

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİNİN FTIR VE KEMOMETRİ TEKNİĞİ KULLANIMI İLE
ERKEN TEŞHİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

H.Bengisu GEDİKLİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

AĞUSTOS 2018

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİNİN FTIR VE KEMOMETRİ TEKNİĞİ KULLANIMI İLE
ERKEN TEŞHİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**H.Bengisu GEDİKLİ
(506151037)**

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ramazan KIZIL

AĞUSTOS 2018

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506151037 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **H.Bengisu GEDİKLİ**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**MEME KANSERİNİN FTIR VE KEMOMETRİ TEKNİĞİ KULLANIMI İLE ERKEN TEŞHİSİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Ramazan KIZIL**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri: **Prof. Dr. Ümit İNCE**
Prof. Dr. Seniha GÜNER
Dr. Öğr. Üyesi Ramazan KIZIL Prof.
Prof. Dr. Sevil ÇELİK
Yüksek Lisans Enstitüsü

Teslim Tarihi : **3 Mayıs 2018**
Savunma Tarihi : **31 Ağustos 2018**



ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her türlü manevi desteğini, anlayışını ve zamanını esirgmeden tüm içtenliğiyle bana yardımcı olan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ramazan KIZIL'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamım ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, her anımda yanımda olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Mayıs 2018

H.Bengisu GEDİKLİ
(Kimya Mühendisi)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1 İnfrared Spektroskopisi Hakkında Bilgi.....	3
2.2 Kemometrik Yöntem.....	5
2.3 FTIR Mikrospektroskopinin Başlıca Uygulama Alanları	7
2.3.1 Diyabet	7
2.3.2 İnflamatuar bağırsak hastalıkları.....	8
2.3.3 Kanser	8
2.3.4 Osteoporoz	9
2.3.5 Alzheimer.....	9
2.3.6 Ateroskleroz	10
2.4 Kanser Histopatolojisi ve Meme Kanseri.....	10
2.5 FTIR Spektroskopisi ile Meme Kanseri İncelenmesi	12
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	17
3.1 Kullanılan Örnekler ve Numune Hazırlama.....	17
3.2 Yöntemler.....	17
3.2.1 Spektroskopi yöntemi	17
3.2.2 Kemometrik yöntem	21
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	23
4.1 FTIR Tekniğinin Örnekler Üzerinde Kullanılması ile Ulaşılan Sonuçlar.....	23
4.2 Kemometrik Yöntemin FTIR ile Elde Edilen Verilerde Kullanımı	25
4.3 Spektral Veriler ile Sınıflandırma ve Hızlı Meme Kanseri Teşhisi	31
KAYNAKLAR	43
EKLER	47
ÖZGEÇMİŞ	53



KISALTMALAR

FTIR	: Fourier Transform Infrared
MRI	: Magnetic Resonance Imaging
ATR	: Attenuated Total Reflectance
FFPE	: Formalin-Fixation applied and Paraffin-Embedded
PLS	: Partial Least Square
CVA	: Canonical Variate Analysis
SIMCA	: Soft Independent Modelling of Class Analogies
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
UV-vis	: Ultraviyole Görünür
PCA	: Principal Component Analysis
PAT	: Process Analytical Technology
PCR	: Principal Component Regression
MLR	: Multiple Linear Regression
H&E(HE)	: Hematoksilin/Eozin
DKIS	: Duktal Karsinoma İnsitu
LKIS	: Lobüleruktal Karsinoma İnsitu
LDA	: Lineer Diskriminant Analiz
UNEQ	: Unequal Dispersed Classes

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1	:Ölçümleri yapılan doku türlerinin sınıflandırılması.....	20
Çizelge 4.1	:Sağlıklı ve tümör meme dokusu IR bantları ve bunların karşılık geldiği moleküler gruplar (s-strong, m-medium, w-weak şiddet skalasını sergiler.).....	24
Çizelge 4.2	:Mikro normal ve patolojik dokularda protein ve DNA piklerindeki kaymalar(meme kanseri)	25
Çizelge 4.3	:Normal dokuların ve kanser dokularının SIMCA modeli ile tahmin edilebilme oranları.....	28
Çizelge 4.4	:Meme dokusunun Spektro-Histopatolojik sınıflandırılması için kullanılan örnek sayısı ve T,N,M skorları	33



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	:PCA için örnek Veri/Sonuç grafiği	6
Şekil 2.2	:HE boyama ile DKIS için elde edilen histopatoloji görüntüleri; (a)Düşük derece DKIS durumu, (b)Yüksek derece DKIS durumu.....	11
Şekil 2.3	:Üç örnek içeren bir spektroskopik veri setinin CVA sınıflandırması	13
Şekil 2.4	:Kullanılan meme kesiti örnekleri(tümör).....	15
Şekil 4.1	:Meme dokusundan toplanmış 3 ayrı spektrum tipi	23
Şekil 4.2	:CVA kullanılarak DNA spektrum bilgileri ile normal ve patolojik dokuların ayırt edilmesi.....	25
Şekil 4.3	:Soldaki CVA diskriminasyonunda amid I, sağdaki CVA diskriminasyonunda amid II bandları baz alınarak normal ve tümör dokuların sınıflandırılması	25
Şekil 4.4	:Meme normal ve tümör dokularının parmak izi bölgesi kullanımı ile PLS-CVA model diskriminasyonu.....	27
Şekil 4.5	:3 grupta yapılan patolojik ve normal meme dokularının CVA ile sınıflandırılması.....	30
Şekil 4.6	:Meme dokularının histolojik decereye bağlı olarak parmak izi(A) ve DNA/RNA bilgileri(B) kullanılarak PLS-CVA ile diskriminasyonu .	31
Şekil 4.7	:Sağlıklı meme dokularının tümör derecelerinin histolojik sınıflandırılmasına(T,N,M) göre diskriminasyonu.....	35
Şekil 4.8	:Tümörlerin parmak izi bilgileri kullanılarak histolojik derecelerine göre sınıflandırılması.....	37
Şekil 4.9	:Histopatolojik özelliklerine göre tümörlerin 10 PLS faktörlü CVA diskriminasyonu	38



MEME KANSERİNİN FTIR VE KEMOMETRİ TEKNİĞİ KULLANIMI İLE ERKEN TEŞHİSİ

ÖZET

Günümüz teknolojisi pek çok alanda gelişme göstermekte ve bu alanlar içerisinde tıp alanında kanser hastalarının hastalık süreçlerinin erken teşhisi, tedavi yöntemleri ve iyileştirilmesi üzerinde de ciddi çalışmalar yürütülmektedir. İnsanlara maddi ve manevi anlamda çok yardımcı olabilecek mevcut gelişen çalışma alanlarında; tıp alanında kanser teşhislerinde kullanımı oldukça basit ve uygun olan FTIR tekniği öne çıkmaktadır.

FTIR tekniği ile kullanılacak olan insan dokuları dinamik bir yapıya sahip olup bölgesel heterojenik farklılıklar gösterir. Heterojenik farklılıklar elde edilen ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi ve yorumlanmasında oldukça fazla varyasyona yol açar. Bu nedenle kemometri tekniği ile dokuların incelenmesi daha faydalı sonuçlar elde etmemizi sağlayacaktır. Günümüzde pek çok farklı alanda kullanılan bu tekniklerin kullanımı, 2002 yılından bu yana artış göstermiştir.

Bu çalışmada, daha önce tıp alanında farklı amaçlarla kullanılan FTIR-ATR tekniği ile birlikte kemometri tekniği ile oluşturulan modellemeler de kullanılarak, meme kanserinin erken teşhisinde, daha kesin ve sağlıklı, objektif, hızlı ve ekonomik maliyeti düşük olabilecek sonuçlar veren bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Acıbadem MAA Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı Acıbadem Maslak Afiliye Hastanesi Patoloji Laboratuvarı ile birlikte yapılan bu çalışmada, ilgili numuneler hastane tarafından temin edilmiş olup 1cmx1cmx1cm boyutlarındadır. FTIR tekniği için Perkin-Elmer Spectrum 100 cihazı kullanılmış, numune ölçümleri $650-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında 4 cm^{-1} spektral çözünürlükte alınmıştır. Numuneler makroskopik FTIR-ATR ölçümleri sonrasında değerlendirilmiş ve dokuların kimyasal kompozisyonlarının spektral pozisyonları literatürden karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmanın ikinci aşamasında ilgili veriler kemometri tekniği ile değerlendirilmek üzere alınarak PLS-CVA ve SIMCA diskriminasyon programları ile model oluşumları gerçekleştirilmiştir. Kemometrik tekniğinde spektrumlarda bulunan parmak izi, DNA/RNA ve protein amid I-II bölgeleri baz alınarak çalışmalar yürütülmüş ve oluşturulan modeller ile klinik histopatolojik sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Çalışmalar sonucunda özellikle parmak izi bölgesinde yapılan modellemelerde normal ve patolojik doku örneklerinin birbirlerinden oldukça başarılı bir şekilde ayrılanabildiği gözlemlenmiş ve kimyasal bilgisi bilinmeyen dokuların gruplandırılması yapıldığında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. İncelemelere sağlıklı ve patolojik dokuların birbirlerinden diskriminasyonundan başlanarak, patolojik dokuların histopatolojik özelliklerine göre ayrışım sağlanmıştır.



EARLY DIAGNOSIS OF BREAST CANCER USING FTIR AND CHEMOMETRY TECHNIQUE

SUMMARY

For cancer patients, early detection of the relevant cancer symptoms is critical to increase survival rates. It has been observed that postmenopausal women which correspond age of 40-55 are most affected by breast cancer in the world. Breast cancer-based deaths among women are estimated accounted for 14% of total cancer-related deaths [1,2]. Early diagnosis of breast cancer is not cheap, rapid or easy. If it is possible to reach all these features in one single case, researches will have come a long way to treatment.

Nowadays, there are a few methods to detect a breast cancer which are MRI (magnetic resonance imaging), mammography, ultrasonography and histopathological examination. It was very likely that these methods would give some erroneous measurements. MRI is an expensive tool and has low precision to express clearly differences between benign and malignant tumor types. Additionally, even it was the best cancer detection method, it has a critical risk for the advanced stage breast cancer patients because of high radiation area. Ultrasonography and mammography have low accuracy in comparison to MRI. On the other hand, histopathological examination can be considered the most using way to recognize the breast cancer. However, this method has some negativeness such as personal mistakes and time consuming procedures.

IR spectroscopy, which has many applications in the industry for environment- or production-based applications, offers a number of advantageous solutions in many ways. In the past, this technique has been used in a wide range of applications, from the combination of gas or liquid mixtures, to the purity of gases or to the analysis of trace components for environmental analysis. The devices used can be increased in variety, from simple filter-based photometers to complex opto-mechanical devices such as Fourier Transform Infrared (FTIR) devices. In complex measurement situations, larger quantities of spectral information are required and either full-spectrum or multi-wavelength analyzers are used. Among the analytical techniques available for process analytical measurements, IR provides a versatile measurement technique where all physical forms of a sample - gas, liquid, solids, and even mixed phases - are present. In recent years, many new technologies have emerged as a result of telecommunication developments in the late 1990s. While not directly applicable at this time, many of these technologies will offer a way to improve the performance of IR measurement devices and help in the development of smaller, lower cost instruments in the future [3].

FTIR has been used as a tool in many investigations. This technique was first used to classify breast cancer tissue in 1996. Normal and cancer tissues are discriminated with phosphodiester groups amide I and amide II bands which are increased in cancer tissues [4]. H. Fabian et al. were used IR imaging system with functional group mapping techniques and cluster analysis to discriminate benign and malignant tumor tissues [5]. FTIR-ATR imaging system which is a practical tool to identify chemical

signatures of fluid or solid unknown structures was detected distinguish between nuclear grades [6]. FTIR was showed that second derivative spectra of breast tissues differ by specific peaks [7]. Samples which were formalin-fixation applied and paraffin-embedded (FFPE process) were used widely to analyze. FFPE process were showed small but significant changes in cancer cells after IR imaging [8]. FTIR were succesfully used with receiver operating characteristic curves, second derivative spectrums and deconvolution of protein amide I peak to distinguish normal, malignant and benign tissues [9]. Taking account all of these, IR spectroscopy can be demonstrated as the newest and accuracy tool to determine a cancer and also its grades by analyzing biochemical structures of tissue sections.

In some studies, different methods have been used in history in order to interpret the data more efficiently. Chemometrics, or chemometric, is the use of mathematical and statistical methods to improve understanding of chemical information and to relate quality parameters or physical properties to analytical instrument data. The results of the studies are modeled and these models can be routinely applied to future data to estimate parameters with the same characteristics. The result of the chemometry approach gains efficiency in evaluating product quality. It can be used to develop more efficient laboratory applications or automated quality control systems. The only requirement is an appropriate tool and software to interpret the patterns in the data [13]. Chemometric method results for the analysis of spectrum data provide many effective ways to calibrate the data. The three general headings to be noted in the use of the chemometric methods are as follows: Powerful calibration, sample selection diagnostics, variable selection and statistical calculation to create reliable models; correct application of spectroscopic data preprocessing to reduce and correct parasites such as overlapping bands, baseline deviations, scattering and path length variation; model validation and integration, rigorous estimation, quality control measurement, real-time product quality and process monitoring [13,15].

The aim of this study was not only to discriminate normal and tumor tissues but also nuclear grades. 17 breast tissue samples were used including 14 normal and 17 tumor tissues. It is stated what could be the spectrum expressing making the pathology in the crude breast tissues which tumor and healthy tissues were not microscopically analyzed. It has been determined that the breast tissue showing cancer formation produces three types of spectrum depending on the fat content: strong, weak fat content and no fat content. Additionally, there were too many paramaters but more suitable indicatess were chosen to analyze which were histological grades (grade I, II and III).

Samples were obtained from Acibadem Medical School Pathology Laboratory (Istanbul/Turkey). Postoperative samples were taken to the pathology laboratory and acquired macroscopic sections (1cm thickness, cubic shape). The sections were immediately injected with formaldehyde and were not allowed to dry. The specimens were analyzed by FTIR-ATR spectroscopy and studied chemometrically.

Chemical fingerprints of samples were determined using a classical FTIR spectrometer (Perkin Elmer Spectrum 100) in the range of 650-4000 cm^{-1} at spectral resolution of 4 cm^{-1} with 16 co-scan. A total of 211 normal and pathological samples taken from 17 patients were evaluated by taking measurements from 106 surfaces. The samples were evaluated according to their fat content after macroscopic FTIR-ATR measurements and at first stage the necessary tissue spectra were determined. The spectral positions of the chemical compositions of the tissues have been compared with the literature.

Spectral data were treated with partial least squares (PLS) technique to reduce the size of the data. Spectral information related to the chemical nature of DNA&RNA and proteins were treated with canonical variate analysis (CVA) and soft independent modelling of class analogies (SIMCA) to predict tumor tissues on a 2D variate plane and determine the class (healthy or not) of an unknown sample. Clinical histopathologic results were compared with established models.

As a result of the studies, it has been observed that normal and pathological tissue specimens can be distinguished from each other very well, especially in the fingerprint region, and similar results are obtained when grouping of the unknown chemical information is done. The chemometric methods used have been shown to achieve great success in this context and as the most important difference from previous articles, tumor tissues were attempted to classify by carcinoma stages with chemometric examination.





1. GİRİŞ

Kanser hastaları için ilgili kanser türünün erken teşhisi, hayatta kalım oranlarını arttırması açısından kritik bir öneme sahiptir. Yapılan araştırmalara göre postmenopozal dönemde bulunan 40-55 yaş aralığındaki kadınlar, dünyada meme kanserinden en çok etkilenen grubu oluşturmaktadır. Buna ek olarak dünya genelinde kadınlarda ki kanser hastaları arasındaki ölüm oranlarına bakıldığında; meme kanseri teşhisi konulan hastaların ölüm oranlarının diğer kanser türlerinden kaynaklanan ölümlerin yaklaşık %14'ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir [1,2].

Günümüzde spektroskopik çeşitleri değişik kullanım alanlarına sahip olmakla birlikte FTIR spektroskopisi klinik alanlarda kullanım için büyük bir potansiyele sahiptir. Bahsedilen potansiyelin bu kadar büyük olmasının en önemli sebepleri; klinik alanlardaki kullanımlarında hızlı, hassas, ekonomik ve hasta için zararsız bir teşhis sürecine izin vermesidir. Dokuda meydana gelen biyokimyasal değişimlerin hastalık süresi boyunca farklılık göstermesi temel alınarak, moleküler düzeyde meydana gelen bu tür kimyasal değişimler vibrasyonel spektroskopik teknikleri ile kanser araştırmalarında ek olarak incelenmektedir.

