



## Fotodinamik Terapi Uygulanan Meme Kanseri Nude Farelerde Tedavi Etkinliğinin FT-Raman ve FT-IR Spektroskopisi ile Karakterizasyonu: Erken Dönem Sonuçları

### Characterization Effectiveness of Photodynamic Therapy Treatment on Breast Cancer Formed Nude Mice based on FT-Raman and FT-IR Spectroscopy: Preliminary Results

Tuğba Kiriş<sup>1</sup>, Saadet Akbulut<sup>1</sup>, Ayşenur Kiriş<sup>1</sup>, Haşim Özgür Tabakoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biyomedikal Mühendislik Enstitüsü  
Fatih Üniversitesi

[tugbakiris9@gmail.com](mailto:tugbakiris9@gmail.com), [akbulut\\_saadet@hotmail.com](mailto:akbulut_saadet@hotmail.com), [kirisaysenur@gmail.com](mailto:kirisaysenur@gmail.com), [tabakoglu@fatih.edu.tr](mailto:tabakoglu@fatih.edu.tr)

#### Özetçe

Doku lezyonlarını ayırt etmek için kullanılan mevcut uygulamalar histopatolojik kriterlere dayanmaktadır. Bu işlemler uygulama ve yorumlama aşamalarında bireylerin kabiliyet ve deneyimlerine bağlı olduğundan hataya açıktır. Bu çalışmanın amacı, histopatolojik yöntemler yerine doku bazlı moleküler analizlerin FT-IR ve FT-Raman spektroskopileri kullanılarak farelerin meme tümörlerine uygulanan fotodinamik terapi (FDT) yönteminin etkinliğinin araştırılmasıdır. Yakın gelecekte doku bazlı moleküler analizlerin histopatolojik yöntemlere alternatif ve/veya tamamlayıcı olarak kullanılacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** FT-IR, FT-Raman, Spektroskopi, FDT, Meme Kanseri, Nude Fare

#### Abstract

Existing applications that are used to distinguish tissue lesions are based on histopathological criteria. Histopathology is a subjective method. Application and interpretation phases are connected to the individuals skill and experience thus open to error. The purpose of this study is to investigate the effectiveness of PDT method to treat breast tumors on mice by tissue-based molecular analysis of the FT-IR and FT-Raman spectroscopy instead of histopathology. In the near future that methods could be an alternative and/or complementary for histopathological analysis.

**Keywords:** FT-IR, FT-Raman, Spectroscopy, PDT, Breast Cancer, Nude Mice

#### 1. Giriş

Meme kanseri dünya genelinde kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olup kadınlarda ölüme sebep olan ikinci kanser nedenidir[1]. Meme kanserinin tanısında tamamlayıcı tarama metodları, hastalığın erken tanısı için ihtiyaç duyulan yöntemlerdir. Son yıllarda meme kanserinin tanısında invazif olmayan teknikler araştırılmaktadır. Optik yöntemler (FT-IR, Raman ve optik yansıtma yöntemleri gibi) geleneksel yöntemlere oranla birçok avantaja sahiptir: doku analizi için zaman alıcı hazırlık aşamaları yoktur, tahribatsızdır, kısa zamanda sonuç alınabilir[2].

Raman saçılması ışının moleküle çarparak farklı bir frekansta, ki bu molekülün yapısında bulunan bağın titreşiminden kaynaklanır, saçılmasıyla meydana gelir[3]. Fourier Transform Raman spektroskopisi biyolojik materyalin yapısında bulunan moleküllerden açığa çıkan ineleastik saçılmaları toplayarak; dokudaki moleküler bileşim, moleküler yapı ve moleküler etkileşimler hakkında bilgi verir[4].

