıyla *S. aureus* ve *P. aeruginosa* planktonik kültürlerinin sayısında azalma ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Çalışmanın *in vivo* sonuçları ise, farelerde konjugatla tedavi edilen *P. aeruginosa* ile enfekte olmuş yaraların ultrason uygulaması ile önemli bir



Şekil 6. Rose bengal aracılı SDT uygulaması. **A)** 80 µM RB + 2 W/cm² ultrases uygulaması, **B)** 40 µM RB + 2 W/cm² ultrases uygulaması, **C)** 20 µM RB + 2 W/cm² ultrases uygulaması, **D)** 80 µM RB + 1,5 W/cm² ultrases uygulaması, **E)** 40 µM RB + 1,5 W/cm² ultrases uygulaması, **F)** 20 µM RB + 1,5 W/cm² ultrases uygulaması, **G)** 80 µM RB + 1 W/cm² ultrases uygulaması, **H)** 40 µM RB + 1 W/cm² ultrases uygulaması, **I)** 20 µM RB + 1 W/cm² ultrases uygulaması

RB: Rose bengal, SDT: Sonodinamik tedavi

bakteriyel eradikasyona neden olduğunu göstermiştir (42). Bu çalışmada ise yaptığımız optimizasyon denemeleri sonucunda 10 dk boyunca 1 MHz frekansta, 1 1,5 ve 2 W/cm² yoğunluklu sadece ultrases uygulamasının *L. tropica* promastigotları üzerinde termal veya sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. *L. tropica* promastigotları için sitotoksik olmayan ultrases uygulama zamanı 10 dk olarak belirlenmiştir. Parazitler üzerine tek başına 80 40 20 µM RB uygulamasının sitotoksik etkiye yol açmadığı, 80 µM RB ile 2 W/cm² yoğunluklu ultrases birlikte kullanıldığında kontrol grubuna göre hücre sayısında azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Morfolojik olarak da bu grupta atipik özellikli parazit formlarına rastlanmıştır.

Ultrases, sonosensitizer ve oksijen dahil olmak üzere üç temel bileşen, birlikte sonodinamik "öldürme etkisi" işleminin sonucunu etkiler. Bunların her biri farklı derecelerde düzenlenebilir, ultrases genellikle kontrol edilmesi en kolay ve oksijenin belirlenmesi en zor olan parametredir. Bu arada, sonosensitizer, tedavinin etkinliğini, seçiciliğini ve güvenliğini artırabileceğinden, sonodinamik stratejinin başarısını en üst düzeye çıkarmada çok önemli bir rol oynar (43). Güç, frekans, yoğunluk ve ultrason basıncı gibi SDT ile ilgili parametreler için tek tip bir standardizasyon geliştirilmelidir. Bu sorunların çözümü, SDT'de klinik dönüşümü hızlandıracaktır. Akustik parametrenin belirlenmesi ultrasesin dozu, sonosensitizerin etkinliği ve lezyonun pozisyonu ile ilgili olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (44).