Bu çalışmada meme kanseri örnekleri üzerinde kemometrik incelemeler yapılmıştır. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi attenuated total reflection (FTIR-ATR) kullanılarak meme kanseri dokusunda ki biyokimyasal izler moleküler düzeyde incelenmiş ve standart histopatolojik değerlendirmeler ile karşılaştırılmıştır. Buna ek olarak kanser dokusu, normal doku ve kanser dokularının evreleri arasında ki farklar incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 İnfrared Spektroskopisi Hakkında Bilgi

Çevre veya üretim temelli uygulamalar için endüstride pek çok kullanım alanı bulunan İnfrared (IR) spektroskopisi pek çok anlamda avantajlı çözümler sunmaktadır. Tarihte bu teknik, gaz veya sıvı karışımlarının bileşiminden, gazların saflığı veya çevresel analiz için eser bileşenlerin analizine kadar geniş bir yelpazede kullanılmıştır. Kullanılan cihazlar, basit filtre bazlı fotometrelerden, Fourier transform infrared (FTIR) cihazları gibi opto-mekanik olan karmaşık aygıtlara kadar çeşitliliği artırılabilir. Non-dispersif infrared spektrometrik yöntem, karbon oksitler ve hidrokarbonlar için yanma gazlarının analizi gibi iyi tanımlanmış analiz yöntemlerinin kullanıldığı ölçümlerde ortak olarak kullanılır. Karmaşık ölçüm durumlarında, daha büyük miktarda spektral bilgi elde etmek gerekir ve ya tam-spektrumlu ya da çoklu dalga boylu analizörler kullanılır. Proses analitik ölçümleri için mevcut olan analitik teknikler arasında, bir numunenin tüm fiziksel formlarının - gaz, sıvı, katılar ve hatta karışık fazların mevcut olduğu durumlarda IR çok yönlü bir ölçüm tekniği sunar. Genellikle uygulamalarda bu tekniğe ek olarak herhangi bir modifikasyon yapılmasına gerek duyulmaz. Son yıllarda birçok yeni teknoloji 1990'ların sonlarında telekomünikasyon gelişmelerinin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Şu anda doğrudan uygulanabilir olmasa da, bu teknolojilerin birçoğu IR ölçüm cihazlarının performansını artırmanın bir yolunu sunmakla beraber gelecekte daha küçük ve daha düşük maliyetli enstrümanların ortaya çıkması konusunda yardımcı olacaktır [3].

IR spektroskopisini ölçüm aralığı açısından tanımlamak önemlidir. Moleküler düzeydeki titreşimlerden elde edilen bilgilere dayalı olarak, IR spektroskopisi için operasyonel dalga boyu aralığı, frekans birimleri cinsinden 800 ile 200000 nm (0.8-200 mm) veya 12000 ila 50 cm^{-1} arasındadır. Bunlar fonksiyonel olarak temel ve ikincil spektroskopi olarak birbirlerinden ayrı tanımlanabilir. Bu, mid-IR (orta IR) ve near-IR (NIR) terimlerine dayanan IR spektroskopisinin klasik tanımlarına yol açmaktadır. NIR, geleneksel olarak izleme uygulamaları için uygulanır. Bununla

birlikte, yıllar boyunca NIR uygulamaları, çok iyi tanımlanmış alanlarda, özellikle tarım ve gıda, kimya ve petrokimya ile ilaç endüstrisinde görülmüştür. Bir zamanlar gaz izleme uygulamaları gibi klasik mid-IR uygulamaları olarak düşünülen uygulamalar şimdi NIR spektral bölgede, özellikle lazer tabanlı teknolojiler ve telekomünikasyon endüstrilerinden geliştirilen diğer teknolojiler nedeniyle popüler hale gelmiştir. Mid- IR bölgesi, hafif ile orta ağırlıklı elementlerin yaygın kimyasal bağ özelliklerinin çoğunun temel titreşimlerini kapsar. Özellikle, çoğu gaz (oksijen ve azot gibi diatomik moleküler gazlar hariç) ve organik bileşikler bu spektral bölgede iyi temsil edilmektedir. Günümüzde mid-IR bölgesi, normalde laboratuvar cihazlarının normal frekans çalışma aralığı açısından $5000-400 \text{ cm}^{-1}$ (2-25 mm) olarak tanımlanmaktadır. Çoğu kimyasal bazlı uygulamalar için, dalga boyu (wavenumber) frekans terimini cm^{-1} birimleri ile kullanmak alışılmış bir işlemdir [3].

Mid-IR için spektral bölge $5000-400 \text{ cm}^{-1}$ aralığında olduğu belirtilmişti; burada 400 cm^{-1} 'in altındaki bölge uzak IR olarak sınıflandırılır ve düşük frekanslı titreşimleri gösterir. NIR'in klasik tanımında IR ve spektrumun görünür kısmı arasında bulunan (nominal olarak 750 ile 3300 nm [0.75-3.3 mm, yaklaşık $13300-3000 \text{ cm}^{-1}$] arası) bölge olarak gösterilir. Aslında NIR spektrumu ultraviyole görünür (UV-vis) cihazının geliştirilmesiyle ortaya çıktı. 1970'lerin sonlarında, NIR'in çok çeşitli katı ve sıvı materyallerin kantitatif ölçümleri için yararlı olduğu kabul edildi ve bunun sonucu olarak, yeni bir enstrüman sınıfı tasarlanarak bu spektral bölgenin ona ait olduğu kabul edildi. Proses izleme uygulamaları için orta IR'nin NIR'ninkiyle karşılaştırıldığında avantaj ve dezavantajları vardır. Mid-IR'nin en büyük avantajı, mid-IR spektrumunun data içeriğine dayanan çok sayıda uygulamaya geniş şekilde uygulanabilir olmasıdır [10,11]. Analitik olarak, NIR'in temel bilgi içeriği sınırlıdır ve farklı uygulamalar için farklı bölgeler, kullanılan spektral bölge boyunca değişir. Her durumda, ölçümler, mid-IR bölgede meydana gelen temel titreşimlerden elde edilen ikincil absorpsiyonları ve kombinasyonlarla ilişkili absorpsiyonları kullanır [12].

2.2 Kemometrik Yöntem

Kemometri, ya da kemometrik yöntem, kimyasal bilginin anlaşılmasını geliştirmek ve kalite parametrelerini veya fiziksel özellikleri analitik enstrüman verisiyle ilişkilendirmek için matematiksel ve istatistiksel yöntemlerin kullanılmasıdır. Çalışmalardaki sonuç verileri modellenir ve bu modeller aynı özelliğe sahip parametreleri tahmin etmek için rutin olarak gelecekteki verilere uygulanabilir. Kemometri yaklaşımının sonucu, ürün kalitesinin değerlendirilmesinde verimlilik kazanmaktadır. Daha verimli laboratuvar uygulamaları veya otomatik kalite kontrol sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılabilir. Tek gereklilik, verilerdeki kalıpları yorumlamak için uygun bir araç ve yazılımdır [13]. Bunların yanı sıra bu çalışmaların biyoloji dalında kullanılmasına biyometrik yöntem, mühendislik dalında kullanılmasına teknometrik yöntem ve psikoloji dalında kullanılmasına psikometrik yöntem denilmektedir. Ayrıca bu çalışmalar istatistik, matematik, endüstriyel çalışmalar, gıda ve besinler, analitik kimya, organik kimya vb. birçok alanda da kullanılmaktadır [14].

Spektrum verilerinin analizi için kemometrik yöntem sonuçları, veri kalibrasyonu için birçok etkili yol sunar. Ayrıca kemometri, metod geliştirmek ve veri analizi için istatistiksel modellerin rutin kullanımını sağlamak için kullanılabilir. Spektrum verilerinin analizinde proses izleme ve kalite güvence ihtiyaçlarını karşılamak için modelleme, sınıflandırma ve tahmin için kemometrik yöntemi destekleyen birçok yazılım paketleri kullanılabilir [13,14].

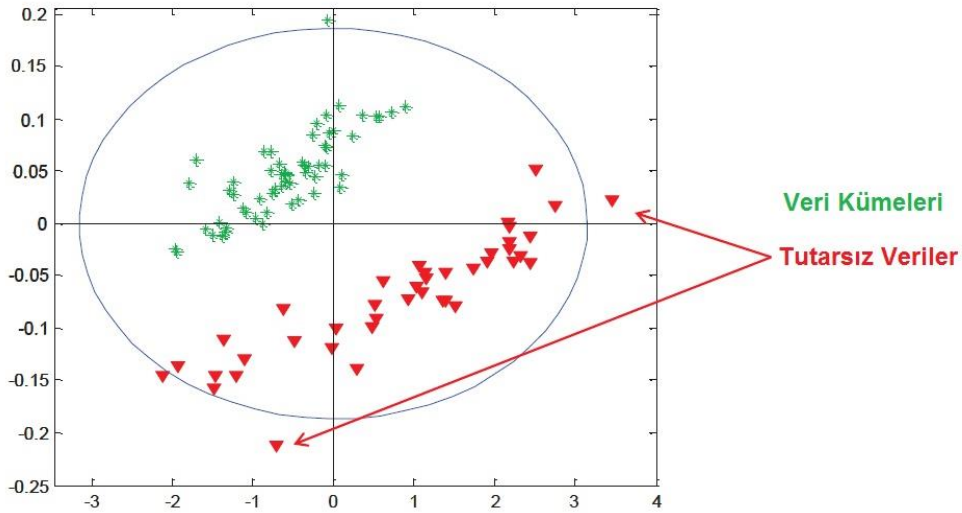
Kemometrik yöntemlerin kullanılmasında dikkat edilmesi gereken 3 genel başlık şu şekilde belirtilmektedir [13,15];

- Çakışan bantlar, temel sapmalar, saçılma ve yol uzunluğu varyasyonu gibi parazitleri azaltmak ve düzeltmek için, spektroskopik veri ön işlemenin doğru şekilde uygulanması
- Güvenilir modeller oluşturmak için güçlü kalibrasyon, örnek seçimi teşhisi, değişken seçimi ve istatistiksel sonuç hesaplaması.
- Model doğrulama ve entegrasyon, titiz tahmin, kalite kontrol ölçümü, gerçek zamanlı ürün kalitesi ve süreç izleme.

Yapılan bir çalışmanın analizi için genel olarak aşağıda belirtilen kemometrik yöntemler uygulanmaktadır [15];

- Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis, PCA)
- Regresyon analizi (PLS, PCR, MLR, 3-way PLS) ve tahmin
- Analogik sınıflamada esnek bağımsız modelleme (SIMCA-soft independent modelling of class analogies) ve PLS-DA klasifikasyonu

Kemometrik yöntemin en önemli aşamalarından biri olan PCA, kullanılacak verilerin doğruluğu ve sonuçların sağlığı açısından en büyük rolü oynamaktadır. Şekil 2.1.'de gösterildiği gibi veri seçiminin doğru yapılması ile benzer deneyler için kolaylık sağlanmakla birlikte doğru sonuç elde edilmesine büyük katkı sağlamaktadır.



Şekil 2.1. PCA için örnek Veri/Sonuç grafiği [14].

Sonuç olarak, kemometrik yöntem bir kimyasal sistemin durumunu sistemin ölçümlerine bağlamak için kullanılan bir köprü olarak adlandırılabilir. Bu çalışmada da görüldüğü üzere kemometri, modern kimya ve biyomedikal endüstrilerinde önemli bir yer edinmiştir. Kemometri için kullanılan yazılımlar, ürün geliştirmede çalışan bilim adamları, süreç mühendisleri, Proses Analitik Teknolojisi (PAT) uzmanları ve Kalite Güvence ve Kalite Kontrol (QA/QC) bilim adamları tarafından güvenilir model oluşturmak, ürün kalitesini sağlamak, hammadde sınıflandırmak ve

proses son noktasını gerçek zamanlı olarak izlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır [13].

2.3 FTIR Mikrospektroskopinin Başlıca Uygulama Alanları

FTIR spektroskopisi astronomiden organik kimyaya kadar birçok farklı alanda yıllarca kullanılmış olup, mikrospektroskopideki hızlı teknolojik gelişmeler ile paralel olarak son yıllarda oldukça genişlemiştir. Bu tekniğin tıpta kullanımındaki gelişmeler; özellikle patoloji, klinik biyokimya ve IR görüntüleme alanlarında olmuştur. Mikrometre kalınlığındaki ince bir doku diliminin istenilen bir bölgesinin net biyokimyasal haritasının çıkarılmasına olanak sağlayan bu teknik ile birçok hastalığın neden olduğu biyokimyasal değişiklikler hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Ayrıca teşhis amaçlı da kullanılabilen bu mikrospektroskopik teknik ile herhangi bir boyama, ekstraksiyon ya da saflaştırma işlemine gerek olmadığı için incelenen sistemin moleküler yapı bütünlüğü bozulmamaktadır.

Moleküler düzey de çok değerli bilgiler veren FTIR spektroskopinin tıptaki genel uygulama alanları diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, kanser, osteoporoz, Alzheimer ve ateroskleroz gibi değişik hastalıklardır.

2.3.1 Diyabet

Diabetes mellitus, insülin eksikliği, yoksunluğu ve/veya direnci durumlarında ortaya çıkan; kardiyovasküler sistem başta olmak üzere birçok sistemi olumsuz yönde etkileyen metabolik bir hastalıktır.

Toyran ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, tip 1 diyabet yapılmış yetişkin Winstar sıçan kalplerinin sol ve sağ taraflarında bulunan damarlarda (venlerde) oluşan değişiklikler FTIR mikrospektroskopi tekniği kullanılarak moleküler düzeyde incelenmiştir [16]. Bu teknik ile mikrometre kalınlığındaki bir doku diliminin istenilen bir bölgesinin moleküler analizi yapılabilmektedir. Her kalpten alınan 9 µm kalınlığındaki 2'şer seri kesitten birincisi FTIR mikrospektroskopi çalışmaları için, ikincisi ise hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanarak karşılaştırma yapmak için kullanılmıştır. Çalışmanın sonunda yapılan sinyal analizinde, spektrumda yer alan bazı bantların sinyal şiddetlerine, kontrol ve diyabet grupları arasında istatistiksel bakımdan önemli değişikliklerin olduğu bulunmuştur [16,17]. Doku boyası ile çalışılan gruptan farklılıklar bulunması; FTIR tekniğinin diyabet sonucunda kalp damarları üzerinde

kısa sürede oluşan (5 hafta) etkilerini moleküler düzeyde göstermesi bakımından önemini anlatmaktadır.

2.3.2 İnflamatuvar bağırsak hastalıkları

Crohn hastalığı ve ülseratif kolit, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının çok önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. İnsanda kolon hastalıklarının patolojik özellikleri birbirine çok benzer olduğu için doğru teşhis koymak çok zordur. Yaşlı hastalarda Crohn hastalığı ve ülseratif kolit, kolonun en aşağı bölgesinde oluşma eğilimindedir. Bu iki hastalığın kansere dönüşme riski taşıması bakımından doğru teşhis edilmesi büyük önem taşımaktadır [18].

Teşhis yöntemlerinden biri olan kolonoskopi, kolonun morfolojik özelliklerini göstermeye yarar, fakat biyokimyasal özelliklerini göstermek için yeterli değildir. İnflamatuvar bağırsak hastalıkları kansere dönüştüğü zaman Crohn hastalığı ve ulseratif kolit birbiri ile aynı özelliklere sahip olacaktır. 2004 yılında Argov ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 20 adet kanser hastası ve 20 adet inflamatuvar bağırsak hastası incelenmiştir [19].

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, normal sağlıklı durumdan inflamatuvar bağırsak hastalıklarına ve kansere geçiş durumunda, özellikle dokudaki karbonhidrat miktarında oluşan değişikliklerin izlenmesini sağlayan $900-1185\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığında önemli değişikliklerin olduğu bulunmuştur [19].FTIR mikrospektroskopi tekniği sayesinde Crohn hastalığı ve ülseratif kolit hastalığı olan bireylerden hangilerinin kanser olmaya eğilimli olduğunu saptamak mümkün olmuştur.

2.3.3 Kanser

Kriptler, kolonda bulunan doku tabakaları boyunca uzanan tüp şeklindeki bezlerdir. Bu kriptlerin taban bölgesinde bulunan aktif kök hücreleri, bağırsak epitelinin yenilenmesinden sorumludur. Kolonda normal olmayan kript üremesi ve gelişimi, kolon kanserinin premalin basamağı olarak kabul edilmektedir [20].

2004 yılında FTIR mikrospektroskopisi kullanılarak yapılan bir çalışmada, 21 tane kolon kanseri hastasının kolonlarından $10\ \mu\text{m}$ 'lik kesitler alınmıştır [21]. Kanserli bölgenin uzağından alınan, normal histopatolojik özelliklere sahip olan kolon biyopsilerindeki kriptler incelenmiştir.

Birçok molekülün kısa sürede eş zamanlı analizine olanak sağlayan bu teknik ile elde edilen sonuçlar, klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. Çünkü elde edilen bulgular, özellikle kanser işaretleyici enzimlerin kullanılmadığı durumlar da FTIR mikrospektroskopinin teşhis amaçlı kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır. Bu bulgu, kolon kanseri ameliyatlarında kanserli bölgenin daha doğru bir biçimde belirlenebilmesi için FTIR mikrospektroskopi tekniğinin kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu teknik kullanıldığında, yalancı negatif sonuçların çıkma riskinde minimuma indirilmiş olmaktadır [21].