FT-Raman spektroskopisi diğer spektroskopik yöntemlere kıyasla daha avantajlıdır: uzaysal çözünürlüğü 2 mm veya daha azdır; sıvı, katı ve yarı-katı numuneler analiz edilebilir; suyun analizlere büyük bir etkisi yoktur. Raman spektroskopisinin en önemli avantajı dokunun yapısal ve biyokimyasal özelliklerini, kısa sürede belirlenebilmesidir[5].

FT Raman spektroskopisi kullandığı dalga boyu ve güç itibarıyla dokuyu etkilemez ve nispeten penetrasyon derinliği daha büyüktür bu nedenle in vivo ölçümler için daha çok tercih edilir[6]. FTIR spektroskopisi kimyasal bağlardaki titreşimleri tespit ederek farklı birçok biyolojik materyaldeki proteinler, lipitler, nükleik asitler ve karbonhidratlarla ilişkili fonksiyonel grupların varlığını ve konsantrasyonlarını moleküler seviyede belirler.

## Fotoelektronik

FTIR spektroskopisi apoptoz, hücre farklılaşması, proteinlerin yapısal değişiklikleri gibi hücresel süreçlerdeki değişikliklere hassastır[7]. Meme kanserinin tedavisinde uygulanan geleneksel yaklaşımların yanı sıra FDT Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış, alternatif ve/veya tamamlayıcı minimal girişimsel bir tedavi yöntemidir[8]. FDT, ışığa duyarlı fotosensitif bir madde ve bu maddenin absorbe edeceği dalga-boyuna sahip ışık kaynağının reaksiyonu sonucunda oksijen varlığında hücrelerin tahribatına dayanır. Geleneksel tedavilerde görülen yan etkilerin azaltılmış olması ve tekrarlanabilir olması FDT'nin en önemli avantajlarıdır[9].

Bu çalışmada tedavi olarak uygulanan FDT'nin etkinliği optik yöntemlerle analiz edilerek araştırılmıştır. Doku bazlı moleküler analizlerde FT-IR spektroskopisi ve FT-Raman spektroskopisi birbirini tamamlayıcı yöntemler olarak kullanılmıştır.

## 2. Malzeme ve Yöntem

### 2.1 Hücre Kültürü ve Tümör Gelişimi

Çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattı Prof. Dr. Bedia Çakmakoğlu tarafından sağlanmıştır. Kanser hücreleri %20 fetal dana serum (FBS), 100 u/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren NaHCO<sub>3</sub> solüsyonu, 2 µM L-glutamin ile desteklenmiş RPMI 1640 besiyerinde, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37°C'de ve nemli ortamda çoğaltılmıştır.

Araştırmada 3 haftalık dişi nude fareler kullanılmıştır. Farelerin flank bölgesine 1:1 oranda matrigel ile 10<sup>7</sup> MCF-7 tümör hücreleri enjekte edilerek, tümör gelişimi sağlanmıştır. Tümör inokulasyonundan önce hayvanlara subkutan olarak östrojen pellet yerleştirilmiştir. İnokulasyonu takiben 2 hafta içerisinde hayvanların enjeksiyon bölgelerinde şişkinlik ve kızarıklıklar oluşmaya başlamıştır, ortalama 4-5 hafta sonunda tümör büyüklük çapı 3-5 mm'ye ulaşan hayvanlar deneye dahil edilmiştir. Çalışmanın yapılması için gerekli etik kurul izni Boğaziçi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Komisyonu'ndan alınmıştır.



Şekil 1: Fotodinamik Terapi öncesinde deneklere östrojen pelleti yerleştirilmesine ait görüntü.

