



## Meme Kanseri Oluşturulmuş Nude Farelerde Fotodinamik Tedavinin Etkinliğinin Fourier Transform Infrared Spektroskopi ile Araştırılması

### Investigation of Photodynamic Therapy Efficiency in Breast Cancer Formed Nude Mice With Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Saadet Akbulut<sup>1</sup>, Tuğba Kiriş<sup>1</sup>, Ayşenur Kiriş<sup>1</sup>, Haşim Özgür TABAKOĞLU<sup>1</sup> Mahmut MÜSLÜMANOĞLU<sup>2</sup>

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

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

<sup>2</sup> Genel Cerrahi Anabilim Dalı  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi  
[mmuslumanoglu@bezmialem.edu.tr](mailto:mmuslumanoglu@bezmialem.edu.tr)

#### Özetçe

Fotodinamik tedavi (FDT), özellikle onkolojik dermatolojik ve oftalmolojik hastalıkların tedavisinde umut verici bir tedavi yöntemidir. Bu çalışmada MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı ekilmiş nude farelere 5 mg/kg ICG'nin intra peritonere enjekte edilmesinin ardından 0, 30, 60 ve 90 dakikalarda lazer uygulamaları yapılmıştır. Uygulamalardan sonra dokularda meydana gelen hücre hasarı, lipid, protein ve nükleik asitlerin absorbanlarındaki değişiklikleri değerlendirmek için Fourier transform infrared spektroskopi kullanılmıştır. Fourier transform infrared spektroskopi hızlı ve girişimsel olmayan, yeni analitik bir yöntemdir. Elde edilen sonuçlara göre, 90 dakikada yapılan uygulamaya ait FT-IR spektrumlarında 3280-2900 cm<sup>-1</sup> bant bölgesindeki lipid içeriğinde önemli bir azalma olduğu görülmektedir. Bununla birlikte yine 90 dakikada yapılan uygulamadan sonra parmak izi bölgesi olarak da adlandırılan 1700-700 cm<sup>-1</sup> bantlarındaki nükleik asit içeriğinde önemli bir azalma olduğu görülmektedir.

#### Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a promising treatment for a number of diseases, especially for oncological, dermatological and ophthalmological indications. In this study explores the efficiency of ICG as a PDT agent for in MCF-7 xenografted nude mice following intra peritoneal administration of 5 mg/kg ICG at 0 min, 30 min, 60 min and 90 min. After the therapy Fourier transform infrared spectroscopy as a novel method which is rapid and non-invasive, was used to assess the cell damage and changes in lipid, protein, and nucleic acids. According to the results, there was significant alterations in the at the 3280-2900 cm<sup>-1</sup> region in 90 min that was a decrease in lipid content. However there was significant decrease in known as fingerprint region at the 1700-700 cm<sup>-1</sup> region in 90 min.

#### 1. Giriş

Dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanser meme kanseridir ve her yıl yaklaşık olarak 1,3 milyon insana meme kanseri teşhisi konulmaktadır. Meme kanseri hücrelerinin

inhibe edilmesi için çeşitli tedavi yaklaşımları kullanılmaktadır(1). Bunlar arasında Fotodinamik terapi giderek artan bir önem kazanmaktadır.

Fotodinamik terapinin sistemik toksisitesinin düşük olması, lokal olarak uygulanabilir olması, tekrarlanabilir olması ve uygulama kolaylığının olması dolayısıyla birçok kanser çeşidinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte tek başına uygulanabileceği gibi diğer tedavi yöntemleriyle kombin edilerek de uygulanabilir (2; 3; 4; 5).

Fotodinamik Terapi (FDT) Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış, bir ışık kaynağı ve ışığa duyarlı bir ajanın kullanıldığı minimal girişimsel bir tedavi yöntemidir. Fotodinamik tedavi sırasında seçici olarak tümör dokuda biriken ışığa duyarlı ajan ile uygun dalga boyuna sahip ışık kaynağı kullanılmaktadır. Işığa duyarlı ajan ışık kaynağıyla etkileşime girmesi sonucu bir dizi fotokimyasal reaksiyonlar meydana getirerek tümör dokusunda apoptoz ya da nekroz meydana gelmesine neden olur (6; 7; 8; 9; 10).

Fourier transform infrared spektroskopi kimyasal bağlardaki titreşimleri tespit ederek dokuların biyokimyasal bileşimlerini belirlemek için kullanılan güçlü bir analitik yöntemdir. Hücre ölümleri sırasında dokudaki lipid, protein ve nükleik asit bileşimindeki değişikliklere hassastır (11; 12; 13).

