



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

**FDT' NİN MEME TÜMÖRÜ ÜZERİNE *In vivo* ETKİLERİNİN FTIR
SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ**

Tuğba KİRİŞ AYDOĞAN

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Biyomedikal Mühendisliği Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Fırat Kaçar**

Haziran, 2017

İSTANBUL

Bu çalışma 05/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Prof. Dr. Fırat KAÇAR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



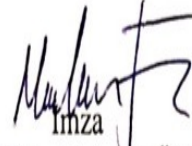
Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma
Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı



Doç. Dr. Emre ARSLAN
Marmara Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Mukden UĞUR
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Mahmut ÜN
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 113S420 numaralı Tübitak projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Danışmanım, Prof. Dr. Fırat KAÇAR' a yaptığı katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Yardımlarını ve katkılarını ilk günden beri artırarak devam ettiren değerli çalışma arkadaşlarım ve kardeşim Ayşenur KİRİŞ ile Saadet AKBULUT' a en içten duygularıyla teşekkürü bir borç bilirim.

Tez konusu tayininde ve tamamlanmasında çok kıymetli katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Haşim Özgür TABAKOĞLU' na, tez çalışmamın yürütülmesi aşamasında bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, in vitro deneylerim için laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU' na ve Yrd.Doç. Elif Sinem BİRELLER' e, in vivo deney aşamalarındaki desteklerinden ötürü Boğaziçi Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi Deneysel Hayvan Üretim ve Bakım Biriminde görevli veteriner hekim Arzu TEMİZYÜREK ve çalışma arkadaşlarına, histopatolojik analizleri ve katkıları için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zuhâl GÜCİN' e teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca destekleriyle, sevgileriyle her zaman yanımda olan biricik annem ve babam Zeynep ve Mehmet KİRİŞ başta olmak üzere tüm aileme, sevgili eşim Ahmet AYDOĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2017

Tuğba KİRİŞ AYDOĞAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. KANSER	3
2.1.1. Kanser ve Kanser Hücrelerinin Özellikleri	4
2.2. MEME KANSERİ	5
2.2.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri.....	6
2.2.2. Meme Kanserinde Evreleme	8
2.2.3. Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri	10
2.2.3.1. <i>Meme Kanserinde Cerrahi Tedavi</i>	11
2.2.3.2. <i>Meme Kanserinde Adjuvan Sistemik Tedavi</i>	11
2.2.3.3. <i>Metastatik Meme Kanserinde Tedavi</i>	12
2.3. FOTODİNAMİK TERAPİ	12
2.3.1. FOTODİNAMİK TERAPİNİN MEKANİZMASI	12
2.3.2. FOTODİNAMİK TERAPİDE KULLANILAN FOTO DUYARLI MADDELER(PS).....	15
2.3.2.1. <i>İndosiyanin Yeşili</i>	17
2.3.3. IŞIK KAYNAKLARI VE DALGABOYU	18

2.3.4. OKSİJEN.....	21
2.3.5. FOTODİNAMİK TERAPİ SONRASI HÜCREDE ÖLÜM MEKANİZMALARI.....	21
2.4. FOURİER DÖNÜŞÜMLÜ KIZİLÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR).....	26
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	28
3.1. HÜCRE HATTI VE KÜLTÜR KOŞULLARI.....	28
3.2. DENEK HAYVANLAR.....	29
3.3. IŞIK KAYNAĞI.....	29
3.4. FOTODUYARLI MADDE.....	30
3.5. DİĞER KİMYASALLAR.....	30
3.6. İN VİVO FLORESANS GÖRÜNTÜLEME.....	31
3.7. MAKROSKOPİK TÜMÖR HACİM ÖLÇÜMLERİ.....	32
3.8. FTIR ANALİZİ.....	32
3.9. HİSTOPATOLOJİK ANALİZ.....	33
3.10. İSTATİSTİK ANALİZ.....	35
3.11. ÇALIŞMANIN DİZAYNI.....	36
3.11.1. Optimizasyon Çalışması.....	36
3.11.2. Ana Çalışma.....	39
4. BULGULAR.....	41
4.1. İN VİVO FLORESANS GÖRÜNTÜLEME ANALİZİ.....	41
4.2. TEDAVİ SÜRECİNDEKİ MAKRO TÜMÖR GELİŞİM ANALİZİ.....	43
4.3. FTIR SPEKTROSKOPİ ANALİZ SONUÇLARI.....	47
4.4. HİSTOPATOLOJİ SONUÇLARI.....	57
4.5. ANA DENEYLERİN SONUÇLARI VE ANALİZİ.....	61
4.5.1. In Vivo Floresans Görüntüleme Analizi.....	61
4.5.2. Makro Tümör Gelişim Analizi.....	62
4.5.3. FTIR Spektroskopi Analiz Sonuçları.....	66

4.5.4. Histopatolojik Analiz.....	67
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	72
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	93



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: AJCC verilerine göre meme kanserinde TNM evrelemesi [66].....	10
Şekil 2.2: FDT'nin genel mekanizması [84].....	13
Şekil 2.3: FDT'deki fotofiziksel enerji diyagramı, uyarılmış durum geçişleri ve reaktif oksijen üretilmesi[84].....	14
Şekil 2.4: İndiyosiyanin yeşilinin moleküler yapısı (sol) ile zamana bağlı (sağ) soğurma-floresans grafikleri [98-99].....	19
Şekil 2.5: Işığın doku içindeki ilerleyişi ve farklı lazer dalgaboylarına bağlı olarak dokudaki penetrasyon derinliği.	20
Şekil 2.6: Dokunun temel bileşenlerinin absorbands spektrumu	20
Şekil 3.1: 809 nm diyot lazer ile hazırlanmış deney düzeneği. Optik fiber denek farenin tümör bölgesine en yakın olacak şekilde konumlandırılarak kullanılmıştır. Deney boyunca anestezide olan farenin kalp atımı sürekli olarak takip edilmiştir.	29
Şekil 3.2: Pellet implante edilme prosedür görüntüleri, pellet kesi bölgesine yerleştirilir (sol), ardından tek dikiş ile kapatılır (orta), bölge dezenfekte edilir (sağ).	31
Şekil 3.3: Tümörü oluşmuş 2 ayrı denek fare görüntüsü.....	37
Şekil 3.4: Taze dokudan FTIR spektrumunun elde edilme aşamaları.....	33
Şekil 3.5: Optimizasyon deneyi FDT uygulaması.....	37
Şekil 3.6: Tümör hücresi enjeksiyonuna ait görüntüler verilmiştir; forseps yardımıyla flank bölgesinde yatay bir cep oluşturuldu. Oluşturulan bu cebe matrigel ile karıştırılmış tümör hücreleri enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra, fareler anesteziden çıkarıldı ve mikro bariyer filtreli özel kafeslerin içine yerleştirildi. Kafes içindeki denekler bir süre sonra kontrol edildiğinde enjeksiyon alanındaki şişliğin kaybolduğu gözlenmiştir.	39
Şekil 3.7: Ana deneyler FDT uygulamaları.....	40
Şekil 4.1: MCF-7 tümörlü nude farelerin in vivo floresans görüntüleri i.p. ICG enjeksiyondan 0-30-60-90 dakika sonra ardışık olarak toplandı. Bağlı ışık birimleri / piksel renk ölçeği çubukları (sağda) ve şeklin alt kısmında bir ölçek çubuğu olarak	

gösterilmektedir (Sol üst 0 dak - Sağ üst 30 dak - Sol alt 60 dak - Sağ alt 90 dakika sonra bir ICG enjeksiyon görüntüleri kaydedildi.).....	41
Şekil 4.2: Denek farelerde ICG aktivitesinin in vivo floresan görüntülemesi. Sol taraftaki görüntüler, dorsoventral açıdan olup i.p. ICG enjeksiyonundan 30 dakika sonra kaydedildi. Sağ taraftaki görüntüler dorsoventral açıdan olup i.p. ICG enjeksiyonundan 60 dakika sonra kaydedildi. Spesifik floresans ışına tümör bölgesinde görülmüştür. Bağlı ışık birimleri / piksel renk skala çubukları (sağda) ve figürün alt kısmında bir ölçek çubuğunda belirtilmiştir. (Birlikim periyotları için 2 ayrı hayvan kullanılmıştır)	42
Şekil 4.3: FT-IR spektrumları. Şekilde 150 mW güçte 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda yapılan ICG tabanlı Fotodinamik Terapiden sonra dokulardaki biyomoleküllerin absorbanlarında meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir.....	47
Şekil 4.4: FT-IR spektrumları. Şekilde 250 mW güçte 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda yapılan ICG tabanlı Fotodinamik Terapiden sonra dokulardaki biyomoleküllerin absorbanlarında meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir.....	49
Şekil 4.5: FT-IR spektrumları. Şekilde 500 mW güçte 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda yapılan ICG tabanlı Fotodinamik Terapiden sonra dokulardaki biyomoleküllerin absorbanlarında meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir.....	51
Şekil 4.6: Optimizasyon Deneilerinin Kızılaltı Spektrumda Hiyerarşik Küme Analizinin Dendrogram ile gösterimi. Lipit bandı (3120-2800cm ⁻¹).....	54
Şekil 4.7: Optimizasyon Deneileri İnfrared Spektrum Analizlerinin Hiyerarşik Küme Analizinin Dendrogram ile gösterimi. Protein bandı (1700-1510cm ⁻¹).....	55
Şekil 4.8: Optimizasyon Deneileri İnfrared Spektrum Analizlerinin Hiyerarşik Küme Analizinin Dendrogram ile gösterimi. Nükleik asit bandı (1290-1010 cm ⁻¹).....	56
Şekil 4.9: Intraperitoneal ICG enjeksiyonun 60 dakika sonrasındaki akümülyasyonun dorsoventral ve dorsal ölçümleri ile değerleri sağ skalada verimiştir, color table: rainbow 2 mod ile denekler görüntülenmiştir	61
Şekil 4.10: ICG enjeksiyonu yapılmadan sadece çıplak tümörün autofloresansı fare dorsoventral pozisyonda iken ölçülmüştür. Değer skalası sağda verilmiştir	62
Şekil 4.11: Tümör boyutlarının yüzde (%) değişimlerinin kontrol grupları ile karşılaştırılması yapılmıştır	64
Şekil 4.12: Ana Deney gruplarından alınan dokulardaki biyomoleküllerin absorbanlarında meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir (Siyah çizgi FDT 250 mW-60 dk. uygulamasını göstermektedir)	66
Şekil 4.13: Ana Deneiler İnfrared Spektrum Analizlerinin Hiyerarşik Küme Analizinin Dendrogram ile gösterimi. Lipit, Protein ve Nükleik asit bandlarında aynı sonuçlar	

gözlemlenmiştir. (1:250 mW 60 dk. Grubunu, 2:Tümör Doku Grubunu, 3:Sağlıklı Doku Grubunu, 4:Lazer Uygulanmış Grubu, 5:ICG Almış Grubu göstermektedir.....67



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: FDT’de klinik olarak kullanılan ve araştırma aşamasındaki fotoduyarlı maddeler (95)	16
Tablo 2.2: Fotodinamik Terapi sonucunda meydana gelen hücre ölüm mekanizmaları (109)	22
Tablo 2.3: Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması	25
Tablo 3.1: Her birinin 2 dişi nude fare içerdiği optimizasyon gruplarının uygulanan lazer gücü ve süresi ile ICG uygulamasından sonra beklenen süreye bağlı olarak numaralandırılması	37
Tablo 3.2: Tablo, ana çalışma gruplarının her biri için kullanılan denek hayvan sayılarını göstermektedir	40
Tablo 4.1: Tümör Çapının Uygulama Günlerindeki Değişimi	44
Tablo 4.2: Tümör hacminin değişik uygulama parametrelerine karşılık gelen değişimi	45
Tablo 4.3: Güç Parametrelerine Bağlı Post-Hoc Tukey Test Sonuçları	45
Tablo 4.4: Zaman Parametrelerine Bağlı Post-Hoc Tukey Test Sonuçları	46
Tablo 4.5: Dendogram Küme Analizi Deney Gurupları	53
Tablo 4.6: Optimizasyon Deneyle Histoloji Sonuçları	57
Tablo 4.7: Ana Deney Kontrol Gruplarına ait elipsoit hacimlerinin 4 günlük takip süresince elde edilen sonuçlarını göstermektedir	63
Tablo 4.8: Ana Deney Grubunun FDT tedavisine ait elipsoit hacimlerinin 4 günlük takip süresince elde edilen sonuçlarını göstermektedir	63
Tablo 4.9: Paired Sample T-Test Sonuçları Tablosu	64
Tablo 4.10: Ana Deney Grubuna ait Tedavi Sonrası Histoloji Görüntüleri.....	67

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

nm	:	Nanometre
mg	:	Miligram
kg	:	Kilogram
µl	:	Mikrolitre
W	:	Watt
mW	:	Miliwatt
°C	:	Santigrat Derece
cm²	:	Santimetre kare
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
dk	:	Dakika
cm	:	Santimetre

Kısaltmalar Açıklama

FDT	:	Fotodinamik Terapi
ICG	:	İndosiyanın Yeşili
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
BKI	:	Beden Kitle İndeksi
MKC	:	Meme Koruyucu Cerrahi
KT	:	Kemoterapi
RT	:	Radyoterapi
ER	:	Östrojen Reseptörü
PR	:	Progesteron Reseptörü
RT	:	Radyoterapi
PS	:	Fotoduyarlı Madde
AB	:	Avrupa Birliği
ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
PS	:	Fotoduyarlı Madde

LED : Işık Yayan Diyot
CW : Sürekli Mod



ÖZET

DOKTORA TEZİ

FDT' NİN MEME TÜMÖRÜ ÜZERİNE IN VİVO ETKİLERİNİN FTIR SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ

Tuğba KIRIŞ AYDOĞAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fırat KAÇAR

Fotodinamik Terapi (FDT) çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış, bir ışık kaynağı ve fotoduyarlı kimyasal bir maddenin kullanıldığı, özellikle solid tümör gruplarında etkili olan minimal girişimsel bir tedavi yöntemidir. Lokalize olması, minimum sağlıklı doku harabiyeti vermesi, tekrarlanabilir ve uygulama kolaylığının olması FDT'nin avantajlarındanıdır.

FDT geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında düşük maliyetlidir, hastaların hayat süresini ve kalitesini yükseltir. FDT sonrasında çevre sağlıklı dokuda bulunan elastin, subepitelyal kolajen zarar görmediği ve korunduğu için harabiyeti gözlenmemektedir. FDT'nin bir diğer avantajı da nüks eden lezyonlarda tekrarlanabilir olmasıdır. Gerek cerrahi yöntem gerekse radyoterapi olsun ikinci kez yapılan müdahalelerde büyük miktarda sağlıklı doku kaybı olmaksızın bir operasyon gerçekleştirmek oldukça güçtür.

Tez çalışmasında, yakın kızılötesi spektrumda soğurma katsayısına sahip olan indosiyanın yeşili (ICG) molekülünün nude farelerde in vivo MCF-7 insan meme kanseri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

FDT-ICG, hematoporphyrin (HpD) türevlerinde kullanılan ışığın dalgaboyuna kıyasla dokuda daha derinlere ulaşabildiğinden, nispeten derin tümörlerin yok edilmesi açısından bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte gün ışığına karşı hassasiyeti az olan ICG, tedavi esnasında ve sonrasında hastaların karanlıkta kalma sürelerini de düşürebilir. MCF-7 insan meme kanseri hücreleri denek hayvanlara enjekte edilip burada tümör dokusu gelişimi sağlanmıştır. Tez kapsamında nude farelerde büyütülen MCF- 7 insan meme kanseri üzerinde biriken ICG molekülünü uyarmak için gerekli ışığın gücü ve tedaviye başlamak için gerekli olan optimum süre belirlenmesi hedeflenmiştir. In vivo floresans görüntüleme yapılarak hem tümör varlığı gösterilmiş hemde ICG tümörde birikim miktarı ölçülmüştür. Patolojik yöntem (H&E), in vivo floresans görüntüleme, makroskopik ölçüm ve FTIR doku karakterizasyonu ile tedavinin etkinliği araştırılmıştır.

Haziran 2017, 111 sayfa.

Anahtar kelimeler: Fotodinamik Terapi, FTIR, Meme kanseri, MCF-7, Nude Fare.