### 2.2 Fotodinamik Terapi Uygulaması

Tümör boyutları 3-5 mm olduğunda FDT uygulamalarına başlanmıştır. 150 mW güçte, 808 nm dalga boyunda, CW mod di-yot lazer ile 20 dakika boyunca ışımaya yapılmıştır. Tedavi 4 gün

## 3. Gün / 17 Ekim 2015, Cumartesi

boyunca tekrarlanmıştır. Fotosensitif madde olarak, 5 mg/kg ICG intraperitoneal uygulanmıştır. Deneklere ICG verildikten sonra, ICG'nin akümüasyonu için 60 ve 90 dakika olmak üzere iki farklı gruba ayrılmıştır. Dördüncü terapiden 48 saat sonra deneklerde kalan tümör dokusunun tamamı çıkartılmıştır. Çıkartılan nekropsi dokusu serum fizyolojik su içerisinde spektroskopik analizler için Fatih Üniversitesi BiyoNano Teknoloji Araştırma Geliştirme Merkezi'ne transfer edilmiştir.

### 2.3 FT-IR Spektroskopisi ile Analiz

Deneklerden elde edilen doku örnekleri bir gece boyunca -80°C derin dondurucuda dondurulmuştur. Ardından liyofilizatör cihazında kurutulmuştur. Dokular kurulduktan sonra FT-IR spektrumları 4000-400 cm<sup>-1</sup> aralığında 4 cm<sup>-1</sup> spektral çözünürlüğü ile toplanmıştır. Belirlenen frekans değerleri kullanılarak spektral bantların hangi fonksiyonel grup ve hangi biyomoleküllerden kaynaklandığı belirlenmiştir.

### 2.4 FT-Raman Spektroskopisi ile Analiz

FTIR spektroskopisi ile analizi yapılan dokulara hiçbir ek işlem yapılmadan FT Raman spektroskopisi analizleri için kullanılmıştır. FT Raman spektrumları 4000-40 cm<sup>-1</sup> aralığında 8 cm<sup>-1</sup> çözünürlüğünde materyalin 4 ayrı noktasından toplanmıştır. Lazerin uyardığı ortalama güç 400 ile 500 mW arasında değişmiştir.

## 3. Sonuçlar ve Tartışma

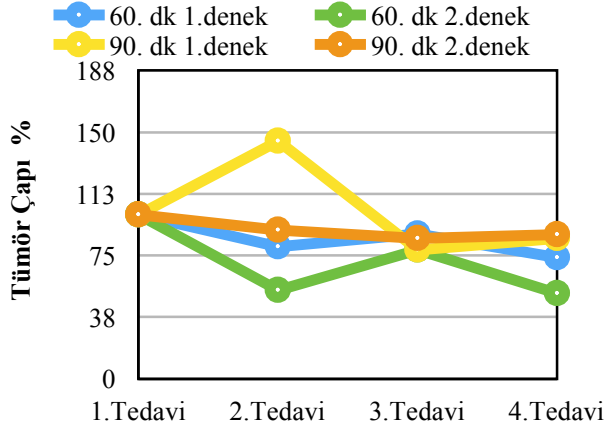
FDT uygulaması yapılan gruplarda deneklere ait tümör boyutu değişimleri ile ölçülmüştür. 1. grupta deneklerde ortalama % 62.75'e, 2. grupta ortalama %80.98'e gerilemiştir (Tablo 1, Şekil 2).

Tablo 1: Deneklerin tümör boyutlarına ait değişimlerin yüzde oranları.

Gruplar	1.Grup (60 dk)		2.Grup (90 dk)	
	1. Denek	2. Denek	1. Denek	2. Denek
Denek numaraları				
1.Tedavi	100	100	100	100
2.Tedavi	80,33	53,96	144,8	90,44
3.Tedavi	88,2	78,33	78,43	85,24
4.Tedavi	73,64	51,86	74,26	87,71