2.3.4 Osteoporoz

Kemiğin dayanıklılığını belirleyen başlıca faktörler kemik yoğunluğu, yapısı ve kimyasal içeriğidir. Osteoporozda oluşan kemik kaybında bu faktörlerde ciddi değişikliklerin olması beklenir. Huang ve ark. tarafından 2003 yılında yapılan bir çalışmada, menopozal osteoporoz modeli oluşturmak için dişi maymunların yumurtalıkları cerrahi yöntemlerle çıkarılmıştır [22].

FTIR mikrospektroskopinin kullanıldığı bu çalışmada, kemiğin farklı bölgelerinde oluşan biyokimyasal değişiklikleri, incelenen dokunun bütünlüğü ve yapısı bozulmadan, moleküler düzeyde tespit etmek mümkün olmuştur. Ayrıca bu çalışmanın sonuçları, osteoporoz tedavisinde kullanılan ilaçların, kemiğin farklı bölgesinde farklı etki yapabileceği gerçeğini ortaya koyması açısından önem taşımakla birlikte FTIR mikrospektroskopinin önemini de vurgulamaktadır.

2.3.5 Alzheimer

Demansın en sık görülen formu Alzheimer hastalığıdır. Alzheimer hastalarının beyninde gri maddede ve hücre dışında da, çözünmeyen amiloid birikintilerinin olduğu ve bu birikintilerin çevresinde normal olmayan nöronal işlemlerin gerçekleştiği bilinmektedir. Bu amiloid birikintilerinin Alzheimer hastalığı patolojisinde önemli olduğu bilinmektedir [23].

1996 yılında yapılan bir FTIR mikrospektroskopi çalışmasında, Alzheimer hastalarından alınan beyin dokusu kesitleri Kongo kırmızı ile boyanarak birikintiler belirgin hale getirilmiştir. Belirgin hale gelmiş olan ilgili bölgeler FTIR mikrospektroskopi tekniği ile incelendiğinde, birikintilerden kaynaklanan protein

bantları görülmüştür. Mikrospektroskopisinden elde edilen sonuçlar Alzheimer hastalığının anlaşılmasında önemli veriler sağlamıştır [24].

2.3.6 Ateroskleroz

Günümüzde sıkça kullanılan medikal teşhis yöntemlerinden ultrason ve manyetik rezonans görüntüleme teknikleri ile aterosklerotik plakların lokasyonu, büyüklüğü ve şekli ile ilgili bilgi elde etmek mümkün iken bu plakaların yapısının kimyasal içeriği hakkında bilgi sahibi olmak olanaksızdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu plakların stabilitesini ve hastalığın ilerlemesini etkileyen faktörlerin anatomik yapıdan çok kimyasal içeriğinin olduğunu göstermiştir [25].

FTIR mikrospektroskopi kullanılarak yapılan bir çalışmada, aterosklerotik tavşan aort'undan alınan 10 µm'lik kesitler alınarak incelenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, kimyasal harita çıkarılarak önemli kimyasalların dokulardaki dağılımları incelenmiştir. Böylece aterosklerotik damarlardaki kimyasalların içerikleri ve dağılımları hakkında detaylı bilgi sahibi olmak mümkün olmuştur [26].

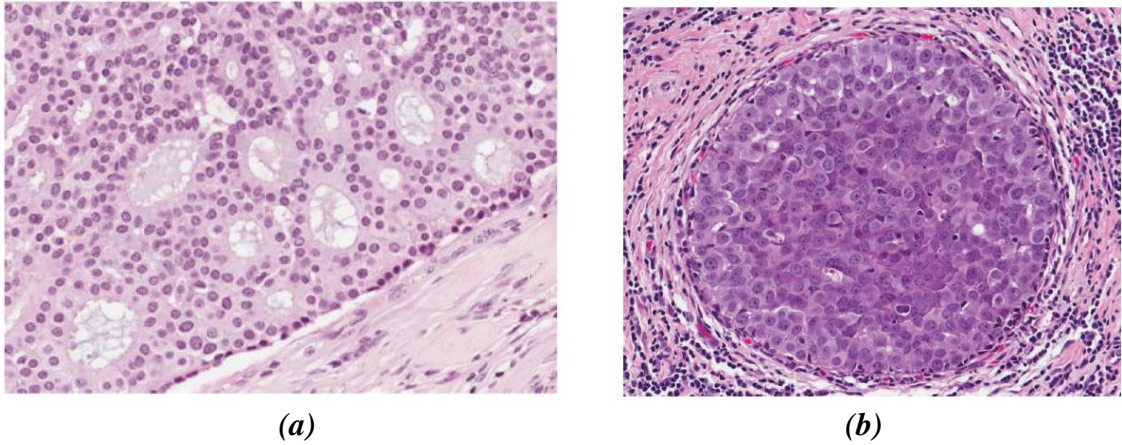
2.4 Kanser Histopatolojisi ve Meme Kanseri

Histopatoloji, biyopsi ile alınmış doku kesitlerinin mikroskop altında gözle muayene edilmesi işlemi olup kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisine yön veren birinci kademe klinik diyagnoz tekniğidir. Modern histopatoloji tarihinin Alman patolojist, antropolojist, halk sağlıkçısı ve politikacı Rudolp Virchow tarafından 19.yy. sonlarında hastalıklı dokuda hücrel morfoloji farklılığının mikroskop altında incelenmesi ile başladığı kabul edilir [27]. Sağlıklı bir dokudan anormal dokuya geçiş durumunda doku yapısında ciddi morfolojik farklılıklar ortaya çıkar. Bu farklılıklardan bazıları; anormal doku mimarisi oluşumu, olgunlaşmış ve farklılaşmış bir dokunun bir başka farklılaşmış dokuya normal olmayan şekilde dönüşmesi, inflamatuvar hücrelerin oluşumu, anormal değişmiş çekirdek/sitoplazma oranı, çekirdek membranının olağandışı düzenlenmesi, çekirdek içinde fazla nükleoli sayısı ve hızlı hücre bölünmesini ifade eden çok sayıda mitotik figürlerin oluşumu olarak sıralanabilir [28,29]. Bahsi geçen bu diyagnostik tanımlayıcıların belirlenmesi için parafine sarılarak fikse edilmiş veya flaş dondurulmuş halde dokulardan genellikle mikrotom kullanarak 3 ile 5 mikrometre kalınlıkta doğranmış kesitler histopatolojik incelemeye alınır. Doku kesiti mikroskop slaytı üzerine nakledildiğinde beyaz veya

grimsi görünüşte olur ve bu halde belirgin bir kontrast farkı olmadığından iyi bir gözlem yapılamaz. Bu sebeple, modern patolojinin başlangıcından itibaren doku kesitleri selüler komponentlere farklı affinitede bağlanma kapasitesine sahip boyar madde ile muamele edilirler. Boyalı dokularda yüksek kontrast farkı yardımıyla görüntülerde daha belirgin bir doku diferansı elde edilmiş olur.

Hematoksilin/Eozin (H&E veya HE) kombinasyonu histopatolojide en sıklıkla kullanılan boyama tekniğidir [29]. Hematoksilin histon proteinlerini koyu mavi veya mor renge boyarken, eozin sitoplazmaya pembe renk verir. Hematoksilin alkali pH değerlerinde hücre çekirdeği ve kalsiyum çöküntülerine bağlanıp oksijen ile yükseltgenerek aktif formu olan hemateine dönüşmesi ile mavi-menekşe rengini verir.

Meme kanseri tümörlerin büyük bir bölümünün kökeni terminal duktus-lobüler ünitelerdir. Hücre büyüklüğü, nükleer derece ve nekroz varlığı gibi sitolojik özellikler göz önüne alınarak duktal karsinoma insitu (DKIS) da komedo (büyük hücreli, yüksek dereceli) ve nonkomedo (küçük hücreli, düşük dereceli) olarak ikiye ayrılır. Ayrıca nadir görülen bir ara grup (ara derece DKIS) da vardır [30-32]. DKIS için bazı histopatolojik incelemeler Şekil 2.2.'de verilmiştir. Lobüler karsinoma insitu (LKIS) multifokal ve multisentrik özellikte olup kohezif karakterli hücrelerin proliferasyonu ile ortaya çıkan bir lezyondur. LKIS aslında kalsifiye olarak bir kitle oluşturmaz ve genellikle başka nedenlerle uygulanan biyopsilerde rastlanır.



Şekil 2.2. HE boyama ile DKIS için elde edililen histopatoloji görüntüleri;

(a): Düşük derece DKIS durumu (b): Yüksek derece DKIS durumu[30].

Genel olarak meme kanserinde üç ayrı dereceleme yapılabilir [33]. Bunlardan ilki iyi diferansiyel Grad 1 tümörleridir ve hücreler küçük tubuller halinde dizili durumdadır, mikroskop altında iyi ayrılmış yani normal hücrelere çok benzeyen hücreler görünür. Grad 2 tümörleri orta derece diferansiyel tümörlerde normalde biraz daha farklı hücre

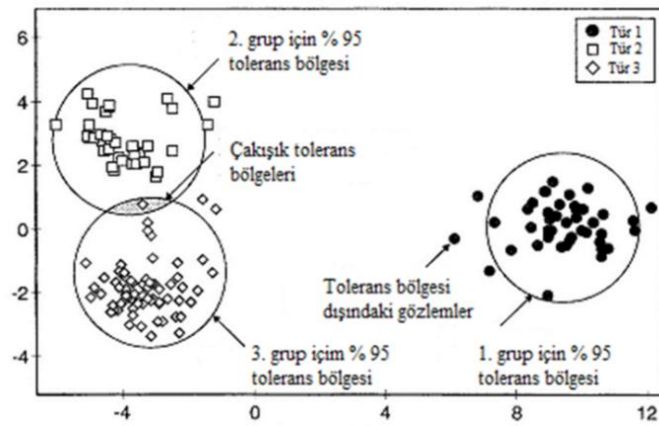
görüntüleri alınır. Grad 3 tümörlerde ise zayıf diferansiye durumu temsil eder ve orijinal doku hücrelerine hiç benzemeyen tümörlerdir.

2.5 FTIR Spektroskopisi ile Meme Kanseri İncelenmesi

Infrared ve Raman spektroskopisi gibi moleküler titreşim esaslı spektroskopik teknikler, analiz hızı, numune hazırlama kolaylığı ve cüzi deney masrafı gerektirmesi nedenlerinden biyoloji alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [34,35]. Spektroskopik teknikler direk olarak optik bilgiyi nakledebildiğinden, hem analiz hızı hem de bilgi kalitesi açısından üstün özelliklere sahiptirler. Titreşim spektroskopisi tekniğinin özü esasında molekül kimyasına dayanmaktadır. Bu nedenle IR gibi spektroskopik bir yöntemle incelenen örneklerin kimyasal kompozisyon bilgileri tüm kovalent bağların (C-H, C-C, C-O-C, C=O, O-H, vb gibi) bir parmak izi okunuşu şeklindedir. Bu parmak izi spektrumunda her bir pik noktası spesifik bir enerjiye/dalga sayısına (wavenumber, cm^{-1}) tekabül ettiğinden, incelenen örneğin kompozisyonu spektral bilgilerden kolaylıkla tahmin edilebilir. Moleküler düzeyde yüksek ayrıntı içeren spektroskopik bilgi karmaşık kompozisyondaki biyolojik doku örneklerin bile hem nicel hem de nitel analizlerinde kullanılabilir.

Spektroskopik bilgilerin aşırı detaylı durumu ve analiz edilen örneklerin genelde karmaşık bir kimyasal yapıya sahip olması nedeniyle, elde edilen bulguların sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesi için özel ve kısmen sofistike veri işleme teknikleri gereklidir. Kemometri, spektroskopi ile elde edilen karmaşık bir kimyasal verinin matematiksel olarak işlenip istatistiksel yöntemlerle yorumlanmasına yardımcı olan çok rastlantı değişkeni “multivariate” üzerine yapılan bir analiz tekniğidir [36]. Kemometri kullanarak bir örneğin kimyasal olarak tanımlanması ve çeşitli türlerden seçilmiş örneklerin sınıflandırılması gibi niteliksel çalışmalar yapılabilir. Bunun yanında karmaşık bir kompozisyondaki bir örneğin içerdiği özel bir molekülün miktarı da tayin edilebilir. Kemometri tekniklerinden en çok tercih edilenlerinden biri Temel Bileşen Analizi olarak bilinen esas bileşen analizi tekniğidir. Bir diğer önemli kemometrik teknik Partial Least Square (PLS) olarak bilinen kısmi en küçük kareler yöntemidir. PLS temel regresyon işlemleri içerip, çeşitli kalibrasyon uygulamalarında özellikle nicel analizler için kullanılmaktadır. PLS ve PCA aynı zamanda kullanışlı birer veri azaltma (data reduction) yöntemleridir. Kemometri teknikleri örneklerin diskriminasyon ve sınıflandırılması gibi niteliksel analizlerde

alanında yoğunlukla kullanılırlar. Çoklu örnek gruplarını sınıflandırmak için hızlı ve güvenilir bir yöntem olan lineer diskriminant analiz (LDA) ve kanonik değişken analizi (Cnonical Variate Analysis, CVA) en çok tercih edilir. Çoklu örnek gruplarından tek bir sınıf modeli oluşturmak ve buna göre bilinmeyen örneklerin bu sınıftan olup olmadığının incelemek için SIMCA ve UNEQ (UNEQ=unequal dispersed classes) gibi sınıf modelleme yöntemleri kullanılır [36]. Şekil 2.3. Tipik bir PLS-CVA Analizinden elde edilebilecek sonucu ve gruplandırmayı göstermektedir. Bu örnek kullanarak üç ayrı grup setinden oluşan örneklemede her bir örneğin hangi gruba dahil olacağı %95 tolerans aralığında belirlenmiştir. Analizin ilk adımında spektral veri bir matris kompozisyonuna dönüştürülür. Bu matris içinde varyans hesabı PLS kullanarak elde edilir ve varyans değeri gruplandırma yapmak için karşılaştırılır. CVA tekniğinde toleransa göre gruplanacak örneklerin yerleşimi (daireler içerisine yerleştirilmesi) chi-square (χ^2) istatistiği ile belirlenir [36]. Şekil 2.3.'de görüldüğü gibi kimi örnekler tolerans dışında kalarak bir guruba dahil edilmeyebilir veya bazı örnekler ise çakışık tolerans bölgelerine tekabül ederek her iki grup ögesi gibi tanımlanabilir. Başarılı bir CVA analizinde örnekleri hemen hepsinin belli bir guruba dahil edilir ve tanımlanmış grupların birbirinden uzak bölgelere yayılır. Meme kanserinde şu ana kadar kemometrik bir sınıflandırma modeli kullanarak sağlıklı ve tümör ayrışımı gösterilmemiştir.



Şekil 2.3. Üç örnek içeren bir spektroskopik veri setinin CVA sınıflandırması[36].

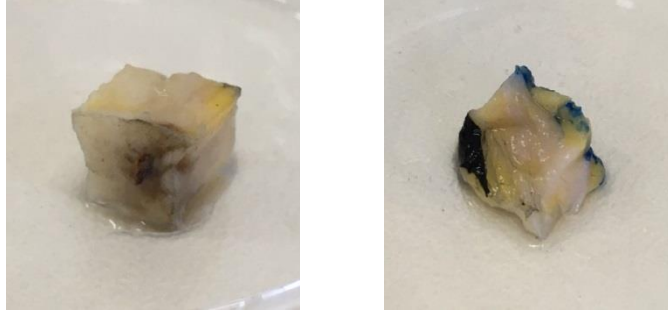
FTIR spektroskopik görüntüleme özellikle biyomedikal örneklerin incelenmesi için çok elverişlidir çünkü var olan patolojik ve histokimyasal protokoller yoğun bir şekilde dokuların görüntülenmesine dayanmaktadır. Dolayısıyla bu yeni nesil kimyasal görüntüleme teknolojisi rahatlıkla söz konusu bu klasik histolojik

metotlarla birleştirilebilir. Mikro-FTIR tekniği standart histolojik protokollerden belirgin şekilde daha fazla bilgi sağlamaktadır çünkü örnek morfolojisi, spesifik biyokimyasal sınırları ve değişimleri spektroskopik parametreler tarafından sorgulanabilmektedir [37]. Ayrıca, FTIR görüntüleme oluşturulan paternler tamamen nesnedir, bunlar paternler sadece vibrasyonel absorpsiyon bandının (spesifik kimyasal fonksiyonel grup) varlığı/yokluğu veya sinyal şiddeti ile ilgilidir, dolayısıyla deneyler için örneklerin ayrıca boyanması gerekmez. IR radyasyonu nispeten düşük enerjili olduğundan FTIR görüntüleme tahribatsız bir tekniktir ve böylece örnek bütünlüğüne zarar vermeden analizler yapılabilir. Bu metot hem doku bileşenlerinin konumsal lokalizasyonunun yüksek hassasiyette belirleme kabiliyetinde, hem de sunduğu kantitatif sonuçların başka kimyasal analizlerle elde edilenlerle kıyaslanabilir olduğundan biyomedikal uygulamalar için ilgi çekicidir [35]. Mikro-FTIR görüntüleme teknolojisi histopatolojide ciddi bir yer tutacak şekilde ilerlemektedir [38-41].