SDT terapötik açıdan faydalı bir strateji olarak büyük bir potansiyele sahip görünmektedir. Ancak incelenen antibakteriyel SDT çalışmaları kendi arasında farklılık gösterdiğinden, verilerin karşılaştırılmasını ve rasyonelleştirilmesini belirsiz kılmaktadır. Aynı zamanda, ultrases dozunda standardizasyon eksikliği ve SDT'nin mekanizmalarının kurulmasını sınırlandırmaktadır. SDT de yer alan baskın mekanizmalar muhtemelen ultrases parametrelerine, biyolojik sisteme ve sonosensitizerlerin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Ayrıca, frekans ve enerji gibi optimal parametreleri belirlemek ve optimum SDT stratejisini oluşturmak için aynı koşullar altında çok sayıda deney yapılmalıdır. Bu sınırlamalara ek olarak, mevcut sonosensitizerler, düşük özgüllük, hızlı agregasyon ve potansiyel toksisite nedeniyle SDT'nin etkinliğini sınırlar. Mükemmel hedef özgüllüğü ve biyoyumluluğu olan yeni nano-sonosensitizerler geliştirmek için önemli çabalar sarf edilmesine rağmen, normal dokular üzerindeki yan etkiler, karmaşık hazırlama yaklaşımları ve hedef bölgede optimal olmayan birikim dahil olmak üzere çeşitli zorlukların ele alınması gerekmektedir. Bu nedenle odak noktası, gelişmiş hedef özgüllüğü, biyoyumluluk, biyogüvenlik ve terapötik etkinliğe sahip sonosensitizerler geliştirmektir. Ayrıca bu çalışmanın bir diğer sınırlaması ise *L. tropica* promastigotlarına karşı RB aracılı SDT'nin *in vitro* tabanlı bir tasarım olmasıdır. Bu analizlerden elde edilen sonuçlar bazı sınırlamalar ışığında değerlendirilmelidir. Sınırlamalar, hücre içi amastigotların veya deneysel hayvan modellerinin olmamasıyla ilgilidir. Ancak, çalışmamızın bazı güçlü yönleri de vardır. Ultrases uygulama optimizasyonu ile literatüre önemli bir katkı sağlanacaktır. Parazitler üzerine yapılan RB aracılı SDT ile ilgili çalışmalar değerli bilgiler sunmaktadır.

SONUÇ

L. tropica promastigotları üzerinde RB aracılı SDT'nin mekanizmaları ve güvenilirliğini keşfetmek, RB'nin tüm özelliklerini ve avantajlarını kullanmak için daha fazla

araştırmaya ihtiyaç olduğuna inanıyoruz. Çeşitli alanlarda elde edilen umut verici sonuçlar ve RB aracılı SDT'nin sunduğu ilginç bakış açıları nedeniyle, gelecekte RB aracılı SDT'nin biyomedikal uygulamalarda kullanımına odaklanacak daha fazla çalışma olacağını öngörüyoruz.

*Etik

Etik Kurul Onayı: *İn vitro* ortamda parazit hücreleri ile çalışıldığından dolayı etik kurul onayına gerek duyulmadı.

Hasta Onayı: İhtiyaç duyulmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulunda olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

*Yazarlık Katkıları

Konsept: S.Ö.Ç., C.A., Ö.F.D., İ.K., H.Ö., Dizayn: S.Ö.Ç., C.A., Ö.F.D., Veri Toplama veya İşleme: S.Ö.Ç., C.A., İ.K., H.Ö., Analiz veya Yorumlama: S.Ö.Ç., C.A., Literatür Arama: S.Ö.Ç., C.A., Ö.F.D., İ.K., H.Ö., Yazan: S.Ö.Ç., C.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri'nden maddi, Prof. Dr. Hatice Ertabaklar'dan ise materyal destek alınmıştır.

KAYNAKLAR

1. Copeland NK, Aronson NE. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. *Curr Opin Infect Dis* 2015; 28: 426-37.
2. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Am J Trop Med Hyg* 2017; 96: 24-45.
3. David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 2009; 22: 491-502.
4. WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly Epidemiol Rec* 2016; 91: 287-96.
5. WHO. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2010; 949: xii-xiii, 1-186.
6. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25: 363-70.
7. Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Kaya T, Ertabaklar H. Evaluation of *In vitro* and *In vivo* Drug Efficacy Over *Leishmania tropica*: A Pilot Study. *Türkiye Parazit Derg* 2018; 42: 11-9.
8. Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 397-401.
9. Navasconi TR, VND Reis, Freitas CF, De Souza Pereira PC, Caetano W, Hioka N, et al. Photodynamic Therapy With Bengal Rose and Derivatives Against *Leishmania amazonensis*. *J Lasers Med Sci* 2017; 8: 46-50.
10. Sharma R, Viana SM, Ng DKP, Kolli BK, Chang KP, de Oliveira CI. Photodynamic inactivation of *Leishmania braziliensis* doubly sensitized with uroporphyrin and diamino-phthalocyanine activates effector functions of macrophages *in vitro*. *Sci Rep* 2020; 10: 17065.
11. Caliskan-Ozlem S, Ertabaklar H, Bilgin MD, Ertug S. Evaluation of photodynamic therapy against *Leishmania tropica* promastigotes using different photosensitizers. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2022; 38: 354-64.
12. Roy J, Pandey V, Gupta I, Shekhar H. Antibacterial Sonodynamic Therapy: Current Status and Future Perspectives. *ACS Biomater Sci Eng* 2021; 7: 5326-38.
13. Rosenthal I, Sostaric JZ, Riesz P. Sonodynamic therapy-a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason Sonochem* 2004; 11: 349-63.
14. Yu T, Wang Z, Mason TJ. A review of research into the uses of low level ultrasound in cancer therapy. *Ultrason Sonochem* 2004; 11: 95-103.