**Fotoelektronik**

3. Gün / 17 Ekim 2015, Cumartesi

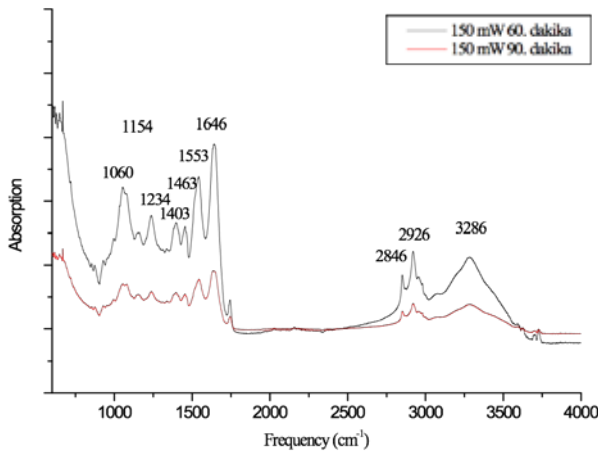


Şekil 2: Deneklerin tümör boyutlarının 4 günlük tedavi süresince değişimlerine ait yüzde oranları.

**3.1 FT-IR Spektroskopisi ile Analiz Sonuçları**

FT-IR spektroskopisi kullanılarak, hızlı ve güvenilir bir şekilde zamana bağlı olarak değişen uygulamalarla hücre yaşamsallığı arasındaki ilişki ve aynı zamanda meydana gelen biyomoleküler değişiklikler belirlenmiştir.

Fotodinamik terapi uygulanan 1. ve 2. gruptaki deneklerin nekropsi dokuları FT - IR spektroskopisi ile analizleri yapılarak hücre ölümleri sırasında biyomolekülerin absorbanlarında meydana gelen değişikliklere ait spektrumlar Şekil 3’de verilmiştir. 1743cm<sup>-1</sup> C=O salınım lipitlerden kaynaklanmaktadır. 1456 cm<sup>-1</sup> protein ve lipitlerdeki CH<sub>2</sub> eğilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. İkiisi arasındaki oran, normal dokudan tümör dokuya geçildiğinde azalma göstermektedir.



Şekil 3: FT-IR spektrumları, 150 mW güçte 60 ve 90. dakikalarda yapılan ICG tabanlı FDT’ den sonra dokulardaki biyomolekülerin absorbanlarında meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir.

Tablo 2: 1743 cm<sup>-1</sup>/1456 cm<sup>-1</sup> frekanslara ait absorban şiddetlerinin oranı.

150 mW 60 dk	150 mW 90 dk
0,01285/0,10033=0,1280	0,03895/0,10813=0,3602

1657cm<sup>-1</sup> amide I proteinlerinin alfa heliks yapısından kaynaklanıyor. 1635cm<sup>-1</sup> amide I proteinlerinin beta sheet yapısından kaynaklanıyor. 1540 cm<sup>-1</sup> amide II proteinlerinin beta sheetlerinden kaynaklanıyor. 1553 cm<sup>-1</sup> amide II proteinlerinin alfa sheet yapısından kaynaklanıyor. 1657/1635 ve 1553/1540 oranının yüksek olması dokunun karsinom ve fibroödem olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Malignant dokularda amide I proteinlerinin alfa heliks bandından kaynaklanan frekansın(1657cm<sup>-1</sup>) şiddetinde azalma gözlenirken, amide I proteinlerinin beta sheet bandından kaynaklanan frekansında (1635 cm<sup>-1</sup>) artış gözlenmektedir.

Tablo 3: 1657 cm<sup>-1</sup>/1635 cm<sup>-1</sup> ve 1553 cm<sup>-1</sup>/1540 cm<sup>-1</sup> frekanslarına ait absorban şiddetlerinin oranı

150 mW 60 dk	150 mW 90 dk
0,18913/0,20814=0,9086	0,15996/0,18173=0,8802
0,14001/0,16746=0,8360	0,14406/0,15395=0,9357

3000-3600 cm<sup>-1</sup> frekans bandları. O-H salınımindan kaynaklanıyor. 2800 ile 3500 arasında yoğunluğun normal dokuda yüksek olması beklenir (kreatin, fosfolipit ve kolesterolden kaynaklanmaktadır). 1050 ile 1080 cm<sup>-1</sup> arasında oksidatif strese bağlı olarak DNA’da oluşan hasarı niteleyen bir tepectiktir. Tedavi sırasında hücrelerde oksidatif bir stresin meydana geldiğini söyleyebiliriz. Bu da tedavi sırasında oluşan ölüm şeklinin oksidatif strese bağlı apoptoz olduğunu göstermektedir.