Bu çalışmanın amacı, 770-810 nm dalga boylarında yüksek absorpsiyona sahip olan fotodinamik terapinin meme kanseri oluşturulmuş nude fareler üzerindeki etkilerinin FT-IR spektroskopi ile araştırılmasıdır. Özellikle çalışmada fotoduyarlı ajan olarak seçilen ICG molekülü intra peritonel olarak verildikten sonra tedaviye başlamak için gerekli olan optimum süreyi belirlemektir.

#### 2. Hücre Kültürü Ve İnokülasyon

Çalışmada kullanılan MCF-7 insan meme kanseri hücre hatları İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'ndan edinilmiştir. MCF-7 insan meme kanseri hücreleri %20 fetal dana serum (FBS), 100 u/ml penisilin ve 100 µg/ml

### Fotoelektrik Sinyaller

streptomisin içeren NaHCO<sub>3</sub> solüsyonu ve 2 µM L-glutamin ile desteklenmiş RPMI 1640 besiyerine ekilip ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37°C'de ve nemli ortamlarda çoğaltılmıştır.

Çalışmada 3 haftalık dişi nude fareler kullanılmıştır. Hücre kültüründen sonra hücreler tripsin ile yıkanarak sayım yapılmıştır. Daha sonra 1\*10<sup>7</sup> hücre/ml PBS nude farelere enjekte edilmiştir. İnokülasyondan önce hayvanlara östrojen takviyesi yapılmıştır.

Çalışma sırasında uygulanan protokol için gerekli etik kurul izni Boğaziçi Üniversitesi Etik Kurul Komisyonu'ndan 2013-01-29 tarihinde alınmıştır.

#### 2.1 Fotodinamik Terapi İle Tedavi

Tümör boyutu 4-5 mm olduğunda 5 mg/kg ICG intra peritonel olarak enjekte edilmiştir. Tedaviye başlamak için gerekli olan optimum süreyi belirlemek için dört farklı süre baz alınarak lazer uygulamaları yapılmıştır. Uygulama sırasında ICG'yi uyarmak için 808 nm dalga boyunda diyot lazer kullanılmıştır.

Gruplara göre ICG verildikten sonra 0, 30, 60 ve 90 dakikalarda tümürlü doku 250 mW gücünde 808 nm dalga boyunda ışık ile 20 dakika boyunca uyarılmıştır. Tedavi protokolü 24 saat arayla 4 gün uygulanmıştır. Dördüncü terapi sonunda tümör dokunun tamamı çıkarılarak serum fizyolojik su içerisinde taşınarak FT-IR analizlerinin yapılması için Üniversitesi BiyoNanoTeknoloji (BiNaTAM) Araştırma Geliştirme Merkezine götürülmüştür. FT-IR spektroskopisi Fatih Üniversitesi BiyoNanoTeknoloji (BiNaTAM) Araştırma Geliştirme Merkezi'nde mevcuttur.

#### 2.2 Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi

Deneklerden elde edilen doku örneklerinin FT-IR spektroskopisi ile analizleri yapılmadan önce dokular kurutulmuştur. Dokular kurutulmadan önce bir gece boyunca -80°C derin dondurucuda donduruldu. Ardından bir gün boyunca -50°C ve alçak basınç altında liyoflizatörde dokudaki suyun süblimleşerek uzaklaşması sağlandı.

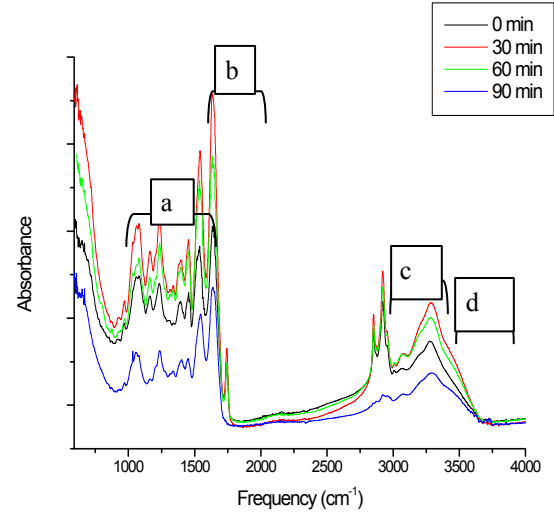
Dokular kurutulduktan sonra FT-IR spektrumları 4000-400 cm<sup>-1</sup> aralığında 4 cm<sup>-1</sup> spektral çözünürlüğü ile toplanmıştır. Belirlenen frekans değerleri kullanılarak spektral bantların hangi fonksiyonel grup ve hangi biyomoleküllerden kaynaklandığı belirlenmiştir.

### 3. Sonuçlar

Bu çalışmada 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.