SUMMARY

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION IN VIVO EFFECTS OF PDT ON MAMMARY TUMOR VIA FTIR SPECTROSCOPY

Tuğba KİRİŞ AYDOĞAN

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biomedical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Fırat KAÇAR

Photodynamic therapy (PDT) is a minimally invasive cancer treatment method which is approved by Food and Drug Administration of United States, and applied on some cancer types; especially for treatment of solid mass of cancer cells by using a light source and photosensitizing chemical agent. The advantages of FDT are localized, minimally invasive tissue destruction, reproducibility and ease of application.

Among those other treatment methods, PDT is cost-effective, have very minimal side effects and provide increased life expectancy and life quality for cancer patients. PDT spares tissue, providing a matrix for regeneration of normal tissue, because it does not damage subepithelial collagen and elastin and there is preservation of noncellular supporting elements. Another advantage of FDT is that it is reproducible in recurrent lesions where high recurrence risk probable. Such retreatment is extremely difficult for either surgery or radiotherapy, without the risk of severe normal tissue damage and due to limits of radiation dose for tissues, organs.

In the thesis study, indocyanine green (ICG) molecule, which has the absorption coefficient in the near infrared spectrum, based FDT effects examined on MCF-7 human breast cancer formed nude mice. FDT-ICG is thought to provide an advantage in terms of the removal of relatively deep tumors, as it can reach deeper into the tissue than the wavelength of light used in hematoporphyrin (HpD) derivatives.

Moreover, ICG, which is less sensitive to daylight, may also reduce the length of time of subjects stay in the dark during and after treatment. MCF-7 human breast cancer cells were

injected into the test animals where tumor tissue development was provided. The aim of the thesis is to determine the light intensity needed to stimulate the ICG molecule accumulated on MCF-7 human breast cancer formed in nude mice and the optimum time to start treatment. In vivo fluorescence imaging was used to measure both the tumor presence and ICG accumulation period in tumor area. Pathologic method (H&E), in vivo fluorescence imaging, macroscopic measurement and FTIR spectroscopy for tissue characterization were used to analyzed treatment effects.

June 2017, 111 pages.

Keywords: Photodynamic Therapy, FTIR, Breast Cancer, MCF-7, Nude Mice.



1. GİRİŞ

Dolayısıyla günümüzde kanser tedavisinde uygulanan geleneksel yöntemler yetersiz kalmaktadır. Tedavide karşılaşılan bu problemler nedeniyle, daha etkili tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Fotodinamik terapi (FDT) bölgesel, özellikle solid tümörlerin tedavisi için, FDA tarafından onaylı bir tedavi prosedürüdür [10, 11].

Bu tez çalışmasının konusu indiyosiyanin yeşili molekülünün ile MCF-7 insan meme kanseri oluşturulmuş nude farelerde in vivo fotodinamik terapi (FDT) uygulamasıdır. Farenin, insandan sonra genomu ortaya çıkarılan ikinci memeli olması, çoğu insan genlerinin farede karşılığı olup, fare ve insan genlerinin fonksiyonlarının yakın ilişkilisinden, ve korunmuş gen düzenine sahip bölgelerin iyi tanımlanmış olması sebebiyle insan hastalıklarının mekanizmalarının aydınlatılmasında birincil model kabul edilen transgenik fare modeli bu çalışmada tercih edilmiştir [12].

Tez kapsamında nude farelerde büyütülen MCF- 7 insan meme kanseri üzerinde biriken ICG molekülünü uyarmak için gerekli ışığın gücü ve tedaviye başlamak için gerekli olan optimum sürenin belirlenmesi hedeflenmiştir. Patolojik yöntem, in vivo floresans görüntüleme, makroskopik ölçüm ve doku karakterizasyonu ile tedavinin etkinliği araştırılmıştır. In vivo floresans görüntüleme yapılarak hem tümör varlığı gösterilmiş hem de fotoduyarlı maddenin (ICG) tümörde birikim miktarı ölçülmüştür. Patolojik yöntem olarak genel doku boyaması yapılmıştır. Çekirdek ve sitoplazma ayırımında kullanılan, histolojik boyalar içinde en geniş kullanımı olan, Hematoksilen-Eosin boyası kullanılmıştır. Doku karakterizasyon çalışması için FTIR spektroskopi cihazı kullanılarak spektrumlar $4000-400\text{ cm}^{-1}$ aralığında 4 cm^{-1} spektral çözünürlüğü ile toplanmıştır. Bütün gruplara ait spektrumlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Belirlenen frekans değerleri kullanılarak spektral bantların hangi fonksiyonel grup ve hangi biyomoleküllerden kaynaklandığı belirlenmiştir. Grupların bant frekanslarındaki kaymalar kontrol grubu ile karşılaştırılarak moleküllerin yapısal değişimleri gösterilmiştir.

Bu çalışmada tıpta özellikle kanser tedavisinde yeni bir yöntem olan fotodinamik terapinin meme kanseri üzerindeki in vivo etkisini araştırarak, hastalığın tedavisine yönelik katkı sağlamak amaçlanmıştır.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Kanser hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. En yaygın ve aynı zamanda en komplike kabul edilen somatik ve genetik hastalık kanserdir [13]. Kanser; kontrolsüz olarak büyüyen, agresif ve vücudun diğer kısımlarına yayılabilen hücreler ile karakterize edilebilir. Her yaştaki insanı hatta fetüsleri bile etkileyebilmektedir ancak çoğu kanser tipinde yaş arttıkça risk artmaktadır. Kanser hastalığında çeşitli etkenlerle değişime uğramış hücrelerin düzensiz ve kontrolsüz bir şekilde sürekli olarak büyümeleri, bölünmeleri gerçekleşmektedir [14]. Çoğalan bu hücreler çeşitli yollarla primer lokalizasyonları dışındaki yerlere de yayılabirler ve o bölgelerde de büyümeye devam edebilirler. Kansere neden olan faktör ne olursa olsun, sonuç olarak hücre genetiğinde bozulma meydana getirmektedir. Tek bir gendeki mutasyon kanser oluşumu için genellikle yeterli değildir, birkaç gende birden oluşan hasarın kanser oluşumunda etkin rol oynadığı düşünülmektedir [15].

Kanserde değişikliğe uğramış genler, normalde doku homeostazisi ve hücre büyümesini düzenleyen üç temel biyolojik yol olan hücre siklusu, apoptoz ve diferansiyasyonu etkiler ve bu fonksiyonları yapılamaz duruma getirir [16]. Kanser oluşumdaki çevresel ve kalıtsal faktörler incelendiğinde yaklaşık %15'nin kalıtsal olduğu genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85'lik kısmının ise çevresel olduğu yaşam boyunca canlı hücrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki değişiklikler ve replikasyon hatalarının oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir [17].

Kanserin primer olarak ilk görüldüğü bölgede, çevre dokulara yapışık olup olmaması benign veya malign olarak adlandırılmasına sebep olur. İyi huylu (benign) tümörler genellikle sınırları belirgin kitlelerdir. Ancak kötü huylu (malign) tümörler, sınırları belirsiz ve çevre dokuya sıkıca yapışık halde bulunurlar. Farklı kökendeki kanser türleri farklı özelliklere sahiptir [4]. Farklı tipteki kanserler, farklı hızlarda büyürler, farklı yayılma biçimleri gösterirler ve farklı tedavilere cevap verirler. Bu nedenle kanser hastalarının tedavisinde, var olan kanser türüne, lokalizasyonuna ve en önemlisi hastaya özgü bireysel tedavi stratejisi

belirlenip uygulanmalıdır.

2.1.1. Kanser ve Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Günümüzde kabul gören kanser tanımı; geri dönüşsüz genomik değişim - değişimler, spesifik genlerde tekli mutasyonları kapsayan değişiklikler veya genomun büyük bir bölümünün kaybedilmesidir [18]. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler gibi kritik fonksiyonları olan bekçi genlerinde meydana gelen işlev kaybı ve resesif fonksiyon kaybı neredeyse her kanser formunda tanımlanmıştır ve neoplastik oluşumunun başlamasının temeli olduğuna inanılmaktadır. Son 25 yılda bu tür değişiklikleri barındıran oldukça fazla sayıda gen tanımlanmıştır, rastgele görülen bu genetik mutasyonların kanser gelişiminin temelini oluşturduğuna işaret ettiği düşünülmektedir. Gerçekte, mutasyona uğramış çeşitli genler kanser hücrelerinde mevcut olsada [19], genel neoplazi riskinin kronik olarak etkinleştirilen veya devre dışı bırakılan kritik fizyolojik yollara kıyasla daha az etkilendiği düşünülmektedir [20]. Böylece, genomda yapısal değişimlerin intrinsik hücresel programlar olan hücre döngüsü kontrol noktası, programlanmış hücre ölümü, farklılaşma, metabolizma ve hücre yapışmasını etkilediği bununla birlikte ekstrinsik programlar olan immün yanıt, matris metabolizması, doku oksijenlenmesi ve vasküler durum değişikliklerine de yol açarak insanda kanser gelişiminin temelini oluşturduğu düşünülmektedir [21].

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran en önemli özellikler aşağıda sıralanmıştır;

Büyüme sinyallerinde otonomi; normal hücreler bölünebilmek için dışardan büyüme faktörü sinyaline ihtiyaç duyarken kanser hücreleri normal büyüme faktörü sinyaline bağımlı değildirler ve kendi kendine çoğalma görülür.

Büyüme sinyalleri engelleyiciler; normal hücreler engelleyici sinyallere homeostası sağlamak için cevap verirken kanser hücreleri büyümeyi engelleyen sinyallere cevap vermezler, mutasyonlar inhibitör faktörlere karşı cevapsızlığa sebebiyet verir.

Programlı hücre ölümünde bozukluklar; Normal hücrelerin sağ kalması büyüme faktörlerinden ya da hücre dışı matriksten gelen apoptozu engelleyen sinyallere bağlıdır fakat kanser hücreleri apoptotik sinyallerden etkilenmezler aksine apoptoz down regülasyonu görülmektedir. Tümör hücrelerinin apoptoza girmemesi DNA hasarına yol açan kemoteropötik ilaçlara da direnç göstermesine neden olmaktadır.

Sınırsız replikasyon potansiyeli; normal hücrelerde hücrenin sınırlı sayıda iki katına çıkmasını belirleyen sayma sistemi mevcuttur. Bu hücrel kontrol sistemi, her replikasyon esnasında meydana gelen telomerlerin kısılmasını belirler, kanser hücrelerinde ise telomerlerin uzunluğu korunur, telomer regülasyonunun değişmesi sınırsız replikasyon potansiyeline neden olur (telomeraz reaktivasyonu).

Anjiyogenez (yeni damarlar oluşturabilme); normal hücrelerin oksijen ve besin sağlayabilmesi için kan damarlarına ihtiyacı vardır, fakat yetişkinlerde dolaşım döngüsü sabittir. Kanser hücreleri anjiyogenezi uyarır, çünkü tümör yayılımı ve gelişimi için yeni kan damarlarının oluşumu büyümesi gereklidir.

İnvazyon ve metastaz yapma; normal hücreler vücuttaki yerlerini korurlar ve genellikle göç etmezler, kanser hücreleri ise vücudun diğer bölgelerine göç ederler, mutasyonlar invazyon ile ilgili enzimlerin aktivitesini değiştirir. Yüzey adezyon moleküllerindeki azalma nedeniyle kanser hücrelerinin tutunma yeteneği normal hücrelerden düşük olmasından dolayı diğer hücreler ve doku bileşenleri ile etkileşime girmesi zorunluluğu ortadan kalkar bu durum kanser hücrelerine metastaz yeteneği kazandırır [4, 22-24].

2.2. MEME KANSERİ

Meme kanseri, dünyadaki tüm kadın kanserlerinin %23' ünü oluşturarak kadınlarda en yaygın olan kanser türüdür. Erkeklerde nadir olarak görülen meme kanseri, tüm meme kanserlerinin ancak %1'i kadardır. Sadece 2002 yılında dünyada yaklaşık 1,15 milyon olgu teşhis edilmiştir. Çok gelişmiş dünya ülkeleri ile Asya, Orta Doğu ve Afrika gibi az gelişmiş ülkelerde meme kanserinin insidans hızlarında belirgin bir coğrafi farklılığa rastlanmaktadır. Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde görülme sıklığı, dünyanın diğer bölgelerinde görülme sıklığından daha fazladır. Beyaz ırkta sarı ırka ve siyah ırka göre daha fazla görülür. Siyah ırkta daha agresif meme kanseri tipleri görülür ve prognoz daha kötüdür. [25]. Global meme kanseri insidans oranları 1990 yılından beri yaklaşık % 0,5 artmıştır [26]. Türkiye'de de kadınlarda kanserin %24.1'ini oluşturan en yaygın kanser tipi meme kanseridir [27, 28]. 2000-2004 yılları arasında yapılan araştırma verilerine göre her sekiz kadından birinde hayatı boyunca meme kanseri gelişebileceği ve her 30 kadından birinin meme kanseri nedeniyle yaşamını yitireceği tahmin edilmektedir [29]. 2017 yılı için Amerika birleşik devletlerinde

252.710 kadının meme kanseri tanısı alacağı 40.610'nun ise yaşamını yitireceği tahmin edilmektedir [30].

2.2.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

Meme kanserinin gelişim nedenleri arasında en üst sıraları hormonların aldığı ve bu hormonlar arasında en büyük risk faktörünün de östrojen olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir [31-33]. Risk faktörlerinin pek çoğu doğrudan veya dolaylı olarak östrojen etkisine bağlıdır [34, 35].

Meme kanserinde etkili olan tüm risk faktörleri değiştirilemeyen risk faktörleri, yaşam tarzıyla ilişkili olan faktörler ve tartışmalı risk faktörleri olmak üzere üç kategoride değerlendirilebilir.

Değiştirilemeyen Risk Faktörleri:

Yaş; yaşamı boyunca her 8 kadından birinde (% 12.56) meme kanseri görülür [36]. Cins ve ırk; kadınlarda görülme sıklığı erkeklerin 100 katıdır (1/100). Beyaz ırkta sarı ırka ve siyah ırka göre daha fazla görülür. Siyah ırkta daha agresif meme kanseri tipleri görülür. Sarı ırk ve Kızılderililer'de meme kanseri riski ve mortalite beyazlardan daha düşüktür. [37]. Genetik faktörler, meme kanserlerinin sadece %5-10'undan genetik faktörler sorumludur. Bu faktörlerin başında, BRCA1 ve BRCA2 :Hereditör meme-over kanseri Sendromu [38], p53 :Li Fraumeni sendromu, ATM: (Ataksik Telenjektazi Mutasyon) geni, PTEN: Cowden sendromu, CHEK2 : Li- Fraumeni sendromu, MSH1 ve MLH2 : Muir-Torre/Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanseri, STK11/LKB1: Peutz-Jeghers Sendromu ve CDH1 : Hereditör Diffüz Gastrik Kanseri gelmektedir [39, 40]. Ailede meme kanseri öyküsünün meme kanserlerinin %15'inde etkin olduğu düşünülmektedir. [41]. 1. derece ve 2.derece akrabalığın yanında kaç kişide görüldüğü de önem taşımaktadır. 1 adet birinci derece akrabada meme kanseri öyküsü varlığı 1.8'lik rölatif risk oluştururken (menopoz öncesi 2.9, menopoz sonrası 1.5), 2 adet birinci derece akrabada meme kanseri öyküsünün varlığı durumunda rölatif risk 4-6'ya yükselmektedir. Kişisel meme kanseri öyküsü durumunda ise diğer memede kanser riski her yıl için %0,5-1 oranındadır. Hereditör meme kanserlerinde ve LKİS'de risk daha yüksektir. [42]. Meme kanseri dışında kanser öyküsü durumunda endometriyum ve over kanseri öyküsünün varlığı durumunda risk 2 kat daha fazladır. Dens meme yapısı riskin 3-6 kat artmasına sebep olmaktadır [43, 44]. Benign meme hastalıklarından non-proliferatif benign meme hastalıkları risk artışına sebep olmaz veya çok hafif artışa neden olabilir.