15. Mišík V, Riesz P. Free radical intermediates in sonodynamic therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 335-48.
16. Yumita N, Sasaki K, Umemura SI, Yukawa A, Nishigaki R. Sonodynamically induced antitumor effect of galliumporphyrin complex by focused ultrasound on experimental kidney tumor. *Cancer Lett* 1997; 112: 79-86.
17. Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, Umemura S. Synergistic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 304-8.
18. Wan GY, Liu Y, Chen BW, Liu YY, Wang YS, Zhang N. Recent advances of sonodynamic therapy in cancer treatment. *Cancer Biol Med* 2016; 13: 325-38.
19. Kashef N, Huang YY, Hamblin MR. Advances in Antimicrobial Photodynamic Inactivation at the Nanoscale. *Nanophotonics* 2017; 6: 853-79.
20. Chen H, Zhou X, Gao Y, Zheng B, Tang F, Huang J. Recent Progress in Development of New Sonosensitizers for Sonodynamic Cancer Therapy. *Drug Discov Today* 2014; 19: 502-9.
21. Xing X, Zhao S, Xu T, Huang L, Zhang Y, Lan M, et al. Advances and Perspectives in Organic Sonosensitizers for Sonodynamic Therapy. *Coord Chem Rev* 2021; 445: 214087.
22. Wang Z, Dabrosin C, Yin X, Fuster MM, Arreola A, Rathmell WK, et al. Broad Targeting of Angiogenesis for Cancer Prevention and Therapy. *Semin Cancer Biol* 2015; 35(Suppl): 224-43.
23. Liang S, Deng X, Ma P, Cheng Z, Lin J. Recent Advances in Nanomaterial-Assisted Combinational Sonodynamic Cancer Therapy. *Adv Mater* 2020; 32: 2003214.
24. Pang X, Li D, Zhu J, Cheng J, Liu G. Beyond Antibiotics: Photo/Sonodynamic Approaches for Bacterial Theranostics. *Nanomicro Lett* 2020; 12: 144.
25. Gandin E, Lion Y, Van de Vorst A. Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives. *Photochem Photobiol* 1983; 37: 271-8.
26. Kochevar IE, Bouvier J, Lynch M, Lin C. Influence of dye and protein location on photosensitization of the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1196: 172-80.
27. Umemura S, Yumita N, Umemura K, Nishigaki R. Sonodynamically induced effect of rose bengal on isolated sarcoma 180 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43: 389-93.
28. Ozbilgin, A, Durmuskahya C, Kayalar H, Ertabaklar H, Gunduz C, Ural IO, et al. Antileishmanial Activity of Selected Turkish Medicinal Plants. *Trop J Pharm Res* 2014; 13: 2047-55.
29. Kivçak B, Mert T, Ertabaklar H, Balcıoğlu IC, Ozensoy Töz S. In vitro activity of *Arbutus unedo* against *Leishmania tropica* promastigotes. *Türkiye Parazitol Derg* 2009; 33: 114-5.
30. Limoncu ME, Eriç B, Gürpınar T, Özbilgin A, Balcıoğlu IC, Hoşgör-Limoncu M. Investigation of in vitro antileishmanial activity of moxifloxacin, linezolid and caspofungin on *Leishmania tropica* promastigotes. *Türkiye Parazitol Derg* 2013; 37: 1-3.
