



ICG Tabanlı FDT'nin *in vivo* Etkisinin Araştırılması
In vivo investigation of ICG Mediated PDT Effects

*Ayşenur KİRİŞ¹, Tuğba KİRİŞ¹, Saadet AKBULUT¹, Haşim Özgür
TABAKOĞLU¹, Zuhale GÜCİN², Mahmut MÜSLÜMANOĞLU³*

¹ Biyomedikal Mühendislik Enstitüsü

Fatih Üniversitesi

kirisaysenur@gmail.com, tugbakiris9@gmail.com, akbulut_saadet@hotmail.com, tabakoglu@fatih.edu.tr

² Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi

zgucin@yahoo.com

³ Genel Cerrahi Anabilim Dalı

3Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi

mmuslumanoglu@bezmialem.edu.tr



Özetçe

Fotodinamik Terapi (FDT) tümör hücrelerine seçici olarak sitotoksik etki uygulayan, klinik olarak onaylanmış, minimal girişimsel bir tedavi yöntemidir. Bu çalışmada indosiyanın yeşili (ICG) tabanlı FDT'nin meme kanserine karşı etkisi in vivo olarak araştırılmıştır. MCF-7 meme kanser hücreleri nude farelere ekilmiş, tümörler 4-5 mm boyutlarına eriştiğinde FDT uygulaması 24 saat ara ile 4 kere yapılmıştır. Sonuçlar patolojik inceleme yöntemlerinden hematoxilen&eoizin ile boyanarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, FDT uygulaması sonrasında %50 oranında küçülme elde edilmiş ve patolojik analizlerde nekroz dokuları görülmüştür.

Abstract

Photodynamic Therapy (PDT) is selectively cytotoxic for tumor cells, minimal invasive and clinical approved therapeutic procedure. Aim of this study is investigation of ICG mediated PDT effects on breast cancer formed animal model. MCF-7 breast cancer cells inoculated to nude mice. When tumors size arrived 4-5 mm, PDT application applied 4 times with 24 hours intervals. Results evaluated with hematoxylin&eosin (H&E) staining which is one of the common pathological examination method. According to results, after PDT treatment, %50 reduction obtained in tumor size and tissue necrosis was observed.

1. Giriş

Meme kanseri, kadınlarında en yaygın görülen ve en çok ölüme neden olan kanser tipidir [1-2]. WHO 2014 verilerine göre, 235,035 kişiye meme kanseri tanısı konması ve 40.430 kişinin meme kanserinden hayatını kaybetmesi beklenmektedir [3]. Meme kanseri, süt üreten ya da süt taşıyan kanallardaki hücrelerden köken alarak bu hücrelerin kontrolsüz büyümesi ile meydana gelmektedir. Meme kanserlerinin onda birinde genetik bir bozukluk tespit edilmektedir. Tedavisi stratejisi olarak cerrahi yöntem, radyoterapi, kemoterapi ve hormon tedavisi klinikte sıklıkla uygulanan yöntemlerdir [2,4,5].

FDT yan etkileri minimize edilmiş, minimal girişimsel, nispeten düşük maliyetli bir tedavi yöntemidir [6]. FDA tarafından onaylanmış olan FDT, minimal girişimsel bir yöntemdir. FDT, azaltılmış yan etkileri ve tekrarlanabilir bir tedavi olması yönüyle geleneksel yöntemlere üstünlük gösterir. FDT uygulamalarının başarısı fotosensitizer tipine ve konsantrasyonuna, ışık kaynağı ve dozuna ve oksijen konsantrasyonuna bağlıdır [7].

Nude fareler timüs bezi eksik olması ya da zarar görmesi sonucu doğuştan immün sistemi eksik türlerdir. İmmün tepkilerini, sahip oldukları çok az sayıda T lenfositleri sayesinde sağlarlar. Kürk eksikliği nedeniyle çıplak (nude) fareler olarak adlandırılırlar. Bu sayede bir çok tümör türü sınırlı bir red cevabı ile nude farelerde yetiştirilebilir [8]. Yetiştirilen tümörler tedavilerinin ardından çeşitli tekniklerle analiz edilebilmektedir. Patoloji yöntemlerinden en yaygın olanı hematoxilen&eoizin (H&E) boyamadır. Temel prensibi, mavimor renk veren hematoxilen ile, pembemsi kırmızı renk veren eoizin'in hücreleri boyamasıdır. Hematoxilen alkali pH'da boyar maddedir ve nükleus ile kalsiyum çöktüntülerini boyar. Eozin, sitoplazma, protein birikimi ve amiloid gibi yapıları boyar [9].