Atipisiz benign proliferatif meme hastalıklarında riskte 1,5-2 kat artış gösterirken, Atipili benign proliferatif meme hastalıklarında riskte 4-6 kat artmaktadır [45-47]. Erken menarşın da meme kanseri gelişiminde bir risk etmeni olduğu gösterilmiştir. Adet düzeni etkenine bakıldığında ilk adet yaşı 12 yaşından küçük veya 16 yaş ve üzerinde olduğu durumlarda 1,3 kat risk fazlaşmaktadır [48, 49]. Menopoz yaşı, 55'ten büyük veya 45-54 yaş aralığında olduğunda 1,5 kat risk artmaktadır. Erken menopoz dediğimiz 45 yaş altında gerçekleştiği durumda ise risk azalmaktadır [50]. Toraks bölgesine Radyoterapi alınması durumu; çocukluk dönemi ve ergenlik döneminde (<30 yaş) toraks bölgesine RT alınmış olması meme kanseri riskini arttırmaktadır. Kırk yaştan sonra alınan RT riski arttırmamaktadır. Ayrıca bir memenin RT almış olması diğer memede kanser riskini %9 arttırmaktadır [51].

Yaşam Tarzıyla İlişkili Risk Faktörleri:

Gebelik ve doğum öyküsü; ilk doğum yaşının 30'dan büyük olması yada 20 den küçük olması riski 2 kat arttırmaktadır [52, 53]. Nullipar olması durumunda risk %30 artmaktadır. Laktasyonun etkisi hala tartışmalı olsa da yapılan bir çalışmada 4-12 ay arasında emziren kadınlarda riski %11 azalttığı düşünülmektedir [54, 55]. Oral Kontraseptifler (OKS) halihazırda kullananlarda ve eskiden kullanmış olanlarda hafifçe bir risk artışı tartışmalı olmakla birlikte görülmektedir. Östrojen ve progesteron dozuyla meme kanseri riski arasında pozitif korelasyon mevcuttur. OKS kesildikten 10 yıl sonra riskin normale döndüğü düşünülmektedir. Hormon Replasman Tedavisinde (HRT) yalnız östrojen içeren (ERT) ile östrojen ve progesteron içeren kombine olmak üzere 2 çeşittir. Bu tedavinin en az 2 yıl kullanılmasından sonra risk artışı görülmektedir. Beden Kitle İndeksi (BKİ) düşük olan kadınlarda HRT etkisi daha belirgin olarak görülmekte olup tedavi kesildikten 5 yıl sonra riskin normale döndüğü görülmektedir [56, 57].

Alkolün etkisine bakıldığında, günde 340 ml bira, 140 ml şarap veya 42 ml 80° alkollü içki kullanılması meme kanseri riskini 1,5 kat arttırmaktadır. Tüketilen miktardaki artışla beraber riskte artmaktadır. Annenin gebelikte alkol kullanması bebekte meme kanseri riskini arttırabilmektedir. Ayrıca alkolün bir diğer olumsuz etkisi folik asit etkinsizleştirmesidir [58, 59].

Obezite, postmenopozal obezite (BKI \geq 30) meme kanseri riskini yaklaşık %30 oranında arttırmaktadır. Postmenopozal obez kadınlarda meme kanseri mortalitesi yüksektir, kısmi

olarak tanının gecikmesine de bağlanmıştır. 18 yaşından sonra ≥ 25 kilo alınması postmenopozal meme kanseri riskini arttırmaktadır [60, 61].

Egzersiz ve fizik aktivite; fiziksel aktivite meme kanseri riskini azaltmaktadır. Egzersizlerin meme kanseri riski üzerine etkisini araştıran bir çalışmada, egzersizin 40 yaş altı kadınlarda meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiş ve haftada 4-5 saat veya daha fazla egzersiz yapan kadınlarda kanser riskinin hiç yapmayanlara kıyasla %60 daha az olduğu bildirilmiştir [62].

Sosyoekonomik seviye; yüksek sosyoekonomik seviyede meme kanseri insidansı daha yüksektir. Düşük sosyoekonomik seviyede ise insidans daha düşük olmakla birlikte mortalite daha yüksektir. Sebze ve meyve tüketimi ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada yüksek oranda sebze ve meyve tüketimi ile düşük orandaki tüketim karşılaştırılmış ve yüksek oranda tüketimin koruyucu bir etkisinin söz konusu olabileceği belirtilmiştir [63].

Tartışmalı Risk Faktörleri:

Yağlı beslenme, östrojen metabolizması, abortus, meme implantları, sigara, çevresel karsinojenler ve gece çalışması meme kanseri oluşumuna katkı sağladığı düşünülen tartışmalı etmenler arasında yer almaktadır.

2.2.2. Meme Kanseri Evreleme

Süt bezleri ile üretilen sütü meme başına taşıyan kanallardan oluşan yapı memeyi oluşturmaktadır. Lobüllerde veya süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ile meme kanseri oluşmaktadır. Meme kanserleri, kanser hücrelerinin lokalize olduğu yere veya yayılma eğilimlerine göre sınıflandırılabilirler. Meme kanseri metastazları akciğer, kemik, lenf nodu ve beyinde ortaya çıkmaktadırlar [64]. Meme kanserleri tümörün oluşumu, nod durumu ve metastaz durumuna göre çeşitli evrelere ayrılmıştır. Genel kabul gören 4 evre aşağıda verilmiştir [65];

Evre 0;

Aynı zamanda 'in-situ' olarak adlandırılan bu evre, tümörün çevre dokulara sızmadığı süt kanallarının ya da süt bezlerinin birinde sınırlı olduğu evredir. Eğer kanser süt bezlerinde oluşmuşsa lobular carcinoma in situ (LCIS) olarak isimlendirilir. Süt kanallarında oluştuğunda ise ductal carcinoma in situ (DCIS) olarak adlandırılmaktadır. LCIS'in memenin herhangi bir yerinde kanser oluşması riskini arttırdığını gösteren bir işaret olduğu kabul

edilmektedir. DCIS durumunda ise kanser hücreleri oluştukları süt kanalları içerisinde sabit kalmış, memenin yağ dokusunada lenf bezleride yayılmamıştır. Kanalların veya bezlerin ötesine de yayılmamıştır

Evre I;

Bu evre tümörün 20 mm ve daha küçük olduğu kanser hücrelerinin memeden başka kısımlara yayılmadığı durumdur. Lenf bezlerine yayılma olmadığı gibi tümörün sınırları belirlidir.

Evre II;

2 alt bölüme ayrılmaktadır. Bunlardan biri olan Evre IIA'da aşağıdaki birkaç durum söz konusudur:

- Memede görünür tümör yoktur, sadece lenf bezlerinde tümör vardır.
- Tümör 20 mm büyüklüğünde veya daha küçüktür ve koltuk altındaki lenf bezlerine yayılmıştır.
- Tümör 20 mm'den büyük olup 50 mm'den küçüktür ve koltuk altı lenf bezlerine yayılmamıştır.

Diğer evre olan Evre IIB'de ise 2 durum söz konusudur:

- Tümör 20-50 mm arasındadır ve koltuk altı lenf bezlerine sızmıştır.
- Tümör 50 mm'den büyüktür ve koltuk altı lenf bezlerine yayılmamıştır.

Evre III;

Tümör koltuk altı lenf bezlerine ve göğüs dışı dokulara sızmış durumdadır. İlerlemiş bir aşama olup 3 alt kısma ayrılmaktadır:

Evre IIIA'da, Tümör 50 mm ve daha büyüktür ve çevre dokulara yayılmıştır. İkincil olarak tümör, çapından bağımsız olarak üçten fazla sayıda koltuk altı lenf bezlerine yayıldığı durumdur.

Evre IIIB'de tümör herhangi bir boyutta olabilir ve memeye komşu dokulara (cilt, göğüs duvarı, kaburgalar veya göğüs duvarındaki kaslar) ve lenf nodlarına yayılmıştır.

Evre IIIC'de ise tümör köprücük kemiği etrafındaki lenf nodlarına, kolun altındaki ve meme içerisindeki lenf nodlarına yayılmıştır veya tümör meme cildine açılmıştır.

Evre IV;

Bu evre uzak metastatik kanser olarak adlandırılan aşama olup kanser meme dışındaki vücut bölümlerine yayılmıştır. Vücuttaki kemiklere, akciğerlere, karaciğer veya beyin gibi uzak organlara yayılmıştır.

Evre I, IIA, IIB (T2N1) erken meme kanseri olarak, Evre IIB(T3N0), III lokal ileri meme kanseri ve Evre IV metastatik meme kanseri adlandırılır.

UICC (Union International Contre Cancere) ve AJCC (American Joint Committee on Cancer)'nin biçimlendirdiği TNM sistemine göre T: Tümörü, N: Bölgesel lenf bezlerini (aksilla, supra ve infraklavikuler, internal mamari) ve M: Metastazı (uzak organ metastazı) temsil etmek üzere meme kanseri evrelemesi şekil 2.1'de verilmiştir [66];

Evre 0	Tis N0 M0	Evre IIIA	T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0
Evre IA	Tmic N0 M0 T1 N0 M0	Evre IIIB	T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0
Evre IB	T0 Nmic M0 Tmic Nmic M0 T1 Nmic M0	Evre IIIC	T1-4, N3 M0
Evre IIA	T0 N1 M0 T1 N1 M0 T2 N0 M0	Evre IV	Herhangi bir T, Herhangi bir N, M1
Evre IIB	T2 N1 M0 T3 N0 M0		

Şekil 2.1: AJCC verilerine göre meme kanserinde TNM evrelemesi [66].

2.2.3. Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri

Uluslararası kılavuzlardan elde edilen bilgilerle hasta ve tümör özelliklerine göre hastanın tedavisi belirlenmektedir. Meme kanseri tanısı konulduktan sonra tedavi hastanın özelliklerine uygun olarak belirlenir. Evre ile birlikte hasta özellikleri (yaş – menopoz – ek sağlık sorunları), tümör özellikleri olan T ve N durumu, grade, ER ve PR değeri, HER2 (c-erbB-2) ve Ki-67 değeri değerlendirilip uygun olan tedaviye geçilmektedir [67]. Erken evre meme kanserinde cerrahi tedavi ve gerekirse adjuvant sistemik tedavi uygulanırken lokal ileri

evre meme kanserinde neoadjuvant sistemik tedavi uygulanır. Metastatik evre meme kanserlerinde ise palyatif sistemik tedavi uygulanmaktadır.

2.2.3.1. Meme Kanserinde Cerrahi Tedavi

Meme koruyucu cerrahinin esas amacı tümörü negatif cerrahi sınırlarla (1-2 mm) total olarak çıkartmak, düşük lokal-bölgesel yinleme ve kozmetik açıdan kabul edilebilir sonuçlar elde etmektir. Radikal mastektomi, genişletilmiş radikal mastektomi, Modifiye radikal mastektomi, Meme koruyucu cerrahi (kadranektomi, lumpektomi, geniş lokal eksizyon) meme cerrahisinde kullanılan yöntemlerdir [68].

Radikal ve genişletilmiş mastektomi günümüzde artık tercih edilmemektedir. Modifiye radikal mastektomi ise meme dokusunun tamamının pektoral fasya ve aksilladaki düzey I – II lenf bezleriyle beraber çıkartılmasıdır. MKC olarak bilinen meme koruyucu hastaya uygun olması durumunda tercih edilmektedir [69]. Meme koruyucu cerrahi de bazı kontrendikasyonlar mevcuttur. Bunlar, multisentrik hastalık durumu (memenin farklı kadranlarında çok odaklı kanser varlığı), tümör boyutu / meme hacmi oranı (MKC yapıldıktan sonra geriye iyi bir kozmetik sonuç kalmayacaksa), radyoterapi yapılamayacak durumlar, daha önce aynı memeye RT öyküsü, 1. ve 2. trimester gebelik, cildi tutan aktif bağ dokusu hastalıkları ve ulaşılabilir RT merkezi olmamasıdır [70].

2.2.3.2. Meme Kanserinde Adjuvan Sistemik Tedavi

Büyük tümör kitlesi cerrahi ve/veya radyoterapi ile ortadan kaldırıldıktan sonra geride kalan mikroskopik rezidüel hastalık için verilen tedaviye adjuvan tedavi denir. Amaç mikrometastazların ortadan kaldırılması ile hastalık nüksü ve yayılma riskinin azaltılmasıdır. Neoadjuvan kemoterapi ise primer KT, preoperatif KT olarak bilinen cerrahi tedavi öncesi uygulanan KT'dir. Neoadjuvan kemoterapideki amaç başlangıçta inoperabl (opere edilemez) olan tümörün operabl hale getirilmesi, yaşam süresini uzatabilmek, operabl tümörlerde meme koruyucu cerrahi şansını arttırmak ve prediktif işaretçilerin belirlenebilmesidir.

Adjuvan sistemik tedavide endokrin tedavi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler (anti-HER2 tedavi) uygulanmaktadır [71]. Endokrin tedavi, ER ve/veya PR pozitif olan tüm hastalara önerilir (%1 zayıf pozitiflikte dahil). Eğer hasta kemoterapi de alacaksa kemoterapiyi takiben başlanır [72]. Adjuvan kemoterapi, HER2 pozitif hastalık (anti-HER2 tedavi ile birlikte), üçlü negatif meme kanseri ve ER+, HER2-, yüksek riskli gruplarda bulunan hastalara önerilir [73, 74]. Adjuvan Anti-HER2 tedavisi (Trastuzumab), HER2 testi meme kanseri dokusunda İHK yöntemle +++ olan veya FISH testi pozitif olan hastalara

kemoterapiyle birlikte ve kemoterapiyi takiben uygulanır. ALB pozitif ve ALB negatif-yüksek riskli hastalarda kullanılır. Bu tedavinin kullanım süresi 1 yıldır. Adjuvan radyoterapi meme koruyucu cerrahi (MKC) yapılmış invaziv kanser ve in situ kanser olan tüm vakalarda önerilir. Mastektomi yapılmış yüksek riskli olgularda da önerilmektedir. Mastektomi sonrası RT yapıldığında lokal rekürrens riskinde yine azalma ile 15 yıllık sağkalımda artış olduğu görülmüştür [75].

2.2.3.3. Metastatik Meme Kanserinde Tedavi

Metastatik meme kanserinde tedavi amacı, semptom ve bulguların palyasyonu, yaşam kalitesinin artırılması ve mümkün olduğunca yaşam süresinin uzatılmasıdır. Meme kanserinde metastazlar ortaya çıktıktan sonra ortalama sağkalım süresi 2-3 yıldır. Metastatik meme kanserinde hormonal tedavi, kemoterapi, lokal tedaviler (RT, nadiren cerrahi) ve destek tedavisi (bifosfonatlar, analjezikler, beslenme ürünleri, kan ürünleri, psikolojik destek tedavisi) verilmektedir. Hormon reseptör durumuna göre ve metastaz yerine göre tedavi seçimi değişmektedir. Metastatik meme kanserinde birinci basamak kemoterapide total yanıt oranı %45 - 80 iken sağkalım süresi 15- 33 ay arasında değişmektedir [76, 77].