1064cm<sup>-1</sup> salınımları ribozdan kaynaklanmaktadır. Hücre ölümü ve ortamdaki riboz miktarına bağlı olarak ICG’nin mitokondride toplandığını söyleyebiliriz. 1227cm<sup>-1</sup> ve 1165 cm<sup>-1</sup> nükleik asitlerden kaynaklanan bandlardır.

Tablo 4: 1064 cm<sup>-1</sup> frekansına ait absorban şiddetleri.

150 mW 60 dk	150 mW 90 dk
0,15607	0,1357

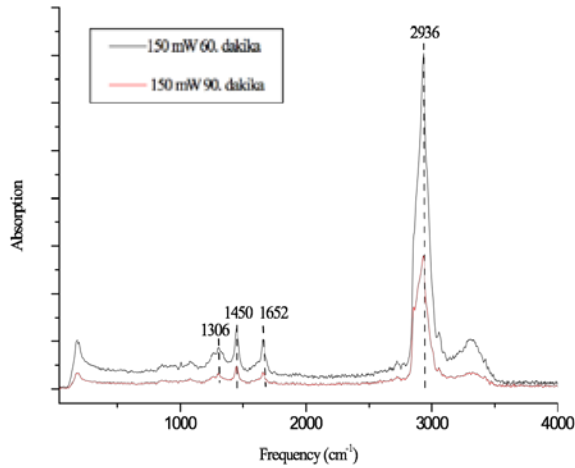
**3.2 FT Raman Spektroskopisi ile Analiz Sonuçları**

FT-Raman spektroskopisi kullanılarak, hızlı ve güvenilir ve FT-IR spektroskopisine oranla nispeten penetrasyon derinliği daha fazla olarak zamana bağlı olarak değişen uygulamalarla hücre yaşamsallığı arasındaki ilişki ve aynı zamanda meydana gelen biyomoleküler bağların titreşimlerinden kaynaklanan değişiklikler belirlenmiştir. 1306 cm<sup>-1</sup> deki pik (CH<sub>2</sub>) bağlarından, fosfolipit ve kolajenden kaynaklanmaktadır. Bu pik özellikle in situ duktal karsinomlar için karakteristik olarak gözlenen bir piktir. 1450 cm<sup>-1</sup> deki pik (CH<sub>2</sub>) ve (CH<sub>3</sub>) proteinlerinden kaynaklanmaktadır. 1652 cm<sup>-1</sup> deki pik amide I proteinlerinden

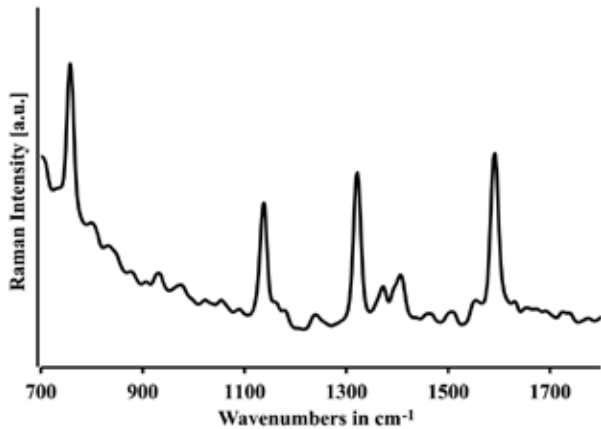
## Fotoelektronik

ve kolajenden kaynaklanmaktadır. 60. dakika da yapılan uygulamaya ait spektrumda amide I proteinlerinden kaynaklanan bu frekansa ait absorpsiyon şiddeti 90. dakika uygulamasından daha yüksektir. FTIR sonuçlarıyla karşılaştırıldığında amide I bandındaki ( $1657 \text{ cm}^{-1}$ ) absorpsiyon şiddeti 90. dakika uygulamasının şiddetinden yüksektir.  $2936 \text{ CH}_3 / \text{C-H}$  gerinmesinden kaynaklanmaktadır.