İndosiyanın yeşili (ICG), klinikte kalp debisi, karaciğer fonksiyonu değerlendirilmesi, retina ve koroidal damarların görüntülemesinde kullanılmakta ayrıca fotodinamik terapide fotosensitizer ajan olarak deneysel çalışmalarda tercih edilmektedir [9,10].

Bu çalışmanın amacı, günümüzde meme kanseri tedavisi için klinikte sıklıkla tercih edilen tedavilere alternatif olarak FDT'nin indosiyanın yeşili (ICG) tabanlı olarak in-vivo meme kanser tümörüne etkisinin araştırılmasıdır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Hücre Kültürü

MCF-7 insan meme kanser hücreleri Prof. Dr. Bedia Çakmakoglu'nun hediyesidir. Hücreler %5 karbondioksit içeren ve 37oC ortamda RPMI 1640 içinde kültüre edildi. RPMI 1640 %10 ve %20'lik fetal dana serumu içermektedir. Bunun dışında 2 µM L-glutamin, 100 µg/ml streptomisin ve 100 u/ml penisilin katılmıştır. Hiperisin %0.1'lik dimethylsulfoxide (DMSO) içinde çözündü ve kullanımdan hemen önce kültür ortamında (1-50 µM) dilüe edildi. Hücre sayımı 0.01 ml hücre süspansiyona 0.01 ml tripan mavisi eklenerek otomatik hücre sayım cihazında yapılmıştır (Invitrogen Cell Counting).

Çalışma Boğaziçi Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 2013-01-29 tarihi başvuru olarak kabul edilmiştir ve onaylanmıştır.

2.2. İnokülasyon

İnokülasyondan önce hayvanlara hormon takviyesi yapılmıştır. 1×10^7 MCF-7 hücresi flank bölgesine intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Hücreler 100 ul PBS içerisinde çözülmüştür. Enjeksiyon yapılan hayvanlar 3 haftalıktr.

2.3. FDT Uygulaması

Tümör çapı 4-5 mm'ye ulaşan hayvanlarda tedaviye başlanmıştır. 5 mg/kg ICG intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Tedaviye alınan hayvanlar ICG enjeksiyonun ardından tedavi tamamlanana kadar karanlık ortamda tutulmuşlardır. Tedavilerden sonra kaliper ile tümör çapı ölçülmüştür.

Çalışmada 2 tedavi grubu oluşturulmuştur. 1.gruba ICG enjeksiyondan hemen sonra ışık uygulaması yapılmıştır. 2. gruba ICG enjeksiyonundan 30 dakika sonra ışık uygulaması yapılmıştır. Tüm gruplarda tedavi 24 saat ara ile 4 gün tekrarlı olarak uygulanmıştır.

Çalışmada 808 nm, CW mod diyot lazer kullanılmıştır. Uygulanan güç 250 mW, uygulama süresi 20 dakikadır.

2.4. Patoloji Analizi

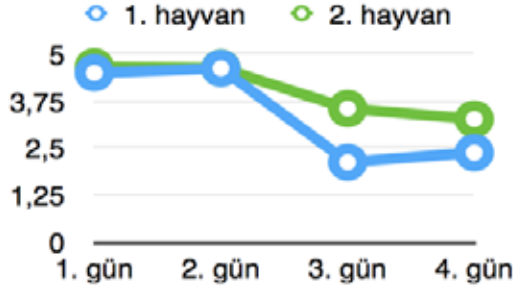
4. FDT uygulamasından 48 saat sonra tümör dokuları çıkartılmış ve patolojik analize alınmıştır. Dokulara hematoxilen&eoizin boyama yapılmıştır.

Fotoelektrik Sinyaller

3. Gün 27 Eylül 2014 Cumartesi (10.45-11.30)

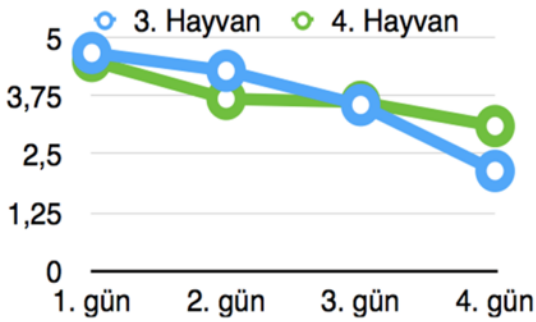
3. Sonuçlar

2 farklı grupta, toplam 4 hayvana uygulanan Fotodinamik terapinin her bir uygulama sonunda tümör boyutlarına etkisi ölçülmüş ve değişimler xx istatistik yöntemlerine göre analiz edilmiştir. Değişim istatistiği grafikte gösterilmiştir (Şekil1-2).