Meme karsinoması epitel hücre birikimleri olarak bilinir. Bu epitel tümör, normal epitele göre hücre morfolojisi ve doku yapısı bakımından farklılık sergiler. Meme kanserinin birçok türü süt bezleri ve kanalların yüzeylerinde başlar. Kanser nedenli biyokimyasal ve morfolojik kompozisyon değişimleri genelde küçük çapta gerçekleştiği için kanser tanımlanması zorlu bir işlemdir. Mikroskopik seviyede oluşan bu değişimler kanser dokusunun çözünürlüğü yüksek bir sistemle incelenmesini gerektirir. Meme hücreleri yaklaşık olarak 10 mikrometre çapındadır [42].

Bu bilgiye göre FTIR görüntülemenin transmisyon modu hücre ölçeğinde ayrıştırma yapabilmeye uygundur. Meme dokusu mikroheterojenitesi de kendi başına bir başka zorluk oluşturan durumdur. Özellikle invazif duktal karsinoma durumunda bu heterojenite problemine çok sıklıkla rastlanılır [42]. İnvazif karsinoma dereceli olarak yıkıcı faza ilerleyen ve tümörün meme çevre dokusunu istila ettiği durumu belirtmekte kullanılır. Böyle durumlarda yapılacak ölçümlerin hücre bazında hassasiyete sahip olması gerekir ki çevre dokuların ne derecede etkilendiği açık bir şekilde belirlenebilsin. Çevre dokuların tümör ile kuşatılması kaydedilen ölçüm değerlerinde kirliliğe neden olarak analizin sağlıklı yapılmasına engel olur. Bu kirlilik durumu duktal karsinoma in situ (DKIS) için daha az sorun teşkil edicidir.

DKIS tümör oluşumunun başlangıç aşamasını oluşturur ve meme süt kanallarında ur yapısında (neoplastik) hücre proliferasyonuna neden olur.



Şekil 2.4. Kullanılan meme kesiti örnekleri (tümör).



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Örnekler ve Numune Hazırlama

Örnekler Acıbadem MAA Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı Acıbadem Maslak Afiliye Hastanesi Patolojisi Laboratuvarı'nda makroskobik boyutlarda hazırlandı. Meme kanseri hastalarından ameliyatla alınan kesitlerden mikrotom cihazı ile makroskobik boyutlarda (1cmx1cmx1cm) küp şeklindeki örnekler, ilgili uzman tarafından elde edildi (Şekil 2.4). Öncelikle parça alındı ve kasete yerleştirildi, kasetin kapağı kapatıldı. İçinde doku örneği bulunan kaset, formalin içerisine alınarak örneğin kurumasına izin verilmedi. Örnekler İTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü Proses Analitik Laboratuvarında FTIR-ATR tekniği ile incelemeye alındı.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Spektroskopi yöntemi

Bu çalışmada kullanılan doku numuneleri FTIR spektroskopisi kullanılarak incelendi. Kullanılan spektroskopi tekniği ile tümör dokuları ile sağlıklı dokuların birbirleri arasındaki farkı görmek için dokuların kimyasal bileşenleri hakkında bilgi edinmesi amaçlandı. Tüm doku numunelerinde ölçüm alınabilen her yüzey için ayrı ayrı incelemeler yapıldı. Çalışma sırasında kullanılan spektroskopik yöntem için Perkin-Elmer Spectrum 100 cihazı kullanıldı. Kullanılan FTIR-ATR kristali ile bazı örnekler arasında çeşitli problemler oluştu. Bunlara örnek olarak elde edilen numunelerin her birinin farklı boyutlara, farklı sertlik ve yapıya sahip olması gösterilebilir. Bu nedenle numunelerin ölçümü sırasında temas ettikleri yüzeye göre hassasiyetleri de göz önüne alınarak, aynı dokunun en fazla beş farklı yüzeyinden ölçüm alındı. İlgili numunelerin FTIR-ATR üzerinde bulunan elmas kaplı 0.5 cm çapında olan ZnSe kristal penceresi üzerine aktararak çalışmalar yapıldı.

FTIR-ATR spektroskopisi maddenin katı ve sıvı formları için uygundur ancak analizlerin doğru sonuçlar verebilmesi için numune ile ATR kristali arasındaki yüzey

temas oranının %100 veya %100'e yakın olması gerekir. İlgili spektroskopi tekniğinin çalışma mekanizmasına göre IR ışınları direkt olarak örnek içinden geçmeli ve örnek dışında bir ortama geçmeden geri dönmelidir. Böylece ışın numune içerisinde toplam reflektans fiziğini gerçekleştirmiş olur. Doku ile ATR yüzeyi arasındaki teması arttırmak ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek amacıyla ölçümlerin alınması sırasında her bir doku üzerine eşit miktarda bir basınç uygulayabilecek bir basınç kolu kullanılmıştır. Bu basınç kolu sistemle bağlantılı bir şekilde çalışmakta ve ekrandan uygulanan basınç miktarı takip edilebilmektedir. Sağlıklı dokuya ait olan örnekler, kanserli dokulara oranla daha yumuşak ve hemen dağılılabir bir yapıda olduğundan dolayı doku üzerine uygulanan basınç, tümör dokularına göre değişkenlik gösterdi. Tümör örneklerinde örnek üzerine uygulanan basınç, örneğin daha sert ve elastik bir yapıda olmasından dolayı sağlıklı dokulara göre daha düşük ve basıncın doku üzerine uygulanabilirliği daha kolay oldu. Sağlıklı dokularda dokunun kolayca hasar görebilmesi riski dolayısıyla yüksek basınçların uygulanabilirliği, araştırmacı açısından daha zor oldu ve her sağlıklı dokuya aynı basıncı uygulamada zorluklar yaşandı. Normal ve patolojik örneklerin ölçümleri 650-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında ve 4 cm^{-1} spektral çözünürlüğünde 16 kez tarama yapılarak alındı. Bu şekilde uygulanan parametrelerle alınan her bir ölçüm 80 saniye gibi bir zaman aldı. Her bir doku yüzeyinden iki kez ölçüm alınarak sonuçların tekrarlanabilirliği gösterildi.

Bu çalışmada kullanılan örnekler homojen yapıda değildi ve bundan dolayı incelemeler sırasında çeşitli zorluklarla karşılaşıldı. Alınan ölçümlerin doğrulanabilir tekrarlılıkta olması da heterojen yapı dolayısıyla riske girmektedir. Normal ve patolojik dokuların kimyasal bileşimlerinin bu yapısı dolayısıyla ilgili dokunun bir yüzeyinden alınan spektrum ile başka bir yüzeyinden alınan spektrum arasında farklılıklar gözlemlendi. Bu nedenle normal ve tümör dokularından alınan spektrumlar arasından, her bir örneği temsilen tek bir spektrum, dokunun kimyasal yapısını gösteren bölgeler göz önüne alınarak titizlikle seçildi ve verileri kayıt altına alındı. Bu çalışmada kullanılan örnek doku sayıları, bu dokulara ait spektral veriler ve verilerin içerdikleri yağ oranlarına göre kimyasal içerikleri bakımından sınıflandırılması Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Dokuların heterojen yapılarından dolayı oluşabilecek karışıklıkların önüne geçebilmek amacıyla meme kanserinin sebep olabileceği kimyasal kompozisyon değişikliklerinin incelenebilmesi için spektral verileri elde edilen örnekler içerdikleri yağ oranlarına göre üç ayrı şekilde sınıflandırıldı. Bu sınıflandırmada 1740 cm^{-1} bölgesinde gözlenen C=O yağ esterlerinin pik şiddetleri göz önüne alındı. Böylece normal ve patolojik dokular yağ içeren, yağ içermeyen ve az miktarda yağ içeren dokular olmak üzere üç ayrı bileşimde ifade edildi. Dokularda meme kanserinden kaynaklı bir şekilde oluşabilecek kimyasal yapıdaki değişiklikler bu sınıflandırma yöntemiyle daha güvenli bir şekilde incelendi.

Bu çalışma boyunca 17 hastadan mastektomi ile çıkarılan memelerden alınan 13 normal ve 17 tümör ile ölçümler yapılarak değerlendirildi (Çizelge 3.1.). Bu dokulardan 13 normal doku ve 13 tümör dokusu aynı hastaya ait olmakla beraber, 4 hastanın sadece tümör dokusu alındı. Bu numunelerin toplam 106 yüzeyinden 211 adet spektroskopik ölçüm yapılabildi. Daha önce de bahsedildiği gibi yapılan spektral ölçümler dokuların yağ içeriklerine göre sınıflandırıldı ve ilgili absorbans piklerinin kuvvetli (yağ içeren), zayıf (az miktarda yağ içeren) olması ve hiç (yağ içermeyen) olmaması göz önüne alınarak üç sınıfa ayrıldı. Absorbans piklerinin hiç olmaması, ilgili absorbans değerinin 0.0025 veya daha düşük olması olarak tanımlandı. Bu değer belirlenirken elde edilen ölçüm sonuçlarında 1769-1719 aralığında değişen piklerin absorbanslarının ortalaması göz önünde bulunduruldu. Spektral ölçümlerde meme dokularında yağ kaynaklı değişimler de görülebildiğinden dolayı bu sınıflandırma, incelememizde örnek dokuların içeriklerinin nasıl olduğu konusunda ve kanser kaynaklı olabilecek farklılıkları daha net ayırt edebilmemizde ilk kez uygulanarak değerlendirildi.

Değerlendirmeler sonucunda ölçümleri alınan toplam 211 doku yüzey spektrasının bir kısmı elendi. Elenme sebepleri arasında aynı dokuya ait birkaç ölçüm sonucunda bazı spektraların kirlilik nedeniyle diğerlerine uyumsuz olması, yüksek yağ içeriğinin gerçek kimyasal parmak izlerini maskeleymesi, değişik dokularda ölçüm sonrası baseline kayması ve dokuların içerisinde saklandığı formalin çözeltisinin ölçümleri etkilememesi için referans alınmasından sonra amid bandının negatif absorbans değerler göstermesi sayılabilir. Normal doku örneklerine ait 11, tümör örneklerine ait 15 spektra çıplak gözle yapılan değerlendirme sonucu olarak elendi ve böylece IR

dar bölgesi de (800 ile 1500 cm^{-1}) kullanılarak elde edilen modellerle birlikte toplamda normal örneklerden 35, tümör doku örneklerinden ise 73 sonuç (toplamda 108 doku spektrası) elendi. Bu da toplamda 103 ölçüm sonucunun yüksek güvenilirlik ve doğrulukla tümör dokuları ile normal dokuların birbirlerine olan diskriminasyonunun değerlendirilmeye alınmasını sağladı. 103 doku spektrasından 38'i normal (sağlıklı), 65'i tümör dokularına aittir.

Çizelge 3.1.: Ölçümleri yapılan doku türlerinin sınıflandırılması.

Hasta No	Doku Türü		Ölçüm Yapılan Yüzey - Yüzeylerden Toplanan Spektrum Adedi	Kuvvetli Yağ Pikleri Veren Spektrum Adedi	Zayıf Yağ Pikleri Veren Spektrum Adedi ($\leq 0,0025$ Abs)	Yağ Pikleri Vermeyen Spektrum Adedi
	Tümör	Normal				
1	Tümör		3-8	-	6	2
2	Tümör		4-8	1	5	2
3	Tümör		5-11	1	3	7
4	Tümör		5-10	-	7	3
5	Tümör		5-10	1	3	6
		Normal	6-12	10	2	-
6	Tümör		4-5	-	3	2
		Normal	4-4	3	-	1
7	Tümör		3-6	-	1	5
		Normal	4-7	7	-	-
8	Tümör		4-8	-	2	6
		Normal	4-7	3	2	2
9	Tümör		4-8	-	4	4
		Normal	2-5	2	3	-
10	Tümör		3-6	-	-	6
		Normal	3-6	4	2	-
11	Tümör		4-8	4	4	-
		Normal	2-5	4	1	-
12	Tümör		5-10	-	4	6
		Normal	3-7	2	3	2
13	Tümör		3-7	-	4	3
		Normal	3-5	5	-	-
14	Tümör		4-9	-	3	6
		Normal	2-4	4	-	-
15	Tümör		4-8	-	8	-
		Normal	2-4	4	-	-
16	Tümör		4-9	-	2	7
		Normal	2-4	4	-	-
17	Tümör		3-7	-	6	1
		Normal	2-3	3	-	-
NORMAL DOKULARDAN ALINAN SPEKTRALAR						
13 hastadan alınan dokular			39 yüzeyden- 73	55	13	5
TÜMÖRDEN ALINAN SPEKTRALAR						
17 hastadan alınan dokular			67 yüzeyden- 138	7	65	66
TOPLAM-KULLANILAN SPEKTRALAR						
Toplam 17 hastadan tümör dokusu, 13 hastadan normal doku			106-211	62	78	71

3.2.2 Kemometrik yöntem

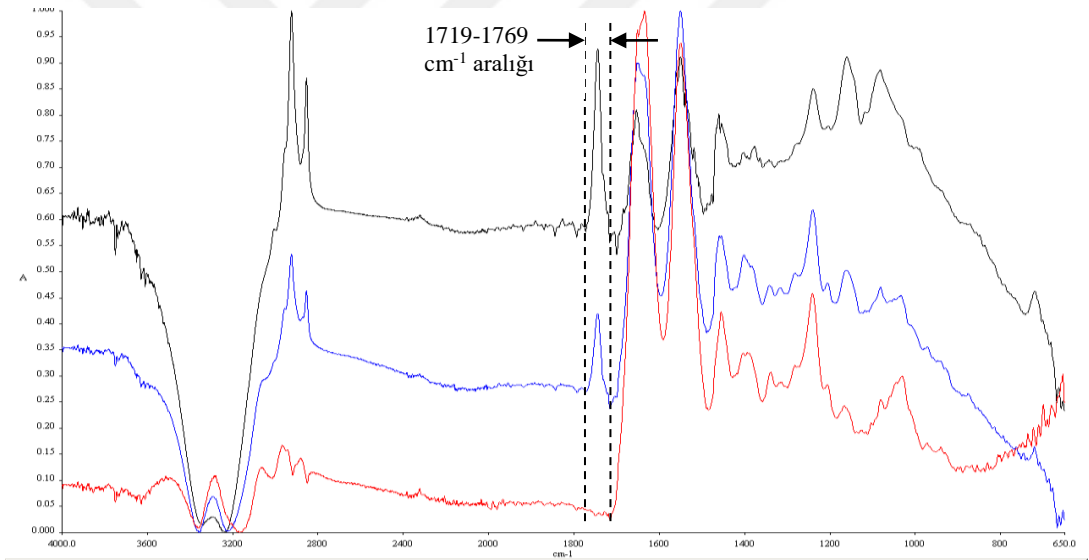
Kanser oluşumu hakkında bilgi verebileceği düşünülen amid I ve II bandı ile DNA pikleri kullanılarak tümör dokusunun normal dokudan diskriminasyonunda kullanılabilecek kemometrik modeller oluşturuldu. Spektroskopik ölçüm verileri alınan normal ve tümör dokularının arasındaki farklar, CVA (canonical variate analysis) ve SIMCA sınıflama modelleri ile gösterilmeye çalışıldı. PCA ile PLS tekniği en çok bilinen kemometri tekniklerindedir ve bu çalışmamızda dokuların diskriminasyonunda ciddi rol oynamıştır. Tümörlerin kendi aralarında sınıflandırılmaları da aynı istatistiksel matematik model oluşturma sistemiyle sağlanmaya çalışıldı. Tipik modelleme sonuçları PLS-CVA koordinat düzleminde gerçekleşti. Üç ayrı grup ataması yapılan örneklemelerde %95 tolerans aralığında örneklerin hangi gruba dahil olacağı belirlendi. Bu analizler için ilk olarak FTIR ölçümlerinde elde edilen veriler matris haline getirildi. Matris için gerekli olan varyans hesapları PLS tekniği kullanılarak sağlandı ve hesaplanan varyanslar gruplandırma yapmak için değerlendirildi. Toleransa göre örneklerin hangi grupta yer alacağı CVA tekniğinde chi-square (χ^2) ile belirlendi [30]. Bu hesaplamalara göre bazı örnekler belli bir gruba dahil olmayarak sapmalar yarattı, bazıları olması gerekenden farklı gruplara dahil olabildi. Kemometrik analizlerde tam başarı ancak örneklerin hepsinin belli bir gruba dahil olmasıyla elde edilir ve bu gruplar da birbirlerine uzak yerlerde konumlanmalıdır. Meme kanseri araştırmalarında bugüne kadar istatistiksel bir matematik hesabı kullanılarak normal ve tümör dokularının diskriminasyonu üzerinde çalışılmamıştır. WINDAS paket programı ilgili tüm kemometrik analizler için kullanıldı.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 FTIR Tekniğinin Örnekler Üzerinde Kullanılması ile Ulaşılan Sonuçlar

Kullandığımız doku örneklerinde tümör olarak tanımlanmış içeriğe sahip olanlarda daha fazla olmak üzere homojen bir dağılım olmadığı gözlemlendi. Dokuların kimyasal içeriklerinin homojen olmaması, elde edilen spektrumlar arasında ilgili dokuyu temsil edebilmesi açısından en yararlı ve gerçekçi spektrumların seçilmesi konusunda çalışılmasına yönlendirdi. Daha önce bahsedildiği gibi normal dokulardan ve tümör dokularından alınan spektrum ölçümleri üç farklı şekilde sınıflandırıldı.