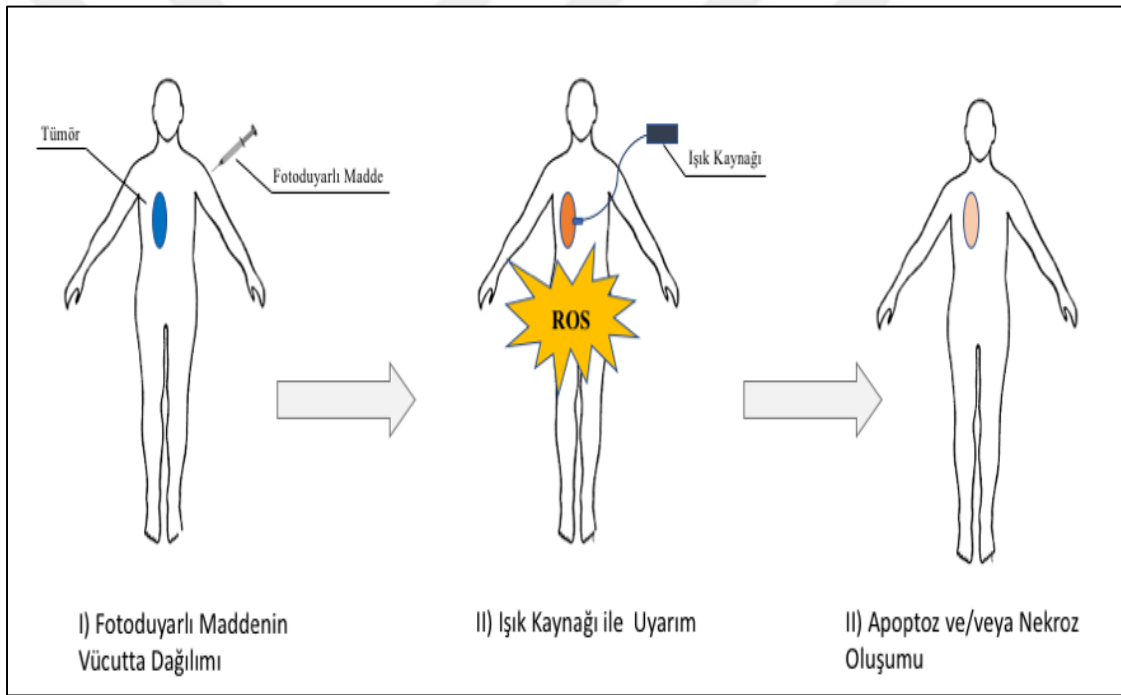
2.3. FOTODİNAMİK TERAPİ

Güneş ışığının sağlık üzerindeki etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Milattan önce 6. yüzyılda Herodotus güneş ışığının kemik gelişimine etkisinden, Milattan önce 460-370 yılları arasında yaşayan Hipokrat güneş ışınlarının kronik hastalıklar üzerinde iyileştirici bir etkisinden bahsetmiştir [78]. Fotodinamik Terapi (FDT) kavramının ise 100 yıllık geçmişi Raab ve Von Tappeiner'in, akrinin gibi bazı boyaaların ışığın varlığında hücre ölümüne neden olduğunu keşfi ile başlamıştır [79]. İnsanlar üzerinde klinik çalışmalar ise 1977 yılında malign lezyonlar üzerinde FDT'nin uygulanması ile başlamıştır [80]. O günden beri gelişme gösteren fotodinamik terapi, benign ve malign birçok durumda yalnız ve kombine tedavi seçeneği olarak kullanılan alternatif yöntemler arasında yerini almıştır [10, 81].

2.3.1. FOTODİNAMİK TERAPİNİN MEKANİZMASI

Fotodinamik Terapi oksijen, fotosensitizer (fotoduyarlı) madde (PS) ve ışığın varlığında çeşitli fotokimyasal reaksiyonlar sonucunda tümör hücrelerini yok eden bir tedavi metodudur [81]. Yalnız başına FDT'nin hiçbir bileşeni toksik özelliğe sahip değildir. Fakat ışık varlığında PS aktive olması ile tümör hücrelerinin yıkımını tetikleyen singlet

oksijen (1O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortaya çıkmasına sebep olur. 1O_2 'nin nanosaniye mertebesinde değişen kısa bir ömrü ve hücre içinde limitli bir difüzyon mesafesine sahip olmasından dolayı fotodinamik hasar PS'in hücrenin hangi kısmında lokalize olduğuna doğrudan bağımlı olarak gerçekleşir. Molekül oksijen, başlangıçtaki moleküler oksijenin çoğalmasında önemli bir rol oynar ve vasküler çöküş, doku tahribi ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Bu hasara bağlı olarak programlı hücre ölümü apoptozis, otofaji ve sekonder nekroz yaygın olmamakla birlikte nekroz hücre ölüm şekli olarak görülür. Özet olarak FDT, spesifik olarak tümöre biriken aktive edilmiş fotosensitizer yoluyla reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek tümör hücresi nekrozu ve/veya apoptozu indükler [82, 83].



Şekil 2.2: FDT'nin genel mekanizması [84].

FDT iki aşamalı uygulamadan oluşmaktadır (şekil 2.2). İlk olarak PS tümörün bulunduğu bölgeye i.v. veya topikal olarak uygulanır ardından PS'in absorpsiyon spektrumuna uygun bir dalga boyuna sahip ışık kaynağı ile PS aktive edilir. Tedavideki iki basamaklı uygulama ile çift yönlü seçicilik sağlanmaktadır. İlk olarak, çevre normal dokulardaki hücrelerden daha yüksek bir oranda kanser hücreleri PS'i tutar. İkincisi, ışık kaynağının sadece tümörlü bölge üzerine odaklanması ile tümör odaklı tedavi sağlanır. FDT'yi oluşturan fotofiziksel işlemler enerji diyagramında özetlenmiştir (şekil 2.3). Fotoduyarlı maddenin fotonla uyarımını takiben, serbest radikaller ve ROS'un oluşumuna yol açan bu fotofiziksel işlemler birkaç

ise teşhis amacıyla PS'i uyararak floresans ışımaya yapması tercih edilmektedir. Tümörün floresans ışımaya yapması sağlanarak noktasal lokasyonu, derinliği, boyutu değerlendirilebildiği gibi mevcut PS miktarını ölçmekte mümkün olmaktadır [86-88].

2.3.2. FOTODİNAMİK TERAPİDE KULLANILAN FOTODUYARLI MADDELER (PS)

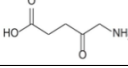
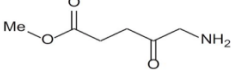
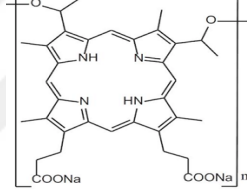
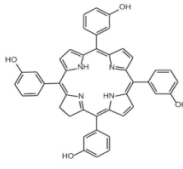
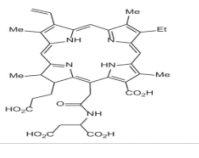
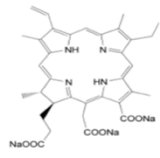
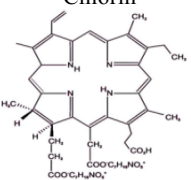
FDT'de kullanılan ilk fotoduyarlı madde 1980'lerde Dougherty ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş, 1987'de FDA tarafından onaylanmış "Photofrin"dir [89]. Klinik olarak FDT için kullanılan ilk PS, hematoporfirin türevi (HPD) olarak adlandırılan porfirinlerin suda çözünür bir karışımı ve daha sonra porfimer sodyum (Photofrin) olarak adlandırılan saflaştırılmış bir versiyondur. Genel olarak FDT çalışmalarında ışığa duyarlı (fotoduyarlı) madde olarak kullanılan bazıları; porfirin tabanlı fotosensitizerlar, klorinler, ftalosyanin, naftalosiyanın, azinler, triarilmetanlar, ksantanlardır [90, 91].

Photofrin günümüzde hala FDT uygulamalarında kullanılsada, uzun süren fototoksisiteye sahip olması (6-10 hafta) ve 630 nm'de uyarılması sebebiyle düşük penetrasyon kapasitesinden kullanımı sınırlı olmaktadır. PS'in ilk jenerasyonunun sınırlamalarının aşılması için, uzamış fotosensitiviteye neden olmayan dokuda daha derine penetre olabilen BPD-MA, m-THPC ve Pc4 (tablo 2.1) gibi 2. nesil PS çalışmaları yapılmaktadır [82, 86, 90].

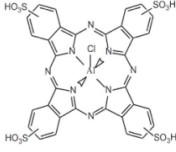
Klinik kullanım için onaylanmamış olsa da padeliporfin'de dahil (WST-11) 3. Nesil olarak sınıflandırılan yeni PS'ler anti bodyler ile konjuge edilerek tümör spesik uygulama imkanı sağladığı gibi 700-800 nm'de maksimum absorpsiyon yapabildiği için daha derin lezyonlara müdahale şansı oluşmaktadır [92, 93]. Fotodinamik terapi uygulamalarında daha iyi sonuç almak için yeni ve etkili ışığa duyarlı madde geliştirme çalışmaları devam etmektedir. FDT için seçilecek olan fotoduyarlı maddeler;

- Karanlıkta toksik olmamalı,
- Tümörlü dokuda birikmeye elverişli olmalı,
- Suda çözülerek zerk edildiği için suda çözünürlüğü iyi olmalı,
- Terapötik pencere içinde yüksek soğurma özelliği olmalı.
- Reaksiyon sonucunda çok miktarda O_2^1 (singlet oksijen) çıkarabilmeli.
- Kimyasal olarak saf olmalıdır [10, 78, 91, 94].

Tablo 2.1: FDT’de klinik olarak kullanılan ve araştırma aşamasındaki fotoduyarlı maddeler [95].

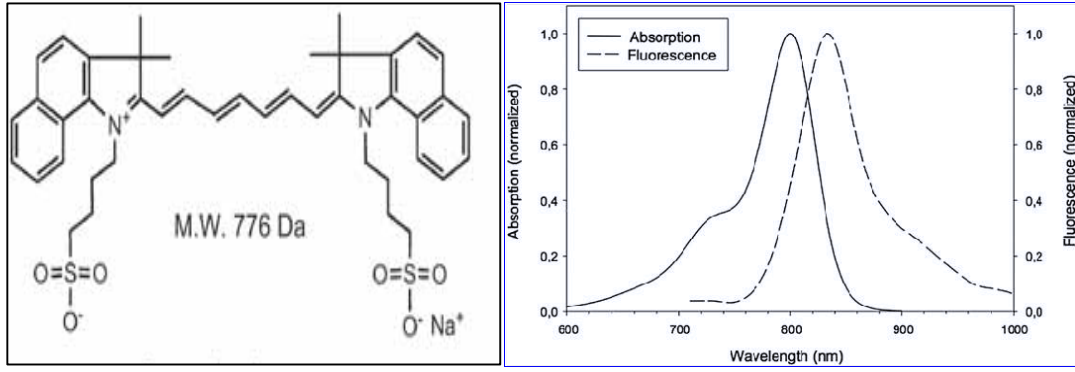
Marka Adı	Fotoduyarlı Madde	Yapısı	Uyarım Dalgaboyu (nm)	Kanser Türü (Onaylı Olduğu Ülke)
I. Klinik kullanımda onaylı olan fotoduyarlı maddeler				
Levulan	5-Aminolevulinic acid (ALA)	Porphyrin precursor 	635	Aktinik Keratoz (Kanada-ABD)
Metvix, Metvixia	Methyl ester 5-ALA	Porphyrin precursor 	635	Aktinik Keratoz (Kanada-ABD)
Photofrin	Porfimer sodium; also called hematoporphyrin derivate (HpD)	Porphyrin 	630	Bazal Hücreli Deri Kanseri (AB) Mesane Kanseri (Kanada) Skvamöz hücreli karsinoma in situ (AB) Servikal Kanser (Japonya) Özafagus kanseri ve displazisi (Kanada-AB-ABD-Japonya) Gastrit Kanseri (Japonya)
Foscan	Meta-tetrahydroxyphenylchlorin (m-THPC)	Chlorin 	652	Baş-boyun kanserleri (AB)
Laserphyrin	Taporfin sodium (Talaporfin), mono-(L)-aspartylchlorin-e6 (MACE, NPe6, LS11)	Chlorin 	664	Akciğer kanseri (Japonya)
Fotonon	Chlorin e6 + polyvinylpyrrolidone	Chlorin 	660	Deri, vulva, serviks ve oral kanser (Rusya)
Fotoditazin	Chlorin e6 + chlorin p6	Chlorin 	660	Deri kanseri (Rusya, Güney Kore)

Tablo 2.1 (devam): FDT’de klinik olarak kullanılan fotoduyarlı maddeler [95].

Photosense	Aluminum sulphonated phthalocyanines	Phthalocyanine 	675	Deri, vulva, oral, özafagus, mide knaserleri ve meme metastazları (Rusya)
II.Klinik deneme aşamasındaki fotoduyarlı maddeler				
Hetvix; Benzvix	ALA esters (hexyl-ALA/benzyl-ALA)	Porphyrin precursor	635	Mesana, Gastrointestinal ve deri kanserleri
Vertoporfın	Benzoporphyrin derivative-monoacid ring A (BPD-MA)	Porphyrin	690	Bazal hücreli karsinoma
Photochlor	2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-alpha (HPPH)	Chlorin	665	Bazal hücreli karsinoma, özafagus, baş-boyun ve akciğer kanseri
Purlytin	Tin ethyl etiopurpurin (SnEt2)	Chlorin	664	Meme, prostat, Kaposi’s sarkoma ve deri kanseri
Lutex	Lutetium texaphyrin/Motexafin lutetium	Texaphyrin	732	Beyin, meme, servikal, prostat kanseri
Pc4	Silicon phthalocyanine 4 (Pc4)	Phthalocyanine	675	Kutanöz T hücreli lenfoma
Tookad	Padoporfın	Bacteriochlorin	762	Prostat kanseri
WST-11	Padeliporfın	Bacteriochlorin	753	Prostat kanseri

2.3.2.1. İndosiyenin Yeşili

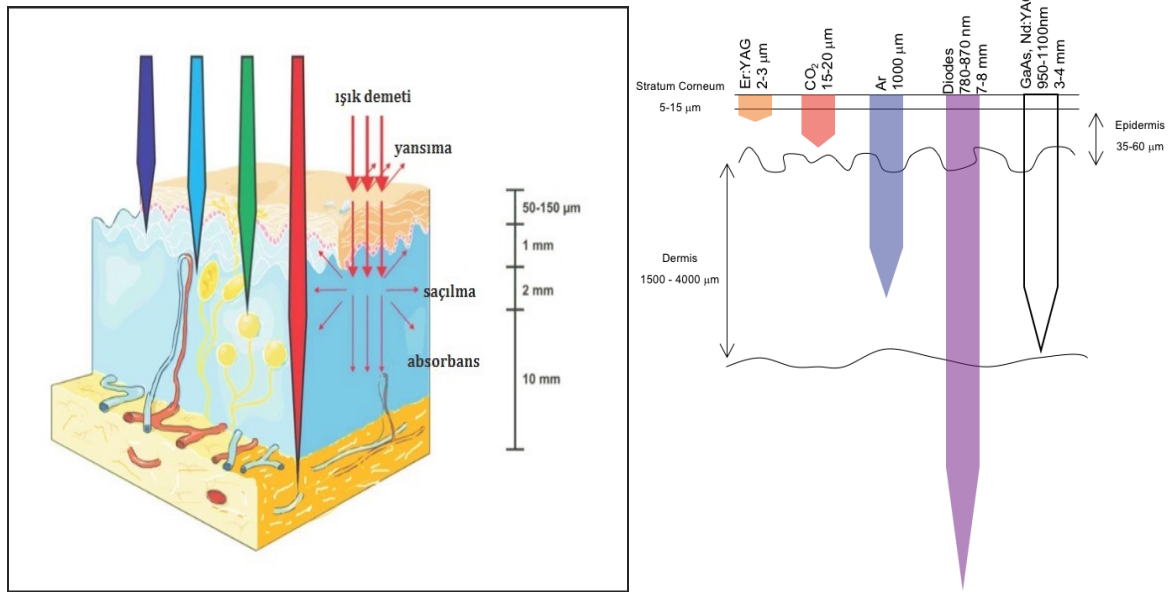
İndosiyenin yeşili (ICG) 40 yılı aşkın zamandır klinikte özellikle oftalmolojide kullanılan bir moleküldür. İndosiyenin yeşili (4,5-Benzoindotricarbocyanine) (C₄₃H₄₇N₂NaO₆S₂) negatif yüklü polimetin boya ve düşük toksiklik ile suda çözünen aniyonik, ışığa duyarlı bir moleküldür. ICG yakın kızıl ötesi spektrumunda (700-830 nm) güçlü bir soğurma katsayısına sahiptir [7]. ICG 1956 yılında FDA tarafından teşhis amaçlı kullanımı için onaylanmıştır [96]. Kalp debisi, karaciğer fonksiyonu değerlendirilmesinde, retina ve koroidal damarların görüntülemesinde kullanılmaktadır [85]. ICG’nin 600-800 nm civarında singlet oksijen oluşturduğu yapılan çalışmada tespit edilmiştir [97]. ICG’ nin nekrotik dokulara seçici olarak bağlandığının keşfi ile ICG-LP kompleksi ve fosfolipitler arasındaki etkileşimden ötürü ICG’nin tıbbi kullanım alanı genişlemeye başlamıştır.



Şekil 2.4: İndiyosiyanın Yeşilinin moleküler yapısı (sol) ile zamana bağlı (sağ) soğurma-floresans grafikleri [98, 99](Sağ grafik Pulsion medical sistemlerden alıntılanmıştır).