İntraperitonel olarak 5 mg/kg ICG verildikten sonra 0, 30, 60, 90 dakikalarda yapılan Fotodinamik Terapi uygulamalarından sonra çıkarılarak FT-IR spektroskopisi ile analizleri yapılan dokulardaki hücre ölümleri sırasında biyomoleküllerin absorbanlarında meydana gelen değişikliklere ait spektrumlar Şekil 1'de verilmiştir.

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



Şekil 1. FT-IR spektrumları. Şekilde 0, 30, 60 ve 90 dakikalarda yapılan Fotodinamik Terapiden sonra dokulardaki biyomoleküllerin absorbanlarında meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir: (a) nükleik asitler; (b) amid I ve amid II proteinleri; (c) lipitler; (d) amid A ve amid B proteinleri.

ICG verildikten 90 dakika sonra yapılan lazer uygulamasında elde edilen spektrumlarda dokudaki nükleik asit, amid I-II, lipit ve amid A-B proteinlerinin konsantrasyonlarında diğer uygulamalara kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir. Uygulamalardan sonra hücre yapının bozulması ve hücre zarının kaybolması dokudaki lipit konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu söylenebilir. Aynı zamanda protein konsantrasyonundaki değişiklikler hücre proteinlerinin denatüre olamaya başladığının göstergesidir. Dokudaki nükleik asit konsantrasyonunun azalması DNA'nın parçalanmasından kaynaklanabilir bu durum aynı zamanda hücrenin apoptoza girdiğinin belirtisi de olabilir.

ICG verildikten 30 dakika sonra yapılan lazer uygulamasında elde edilen spektrumlarda dokudaki nükleik asit, amid I-II, lipit ve amid A-B proteinlerinin konsantrasyonlarının beklenenden yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni 30 dakikalık sürenin ICG'nin tümör dokuda birikmesi için yeterli bir süre olamaması ya da nude farelerin metabolizma hızına bağlı olarak ICG'nin vücuttan uzaklaştırılmış olabilir.

### 4. Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından 113S420 proje numarası ile desteklenmiştir. İstanbul Üniversitesi Moleküler Tıp bölümünden Prof. Dr. Bedia Çakmakoğlu ve ekibine hücre kültürü çalışmalarına verdikleri teknik destek için teşekkür ederiz.

### 5. Kaynakça

1. *Microgel-Encapsulated Methylene Blue for the Treatment of Breast Cancer Cells by Photodynamic Therapy.* Anil Khanal, Minh-Phuong Ngoc Bui, Seong S. Seo. 2014 March; 17(1), Journal of Breast Cancer, s. 18-24.
2. *A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy.* Huang, Zheng. 2005, Technol Cancer Res Treat., s. 283-293.



### Fotoelektrik Sinyaller

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

3. *Photodynamic therapy for cancer.* **Dolmans, Dennis E.J.G.J., Fukumura, Dai ve Jain, Rakesh K.** 2003, Nature Publishing Group, s. 380-387.
4. *Photodynamic therapy: from the beginning.* **Kessel, D.** 2004, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, s. 3-5.
5. **Prasad, Paras N.** *Introduction to Biophotonics.* New York City : John Wiley & Sons, Inc, 2003.
6. **Allison, R.R., et al.** Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers-A review of applications and outcomes. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* . 2005, s. 2:205—222.
7. **Allison, Ron R. ve Moghissi, Keyvan.** Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013, s. 10:331—341.
8. **Nonaka, M. ve H. Ikeda, T. Inokuchi.** Effect of combined photodynamic and chemotherapeutic treatment on lymphoma cells in vitro. *Cancer Letters* . 2002, s. 184:171–178.
9. **Ribeiro, Joselito Nardy, Silva, André Romero da ve Jorge, Renato Atilio.** Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. December 2004, s. 383-390.
10. **Walt, Heinrich, et al.** Early apoptotic responses in transgenic mouse mammary carcinoma for photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* . 2006, s. 3:227—233.
11. *In vitro efficiency and mechanistic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for human melanoma.* **Abdel-Megid Mamoon, Amira M. Gamal—Eldeen, Meghan E. Ruppel, Randy J. Smith, Thomas Tsang, Lisa M. Miller MS.** s.l. : Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2009, Cilt 6:105—116.
12. *Detection of structural disorders in pancreatic tumour DNA with Fourier-transform infrared spectroscopy.* **Venkata Radhakrishna Kondepoti, Michael Keese, H. Michael Heise, Juergen Backhaus.** s.l. : Vibrational Spectroscopy, 2006, Cilt 40:33-39.
13. *Fiber-optic probes enable cancer detection with FTIR spectroscopy.* **Mark A. Mackanos, Christopher H. Contag.** s.l. : Trends in Biotechnology , 2010, Cilt 28:317–323.