Şekil 4.1. Meme dokusundan toplanmış 3 ayrı spektrum tipi (siyah; yüksek yağ oranı, mavi; düşük yağ oranı, kırmızı; hiç yağ oranı gözlenmeyen spektrum örneklerini temsil eder) .

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi normal dokulara ait spektrumlarında yağ oranının yüksek, patolojik dokularda sağlıklı dokulara göre daha düşük yağ oranının olduğu gözlemlendi. Birçok tümör dokusunda ise neredeyse hiç yağ oranı gözlemlenmedi. Yağ oranlarının belirlenmesi için temel alınan spektral pozisyon 1719 ile 1769 cm^{-1} dalga sayısı aralığındadır (Çizelge 4.1).

Her bir doku için seçilen temsili spektrumlardaki her bir pikin karşılık geldiği spektral düzlem ve moleküler gruplar literatürden araştırıldı ve Çizelge 4.1.'de bir araya getirildi. Çalışmada spektrumlardaki DNA ve protein bandlarındaki değişimler incelendi ve amid I (1613-1694 cm^{-1}) ve II (1517-1590 cm^{-1}) bandları arasında sağlıklı ve patolojik dokular arasında ciddi bir farka rastlanılmamasına rağmen bu bandlarda görülen piklerin omuz diye tabir edilen oluşumlarında 5 cm^{-1} dalga boyu kadar kayma olduğu tespit edildi (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1.: Sağlıklı ve tümör meme dokusu IR bantları ve bunların karşılık geldiği moleküler gruplar(s-strong,m-medium,w-weak şiddet skalasıdır) [5,43,44].

Normal	Tümör	Moleküler Titreşim Moduyla Eşleştirmesi
Spektral Pozisyon (cm^{-1})	Spektral Pozisyon (cm^{-1})	
3007 (w)	3006 (w)	=CH olefinik gerilme (doymamış yağlar)
3000-2881 (s)	3000-2881 (s)	CH ₂ asimetric gerilme
2874-2836 (s)	2874-2836 (s)	CH ₂ simetric gerilme
1745 (s)	1769-1719 (s)	Fosfolipitler ve lipitlerin C=O gerilme titreşimleri (ester)
1688-1618 (s)	1694-1613 (s)	Protein amid I, C=O gerilme titreşimleri+NH bükülme (proteinler)
1586-1517 (s)	1590-1517 (s)	Protein amid II, NH bükülüm, CN gerilme titreşimleri
	1519 (m)	Halka C-C gerilmesi—tirosin kalıntısı (tirosin proteinleri)
	1510 (m)	Kaynak yok
	1466 (s)	CH ₂ makaslama titreşimi
	1494-1473 (w/m)	Kaynak yok
1458 (s)	1473-1436 (s)	CH ₂ , CH ₃ eğilme (proteinler)
1423-1378 (m)	1425-1376 (m)	COO ⁻ simetric gerilme (DNA/RNA)
1378 (m)	1376 (m)	Amino asit kalıntılarında ki alifatik grupların CH ₃ deformasyonu
	1363 (m)	Kaynak yok
1342-1282 (m)	1341-1282 (m)	Amit III (proteinler)
1240 (s)	1238 (s)	PO ₂ ⁻ asimetric gerilme (nükleik asitler)
1203-1159 (m/s)	1205-1161 (s)	Kaynak yok
1117 (m)	1117 (s)	C-O gerilme—riboz halkası (RNA)
1098 (m)		Kaynak yok
	1082 (s)	PO ₂ ⁻ simetric gerilme (nükleik asitler, fosfolipitler)
1035 (w)	1033 (s)	COH deformasyonu (nükleik asitler)
1002 (w)	995 (m)	RNA gerilme ve ürasil halkası bükülmesi
967 (w)		Dianiyonik fosfat monoester
937 (m)	939 (m)	Kaynak yok

Çizelge 4.2.'de normal ve patolojik dokularının spektrumlarında gözlemlenen pik konumları arasındaki değişimlerin ne kadar olduğu gösterilmek istenmiştir. Burada protein amid I ve II bandları ile DNA 1240 ve 1082 cm^{-1} dalga sayısında görülen piklerin spektral düzlem üzerindeki konumlarının patolojik değişim gösteren doku hücrelerine ait olabileceği düşünüldü.

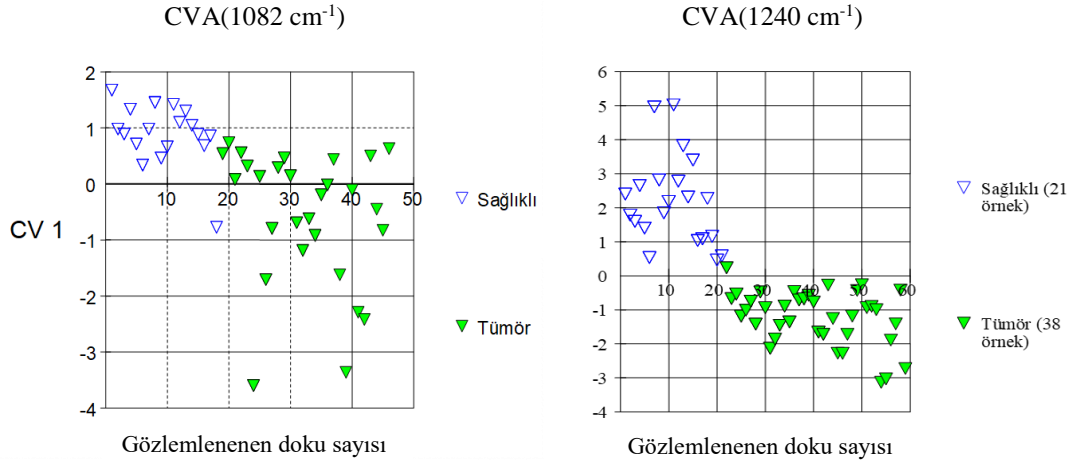
Çizelge 4.2.: Mikro normal ve patolojik dokularda protein ve DNA piklerindeki kaymalar (meme kanseri).

Kullanılan Pik	Protein Amid I		Protein Amid II		DNA 1240 cm^{-1}	DNA 1082 cm^{-1}
	1.pik	2.pik	1.pik	2.pik		
Normal	1634±1	1652±5	1551±3	1557±5	1240±1	1081
Tümör	1634±2	1651±2	1551±3	1557±1	1239±1	1080±2

4.2 Kemometrik Yöntemin FTIR ile Elde Edilen Verilerde Kullanımı

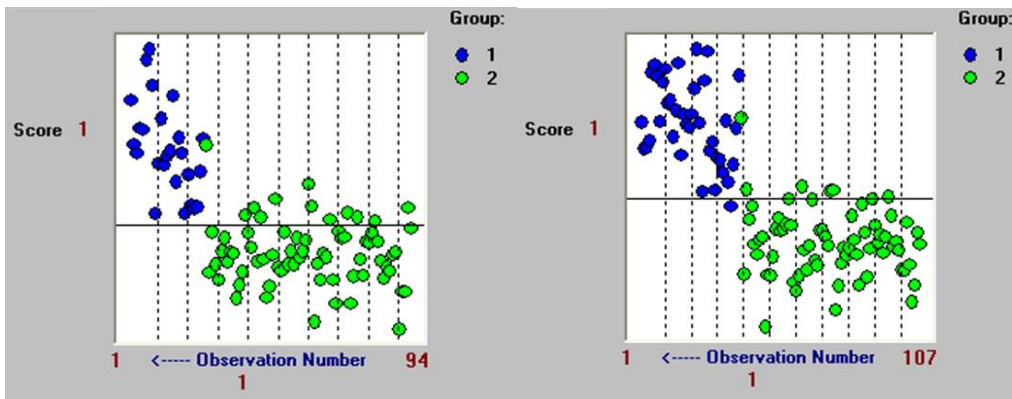
Meme kanseri dokuları ile sağlıklı meme dokularının FTIR ile ölçümlerinin alınmasından sonra yapılan çalışmalar neticesinde protein amid I-II ve DNA piklerinin kanser hücrelerinin oluşumunun izlenmesinde etkili olacağı düşünüldü. İlgili spektrum ve dalga sayılarının absorpsiyonlarının verilerinin daha objektif değerlendirilebilmeleri ve sağlıklı meme dokularıyla kanser dokularının ayırt edilebilmesi için kemometrik modeller üzerinde çalışıldı. CVA ve SIMCA istatistiksel modelleme programları kullanılarak normal ve tümör dokuların diskriminasyonu sağlanmaya çalışıldı. Tümörlerin sınıflandırılmasında da benzer sınıflandırma modelleri oluşturuldu.

Şekil 4.2.'de CV 1 (canonic variate 1) düzleminde 1240 cm^{-1} dalga sayısı verileri kullanılarak, ilgili bölgede IR ışınlarının daha güçlü etkisini göstermesi nedeniyle gürültülerin asıl bilgileri çok etkilemeden güzel bir diskriminasyon elde edildiği görülebilir. İlgili şekilde DNA piklerinin görüldüğü 1082 ve 1240 cm^{-1} dalga sayılarının CVA analizi, normal ve patolojik dokuların farkını göstermek amacıyla kullanıldı.



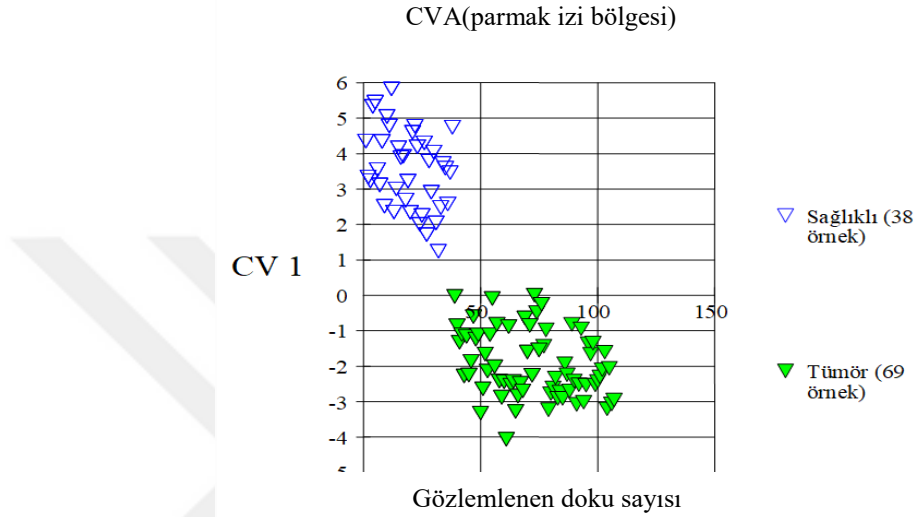
Şekil 4.2. CVA kullanılarak DNA spektrum bilgileri ile normal ve patolojik dokuların ayırt edilmesi.

Ölçümleri alınan protein amid I ve II piklerinin spektral pozisyonları verileri, 12 adet PLS skoru ile yapılan CVA sınıflaması Şekil 4.3.'te gösterildi. Normal ve patojenik dokular arasındaki ayırım, bu piklerin verilerinin model üzerinde işlenmesiyle saptandı. Protein amid I bandının amid II'ye göre daha fazla su/nemden etkilendiği ve bu durumda da ilgili pikte değişiklikler olduğu görüldü ve protein amid II'nin spektral değerleri kullanıldığında sağlıklı ve tümör doku arasındaki fark bu nedenle daha iyi yansıtılabildi. Suyun kimyasal parmak izinin FTIR analizinde görüldüğü dalga sayısı aralığı amid II ile çakışmamakta ve bu sebepten dolayı amid II bandında ki bilgiler daha net analiz edilebildi.



Şekil 4.3. Soldaki CVA diskriminasyonunda amid I, sağdaki CVA diskriminasyonunda amid II bandları baz alınarak normal ve tümör dokularının sınıflandırılması (mavi, normal; yeşil, tümör dokuları temsil eder) .

FTIR ölçümleri sonucu elde ettiğimiz verilerden DNA ve protein bandlarının birlikte değerlendirilmesi sonucunda daha kapsamlı ve daha belirgin bir sonuç elde etmek amacıyla 800-1700 cm^{-1} bölgesindeki tüm pikler kullanılarak yeni modeller oluşturuldu. Bu modeller parmak izi bölgesinde (800-1700 cm^{-1}), 12 PLS skoru ile CVA hibrit sınıflandırması ile yapıldı. Oluşturulan modeller ile meme dokularındaki normal ve patolojik ayrımının daha net olduğu gösterildi (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Meme normal ve tümör dokularının parmak izi bölgesi kullanımı ile PLS-CVA model diskriminasyonu.

Şekil 4.4’de net bir şekilde görüldüğü gibi sağlıklı olarak ifade edilen örneklerin hepsi CV1 pozitif bölgesinde, tümör olarak ifade edilen patolojik örnekler ise CV1 negatif bölgesinde kaldı. Parmak izi bölgesinde protein ve DNA bilgilerinin birlikte değerlendirilmesi sonucunda CVA ile istenilen sınıflandırmanın çok iyi bir şekilde yapılabildiği gösterildi. 69 tümör örneğinden 3 tanesi sıfır düzeyinde görüldü, buna karşılık tüm sağlıklı doku örnekleri pozitif CV1 bölgesinde kaldı. Böylece CVA sınıflandırmasının yüksek bir başarı ile gerçekleştiği rahatlıkla söylenebilir.

Yukarıda anlatılan işlemler sonucunda FTIR ölçümlerinden elde edilen verilerin sağlıklı ve patolojik dokuların birbirinden farklı olarak sınıflandırılmasının mümkün olduğu gösterildi. Bu aşamada kemometrik, yani istatistiksel bir model oluşturularak hangi sınıfa ait olduğu bilinmeyen bir dokunun hangi sınıfa (normal veya tümör) ait olabileceğinin saptanıp saptanamayacağı üzerine çalışıldı. SIMCA diskriminasyon modeli, bir dokunun karakteristik özelliklerine göre belli bir gruba dahil edilemeyeceğini göstermek için kullanıldı ve modeller, tümör ve normal dokular için

ayrı ayrı oluşturuldu. Tümör için 38 doku örneği, sağlıklı doku örnekleri için 21 doku örneği SIMCA modeli oluşturmak üzere kullanıldı. 31 tümör ve 17 normal doku örneği de test aşamasında kullanıldı. Çizelge 4.3.'de SIMCA modellerinin başarı oranları gösterilmiştir. İlgili tablo incelendiğinde sağlıklı dokular için 12 örnek doğru sınıflandırılırken 1 örnek tümör olarak sınıflandırıldı ve 4 örnek de belli bir sınıflandırmaya dahil olamadı. Bu şekilde modelin sınıflandırma başarı oranı %71'de kaldı (normal dokular için). Tümör dokularının sınıflandırmaları incelendiğinde 26 doku örneği doğru sınıflandırılırken 5 doku örneği model tarafından sağlıklı olarak gösterildi, böylece spektral moleküler histopatoloji kaynaklı tümör için oluşturulan modelin başarı oranı %84 olarak belirlendi.