2.3.3. IŞIK KAYNAKLARI VE DALGABOYU

FDT'nin temel bileşenlerinden biri ışıktır. Işık kaynağı seçimi FDT’de hayati öneme arz eder. Canlı dokuya ışık ile muamale edildiğinde yani foton gönderildiğinde doku tarafından absorbe edilir ya da saçılır. Saçılan fotonlar dağınık fotonlar ya absorbe olur ya da difüz reflektans ile ilgili doku dışına çıkar. Işığın dokuda yayılırken ilerlerken izlediği yol şekil 2.5’de gösterilmektedir.

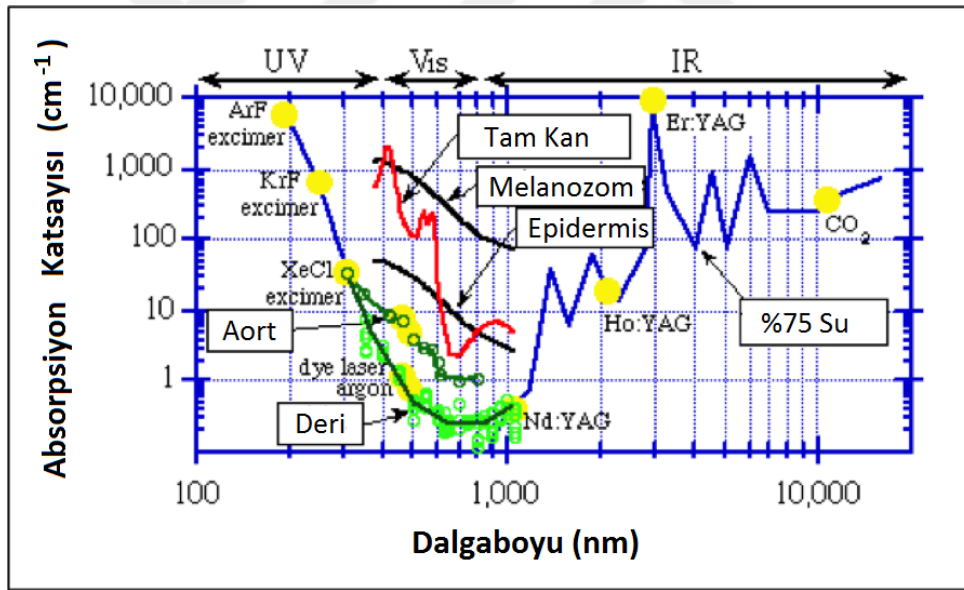


Şekil 2.5: Işığın doku içindeki ilerleyişi ve farklı lazer dalgaboylarına bağlı olarak dokudaki penetrasyon derinliği.

Bir yandan da dokudaki kromoforlar tarafından ışık absorbe edilir. Hemoglobün, melanin, lipidler, aminoasitler ve su tarafından absorbe edilmesi ışığın dokuda penetre olacağı

mesafenin kısalması ile sonuçlanır. Şekil 2.6'de gösterildiği gibi her bir kromofor sadece belirli bir dalga boyundaki ışığı absorbe edebilmektedir [90]. Görüldüğü üzere ışık kaynağı seçiminde ortamdaki dokunun özelliklerinin de gözardı edilmesi gerekmektedir.

Işık kaynağının seçiminde öncelikle dikkat edilmesi gereken 2 husus vardır. Birincisi ışığın ulaşması gereken derinliktir, penetrasyon derinliğine bağlı olarak ışık kaynağı seçimi yapılmalıdır. Görünür bölgeden ve yakın kızılötesi spektrumda ilerledikçe penetrasyon derinliği artmaktadır [100]. Kırmızı ışık (600-700 nm) daha derin nüfuz ederken, mavi ışık (400 nm) dokuda nispeten düşük penetrasyona sahiptir. Canlı dokunun "optik penceresi" olarak da bilinen terapötik pencere 600-1300 nm arasındır. Bu sebeple dokuda maksimum derinliklere ulaşmak için, mümkün olan en uzun dalga boyunda absorpsiyon yapan fotoduyarlı madde seçilmelidir. İkinci olarak seçilen ışık kaynağının sahip olduğu dalgaboyu, seçilen fotoduyarlı maddenin absorpsiyon spektrumuna karşılık gelmesidir. En ideal dalgaboyu, maksimum derinlikte en yüksek oranda 1O_2 meydana gelen dalga boyudur.



Şekil 2.6: Dokunun temel bileşenlerinin absorpsiyon spektrumu (Oregon Graduate Enstitüsü, ECE532 kodlu biyomedikal optik ders notları).

FDT'de kullanılan ilk ışık kaynakları özellikle dermatolojik uygulamalarda kullanılan koherent olmayan ışık üreten geleneksel akkor filament lambalardır. Floresan tüpler, akkor filament lambalar, atımlı boyalı lazerler ve LED'ler de dahil olmak üzere FDT'de birçok ışık kaynağı günümüze kadar kullanılmıştır [101].

LED'ler, son birkaç yılda özellikle dermatoloji gibi kolay ulaşılabilen doku yüzeylerinde kullanılabilirdi için, FDT için pratik bir teknoloji haline geldi. Diyot lazer kaynakları üzerinde LED kullanmanın temel avantajları, düşük maliyetli, daha küçük boyutlu, geniş aydınlatma alanı ve LED'leri farklı ışınlama geometrilerine göre konfigürasyon kolaylığıdır. Başlangıçta, düşük çıkış gücü ve dalga boyu aralığı LED'ler için büyük sınırlamalar olarak düşünülse de LED teknolojisindeki son gelişmeler, yüzlerce mW / cm^2 ışınımın üretilmesini ve görünür bölge ile yakın kızıl ötesi spektrumun çoğunu kapsayan dalga boylarının üretilmesini sağladı. Endoskopik veya interstisyel olarak uygulanabilen doğrusal LED dizileri de geliştirilmiştir. Lazer diyotlarına benzer şekilde, LED'lerin tek çıkış dalga boyu vardır; Bununla birlikte, üretilen watt başına maliyet önemli ölçüde azdır ve bu nedenle her bir fotosensitizer için farklı kaynaklara sahip olmak maddi olarak önemli bir sorun teşkil etmemektedir [102].

Lazerler koherent ve monokromatik dalga boyuna sahip olmasından dolayı ışık dozimetresinin kolay hesaplanmasına imkan sağlamaktadır. Bu özelliği de lazerleri FDT'de en çok tercih edilen ışık kaynağı haline getirmiştir. Lazerlerin en önemli avantajı, tedaviler sırasında fotoaktifleşmenin maksimum verimliliğini sağlayan tek renkliliğidir. Bunun yanı sıra lazer ışığının doğasından dolayı fiber optik sistemler kullanılarak ulaşılması güç bölgelere müdahale etme imkanı vermektedir. 1980'lerin başında, çoğu tedavi argon iyon lazeri (488-514 nm) ile gerçekleştirilmiştir. Bu lazerler dalga boyu esnekliği avantajına sahip olduklarından, farklı fotoduyarlı maddeler için aynı lazerin kullanılabilir olması avantajına da sahiptir. Bununla birlikte, bu teknoloji boyutu, yüksek elektrik gücü kullanımı ve su soğutma gereksinimleri nedeniyle ameliyathane şartları ve çevre için uygun değildi. Daha sonra, argon iyon lazerlerinin yerine katı hal, frekans katlamalı Nd: YAG (1064 nm) veya KTP (532 nm) lazerleri almıştır. Bu önemli gelişme bazı güvenilirlik ve soğutma sorunlarını çözmüş olsa dahi halen hantal ve pahalıdır. Daha yakın zamanlarda, KTP boya lazer sistemleri büyük oranda birçok FDT uygulaması için standart kaynak olan diyot lazerlerle değiştirildi. Diyot lazerleri, endoskopik ve interstisyel ışık iletimi için tek bir optik alıcıya bağlanarak çok etkili bir şekilde kullanılabilmesi kullanımını yaygınlaştırmıştır (>%90). PDT uygulamasında diyot lazerlerinin başlıca sınırlaması, tek bir dalga boyunda ışık üretmesidir ve bu nedenle farklı dalgaboyuna sahip her PS için ayrı bir diyot lazer sistemi gerekmesidir [101, 103]. Dokudaki penetrasyon derinliğinin diğerlerine kıyasla daha fazla olmasından dolayı

günümüzdeki birçok deneysel ve klinik FDT uygulamalarında PS ile uyumlu olduğu takdirde diyet lazerler kullanılmaktadır (Şekil 2.5).

2.3.4. OKSİJEN

FDT'nin fotokimyasal reaksiyonlarının meydana gelmesi için O₂ gerekliliği dolayısıyla, bir tümörde oksijenin varlığı tedavinin sonucu için kritik bir öneme sahiptir. Hipoksik hücreler, fotosensitizasyona karşı çok dirençli olup reaksiyonu inhibe etme eğilimi gösterebilirler. Bu sebeble hiperbarik oksijenin fotosensitizasyonun etkisini artırabileceği kanısına varılmıştır [104]. Tümör vaskülaritesi ve oksijen difüzyon hızlarına bağlı olarak tümör bölgeleri arasında oksijen basıncında ciddi değişiklikler görülebilir [105].

Derin solid tümörlerde oksijen varlığı ciddi bir sorun iken yüzeysel deri tümörlerinde O₂ seviyesi sınırlandırıcı bir etki oluşturmamaktadır. FDT aydınlatması sırasında O₂ tüketim oranı bir diğer önemli husustur. Derin tümörlerdeki esas problem ışık kaynağı ile bölgenin uyarılması esnasından ortamdaki O₂'nin dokudaki difüzyon oranından daha hızlı tükenmesi durumunda tümörde kısa süreli O₂ yoksunluğunun meydana gelmesidir.

Başarılı bir fotodinamik terapi uygulamasının gerçekleşmesi için fotoduyarlı madde ve ışık kaynağı seçimine dikkat edildiği kadar ortam ve tümör dokudaki oksijen seviyeleri de mutlaka dikkate alınmalıdır [106].

2.3.5. FOTODİNAMİK TERAPİ SONRASI HÜCREDE ÖLÜM MEKANİZMALARI

Tezin diğer kısımlarında da bahsedildiği gibi, başarılı bir fotodinamik terapi sonucu için üç faktörün (fotoduyarlı madde, ışık ve oksijen) önemi, bunlara bağlı olarak değişen reaksiyon mekanizmalarının önemi in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir [90, 107].

Mevcut literatür incelendiğinde, FDT'den sonra hücre ölümüne neden olan tek bir yoldan ziyade birçok yolun bulunduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. FDT ile aktive edilen farklı hücre ölüm yolları [108] ve bu ölüm şeklinin oluşumunda etkin rol oynayan yapılar aşağıdaki tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2: Fotodinamik Terapi sonucunda meydana gelen hücre ölüm mekanizmaları [109].

	ORGANEL	PROSES- PROSESLER
Direk Hücre Hasarı	Mitokondri: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Sitokrom c salınımı ➤ BCL-2 hasarı 	Apoptozis
	Sitoplazma: <ul style="list-style-type: none"> ➤ NFxB hasarı 	
	Endoplazmik Retikulum: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Beclin 1 ➤ mTOR aktivasyonu 	Otofaji
	Hücre Membran Disintegrasyonu	Nekrozis
Vasküler Hasar	Bölgesel Oksijen ve Besin yetersizliği	Apoptozis Nekrozis Otofaji
İmmün Sistemin Aktivasyonu	Sitotoksik T Hücreleri	Granzyme Tabanlı Apoptozis

Apoptozis, Nekrozis ve Otofaji ile Fotodinamik terapininin ilişkini detaylandırırsak;

FDT ve Apoptozis;

Apoptozis, genetik olarak vücuttaki her hücrede kodlanmış çok basamaklı ve karmaşık bir hücre ölüm programı olup en yaygın özelliği, hücrenin kendi kendine yok oluşuna aktif katılım göstermesidir [110]. Genellikle sitokromun mitokondriyal salınımıyla veya ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile başlayan bir süreçtir. Aktivasyon nasıl başlamış olursa olsun sonunda kaspaz-3, 6 ve 7 olarak bilinen kaspaz basamaklarının aktivasyonuna neden olur [111]. Aktif kaspazlar hücresel substratları parçalarken ölmekte olan hücrede biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler görülür. Hücrede, apoptozun en karakteristik özellikleri olarak artan sitoplazmik Ca^{2+} konsantrasyonu, hücre dehidrasyonu, nükleer çevreye bağlı kromatin yoğunlaşması, internükleozomal kesitlerinde DNA'ya tercih eden endokardüklenazın aktivasyonu, proteoliz, çekirdeğin fragmentasyonu ve parçalanması ve plazma zarının yapısal

bütünlüğünü apoptozun ileri aşamalarında dahi koruması gösterilebilir (Tablo 2.3) [112, 113].

Tümör hücrelerinin apoptoza karşı gösterdiği direncin kanser gelişiminde önemli bir unsur olabileceği düşünülmektedir, bu sebeble apoptozis sürecinin sinyalizasyonunun temel unsurlarının modülasyonu, tedavi sonucu ölen tümör hücresi ölümünü doğrudan etkileyebileceği düşünülmektedir [114].

FDT ve Nekrozis;

Tüm hücrenin aktif katılımını gerektiren apoptozisin tersine nekroz pasif ve dejeneratif bir süreçtir. Nekrotik hücre ölümü, programlanmamış, sitoplazmik şişme, organellerin yok edilmesi ve plazma membranının bozulması ile karakterize edilen dejenerasyonun şiddetli ve hızlı bir şekli olarak tanımlanabilir (tablo 2.3). Çoğunlukla sitotoksik ajanların aşırı dozu ile indüklenir. In vivo, nekroz dokudaki iltihap tepkisini tetikler. Fiziksel veya kimyasal hasarın neden olduğu, kazara hücre ölümü olarakta nekrozisi adlandırmak mümkündür [115].

FDT sonrasında hücrede nekroza neden olan faktör ve parametreleri araştırmak, apoptozise neden olan faktörleri incelemek kadar kolay olmamaktadır. FDT sonrasında hücre ölümünün türünü belirlemede önemli faktör olarak hücre tipi, bozulmamış bir apoptoz seti varlığı, fotoduyarlı maddenin subselüler lokalizasyonu, uygulanan ışığın dozu ve lokal oksijen basıncı sayılabilir [116]. Genel olarak mutabakata varılan tek ortak faktör vardır ki yüksek dozda ışık uygulaması/fotoduyarlı madde uygulaması nekroz yolu ile hücre ölümü eğilimine sebep olurken, nispeten düşük dozlarda verilen PDT bileşenleri hücrede apoptozis eğilimini arttırmaktadır.

FDT ve Otofaji;

Otofaji, katabolik hücresel mekanizma olup hücresel ürünlerin sentezi, parçalanması ve geri dönüşümü arasında bir denge kurmasını sağlayan mekanizmadır. Hücresel organellerin ve proteinlerin lizozomal yıkımını içeren çeşitli otofajik süreçler mevcuttur. En iyi bilinen mekanizma şu şekilde ilerlemektedir: otofagozom adı verilen iki membranlı bir yapı hedef bölgeyi çevreler ve içeriğini sitoplazmanın geri kalanından ayıran bir vesikül oluşturur. Bu vesikül daha sonra lizozom yolu ile taşınır ve karışır, daha sonra lizozomal hidrolazlar tarafından bozularak otofagolizozom adı verilen bir yapı oluşturur. İstenmeyen proteinlerin, organellerin ve işgal altındaki mikroorganizmaların yok edilmesini kolaylaştırmanın yanısıra,

otofaji bir hücrenin besinlerini açlık veya stres zamanlarında gereksiz proseslerden hayati süreçlere yeniden ayırmasına izin vermektedir. Otofaji sürecini yöneten sinyal yolları, hücre büyümesini ve protein sentezini kontrol eden rapamisin kinaz (TOR) hedefinin tanımlanmasından sonra daha iyi anlaşılmıştır [117, 118].

Kanser otofaji ile ilişkilendirilen ilk hastalıklardandır [119]. Beclin1'in bir tümör baskılayıcı bir protein olduğu keşfedilmiştir ki otofajide önemli rol oynayan bir proteindir [120]. Otofajinin FDT'nin sonucunu nasıl etkilediği henüz tam olarak bilinmemektedir [121]. Otofaji, FDT'ye bağlı apoptozda rol oynar, ancak iki süreç birbirinden bağımsız olarak da oluşabilir henüz bu konuda araştırmalar devam etmektedir [122].