31. Sugita N, Iwase Y, Yumita N, Ikeda T, Umemura SI. Sonodynamically induced cell damage using rose bengal derivative. *Anticancer Res* 2010; 30: 3361-6.
32. Liu X, Zhao K, Cao J, Qi X, Wu L, Shen S. Ultrasound responsive self-assembled micelles loaded with hypocrellin for cancer sonodynamic therapy. *Int J Pharm* 2021; 608: 121052.
33. Yue W, Chen L, Yu L, Zhou B, Yin H, Ren W, et al. Checkpoint blockade and nanosonosensitizer-augmented noninvasive sonodynamic therapy combination reduces tumour growth and metastases in mice. *Nat Commun* 2019; 10: 2025.
34. Ma X, Pan H, Wu G, Yang Z, Yi J. Ultrasound may be exploited for the treatment of microbial diseases. *Med Hypotheses* 2009; 73: 18-9.
35. Liu B, Wang DJ, Liu BM, Wang X, He LL, Wang J, et al. The Influence of Ultrasound on the Fluoroquinolones Antibacterial Activity. *Ultrason Sonochem* 2011; 18: 1052-6.
36. Pourhajibagher M, Esboei BR, Hodjat M, Bahador A. Sonodynamic excitation of nanomicelle curcumin for eradication of streptococcus mutans under sonodynamic antimicrobial chemotherapy: enhanced anti-caries activity of nanomicelle curcumin. *Photodiagn Photodyn Ther* 2020; 30: 101780.
37. Zhang Y, Zhang H, Zhuang D, Bi L, Hu Z, Cao W. Hematoporphyrin monomethyl ether mediated sonodynamic antimicrobial chemotherapy on *porphyromonas gingivalis* in vitro. *Microb Pathog* 2020; 144: 104192.
38. Li G, Li J, Hou Y, Xie S, Xu J, Yang M, et al. Levofloxacin-Loaded Nanosonosensitizer as a Highly Efficient Therapy for *Bacillus Calmette-Guérin* Infections Based on Bacteria-Specific Labeling and Sonotheranostic Strategy. *Int J Nanomedicine* 2021; 16: 6553-73.
39. Yang M, Xie S, Adhikari VP, Dong YU, Du Y, Li D. The synergistic fungicidal effect of low-frequency and low-intensity ultrasound with amphotericin B-loaded nanoparticles on *C. albicans* in vitro, *Int J Pharm* 2018; 542: 232-41.
40. Alves F, Pavarina AC, Mima EGDO, McHale AP, Callan JF. Antimicrobial sonodynamic and photodynamic therapies against *Candida albicans*. *Biofouling* 2018; 34: 357-67.
41. Nakonechny F, Nisnevitch M, Nitzan Y, Nisnevitch. Sonodynamic excitation of rose bengal for eradication of gram-positive and gram-negative bacteria. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 684930.
42. Costley D, Nesbitt H, Ternan N, Dooley J, Huang Y, Hamblin MR, et al. Sonodynamic inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria using a rose bengal-antimicrobial peptide conjugate, *Int J Antimicrob Agents* 2017; 49: 31-6.
43. Fan L, Muhammad AI, Ismail BB, Liu D. Sonodynamic antimicrobial chemotherapy: An emerging alternative strategy for microbial inactivation. *Ultrason Sonochem* 2021; 75: 105591.
44. Gong Z, Dai Z. Design and Challenges of Sonodynamic Therapy System for Cancer Theranostics: From Equipment to Sensitizers. *Adv Sci (Weinh)* 2021; 8: 2002178.