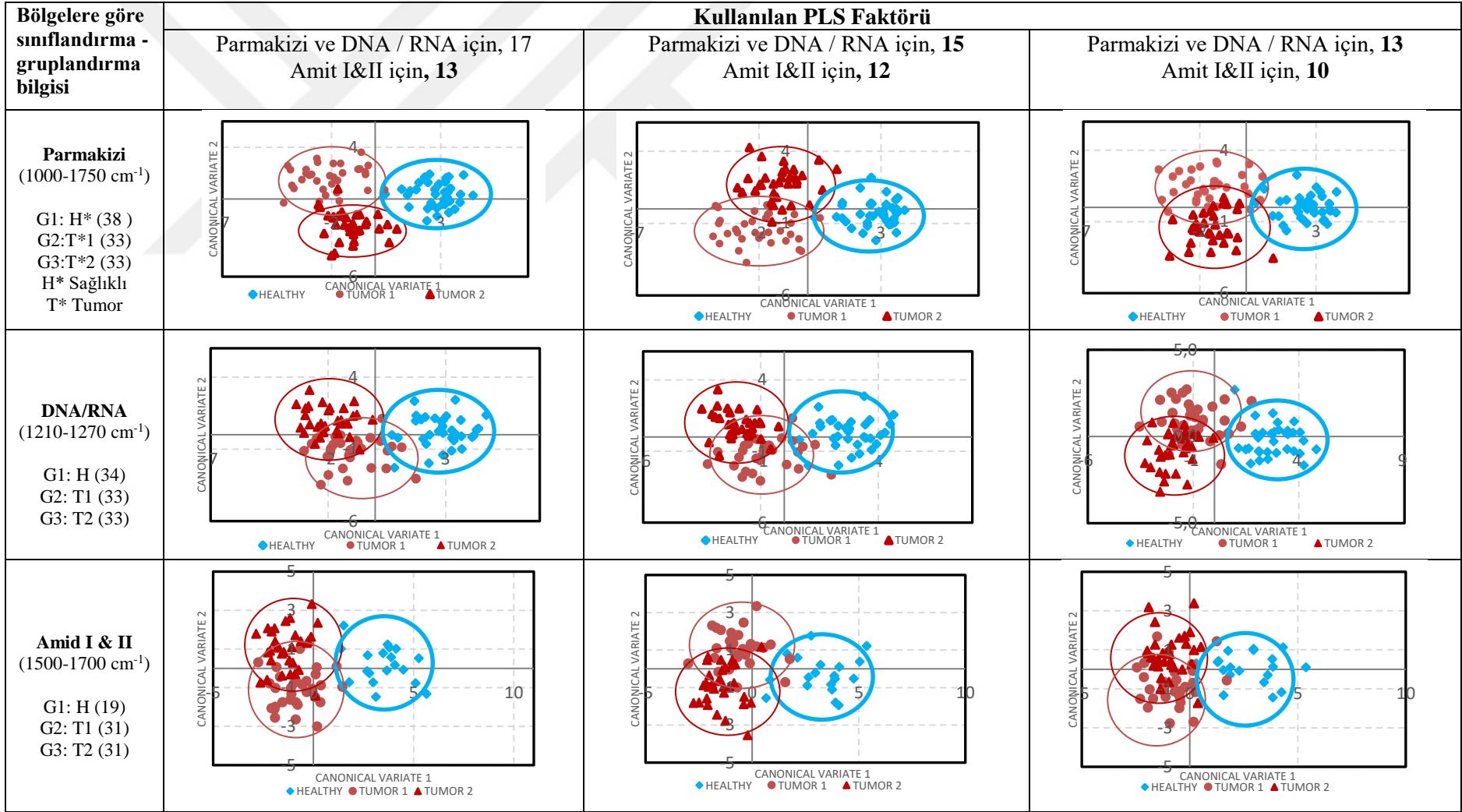
Çizelge 4.3.: Normal dokuların ve kanser dokularının SIMCA modeli ile tahmin edilebilme oranları

SIMCA Modeli Sınıflandırması	Sağlıklı İçin	Tümör İçin
Belirsiz	4	-
1 (Normal)	12	5
2(Tümör)	1	26
Modelin % Tahmin Etme Başarısı	71	84

Sınıflandırma yapılırken kullanılan PLS'ler, sınıflandırması yapılmak istenen toplam örnek sayısının 1/6'sının üzerinde kullanılması tavsiye edilmez. Yüksek PLS kullanımı sapmaların (overshooting) artmasına neden olarak sağlıklı sonuçlar vermez. Şekil 4.5., bu çalışmada şu ana kadar yapılan sınıflandırmanın şartları zorlaştırılarak elde edilen modelleri göstermektedir. Burada patolojik örnekler 2 gruba ayrıldı ve 1 normal doku grubuyla birlikte diskriminasyonu elde edilmeye çalışıldı. Böylece uygulanan kemometri tekniğinin spektropatolojik ayırlama performansı daha sağlıklı bir biçimde ölçüldü. Şekil 4.5.'te PLS skorları ve örnek sayıları da belirtildi.

Şekil 4.5. dikkatlice incelendiğinde patolojik dokuların normal dokulardan ayrı gruplandığı görüldü. Tümör 1 (T1) ve Tümör 2 (T2) grupları elde edilen sonuçlar içerisinde tamamen random seçilerek isimlendirildikten sonra model oluşturma çalışması yapıldığında bu grupların ya birbirine yakın ya da ortak bir grupta sınıflandığı görüldü. Böylece tümör grupları random bir şekilde ayrıldığında da model sonuçlarında bu grupların birbirlerine yakın konumlandığı gözlemlendi. Gruplamalar protein amid I-II, DNA/RNA ve parmak izi bölgelerinde farklı PLS skorları kullanılarak yapıldı. Bunlar arasında parmak izi bölgesi kullanımı ile en iyi sonuçlar elde edildi.



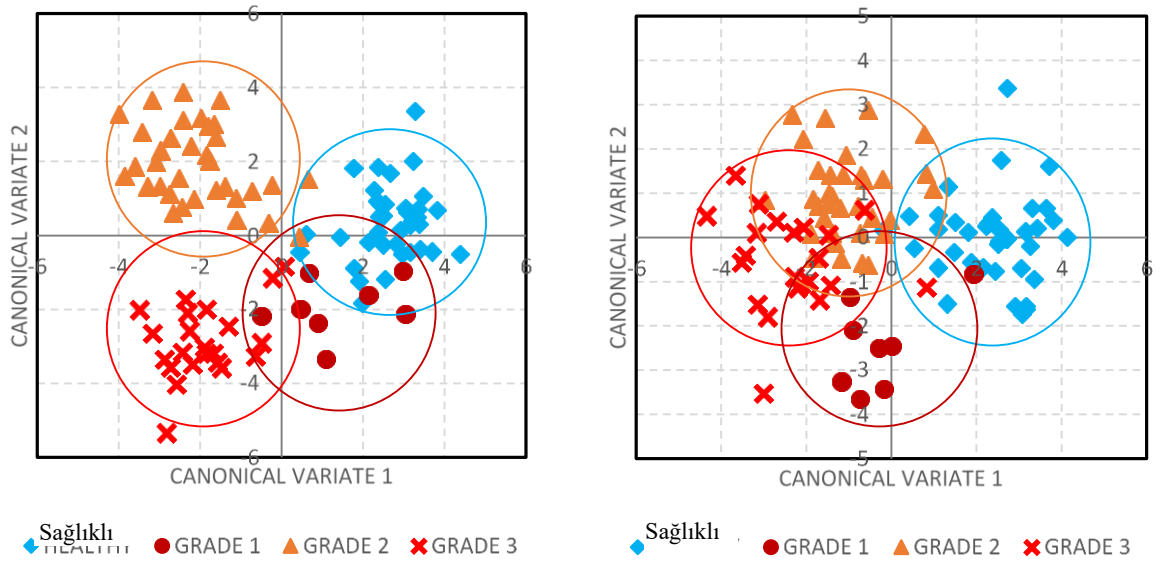


Şekil 4.5. 3 gruba yapılan patolojik ve normal meme dokularının CVA ile sınıflandırılması.

4.3 Spektral Veriler ile Sınıflandırma ve Hızlı Meme Kanseri Teşhisi

Normal ve tümör meme dokularının spektroskopik ölçümlerinde elde edilen spektrumlarla yapılan yağ içeriğine göre yapılmış sınıflandırma ile patolojik dokuların histopatolojik özelliklerinin değerlendirilmesi Ek-A'da gösterildi. Toplamda 17 hastadan elde edilen tümör ve normal dokular kullanıldı. Tümör dokularının incelemesine devam edilerek histolojik gradeleri arasında bir sınıflandırma yapıldı. Böylece tümör dokularının kendi aralarında kimyasal içeriklerine göre 1, 2 veya 3. dereceden (grade) olduğu belirlenmeye çalışıldı.

Ek-A'da belirtilen tümörün histopatolojik özelliklerinden tümör dereceleri baz alınarak, tümörler kendi içlerinde Grade1, Grade2 ve Grade3 olarak tanımlandı ve birbirlerinden diskriminasyonuna çalışıldı. Şekil 4.6.'da IR ölçümlerinde elde edilen DNA/RNA ve parmakizi bölgeleri absorpsiyonları verileri kullanılarak 1 normal ve 3 patolojik grup tanımlanarak 14 PLS ile CVA diskriminasyon modelleri gösterilmiştir.



A: G1: H (38), G2:Grade1 (8), G3:Grade2 (34), G4:Grade3 (22) **B:**G1: H (38), G2:Grade1(8), G3:Grade2(34),G4:Grade3 (22)

Şekil 4.6. Meme dokularının histolojik dereceye bağlı olarak parmak izi (A) ve DNA/RNA bilgileri (B) kullanılarak PLS-CVA ile diskriminasyonu

Şekil 4.6.'da gösterilen modellerden A şeklini incelendiğinde parmak izi bölgesi verileri ile yapılan ayırlama sonucundan Grade 2 ve Grade 3 grubunun sağlıklı gruptan rahatlıkla ayrımlanabildiği ancak Grade 1 grubunun tam olarak

ayrılanmadığı görüldü. Grade 1 grubunun kanser oluşumunun en az olduğu grup olması; doku kimyasal kompozisyonlarında ki küçük değişiklikler olduğu anlamına gelmesi nedeniyle, bu grupta bulunan örneklerin bir kısmı sağlıklı grupta yer almıştır. Grade 2 ve 3 gruplarının sağlıklı doku grubundan diskriminasyonunun ise kanser dokularında ki kimyasal kompozisyonların kanser derecelerine göre değişmesi nedeniyle teorik bilgiler ile örtüştüğü görüldü. DNA/RNA bilgileri kullanarak oluşturulan CVA diskriminasyon modelinde (B), Grade 3 örnekleri sağlıklıdan çok iyi ayırt edilebilirken, Grade 1 örnekleri parmak izi bölgesinde yapılan çalışmaya göre çok daha iyi ayrılanabildi. Hücre çekirdeği kimyasal kompozisyon bilgileri kullanılarak yapılan bu çalışmada Grade 2, Grade 1'den tam olarak diskrimine olurken birkaç örneğin sağlıklı doku örneklerinin bulunduğu gruba dahil olduğu görüldü.

Makroskopik ölçümlerin hücre DNA ve RNA'sını tam olarak kapsayamamış ve ilgili piklerin zayıf olması CVA analizlerini ve dolayısıyla da elde edilmeye çalışılan diskriminasyon doğruluğunu ve duyarlılığını etkilemektedir. Parmak izi bölgesi oldukça geniş bir aralık olup çok fazla kimyasal kompozisyon bilgisi içermesine rağmen, yapılan diskriminasyon modellerinde Grade 2 ve Grade 3 tümör sınıflandırmalarında başarı elde edildi. DNA/RNA bölgesi kullanılarak yapılan diskriminasyon modellerinde ise Grade 1 tümörlerin diferansiyelinin daha başarılı olduğu görüldü.

Meme kanseri evrelerini ifade eden bu histopatolojik derecelendirmelerin yapılmasında baz alınan hücre tubulus yapımı (T), nukleus özellikleri (N) ve mitoz sayıları (M) gibi verilere dayalı olarak da normal ve patolojik meme dokularının ayrımı yapılmaya çalışıldı. Çizelge 4.4.'te 17 hastanın T, N ve M skorları ile bu hastalardan toplanan spektrumların tipleri ve toplam sayıları ayrıntılı şekilde gösterildi.

Çizelge 4.4.: Meme dokusunun Spektro-Histopatolojik sınıflandırılması için kullanılan örnek sayısı ve T,N,M skorları

Hasta	Spektrum Tipi			Spektrohistopatolojik Sınıflandırma				
	Tip I	Tip II	Tip III	Tümör Tipi	Histolojik Grade	Tubulus Yapımı (T)	Nukleus Özellikleri (N)	Mitoz Sayısı (M)
1	-	2	2	İnvazif duktal karsinom	2	3	3	1
2	1	2	1	İnvazif duktal karsinom	2	3	3	1
3	-	1	4	Lobüler karsinom	2	3	3	1
4	-	4	2	İnvazif duktal karsinom	3	3	3	2
5	-	1	4	Lobüler karsinom (pleomorfik)	2	3	3	1
6	-	1	-	İnvazif duktal karsinom	2	3	3	1
7	-	-	1	İnvazif duktal karsinom	2	3	2	2
8	-	1	3	İnvazif duktal karsinom (multifokal)	1	2	2	1
9	-	1	2	İnvazif lobüler karsinom (klasik)	1	3	1	1
10	-	-	4	İnvazif duktal karsinom	3	3	3	3
11	2	2	-	İnvazif duktal karsinom (multifokal)	2	3	2	1
12	-	1	4	Nöroendokrin karsinom	2	3	2	1
13	-	2	1	İnvazif duktal karsinom	2	3	2	1
14	-	-	5	İnvazif duktal karsinom	3	3	3	2
15	-	5	1	İnvazif duktal karsinom	3	3	3	3
16	-	-	5	İnvazif duktal karsinom	2	2	3	2
17	-	2	-	İnvazif duktal karsinom	2	2	3	1

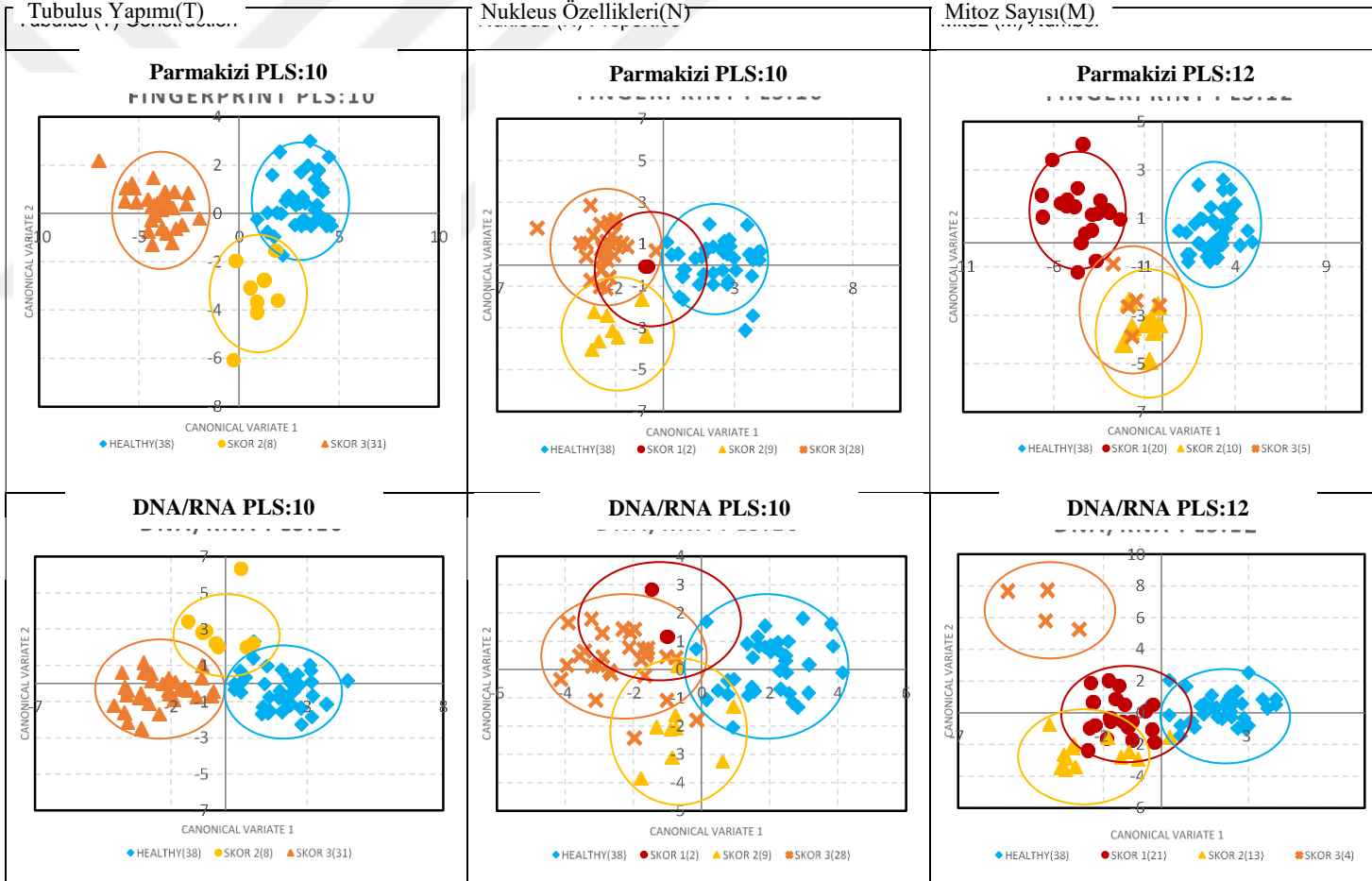
Çizelge 4.4.'te ki verilere dayanarak T, N ve M bilgilerine göre ayrı gruplar atanarak sağlıklı meme dokularından ayrıştırılmaya çalışıldı. Bu çalışmada daha önce uygulandığı gibi DNA/RNA ve parmak izi bölgelerinde bulunan veriler kullanılarak CVA diskriminasyon modelleri oluşturuldu (Şekil 4.7.). Parmak izi bölgesinde yapılan çalışmaların diğer DNA/RNA bölgesine göre daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlendi. Tubulus oluşturma özelliğine göre yapılan gruplandırmada tümörlerin normal dokulardan belirgin bir şekilde ayrımlandığı görüldü. Nukleus özelliğine göre ise parmak izi bölgesi bilgileri ışığında skor 2 ve skor 3 değerleri diskrimine edilebildi. Mitoz sayısına göre de parmak izi bölgesi tüm tümörleri başarı ile ayrıştırabildi ve skor 3 örneklerinin DNA/RNA bölgesinde diğerlerinden tamamen farklı bir yerde konumlandığı görüldü.