Tablo 2.3: Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması.

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan nedenler	İskemi Hipotermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması "Senescence" HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
Morfolojik özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin "flocculation"u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücresinin intact mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon homeostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu (=ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C'de gerçekleşmez DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirteci) Preolitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

2.4. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FTIR)

Fourier transform infrared spektroskopi kimyasal bağlardaki titreşimleri tespit ederek dokuların biyokimyasal bileşimlerini belirlemek için kullanılan güçlü bir analitik yöntemdir. 19. yüzyıl itibariyle fourier dönüşümlü kızılötesi (Fourier transform infrared; FT-IR, FTIR) spektroskopi tekniklerinin kullanılması hızla gelişen bir araştırma alanıdır. Özellikle tahribatsız spektral görüntüler oluşturması sebebiyle sitolojik ve histolojik tanıda kullanılmaya başlamıştır. Hücre ölümleri sırasında dokudaki lipid, protein ve nükleik asit bileşimindeki değişikliklere hassastır. FTIR görüntüleme, araştırılan doku veya hücre türünün bilgi açısından kimyasal olarak spesifik IR spektrumlarına dayalı zengin uzaysal olarak çözünlenmiş bir görüntüsünü sağlayabilmektedir [123]. Kızılötesi bölgesinde absorpsiyon, moleküllerin titreşim ve dönme düzeylerini uyarır. FTIR yöntemi, bu uyarımın ölçülmesi esasıyla çalışır. Kızılötesi ışının absorpsiyonu, titreşim ve dönme durumları arasındaki enerji farklarının minör olmasından ekseriyetle yöntem moleküler yapılarla sınırlı kalmaktadır.

FTIR spektroskopisi incelemelerinde dalga sayısı ölçek olarak kullanılmaktadır. İncelemelerde genellikle kızılötesi ışığı ile 4000 ile 400 cm^{-1} arasında kalan bölge incelenir. Biyolojik materyalleri incelemek için, ölçülen en önemli spektral bölge tipik olarak parmak izi bölgesi bölgesi olarakta adlandırılan (600-1450 cm^{-1}) ile amid I ve amid II (amid I / II) bölgesi (1500-1700 cm^{-1}) 'dir. 2550-3500 cm^{-1} dalga boyu bölgesi S-H, C-H, N-H ve O-H gibi gerilme titreşimleri ile bilgi sağlarken düşük dalga boyu bölgeleri bükme ve karbon iskelet parmak izi titreşimlerine karşılık gelmektedir [124, 125].

FTIR spektroskopisi ile numune incelemeden önce ön işlem gerekmektedir. Özellikle su içeren numuneler direkt incelendiğinde istenilen spektrumlar elde edilememektedir. Ortamdaki suyun soğurulması ile protein, amid I bandları, membranda C=O titreşim bandlarının üst üste çakışması durumu gerçekleşir. FTIR spektroskopisinin en önemli dezavantajı suyun kızılötesi dalgaboyunda kuvvetli bir sinyal vermesi sebebiyle bazı bantları maskeleyesidir. Bunu önlemek için incelenecek numuneye (canlı doku, fikse edilmiş doku, sıvı madde, çözelti vb.) uygun yöntemler geliştirilmiştir. Canlı doku için en çok tercih edilen yöntem liyofilizasyon yöntemidir.

Dondurarak kurutma olarakta bilinen liyofilizasyon, özellikle ısıya duyarlı numunelerde kayıpları önemli oranda önleyebilmektedir. Bu işlemde, su donmuş halde uzaklaştırılırken numunenin morfolojisi, çözünürlüğü ve kimyasal bütünlüğü korunmaktadır. Bunun yanı sıra,

açık ortamlarda kurutmaya kıyasla daha hızlı ve etkin biçimde ortamdaki suyu yoketmek mümkün olduğu için bakteri vb. kontaminasyon riskleri de ciddi oranda azalmaktadır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE HATTI VE KÜLTÜR KOŞULLARI

Çalışmada kullanılan MCF-7 insan meme adenokarsinoma hücresi NCI-PBCF-HTB22 (American Type Culture Collection (ATCC) HTB-2) İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE Moleküler Tıp bölümünden Prof. Dr. Bedia Çakmakoğlu tarafından hediye edilmiştir. Özel karyovialler içinde bulunan MCF-7 hücreleri sıvı nitrojen tankından alınarak buz içerisinde hızlı bir şekilde laboratuvara taşınarak 37°C'lik su banyosuna transfer edilmiştir. Su banyosundan alınan MCF-7 hücreleri ile yapılan tüm işlemlere steril ortamda laminar kabin içerisinde devam edilmiştir. MCF-7 monolayer hücreleri 2 mM L-glutamin, %10 FBS (fetal bovin serum), penisilin (100 units/ml) ve streptomisin (100 g/ml) eklenerek oluşturulan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-no phenol red) besiyerinde flasklara transfer edilmiştir. Flasklar 37°C'de, %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler flaskın %80'ini kapladığında besi ortamı yenisi ile değiştirilip hücreler pasajlanmıştır.

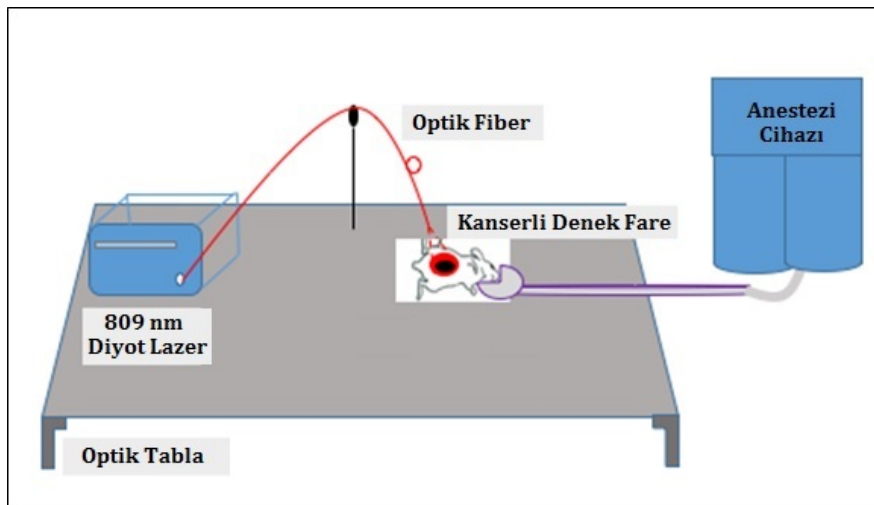
Çalışma için yeterli sayı yoğunluğuna ulaşıldığında hücreler tripsin ile kaldırılıp transfer işlemleri için hazırlanmıştır. Öncelikle her bir flask 2 kez 2 ml PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ile yıkanarak atık maddelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından 2 ml Tripsin-EDTA flasklara eklenerek CO₂ inkübatörde 5-7 dakika bekletilmiştir. İverted mikroskop altında hücrelerin durumu gözlenmiştir, hücrelerin tabandan kaldırılması tamamlandığında ise hemen taze besiyer eklenerek tripsin aktivitesi durdurulmuştur. Tripsin ile kaldırılan hücreler besiyer içeren falkona aktarılıp 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatan uzaklaştırılıp çöken pellet üzerine 1ml taze büyüme besiyeri eklenerek hücre sayımı yapılmıştır. Sayımın ardından 1 ml taze hücre besiyeri içerisinde hücreler karyoviallere aktarılmıştır (1 ml besiyer / 10 milyon hücre). Karyovialler özel taşıma kutusu içerisine dikkatlice yerleştirilip 36-38°C' de Boğaziçi Üniversitesi Vivarium (Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi) Deneysel Hayvan Üretim ve Bakım Birimine transfer edilmiştir.

3.2. DENEK HAYVANLAR

Dişi atimik nude (nu\nu) fareler Boğaziçi Üniversitesi Vivarium (Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi) Deneysel Hayvan Üretim ve Bakım Biriminden satın alınmış olup çalışmanın transgenik fareler üzerindeki bölümleri etik kurul izni dahilinde bu merkezde uzman veteriner hekim eşliğinde gerçekleştirilmiştir. Nude fareler 22°C sıcaklık, %40-70 nem şartlarında ve 12:12 saat aydınlık: karanlık döngüsünde özel kafeslere yerleştirilmiştir. Denekler çalışma boyunca ad libitum olarak beslenmiştir. Deneysel işlemler sonrası denek fareler her kafeste 1 fare olacak şekilde mikrobariyer filtreli kafeslerde SPF (specific pathogen free) şartlarda tutulmuştur. Çalışmada 18- 20 gram ağırlığında 4-5 haftalık rastgele seçilmiş dişi nude fareler kullanılmıştır. Boğaziçi Üniversitesi Kurumsal Hayvan Deneyleti Etik Kurulu tarafından bu çalışma onaylanmış ve denetlenmiştir.

3.3. IŞIK KAYNAĞI

Işık kaynağı olarak 809 nanometre diyot lazer sistemi kullanılmıştır. Lazer probu denek farenin tümörüne değmemek koşulu ile en yakın olacak şekilde konumlandırılmıştır (Şekil 3.1). Maksimum 2 Watt çıkış gücü olan lazer sürekli modlu (CW) olup ayarlanabilir özelliktedir. Hedef dokuya lazer ışığı 1000 µm kalınlığında optik fiber kullanılarak gönderilmiştir. 1000 µm'lik optik fibere kolimatör bağlanarak 1 cm²'lik tümör alanı lazer kaynağı ile uyarılmıştır. Lazerin çıkış gücü her deney öncesi ve sonrası optik güç ölçer ile kontrol edilmiştir (Newport CA, USA).



Şekil 3.1: 809 nm diyot lazer ile hazırlanmış deney düzeneği. Optik fiber denek farenin tümör bölgesine en yakın olacak şekilde konumlandırılarak kullanılmıştır. Deney boyunca anestezide olan farenin kalp atımı sürekli olarak takip edilmiştir.

3.4. FOTODUYARLI MADDE

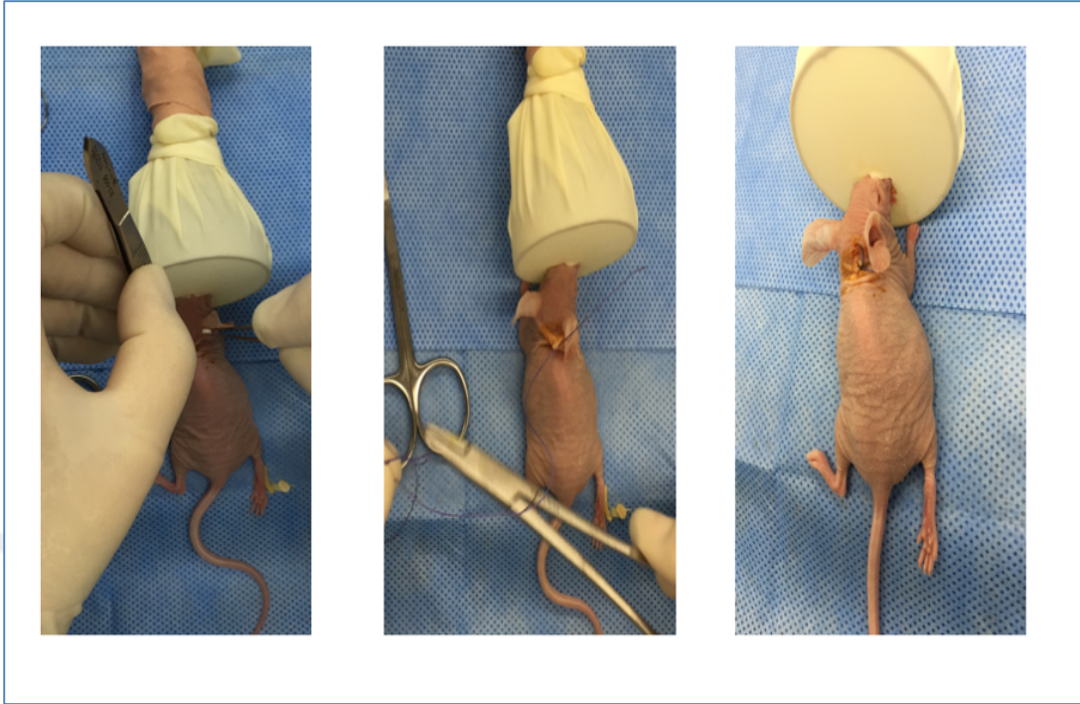
Çalışmada fotoduyarlı (fotohassaslaştırıcı) madde olarak ICG (Pulsion Medical Systems AG, Munich, Germany) kullanılmıştır. ICG yakın kızılötesi spektrumun özellikle 780-810 nanometreleri arasında absorban ve floresans ışına yapmaktadır. Her uygulama öncesi PBS de çözerek hazırlanan kuru ICG çözeltisi deney öncesinde, uygulama esnasında ve sonrasında karanlık ortamda tutularak ışıktan zarar görmesi (photobleaching) engellenmiştir. Her denek fareye 5 mg/kg ICG çözeltisi verilmiştir. ICG' nin kullanıldığı tüm deneyler karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.5. DİĞER KİMYASALLAR

Transplantasyonunun başarı oranını arttırmak, hücrelerin tutunmasını desteklemek amacıyla Matrigel Matrix kullanılmıştır. Yüksek konsantrasyon (HC) Matrigel Matrix (BD, Matrigel Matrix, Biosciences, Germany) final konsantrasyonu 9 mg/ml olacak şekilde soğutulmuş PBS (phosphate-buffered saline, Biochrom, Germany) ile seyreltilmiştir. Her bir denek fareye 50 µl matrigel matrix (1:1 Hücre: Matrigel) tümör hücreleriyle birlikte enjekte edilmiştir. Tümör hücresi enjeksiyonundan 3-5 dakika önce anestezisi altında denek farelere 17β-östradiol pelleti (SE-121, Innovative Research of America, USA) implante edilmiştir. Her bir pellet 3.00 mm büyüklüğünde olup deneklere 60 gün boyunca toplam 0,36 mg 17β-östradiol takviyesi sağlamıştır.

Pelletlerin implante edilmesinde aşağıdaki prosedür takip edilmiştir (şekil 3.2):

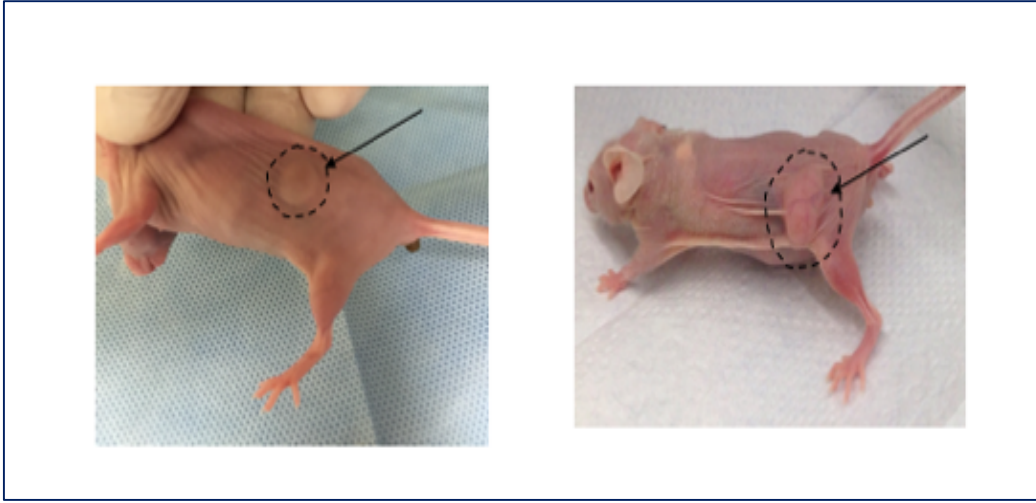
1. Denek hayvanın ensesinin lateral yönündeki deri pens ile tutularak kaldırılır
2. Pellet boyutuna eş bir kesi yapılır.
3. Bir çift pens yardımıyla kesi bölgesinde bir cep oluşturulur.
4. Oluşturulan cebe pens yardımıyla pellet yerleştirilir.
5. Kesi tek dikiş ile kapatılır ve dezenfaktan ile bölge temizlenir.