Şekil 4: FT Raman spektrumları. Şekilde  $150 \text{ mW}$  güçte 60 ve 90. dakikalarda yapılan ICG güdümlü Fotodinamik Terapiden sonra dokulardaki biyomoleküllerin absorpsiyonlarında meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir.



Sitokrom c hücre apoptoza girdiğinde mitokondri tarafından sitoplazmaya salınır, dolayısıyla ortamda sitokrom c nin varlığı hücrenin apoptoza girdiğinin bir göstergesidir. Sitokrom c raman spektrumu Şekil 5'de gösterilmiştir. Şekil 4 ile Şekil 5 karşılaştırıldığında sitokrom c'nin bu dokularda lokalize olduğu ve uygulanan tedavinin hücreleri apoptoza sürüklediği görülmüştür [10].



Şekil 5: Sitokrom c ft-raman spektrumu

3. Gün / 17 Ekim 2015, Cumartesi

## 4. Teşekkür

Bu çalışma Tübitak tarafından 113S420 proje numarasıyla desteklenmiştir.

## 5. Kaynakça

1. Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A. Cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 62, 10–29, 2012.
2. Rocha-Osornio L.; Pichardo-Molina J.L.; Barbosa-Sabanero G.; Roca J.M. de la; Frausto-Reyes C.; Huerta-Franco R.; Martínez-García J. A., Characterization of Breast Cancer Tissue From a Rat Model With and Without Cancer: The Use of Raman Spectroscopy. Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication, 48:6, 393-402, 2015.
3. Wachsmann-Hogiu S.; Weeks T.; Huser T., Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy – from single cells to humans. Current Opinion in Biotechnology. February; 20(1): 63–73, 2009.
4. Amharref N.; Beljebbar A.; Dukic S.; Venteo L.; Schneider L.; Pluot M.; Manfait M. Discriminating healthy from tumor and necrosis tissue in rat brain tissue samples by Raman spectral imaging. Biochimica et Biophysica Acta 1768, 2605–2615, 2007.
5. Barroso E.M.; Smits R.W.; Bakker Schut T.C.; Hove I. ten; Hardillo J.A.; Wolvius E.B. Discrimination between oral cancer and healthy tissue based on water content determined by Raman Spectroscopy. Anal.Chem. 2015.
6. Saka A.S.; Shafer-Peltier K.E.; Fitzmaurice M.; Crowe J.; Dasari R.R.; S. Feld M.S. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. PNAS, August 30, vol. 102 no. 35, 12371–12376, 2005.
7. Gaudenzi S.; Pozzi D.; Toro P.; Silvestri I.; Morrone S.; Castellano A.C. Cell apoptosis specific marker found by Fourier Transform Infrared Spectroscopy IOS press. 18, 415–422 415, 2004.
8. Dolmans E.J.; Dennis G.J.; Fukumura D.; Rakesh K. Photodynamic therapy for cancer. Nature. 380-387, 2003.
9. Allison; Ron R.; Moghissi; Keyvan. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 10, 331–341, 2013.
10. Hamideh Salehi, Elodie Middendorp, Ivan Panayotov, Pierre-Yves Collart Dutilleul, Attila-Gergely Vegh, Sathish Ram krishnan, Csilla Gergely, and Frederic Cuisinier. Confocal Raman data analysis enables identifying apoptosis of MCF-7 cells caused by anticancer drug paclitaxel. Journal of Biomedical Optics, 18(5), 056010, 2013.