Bu çalışmada normal ve patolojik dokuların birbirlerinden diskrimine edilmelerine ilave olarak tümör doku örneklerinin histopatolojik değerlerine göre diskrimine edilmesine çalışıldı. T,N ve M skor değerlerine göre değil de genel tümör histolojik sınıflandırmasına göre yapılan çalışmada PLS skoru 10'a düşürülerek CVA analizi başarılı bir şekilde yapıldı (Şekil 4.8.). CVA model oluşumu için toplamda 64 meme tümör dokusu örneği kullanıldı ve Grade 2 ve Grade 3 birbirlerinden çok ayrı konumlandırılmasa da Grade 1'in diğer iki gruptan tamamen ayrı konumlandığı görüldü. Böylece Grade 2 ve 3 derecelerine sahip örneklerde Grade 1'e göre daha fazla kimyasal kompozisyon farklılığı olduğu söylenebilir. Patolojik olduğu bilgisine sahip olunan dokuların hangi derecede kanser hücrelerine sahip olduğu bilgisine, spektroskopi ölçümleriyle birlikte hızlı diskriminasyonunun yapılarak ulaşılabilmesi çalışmanın klinik önemini gösterir.

Tümörler genel histopatolojik derecelerinin tanımlanmasında kullanılan T, N ve M skorlarına göre de gruplandırılmaya çalışıldı (Şekil 4.9.). Yine aynı şekilde sağlıklı dokular bu gruplandırılmalara dahil edilmedi. Bu aşama sonucunda da en iyi ayırım parmak izi bölgesinde elde edildi. Nukleus özelliği ve mitoz sayısına göre yapılan sınıflandırmada 3 adet grup ataması yapılırken, tubulus oluşumuna göre yapılan sınıflandırmada 2 adet grup ataması yapılabildi. Tubulus oluşumuna göre 2 grup atanabilmesinin tek nedeni, incelenen doku örneklerinden 1 nolu skorun tespit edilmemesi ve böylece sadece 2 ve 3 nolu skorların tespit edilmesidir. Şekil 4.9.'da nukleus özelliklerine (a), mitoz sayısına (b) ve tubulus oluşumuna (c) göre 10 PLS skorlu CVA sınıflandırmasında atanan histopatolojik tümör skorlarının çok iyi

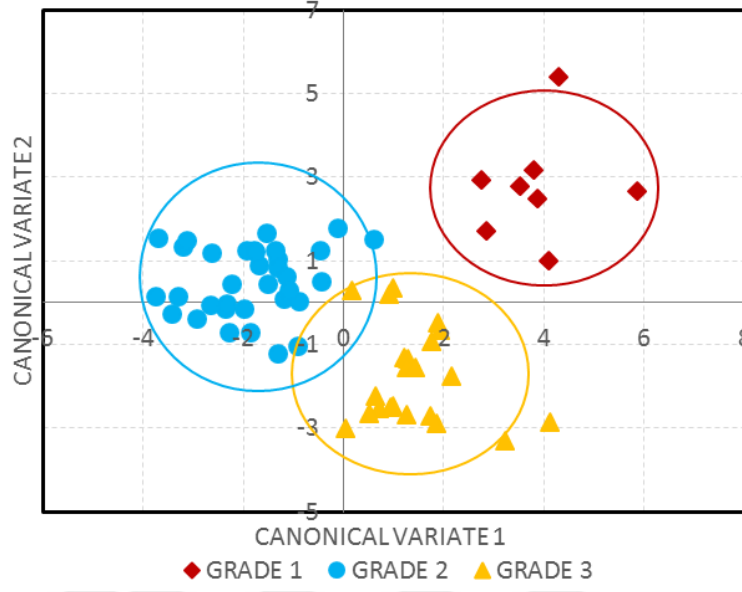
ayrıldığı görüldü. Mitoz sayısına (b) göre oluşturulan CVA modelinde daha kısmi bir diskriminasyon ile karşılaşıldı. Burada sapma gerçekleştiren yaklaşık 4 adet örneğe rastlandı (Şekil 4.9.). Grup bilgileri ve her bir skor değeri için kaç tane spektrum yer aldığı bilgileri de Şekil 4.9.'da modellerin hemen altında sunuldu.





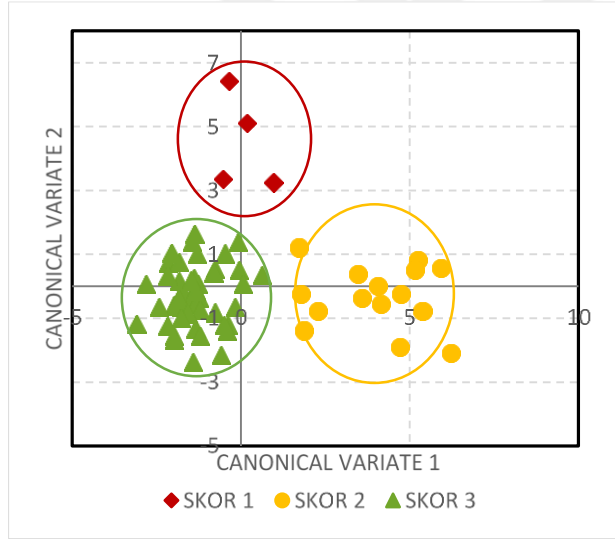
Şekil 4.7. Sağlıklı meme dokularının tümör derecelerinin histolojik sınıflandırılmasına(T,N,M) göre diskriminasyonu

PARMAK İZİ PLS:10



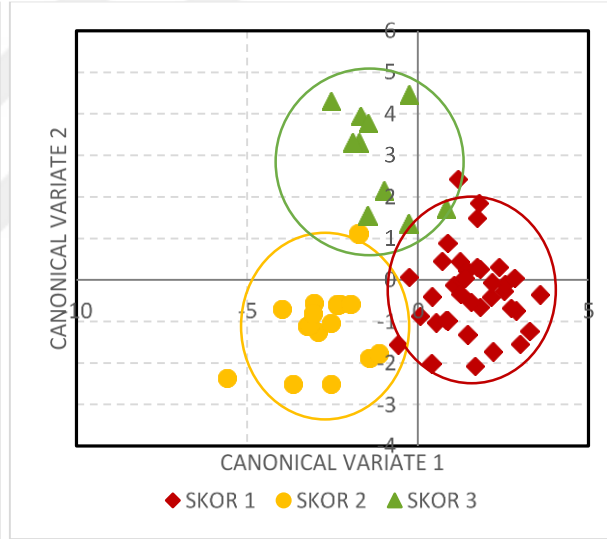
G1: Grade 1 (8), G2: Grade 2 (34), G3: Grade 3 (22)

Şekil 4.8. Tümörlerin parmak izi bilgileri kullanılarak histolojik derecelerine göre sınıflandırılması.



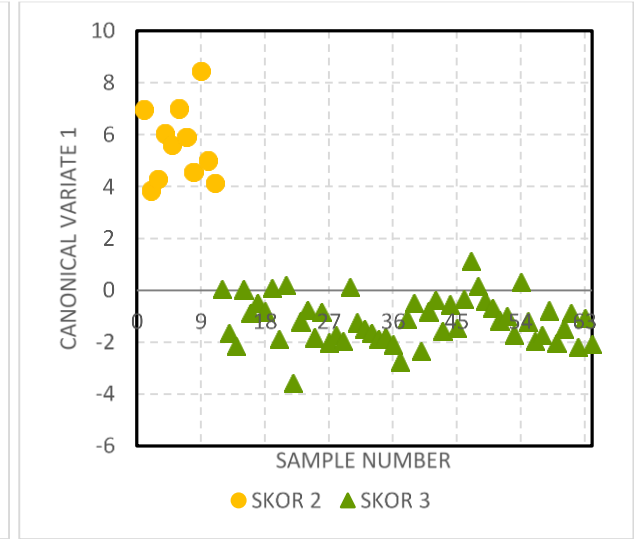
A: G1:Skor1(4), G2:Skor2(15), G3:Skor3(45)

(a) Nucleus özellikleri



B: G1:Skor1(37), G2:Skor 2(17), G3:Skor 3(10)

(b) Mitoz Sayısı



C: G1:Skor2 (11), G2:Skor3 (53)

(c) Tubulus Oluşumu

Şekil 4.9. Histopatolojik özelliklerine göre tümörlerin 10 PLS faktörlü CVA diskriminasyonu.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 17 farklı meme kanseri hastasına ait patolojik doku örnekleri ile sağlıklı doku örneklerinin kimyasal bileşenleri FTIR-ATR tekniği ile incelenmiş ve daha önce bu alanda kullanılmamış olan kemometri tekniği ile sağlıklı ve tümör doku örneklerinin birbirlerinden ayrıştırılmasının gösterilmesi amaçlanmıştır.

Doku örneklerinin makro spektroskopik sonuçlarının değerlendirilmesinde her bir örneğin içerdiği yağ bileşenleri baz alınmış ve üç farklı sınıflandırma yapılarak kanser hücrelerinin bilinen enerji kaynakları üzerinden ilerlenmeye çalışılmıştır. Fosfolipitler ve lipitlerin C=O gerilme titreşimlerinin (ester) bilgisini içeren 1769-1719 cm^{-1} bölgesinde bulunan pikler baz alınarak sınıflandırmalar yapılmıştır.

Dokuların kimyasal kompozisyonlarının incelenmesinde yağ bileşenlerinin bulunduğu bölgelerin yanı sıra, bu çalışmada yüksek önem taşıyan parmak izi bölgeleri, DNA/RNA pikleri ile protein amid I-II bandlarının bulunduğu dalga sayıları da dikkatlice incelenmiş ve kemometri tekniği kullanılarak CVA modelleri oluşturulmuştur. Bu modellerin oluşturulmasında PLS faktörü kullanılmıştır. Patolojik ve sağlıklı dokuların kemometri tekniği ile diskrimine edilebileceği gösterildikten sonra SIMCA programı ile kimyasal kompozisyon bilgisi tanımlanmayan örneklerin nasıl bir gruplaşma göstereceği sergilenmiştir.

Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlarda tümör ve sağlıklı dokuların yağ içeriklerinin farklı oldukları ve tümör dokularında ki yağ içeriğinin sağlıklı dokulara göre oldukça az olduğu tespit edilmiştir. Dokuların histopatolojik değerleri göz önünde bulundurulduğunda patolojik dokuların hangi evrede kanserli hücre çoğalmasına bağlı olarak da yağ içeriklerinin değiştiği söylenebilir. Bu durumda grade 1 meme kanseri hücrelerinde ki yağ içerik oranlarının grade 2 ve 3'e oranla daha fazla olması beklenmektedir.

PLS-CVA modelleri ile sağlıklı ve patolojik doku örnekleri başarılı bir şekilde birbirlerinden ayrı sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma en iyi parmak izi bölgesinde gözlenmiştir. Böylece FTIR spektral verileri ile kemometrik tekniği kullanımının

beklenen ölçüde fayda sağladığı görülmüş ve patolojik doku örneklerinin kendi aralarında ayrılanıp ayrılanamayacağı gözlenmiştir.

SIMCA diskriminasyon modeli kullanılarak kimyasal karakteristik özellikleri bilinmeyen bir örneğin ne kadar doğru sınıflandırılabileceği sergilenerek, tümör örnekleri için başarı oranı %84 iken normal doku örneklerinde bu oran %71'de kaldığı görülmüştür (Çizelge 4.3.). Tümör doku grupları kendi aralarında rastgele tanımlanarak Şekil 4.5.'te doğru bir biçimde CVA modeli ile sağlıklı gruptan ayrılanabilmiştir. Burada da parmak izi bölgesinde en iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Klinik histopatolojik değerlendirme sonuçlarında belirtilen hastaların kanser derecelerine göre de benzer modeller kullanarak sağlıklı dokulardan ayrılanmasına çalışılmıştır (Şekil 4.6.). Değerlendirme parmak izi ve DNA/RNA bölgeleri baz alınarak yapılmıştır ve kanser derecelerinden Grade 1'in parmak izi bölgesinde sağlıklı doku grubuna yakın olduğu gözlenmiştir. DNA/RNA bölgesinde ise Grade 1'in daha başarılı ayrıldığı gözlenmiştir. CVA analizlerini etkileyen faktörlerden birkaçı; ilgili piklerin zayıf olması ve DNA gibi bölgelerin makroskopik ölçümler ile tam olarak tanımlanamamış olmasıdır. Bu durum diskriminasyon doğruluklarını etkilemektedir. Parmak izi bölgesinde çok fazla kimyasal kompozisyon bilgisi bulunmaktadır ve parametrelerin çokluğuna rağmen bu gölgede Grade 2 ve 3 tümörlerinin çok daha başarılı olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 4.8.'de klinik histopatolojik gradelerin sadece kendi aralarındaki gruplaşması incelenmiştir. Bunun sonucunda Grade 1'in diğer iki gruptan açıkça ayrı konumlanması; Grade 2 ve 3'ün hücre kimyasal kompozisyon değişimlerinden çok daha az ve farklı olduğu görülmektedir.

Son olarak, bu çalışmada benzer modellerin kullanıldığı bir diğer gruplandırma ise klinik çalışmalar sonucunda elde edilen histopatolojik tümör derecelerinin tanımlanmasında rol oynayan 3 farklı yapının (T,N,M) özelliklerine göre diskriminasyon denenmiştir (Şekil 4.9.). Burada elde edilen en iyi sonuçlar parmak izi bölgesindedir. Bu bölgede ki sonuçlar Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. Nukleus özelliklerine göre yapılan ayırmada tüm skorların birbirlerinden en iyi şekilde ayrılandığı gözlemlenmiştir.

Elde edilen tüm sonuçlar FTIR-ATR tekniğinin makroskopik ölçümlerinin sonucunda elde edilen verilerle kemometrik sınıflandırma yöntemlerinin birlikte

kullanılmasının başarılı sonuçlar verdiğini göstermektedir. Bu çalışmaların devamı, meme kanserinin hızlı ve erken teşhisinin ne kadar ucuz ve pratik yollarla yapılabileceğini gösterecek niteliktedir.





KAYNAKLAR

- [1] **Mostaço-Guidolin, L. B., Murakami, L. S., Batistuti, M. R., A. Nomizo, L. Bachmann,**2011, Molecular and chemical characterization by Fourier transform infrared spectroscopy of human breast cancer cells with estrogen receptor expressed and not expressed, 69-90.
- [2] **Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., E. Ward, D. Forman,** 2011, Global cancer statistics, A Cancer journal for Clinicians(61), 69-90.
- [3] **Coates, John P.,** Process Analytical Technology, Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries, 91-97, Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- [4] **M. Meurens, J. Wallon, J. Tong, H. Noel, J. Haot,** 1996, Breast cancer detection by Fourier transform infrared spectrometry, Vib. Spectrosc., 10:341-346.
- [5] **H. Fabian, P. Lasch, M. Boese, W. Haensch,** 2003, Infrared microspectroscopic imaging of benign breast tumor tissue sections, J. Mol. Struct. 661-662, 411-417.
- [6] **S. Rehman, Z. Movasaghi, J. A. Darr, I. U. Rehman,** 2010, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of breast cancer tissues; identifying differences between normal breast, invasive ductal carcinoma, and ductal carcinoma in situ of the breast, Appl. Spectrosc. Reviews,45:355-368.
- [7] **S. Kumar, C. Desmedt, D. Larsimont, C. Sotiriou, E. Goormaghtigh,** 2013,Change in the microenvironment of breast cancer studied by FTIR imaging, Analyst, 138:4058-4065.
- [8] **M. Verdonck, N. Wald, J. Janssis, P. Yan, C. Meyer, A. Legat, D. E. Speiser, C. Desmedt, D. Larsimont, C. Sotiriou, E. Goormaghtigh,** 2013, Breast cancer and melanoma cell line identification by FTIR imaging after formalin-fixetion and paraffin-embedding, Analyst, 138:4083-4091.
- [9] **W. M. Elshemey, A. M. Ismail, N. S. Elbially,** 2016,Molecular-level characterization of normal, benign, and malignant breast tissues using FTIR spectroscopy, J. Med. Biol. Eng., 36:369-378.
- [10] **Colthrup, N.B.; Daly, L.H.; Wiberley, S.E.,**Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, San Diego: Academic Press.
- [11] **Lan-Vien, D.; Colthrup, N.B.; Fateley, W.G.; Grasselli, J.G.,**Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies of Organic Molecules, San Diego: Academic Press.
- [12] **Workman J. J. Jr.,**1996,Interpretive Spectroscopy for Near Infrared, Appl. Spectrosc. Rev., 251-320.