Şekil 3.2: Pellet implante edilme prosedür görüntüleri, pellet kesi bölgesine yerleştirilir (sol), ardından tek dikiş ile kapatılır (orta), bölge dezenfekte edilir (sağ).

3.6. İN VİVO FLORESANS GÖRÜNTÜLEME

Görüntüleme için kullanılacak olan ICG (Pulsion, Germany) uygulamanın hemen öncesinde PBS (phosphate-buffered saline, Biochrom, Germany) içerisinde çözülmüştür. Tümör transplantasyonunu takip eden yaklaşık 3-4 hafta sonra tümör boyutu 3-5 mm'ye ulaşmaktadır. Yaklaşık 3-4 hafta sonunda tümör elle palpe edilebilir boyuta ulaştığında (şekil 3.3) intraperitoneal olarak ICG çözeltisi deneklere enjekte edilir. Görüntüleme amacıyla kullanılan ICG dozu da denek başına 5 mg/kg'dır. Intraperitoneal enjeksiyonun ardından denek farelere in vivo floresans görüntüleme IVIS System (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) yapılarak tümör boyutu ve ICG'nin tümör odağı ile diğer organlardaki birikimi incelenmiştir. Denek farenin fotografik görüntüsü özel olarak aydınlatılan haznede çekilip, ardından farelerde aktif ICG tarafından üretilen foton sayılarının uzaysal dağılımı ile temsil edilen sahte renk (pseudocolor) görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 3.3: Tümörü oluşmuş 2 ayrı denek fare görüntüsü.

3.7. MAKROSKOPİK TÜMÖR HACİM ÖLÇÜMLERİ

Her tedavi öncesi ve sonrasında makroskopik tümör boyutları dijital kaliper yardımı ile aynı kişi tarafından ölçülmüştür. Tümör hacim hesabı 3.1'deki formülasyona göre yapılmıştır

$$V = 4/3\pi abc \quad (3.1)$$

Formülde gösterilen a: tümörün eni, b: tümörün boyu, c: tümörün derinliğini ifade etmektedir. Tümör hacmindeki azalma hesaplanırken ilk tedaviden önce ölçülen tümör hacmi referans alınmıştır.

3.8. FTIR ANALİZİ

Tedavi sonrası nekropsi ile alınan tümör ve/veya kalıntısı izotonik solüsyon içerisinde spektroskopik analiz laboratuvarına transfer edilmiştir (BINATAM R&D Center, İstanbul). Analiz öncesi tüm numuneler liyofilize edilmiştir. İzotonik içerisindeki tümör doku distile su ile 2 kez yıkanıp ardından steril karyovial içerisinde -80°C bir gece bekletilmiştir.

-80°C den çıkarılan doku hızlı bir şekilde liyofilizatör cihazına yerleştirilip doku boyutuna bağlı olarak en az 24 saat cihaz içerisinde bırakılmıştır. (Lyophilizer, Christ Alpha 1-2 LD plus, Freeze Dryer, UK). Liyofilize işlemi sonrası ölçüme hazır olan

5- Şeffaflandırma (Temizleme)

6-Sertleştirme (İnfiltrasyon-impregnasyon)

7- Gömme- Bloklama (Embedding)

8- Kesit Alma

9- H&E Boyama

10- Kapatma

4. ve 9. Basamaklarda uygulanan prosedür aşağıda detaylıca verilmiştir;

4. Dehidrasyon/Takip

Basamak	Solüsyon	Zaman
1	Ksilen	5 dk
2	Ksilen	5 dk
3	Ksilen	5 dk
4	Saf etanol (Etil alkol)	20 sn
5	Saf etanol	20 sn
6	Saf etanol	20 sn
7	95% etanol	20 sn
8	80% etanol	20 sn
9	70% etanol	20 sn
10	Çeşme suyu	2 dk

9. H&E Boyama

Basamak	Solüsyon	Zaman
1	Harris Hematoksilen	5 dk
2	Çeşme suyu	20 sn
3	1% Asid alkol	5 sn

4	Scotts Çeşme suyu	2 dk
5	Eozin	2 dk
6	Çeşme suyu	20 sn

Tümör dokunun regresyon derecesi Payne & Miller Grادلama sistemine göre verilmiştir [127];

Grade 1: Malign tümör hücrede bazı değişiklikler mevcut fakat genel tümör hücresi sayısında azalma yok.

Grade 2: İnvaziv tümör hücresinde minimal azalma ancak hala hücre yoğunluğu yüksek (<%30).

Grade 3: tümör hücresinde orta derecede azalma (%30-90 azalma).

Grade 4: İnvaziv hücrede belirgin kayıp, sadece dağınık hücreler arasında ufak kümeler görülür (>%90 azalma).

Grade 5: Primer tümör bölgesinde invaziv hücreler tespit edilemez sadece makrofaj içeren vasküler fibroelastik stroma görülebilir. (DCIS olabilir).

3.10. İSTATİSTİK ANALİZ

Tek yönlü varyans analizinin uygulandığı verilerde 0.05 anlamlılık düzeyi temel alınmıştır (IBM-SPSS Statistics v.21). Varyansların homojenliği, Levene testi ile analiz edilmiştir. Veriye uygun olarak ANOVA, Paired Sample T-Test uygulanmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey HSD testi kullanıldı. FTIR verisinin istatistiksel analizi Hiyerarşik küme analizi (HCA), spektral verilerin sınıflandırılması için Origin 6.0 yazılımı (Bruker Optik GmbH, Almanya) kullanılmıştır.

FTIR verisinin istatistiksel analizi Hiperaktivite kümesi analizi (HCA), spektral verileri sınıflandırmak için OPUS yazılımı (Bruker Optik GmbH, Almanya) ile gerçekleştirildi. HCA, verinin benzeşim derecelerine göre kümeleşmesini sağlamaktadır. Yöntem, tüm data seti arasındaki öklid uzaklığını hesaplar, birleştirme süreci (sonuç), bir heterojenite

skalasına göre kümeler halinde spektrumların yeniden gruplandırılmasını sunan bir dendrogram olarak adlandırılan ağaç benzeri bir diyagram olarak sunulmaktadır [128] .

3.11. ÇALIŞMANIN DİZAYNI

Farklı ICG akümülyasyon süreleri ve değişen lazer güçlerine bağlı olarak in vivo nude farelerde FDT' nin meme kanseri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Aşağıdaki 4 grup üzerinden çalışma yapılmıştır.

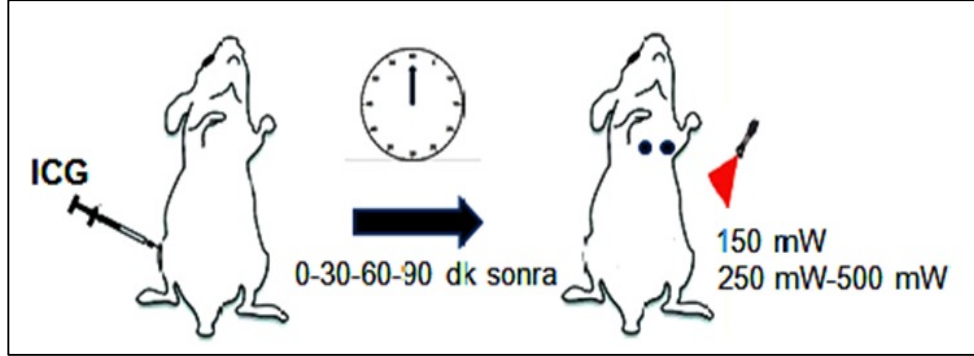
1. **Kontrol Grubu:** Sadece Tümör, ICG uygulanmadı, Lazer uygulanmadı
2. **Lazer Uygulanmış Grup:** Tümör + Lazer uygulaması, ICG uygulanmadı
3. **ICG almış Grup:** Tümör + ICG uygulandı, Lazer uygulanmadı
4. **FDT (Lazer + ICG) Grubu:** Tümör + ICG uygulandı + Lazer uygulandı

Çalışma optimizasyon ve ana çalışma olmak üzere 2 kısım olarak dizayn edildi.

3.11.1. Optimizasyon Çalışması

Optimizasyon deneyleri 12 farklı grup üzerinden dizayn edilmiştir. Tablo 3.1 de bu gruplar ve numaralandırılması gösterilmiştir. Grup 1 ICG uygulamasının hemen ardından (0 dk) 150 mW güçte lazer uygulanan gruptur. Grup 2 ICG uygulamasının ardından 30 dk beklendikten sonra 150 mW güçte lazer uygulanan gruptur. Grup 3 ICG uygulamasının ardından 60 dk beklendikten sonra 150 mW güçte lazer uygulanan gruptur. Grup 4 ICG uygulamasının ardından 90 dk beklendikten sonra 150 mW güçte lazer uygulanan gruptur. Grup 5 ICG uygulamasının hemen ardından (0 dk) 250 mW güçte lazer uygulanan gruptur. Grup 6 ICG uygulamasının ardından 30 dk beklendikten sonra 250 mW güçte lazer uygulanan gruptur. Grup 7 ICG uygulamasının ardından 60 dk beklendikten sonra 250 mW güçte lazer uygulanan gruptur. Grup 8 ICG uygulamasının ardından 90 dk beklendikten sonra 250 mW güçte lazer uygulanan gruptur. Grup 9 ICG uygulamasının hemen ardından (0 dk) 500 mW güçte lazer uygulanan gruptur. Grup 10 ICG uygulamasının ardından 30 dk beklendikten sonra 500 mW güçte lazer uygulanan gruptur. Grup 11 ICG uygulamasının ardından 60 dk beklendikten sonra 500 mW güçte lazer uygulanan gruptur. Grup 12 ICG

uygulamasının ardından 90 dk beklendikten sonra 500 mW güçte lazer uygulanan gruptur (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Optimizasyon deneyi FDT uygulaması.

Tablo 3.1: Her birinin 2 dişi nude fare içerdiği optimizasyon gruplarının uygulanan lazer gücü ve süresi ile ICG uygulamasından sonra beklenen süreye bağlı olarak numaralandırılması.

Uygulanan Güç ve Süre	ICG Uygulamasından Sonra Beklenen Süre			
	0 dk	30 dk	60 dk	90 dk
150 mW - 20 dk	1. grup	2. grup	3. grup	4. grup
250 mW - 20 dk	5. grup	6. grup	7. grup	8. grup
500 mW - 20 dk	9. grup	10. grup	11. grup	12. grup

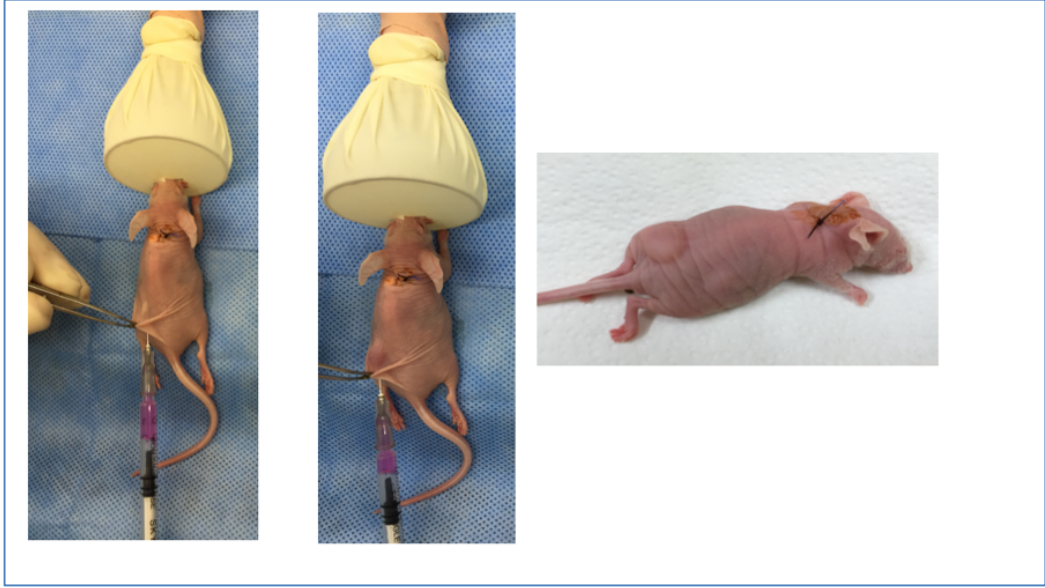
Tümör oluşumundan tedavi sonuna kadar uygulanan prosedür aşağıdaki gibidir;

1- 17 β -Estradiol pelletleri, her bir denek nude fareye, %1-3 izofloran inhalasyon anestezisi altında tümör hücresi aşılmasından 3-5 dakika önce implante edilmiştir (Şekil 3.2).

2- 1 ml hücre medyumunu içerisinde 50 ul matrigel matrisi ile 10 milyon MCF-7 insan meme adenokarsinom hücresi verilmiştir. Matrigelin katılaşmasını önlemek için subkutan enjeksiyondan hemen önce matrigel tümör hücreleri ile karıştırılıp enjeksiyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6).

3- Denek fareler her gün takip edilmiştir.

- 4- Tümör hücresi transplantasyonundan ortalama 10-15 gün sonra palpe edilebilen minik solid tümör elde edilmiştir.
- 5- İlk palpasyon sonrası tümör boyutu dijital kaliper ile ölçülmüştür ve günlük olarak aynı kişi tarafından kaydedilmiştir.
- 6- Tümörler yaklaşık 3-5 milimetreye ulaştığında denek fareler, optimizasyon çalışması için rasgele gruplara ayrılmıştır (Şekil 3.3).
- 7- Her bir denek fare için ICG 5 mg/kg konsantrasyon verilmiştir ve bekleme (birikim) süresi boyunca photobleaching olmaması için (ışıktan zarar görme) karanlık bir ortamda tutulmuştur.
- 8- Bekleme periyodu bittikten sonra denek fareler 20 dakika boyunca 809 nm CW diyot lazer ile tedavi gubunun gerektirdiği güçte uyarılmıştır, bu esnada denekler anestezi altına tutulmuştur.
- 9- Bekleme süresi ve uygulanan lazer gücü Tablo.3.1'de gösterilen gruplara göre seçilmiştir.
- 10- 7. ve 8. adımlar 4 kez tekrarlanmıştır, tedavi ardışık olarak 4 gün tekrar edilmiştir.
- 11- Dördüncü tedaviden sonra, fareler 48 saat boyunca karanlık odada tutulmuştur. Tedavi edilen farelerde hastalığın ilerleyici bir işaretinin olası varlığı yakından izlendi ve etik ilkeler gereği ölüm noktasına (moribund) gelen denek olması durumunda sakrifiye edilmiştir.
12. 48 saat boyunca fareler, sabit sıcaklık (22°C) ve nem (% 40-70) altında ve spesifik patojen içermeyen (SPF) koşullar altında barındırılmıştır.
13. Tüm işlemler sırasında hayvan refahına dikkat edilmiştir. Çalışma her aşamasında denek fareler ad libitum beslenmiştir, yiyecek ve suya erişim sınırlandırılmamıştır.
14. 48 saat sonra deneklere nekropsi yapılmıştır, lokal tümör ile uzak-yakın metastazlar saptanmıştır. Tümör dokusunun yarısı, FTIR spektrum analizi için -80°C'de saklanmıştır. Diğer yarısı histopatolojik analiz için formalin içerisinde sabitlenmiştir.



Şekil 3.6: Tümör hücresi enjeksiyonuna ait görüntüler verilmiştir; forseps yardımıyla flank bölgesinde yatay bir cep oluşturuldu. Oluşturulan bu cebe matrigel ile karıştırılmış tümör hücreleri enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra, fareler anesteziden çıkarıldı ve mikro bariyer filtreli özel kafeslerin içine yerleştirildi. Kafes içindeki denekler bir süre sonra kontrol edildiğinde enjeksiyon alanındaki şişliğin kaybolduğu gözlenmiştir.