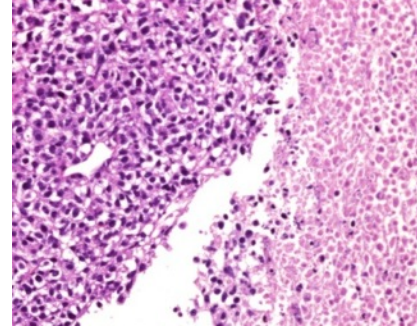
Şekil 1. FDT Uygularının 1. Grubun Tümör boyutlarına etkisi

Birinci gruptaki hayvanlara ICG enjeksiyonun ardından hayvanlara 250 mW güçle 20 dakika lazer uygulaması yapılmıştır. 1. hayvanda tümör çapında %50'ye yakın oranda küçülme kaydedilmiştir. 2.hayvanda tümör çapında %50'den fazla küçülme görülmüştür (Şekil 1).



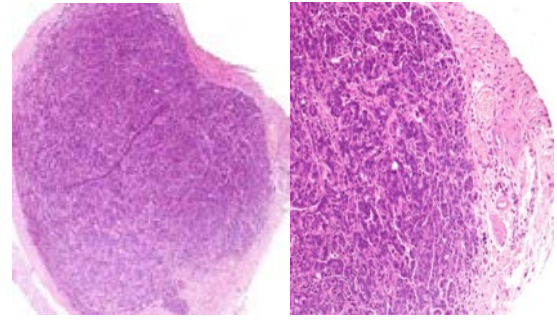
Şekil 2. FDT Uygularının 2. Grubun Tümör boyutlarına etkisi

İkinci gruptaki hayvanlara ICG enjeksiyonundan 30 dakika sonra 250 mW güçle 20 dakika lazer uygulaması yapılmıştır. Tümör çapında 3. hayvanda %50'den daha fazla küçülme elde edilirken, 4. hayvanda %50'ye yakın küçülme elde edilmiştir (Şekil 2).



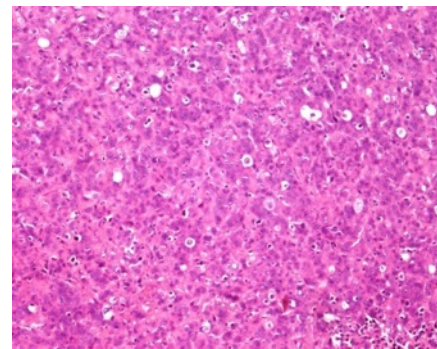
Şekil 3. 1.hayvana ait H&E boyama görüntüsü (x400)

1. hayvandan alınan numunenin patolojik incelemesinde solda belirgin a tipi tümör dokusu, sağda nekroz dokusu görülmektedir (Şekil 3).



Şekil 4. 2.hayvana ait H&E boyama görüntüleri (a.x100, b.x200)

2. hayvandan alınan numunenin patolojik incelemesinde sağda iyi sınırlı malign tümör görülmüştür. Soldaki fotoğrafta iyi sınırlı tümör dokusu içinde nekroz görülmektedir (Şekil 4).

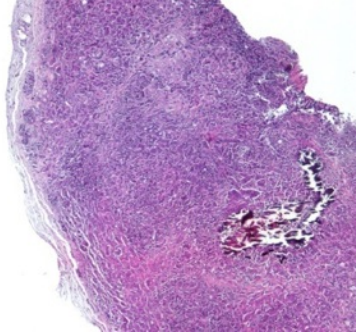


Şekil 5.3.hayvana ait H&E boyama görüntüsü (x400)

3. hayvandan alınan numunenin patolojik incelemesinde belirgin a tipi gösteren sınırlı alanda tübüler yapı oluşturan, geniş kısımda solid tümör dokusu görülmüştür (Şekil 5).

Fotoelektrik Sinyaller

3. Gün 27 Eylül 2014 Cumartesi (10.45-11.30)



Şekil 6. 4.hayvana ait H&E boyama görüntüsü(x100)

4. hayvandan alınan numunenin patolojik analizinde iyi sınırlı malign tümör dokusu görülmektedir. Periferde nekroz dokuları görülmektedir (Şekil 6).