- [13] **Bu, D.**, Bridging the Gap between the State and Measurement of a Chemical System, CAMO Software Inc..
- [14] **Fernández, J.A., Baeten, P.V., Dardenne, P.**, Walloon Agricultural Research Centre (CRA-W), Valorisation of Agricultural Products Department Gembloux, Belgium.
- [15] **Miller, J.N., Miller, J.C.**, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Sixth Edition, 221-228.
- [16] **Toyran N, Lasch P, Naumann D, Turan B, Severcan F.**, 2006, Early alterations in myocardia and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study, *Biochem J*.
- [17] **Toyran N, Turan B, Severcan F.**, 2007, Selenium alters the lipid content and protein profile of rat heart: an FTIR microspectroscopic study. *Arch Biochem Biophys*.
- [18] **Winkler R, Wittmer A, Heusermann U.**, 2002, Cancer and Crohn's disease, *Z Gastroenterol*.
- [19] **Argov S, Sahu RK, Bernshtain E, Salman A, Shohat G, Zelig U, et al.**, 2004, Inflammatory bowel diseases as an intermediate stage between normal and cancer: a FTIR-microspectroscopy approach, *Biopolymers*.
- [20] **Lipkin M.**, 1987, Proliferation and differentiation of normal and diseased gastrointestinal cells, In: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 2nd ed. New York: Raven Pres; 255.
- [21] **Sahu RK, Argov S, Bernshtain E, Salman A, Walfisch S, Goldstein J, et al.**, 2004, Detection of abnormal proliferation in histologically 'normal' colonic biopsies using FTIR-microspectroscopy, *Scand J Gastroenterol*.
- [22] **Huang RY, Miller LM, Carlson CS, Chance MR.**, 2003, In situ chemistry of osteoporosis revealed by synchrotron infrared microspectroscopy.
- [23] **McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM.**, 1984, Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease, *Neurology*.
- [24] **Choo LP, Wetzel DL, Halliday WC, Jackson M, LeVine SM, Mantsch HH.**, 1996, In situ characterization of beta-amyloid in Alzheimer's diseased tissue by synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy.
- [25] **Buschman HP, Motz JT, Deinum G, Römer TJ, Fitzmaurice M, Kramer JR, et al.**, 2001, Diagnosis of human coronary atherosclerosis by morphology-based Raman spectroscopy.
- [26] **Toyran N, Zorlu F, Severcan F.**, 2005, Effect of stereotactic radiosurgery on lipids and proteins of normal and hypoperfused rat brain homogenates: a Fourier transform infrared spectroscopy study.
- [27] **Hadju, SL.**, 2005, A note from history: Rudolf Virchow, pathologist, armed revolutionist, politician, and anthropologist, *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 35:203-205.

- [28] **Sturgis, C.D., Nassar, D.L., A'Antonio, J.A., Raab, S.S.**, 2000, Cytologic features useful for distinguishing small cell from non-small cell carcinoma in bronchial brush and wash specimens, *American Society for Clinical Pathology*, 114:197-202.
- [29] **Chan, JK.**, 2014, The wonderful colors of the diagnostic surgical pathology, *International Journal of Surgical Pathology*, 22:12-32.
- [30] **Bane, A.**, 2013, Ductal carcinoma in situ: what the pathologist needs to know and why, *International Journal of Breast Cancer*.
- [31] **Allred, DC, Wu, Y, and Mao, S.**, 2008, Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution, *Clinical Cancer Research*, 4:370-378.
- [32] **Baloğlu, H ., ÖZTEK, İ ., Aydın, S., Karakaya, M ., Lokman S., Yaylacı, M.**, 1995, Meme Kanserlerinde Proliferatif Kapasite: Klinik Önemi ve Tayin Yöntemleri, *Meme Hastalıkları Dergisi*, 51-57.
- [33] **Singh, R., Hellman, S., Heimann, R.**, 2004, The Natural History of Breast Carcinoma in the Elderly, Implications for Screening and Treatment, *American Cancer Society*, 1807-1813.
- [34] **Kizil, R., J. Irudayaraj.**, 2007, Applications of Raman spectroscopy for food quality measurement, In: *Nondestructive Assessments in Food Quality*, Editors: J. Irudayaraj, Reh C.T., Blackwell Publishing.
- [35] **Bellisola, G., Sorio, C.**, 2012, Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis, *Am. J. Cancer Res.*, 1:1-21.
- [36] **Kemsley, E.K.**, 1998, *Discriminant Analysis and Class Modeling of Spectroscopic Data*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- [37] **Kendall, C., Isabelle, M., Bazant-Hegemark, F., Hutchings, J., Orr, L., Bahrah, J., Baker, R., Stone, N.**, 2009, Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnosis, *Analyst*, 134:1029-1045.
- [38] **Petibois, C., Desbat, B.**, 2010, Clinical application of FTIR imaging: new reasons for hope, *Cell*, 28:495-500.
- [39] **Diem, M., Haensch, W., Lasch, P., Naumann, D.**, 2003, Imaging of Colorectal Adenocarcinoma Using FT-IR Microspectroscopy and Cluster Analysis, *Biochim et Biophys*, 1688:176-186.
- [40] **Baker, M.J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H.J., Dorling, K.M., Fielden, P., Gardner, P., Martin, F.L.**, 2014, Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials, *Nat. Protoc.*, 9:1771-1791.
- [41] **Biswas, S., Walsh, M.J., Bhargava, R.**, 2014, Fourier transform infrared (Ft-IR) spectroscopic imaging for solid tumor histopathology, In: *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine, Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics*, Ed. M. Baranska, Chapter 16, 475-504.
- [42] **Fabian, H., Lasch, P., Boese, M., Haensch, W.**, 2002, Mid-IR microspectroscopic imaging of breast tumor tissue sections, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 67:354-362.

- [43] **K. Malek, B.R. Wood, K.R. Bambery**, 2014, Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine FTIR Imaging of Tissues: Techniques and Methods of Analysis, pp.419-473.
- [44] **H. Fabian, N.A.N. Thi, M. Eiden, P. Lasch, J. Schmitt, D. Naumann**, 2006, Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections by using IR-microscopy, *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, 874-882.



EKLER

Sayfa

EK A: Çalışma boyunca kullanılan doku örneklerinin spektroskopik analizlerinin sonuçlarında karşılaşılan spektrum tipleri ile tümörlerin histopatolojik değerlendirilmesi	49
EK B: Tümörlerin histopatolojik değerlendirilmesinde kullanılan terimler ve açıklamaları	51





EK A.

HASTA	ÖRNEK ÇEŞİDİ	Spektroskopik Ölçümlerde Karşılaşılan Farklı Spektrum Tipleri ve Rastlanma Sıklıkları			TÜMÖRÜN HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ
		Belirgin Yağ Pikleri Veren	Zayıf Yağ Pikleri Veren	Yağ Pikleri Vermeyen	
		Spektrum Tip I	Spektrum Tip II	Spektrum Tip III	
1	Tümör	-	2	2	Yaş: 42, Tümör Çapı:12 mm, Tümör Kaynağı: İnvazif Duktal Histolojik Grade: 2 (T:N:M=3:3:1) Lenf Nodu Durumu: 3 lenf nodu pozitif, Hormonlar: ER (-), PR(-), HER-2/neu(+) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %32 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Var
	Sağlıklı	-	-	-	
2	Tümör	1	2	1	Yaş: 61, Tümör Çapı: 20 mm, Tümör Kaynağı:İnvazif Duktal Histolojik Grade: 2 (T:N:M=3:3:1) Lenf Nodu Durumu: 2 lenf nodu pozitif (mikrometastaz) Hormonlar: ER (+) %100, PR(-), HER-2/neu(-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %27 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Yok
	Sağlıklı	-	-	-	
3	Tümör	-	1	4	Yaş: 73, Tümör Çapı: 19 mm, Tümör Kaynağı: Lobüler Karsinom, Histolojik Grade: 2 (T:N:M=3:3:1) Lenf Nodu Durumu: 2 lenf nodu pozitif Hormonlar: ER (+) %100, PR(+), %100, HER-2/neu(-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %15 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Yok
	Sağlıklı	-	-	-	
4	Tümör	-	4	2	Yaş: 22, Tümör Çapı: 30 mm, Tümör Kaynağı: İnvazif Duktal Histolojik Grade: 3 (T:N:M=3:3:2) Lenf Nodu Durumu: 14 lenf nodu pozitif Hormonlar: ER (+) %60, PR(+), %50, HER-2/neu(+) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %44 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Var
	Sağlıklı	-	-	-	
5	Tümör	-	1	4	Yaş: 36, Tümör Çapı: 70 mm, Tümör Kaynağı: Lobüler Karsinom (Pleomorfik tip) Histolojik Grade: 2 (T:N:M=3:3:1) Lenf Nodu Durumu: 5 lenf nodu pozitif Hormonlar: ER (+) %93, PR(+), %13, HER-2/neu(-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %40 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Var
	Sağlıklı	8	2	-	
6	Tümör	-	1	-	Yaş: 49, Tümör Çapı: 45 mm, Tümör Kaynağı: İnvazif Duktal Histolojik Grade: 2 (T:N:M=3:3:1) Lenf Nodu Durumu: 35 lenf nodu pozitif Hormonlar: ER (+) %100, PR (-), HER-2/neu (-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %13 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Var
	Sağlıklı	3	-	1	
7	Tümör	-	-	1	Yaş: 73, Tümör Çapı: 20 mm, Tümör Kaynağı: İnvazif Duktal Histolojik Grade: 2 (T:N:M=3:2:2) Lenf Nodu Durumu: 1 lenf nodu pozitif Hormonlar: ER (+) %100, PR (+) %100, HER-2/neu (-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %17 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Var
	Sağlıklı	7	-	-	
8	Tümör	-	1	3	Yaş: 45, Tümör Çapı:15-5 mm, Tümör Kaynağı: Multifokal İnvazif Duktal Histolojik Grade: 1 (T:N:M=2:2:1) Lenf Nodu Durumu: 1 lenf nodu pozitif (mikrometastaz) Hormonlar: ER (+) %100, PR (+) %65, HER-2/neu (-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %12 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Var
	Sağlıklı	3	-	2	
9	Tümör	-	1	2	Yaş: 61, Tümör Çapı: 50 mm, Tümör Kaynağı: İnvazif Lobüler (Klasik) Histolojik Grade: 1 (T:N:M=3:1:1) Lenf Nodu Durumu: 3 lenf nodu pozitif Hormonlar: ER (+) %100, PR (+) %80, HER-2/neu (-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %7 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Yok
	Sağlıklı	2	3	-	

HASTA	ÖRNEK ÇEŞİDİ	Spektroskopik Ölçümlerde Karşılaşılan Farklı Spektrum Tipleri ve Rastlanma Sıklıkları			TÜMÖRÜN HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ
		Belirgin Yağ Pikleri Veren	Zayıf Yağ Pikleri Veren	Yağ Pikleri Vermeyen	
		Spektrum Tip I	Spektrum Tip II	Spektrum Tip III	
10	Tümör	-	-	4	Yaş: 32, Tümör Çapı: 14 mm, Tümör Kaynağı: İnvazif Duktal Histolojik Grade: 3 (T:N:M=3:3:3) Lenf Nodu Durumu: Lenf nodu negatif Hormonlar: ER (-), PR (-), HER-2/neu (-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %68 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Yok
	Sağlıklı	4	2	-	
11	Tümör	2	2	-	Yaş: 76, Tümör Çapı: 32-15-5-2-2-2 mm, Tümör Kaynağı: Multifokal İnvazif Duktal Histolojik Grade: 2 (T:N:M=3:2:1) Lenf Nodu Durumu: 23 lenf nodu pozitif Hormonlar: ER (?), PR (?), HER-2/neu (?) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: % ? Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Var
	Sağlıklı	4	1	-	
12	Tümör	-	1	4	Yaş: 46, Tümör Çapı: 21 mm, Tümör Kaynağı: Nöroendokrin tümör Histolojik Grade: 2 (T:N:M=3:2:1) Lenf Nodu Durumu: Lenf nodu negatif Hormonlar: ER (?), PR (?), HER-2/neu (?) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: % ? Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Var
	Sağlıklı	2	3	2	
13	Tümör	-	2	1	Yaş: 49, Tümör Çapı: 55 mm, Tümör Kaynağı: İnvazif Lobüller Histolojik Grade: 2 (T:N:M=3:2:1) Lenf Nodu Durumu: Lenf nodu negatif Hormonlar: ER (+) %100, PR (+) %40, HER-2/neu (-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %27 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Var
	Sağlıklı	3	-	-	
14	Tümör	-	-	5	Yaş: 32, Tümör Çapı: 40 mm, Tümör Kaynağı: İnvazif Duktal Histolojik Grade: 3 (T:N:M=3:3:2) Lenf Nodu Durumu: 8 lenf nodu pozitif Hormonlar: ER (+) %90, PR (+) %13, HER-2/neu (-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %42 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Yok
	Sağlıklı	2	-	-	
15	Tümör	-	5	1	Yaş: 47, Tümör Çapı: 25 mm, Tümör Kaynağı: İnvazif Duktal Histolojik Grade: 3 (T:N:M=3:3:3) Lenf Nodu Durumu: Lenf nodu negatif Hormonlar: ER (+) %90, PR (+) %50, HER-2/neu (+) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %79 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Yok
	Sağlıklı	3	-	-	
16	Tümör	-	-	5	Yaş: 80, Tümör Çapı: 20 mm, Tümör Kaynağı: İnvazif Duktal Histolojik Grade: 2 (T:N:M=2:3:2) Lenf Nodu Durumu: 1 lenf nodu pozitif (mikrometastaz) Hormonlar: ER (+) %97, PR (+) %100, HER-2/neu (-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %26 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Yok
	Sağlıklı	2	-	-	
17	Tümör	-	2	-	Yaş: 47, Tümör Çapı: 25 mm, Tümör Kaynağı: İnvazif Duktal Histolojik Grade: 2 (T:N:M=2:3:1) Lenf Nodu Durumu: 1 lenf nodu pozitif Hormonlar: ER (+) %90, PR (+) %10, HER-2/neu (-) Hücre Proliferasyonu Ki-67 Değeri: %37 Lenfobasküler Boşluk Yayılımı: Yok
	Sağlıklı	2	-	-	
Toplam	17	Tümör	3	25	39
		Sağlıklı	45	11	5

EK B.

Histolojik Grade: Farklı histolojik özelliklerin göz önünde bulundurulmasıyla yapılan bir sınıflandırmadır. Günümüzde en çok kullanılan gradeleme sistemi modifiye Bloom-Richardson sistemidir. Bu gradeleme sisteminde tümör hücrelerinin nükleer özellikleri, oluşturdukları tubulus yapılarının oranı ve mitoz sayısı ayrı ayrı skorlanarak elde edilen toplam skora göre grade belirlenmektedir.

Tubulus Yapımı (T): Tümörün ne kadarlık bir kısmında tubulus yapılar oluştuğunu gösterir ve ona göre skor verilerek gradeleme yapılır.

Nukleus Özellikleri (N): Tümörün nükleer özellikleridir ve çekirdek pleomorfizmine bakılarak skorlar belirlenir.

Mitoz Sayısı (M): Kullanılan mikroskopun tipine göre değişmektedir. Hücrede belirli bir büyütme alanında ne kadar mitoz sayısı olduğunu gösterir. Belirli mitoz sayısına göre skor atanır.

Lenf Nodu: Lenfatik sistemin parçası olan küçük fasülye şekilli organlar (lenf bezi de denir). Kolun altında yer alan lenf bezleri göğüs ve kolda biriken lenf sıvısını boşaltır. Cerrahi sırasında aksiller lenf bezlerinin bazıları meme kanserinin evresini tespit etmek üzere çıkarılır.

Lenf Nodu (+): Lenf bezlerine yayılmış meme kanseri.

Lenf Nodu (-): Lenf bezlerine yayılmamış meme kanseri. (Erken evre hastalık da denir).

ER: Östrojen reseptörü. Bazı hücrelerin üzerinde yer alan, östrojen hormonunun bağlanabildiği bir duyarga. ER –pozitif (ER+) terimi östrojen reseptörünü taşıyan tümör hücrelerini ifade eder.

PR: Progesteron reseptörü. Bazı hücrelerde yer alan progesteron hormonunun bağlanabildiği bir duyarga. PR – pozitif (PR +) terimi progesteron reseptörüne sahip tümör hücrelerini ifade eder.

HER-2/neu (Humon epidermal growth factor receptor-2): Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinden bir protoonkogen. Metastatik meme kanserinin ne kadar agresif olduğunu anlamaya yardımcı olan prognostik bir belirleyici olarak kullanılır. Genellikle östrojen ve progesteron reseptör (ER ve PR) testleri ile beraber kullanılır.

Ki-67: Hücre çekirdeğinde bulunan ve mitozda miktarı artan protein yapıda bir moleküldür. Hücre proliferasyonunun iyi bir belirteçidir. Ki-67 düzeyinin immunohistokimya ile tespiti hücre proliferasyon hızı hakkında bilgi vermektedir.



ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad : H.Bengisu Gedikli
Doğum Yeri ve Tarihi : Kahramanmaraş, 1991
Adres : Başakşehir Mah. Anafartalar Cad. Oyakkent 2. Etap
C1 Blok Daire:7Başakşehir/İST.
E-posta : h.bengisugedikli@gmail.com
Lisans : Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Kimya Mühendisliği Bölümü