4. Tartışma

FDT malignant tümörlerde, tümör boyutunu etkili olarak azaltan bir tedavi yöntemidir. Fotodinamik terapi geleneksel yöntemlere kıyasla çeşitli avantaja sahip bir yöntemdir. Bunlar; minimal girişimsel olması, tekrar edilebilir olması ve seçici olarak bir bölgeye uygulanabilmesidir.

Bu çalışmada, hayvanların tümör boyutları izlenmiş ve tedavi sonucu patolojik analiz kullanılarak tümör yapıları incelenmiştir.

Intraperitoneal olarak 5mg/kg ICG verildikten sonra 0 ve 30. dakikalarda yapılan FDT uygulamalarından sonra tümör çaplarına ait küçülmeler Şekil 1 ve Şekil 2'de verilmiştir. Tedavi tamamlandıktan sonra çıkartılan tümörlerin patolojik analizlerine ait görüntüler Şekil 3, 4, 5 ve 6'da verilmiştir.

Çalışma sonucu yapılan patolojik analize göre 4 hayvanda da malign tümör geliştirilmiştir.

ICG verildikten 0 dakika sonra yapılan uygulamada elde edilen sonuçlarla, 30 dakika sonra yapılan uygulamalar arasında anlamlı bir fark yoktur. Her iki uygulamada da hayvanların tümör boyutları ortalama %50 oranında küçülmüştür.

ICG enjeksiyonun hemen ardından FDT uygulamasına alınan 1. hayvanın patolojik analizinde büyük bir nekroz dokusu görülmüştür. 2. hayvanın patolojik incelemesinde iyi sınırlı tümör dokusu görülmüştür.

ICG enjeksiyondan 30 dakika sonrasında başlatılan FDT uygulamasından ardından 3. hayvandan alınan tümör dokusunun patolojik analizinde belirgin a tipi iyi sınırlı tümör görülmüştür. 4. hayvandan alınan tümör dokusunun analizinde periferdeki nekroz dokuları görülmüştür. Nekroz dokuları tedavinin kısmen başarılı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın ön sonuçlarına göre Fotodinamik Terapi 250 mW lazer uygulaması ile 5mm'lik meme kanser modellerinde kısmen başarılı olmuştur. Parametrelere ait optimizasyon çalışması yapılmaya devam etmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, Tübitak 1002 kodlu 113S420 proje numarası ile desteklenmiştir.

5. Kaynakça

1. J.Ferlay, et al., Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Worldwide. IARC Cancer Base No. 5, version 2.0. IARC Press, Lyon, 2002 (2004).
2. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. International Journal of Cancer 1999; 80: 827—41.
3. Theakston F. World health statistics 2008. In: Breast cancer: mortality and screening. France: WHO Press; 2008.
4. Montazerabadi A.ve ark., The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 109, 42–49, (2012).
5. Institute, N. C., Radiation Therapy and you. A guide to self-help during cancer treatment,USA: National Institutes of Health, 2007.
6. Saville, M.W., Lietzau, J., Pluda, J.M., Wilson, W.H., Humphrey, R.W., Feigel, E. and et al., Treatment of HIV-associated Kaposi's sarcoma with paclitaxel, The Lancet, 346(8966): 26–8, 1995.
7. Mamoona A.M., Gamal A.M. and et al., In vitro efficiency and mechanistic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for human melanoma, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 6:105-116, 2009.
8. Sorensen R, Iani V, Moan J. Kinetics of photobleaching of protoporphyrin IX in the skin of nude mice exposed to different fluence rates of red light. Photochem Photobiol 1998;68(6):835—40.
9. AFIP Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, March 1992.
10. El-Daly SM, Gamal-Eldeen AM, Abo-Zeid MAM, Borai İH, Wafay HA, Abdel-Ghaffar ARB Photodynamic Therapeutic Activity of Indocyanine Green Entrapped in Polymeric Nanoparticles. Photodiagnostic and Photodynamic Therapy 2012;13-26
11. A. M. Mamoona, A. M. Gamal-Eldeen, M. E. Ruppel, R. J. Smith, T. Tsang, and L. M. Miller, "In vitro efficiency and mechanistic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for human melanoma," *Photodiagnosis PhotodynTher*, vol. 6, pp. 105-16, Jun 2009.