3.11.2. Ana Çalışma

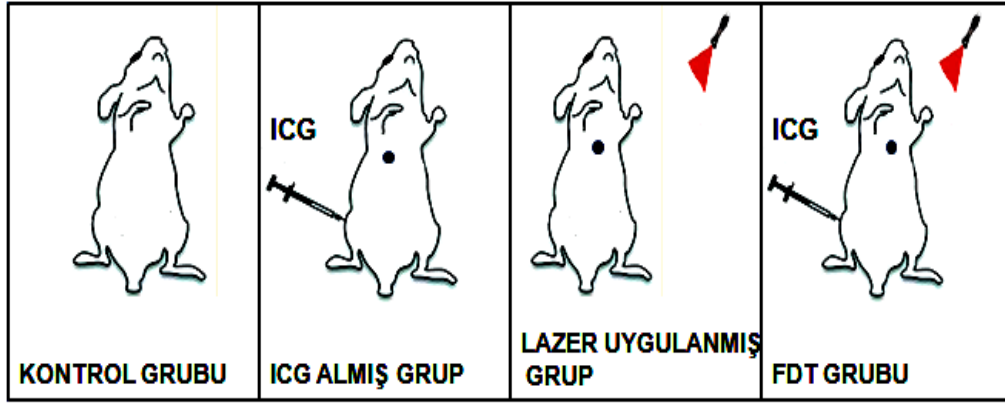
Ana çalışma optimizasyon çalışmasından elde edilen sonuçlara göre yapılmıştır. Aşağıdaki 4 grup ana çalışma için test edilmiştir;

1. **Kontrol Grubu:** Sadece Tümör, ICG uygulanmadı, Lazer uygulanmadı
2. **Lazer Uygulanmış Grup:** Tümör + Lazer uygulaması, ICG uygulanmadı
3. **ICG Almış Grup:** Tümör + ICG uygulandı, Lazer uygulanmadı
4. **FDT (Lazer + ICG) Grubu:** Tümör + ICG uygulandı + Lazer uygulandı.

Ana çalışma, 17 fare üzerinde tasarlanmıştır (Şekil 3.7), aşağıdaki tabloda, her çalışma grubu için ayrılan denek hayvan sayısı gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Tablo, ana çalışma gruplarının her biri için kullanılan denek hayvan sayılarını göstermektedir.

Grup	Denek Sayısı
<i>Kontrol Grubu</i>	3
<i>Lazer Uygulanmış Grup</i>	3
<i>ICG Almış Grup</i>	3
<i>FDT (Lazer + ICG) Grubu</i>	8



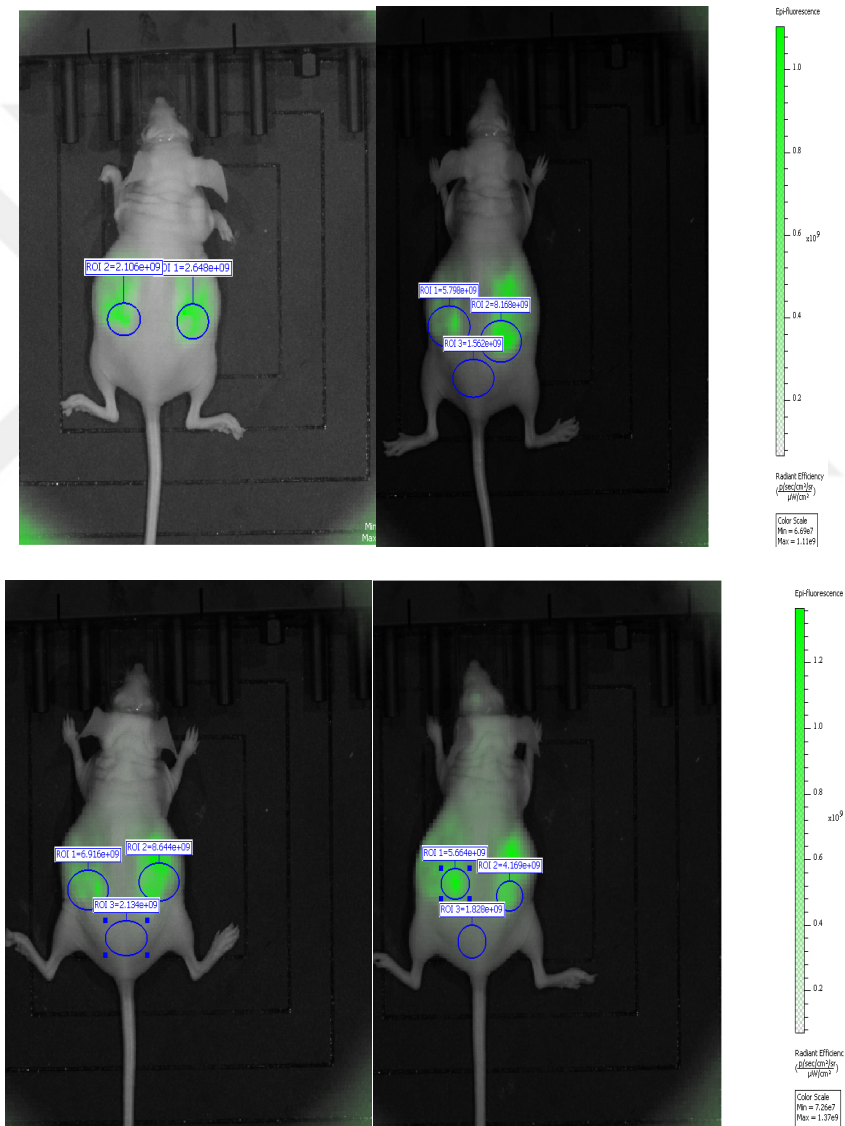
Şekil 3.7: Ana Deneyler FDT Uygulamaları.

3.11.1 optimizasyon çalışmasında tümör oluşumdan tedavi sonlandırılmasına kadar uygulanan 14 basamaklı prosedür ana çalışmadaki denek fareler içinde birebir uygulanmıştır. Ana çalışmada kullanılan lazerin gücü ve ICG'nin bekleme süresi optimizasyon çalışmasının sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda seçilmiştir.

4. BULGULAR

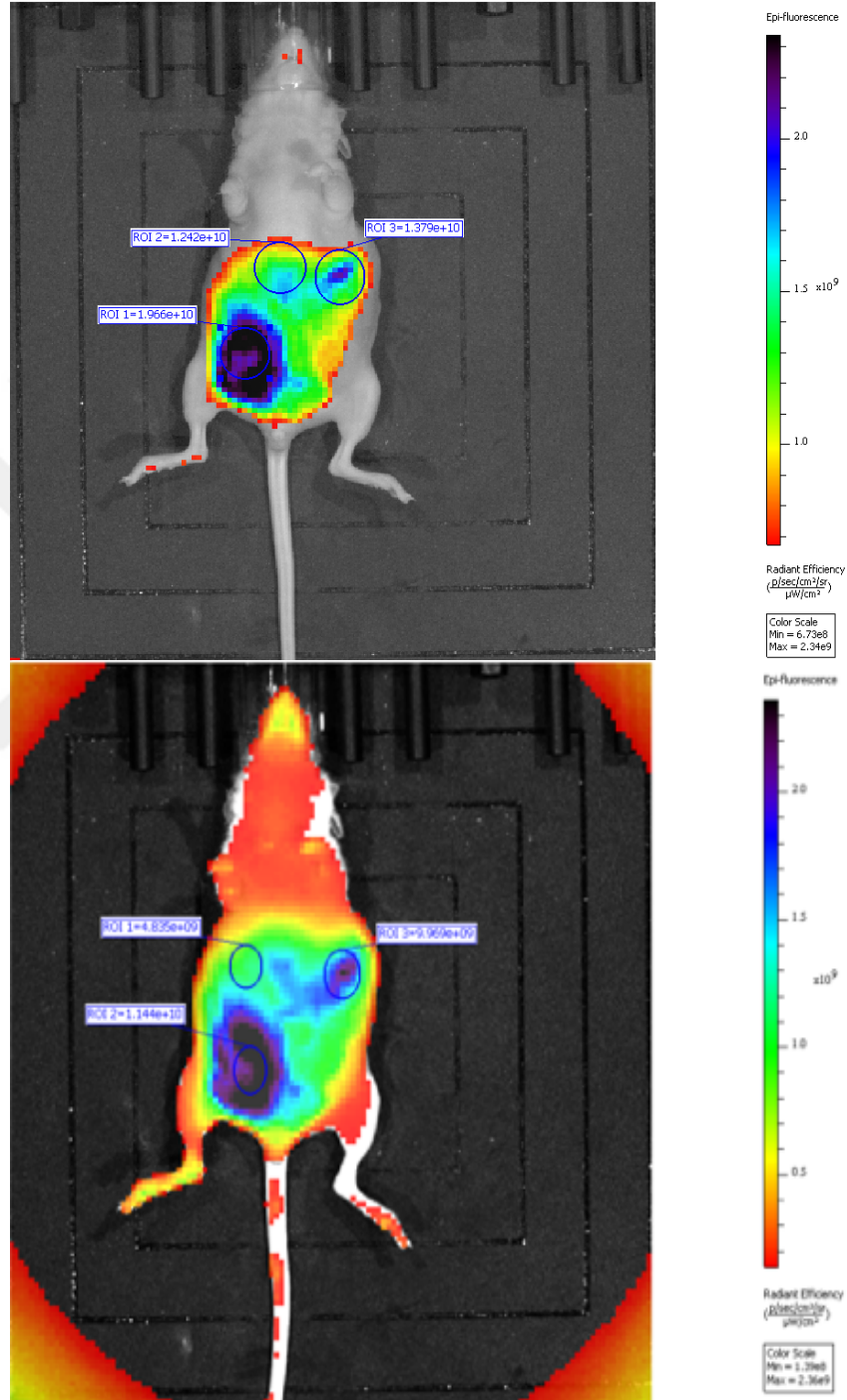
4.1. IN VIVO FLORESANS GÖRÜNTÜLEME ANALİZİ

Subkutan MCF-7 hücreleri enjeksiyonundan 3-4 hafta sonra tümör elle palpe edilir duruma geldiğinde görüntüleme işlemi yapılmıştır.



Şekil 4.1: MCF-7 ile meme tümörü oluşturulan nude farelerin in vivo floresans görüntüleri i.p. ICG enjeksiyondan 0-30-60-90 dakika sonra ardışık olarak toplanmıştır. Bağlı ışık birimleri / piksel renk ölçeği çubukları (sağda) ve şeklin alt kısmında ölçek çubuğu olarak gösterilmektedir (ICG enjeksiyonundan sol üst 0 dak - Sağ üst 30 dak - Sol alt 60 dak - Sağ alt 90 dakika sonra floresans görüntüleri kaydedilmiştir).

Tümörlerin floresans görüntülenmesi ve ICG birikimi tespiti için farelere 5 mg/kg konsantrasyonda intraperitoneal ICG verilmesini takiben belirlenen sürelerde beklenil mesini takiben floresans görüntüleri kaydedilmiştir.



Şekil 4.2: Denek farelerde ICG aktivitesinin in vivo floresan görüntülenmesi. Üst taraftaki görüntü, dorsoventral açıdan olup i.p. ICG enjeksiyonundan 30 dakika sonra kaydedildi. Alt taraftaki görüntü dorsoventral açıdan olup i.p. ICG enjeksiyonundan 60 dakika sonra kaydedildi. Bağlı ışık birimleri / piksel renk skala çubukları (sağda) ve figürün alt kısmında ölçek çubuğunda belirtilmiştir. (Birikim periyotları için 2 ayrı denek kullanılmıştır).

Floresans görüntülemekten elde edilen verilerde ICG' nin enjeksiyon ve tümör bölgesinde birikim yaptığı ölçülmüştür. Şekil 4.1'de de tespit edildiği üzere birikim miktarı beklenen süreye göre değişmektedir. 0-30-60-90 dakikalık bekleme sürelerinde floresans sinyalinin şiddeti değişmiştir. 30 dakika ve 60 dakikanın sinyal şiddetlerinin benzer olması sebebiyle ek görüntüleme bu iki süre için yapılmış olup şekil 4.2'de bu görüntü verilmiştir.

4.2. TEDAVİ SÜRECİNDEKİ MAKRO TÜMÖR GELİŞİM ANALİZİ

4 gün boyunca uygulanan tedavi süresince R1-R2 çap ve derinlik ölçümleri elektronik kumpas ile alınıp aşağıdaki tablo oluşturulmuştur (tablo 4.1). Bu ölçümlere karşılık gelen elipsoid hacimleri de hesaplanarak tümörün tahmini-yaklaşık boyutları çıkarılmıştır.

Tablo 4.1: Tümör Çapının Uygulama Günlerindeki Değişimi

	Hayvan No/ Patoloji No	1.gün			2.gün			3.gün			4.gün		
		R1 (mm)	R2 (mm)	Derinlik (mm)	Ellipsoid Volume	R1 (mm)	R2 (mm)	Derinlik (mm)	Ellipsoid Volume	R1 (mm)	R2 (mm)	Derinlik (mm)	Ellipsoid Volume
250 mw, 30dk	6	3.37	3.43	1.20	7.28	3.19	3.36	1.20	6.75	3.03	3.36	0.81	4.31
	7	4.67	4.42	1.30	14.02	4.64	4.14	1.09	10.95	2.69	2.49	1.55	5.45
250 mw, 0dk	8	6.67	6.04	3.04	64.02	6.29	6.04	3.30	65.67	6.55	6.53	1.90	42.62
	9	3.04	4.66	2.20	16.30	3.69	4.45	2.30	19.73	3.62	4.91	1.95	18.17
250 mw, 60dk	10	4.51	3.23	4.64	35.40	5.18	5.27	2.45	34.93	3.91	3.45	2.24	15.78
	11	5.43	6.90	3.13	61.37	5.44	5.38	2.60	39.82	5.64	4.56	2.11	28.48
250 mw, 90dk	12	4.07	3.64	2.52	19.51	3.79	4.58	1.91	17.35	3.68	3.65	1.48	10.42
	16	3.62	3.82	1.66	11.99	2.98	2.35	1.46	5.37	2.25	2.89	1.35	4.61
150 mw, 0dk	13	4.13	4.36	2.14	20.11	3.24	4.74	2.15	17.26	3.81	5.20	1.19	12.28
	17	4.28	5.52	4.95	61.22	4.42	6.43	3.67	54.63	3.23	3.27	2.01	11.14
150 mw, 30dk	14	4.45	5.27	2.12	25.98	3.66	4.06	2.29	17.80	4.32	4.00	2.96	26.76
	18	4.78	5.55	4.18	58.00	3.16	4.24	4.76	33.45	2.59	2.79	1.60	6.05
150 mw, 60dk	15	5.91	4.42	2.49	34.00	5.11	4.39	2.33	27.31	5.15	4.59	2.43	29.99
	19	4.98	5.75	2.32	34.83	3.75	4.15	2.31	18.79	4.68	4.59	2.43	27.28
150 mw, 90dk	20	3.07	3.03	1.42	6.90	3.26	3.73	1.57	9.99	2.68	2.41	1.61	5.41
	21	4.41	4.22	2.97	29.00	3.39	5.18	2.86	26.23	4.17	5.39	2.83	33.28
500 mw, 0dk	22	2.23	2.17	1.12	3.05	3.76	3.36	1.10	7.27	3.91	3.73	2.29	17.51
	26	5.60	4.69	2.47	33.96	5.29	4.34	2.23	26.78	3.80	3.06	2.11	12.82
500 mw, 30dk	23	5.25	4.28	2.62	30.72	4.52	4.24	2.45	24.51	3.33	3.70	1.89	12.21
	27	6.97	5.67	2.21	45.64	6.06	5.11	2.34	37.92	6.68	4.37	2.25	34.39
500 mw, 60dk	24	3.07	3.27	1.70	8.91	4.08	4.00	2.92	24.95	3.15	3.47	2.25	12.86
	28	3.32	2.90	0.75	3.78	3.34	3.05	0.80	4.26	3.10	2.95	1.36	6.50
500 mw, 90dk	25	4.81	4.51	2.08	23.60	4.01	3.78	2.02	16.02	4.00	3.68	2.00	14.97
	29	3.58	3.26	1.10	6.73	3.44	3.17	1.03	5.89	3.41	3.12	1.00	5.54

Hesaplamalar sonucunda elde edilen tümör küçülme oranları tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2: Tümör hacminin değişik uygulama parametrelerine karşılık gelen değişimi.

Kullanılan Parametre	1. gün %100	2. gün % Küçülme	3. gün % Küçülme	4. gün % Küçülme
250 mW, 30dk	100	7,27	40,77	60,83
	100	21,91	61,11	54,79
250 mW, 0dk	100	-2,58	33,43	43,68
	100	-21,06	-11,48	48,76
250 mW, 60dk	100	31,2	55,41	67,20
	100	35,11	53,59	62,36
250 mW, 90dk	100	11,06	46,59	84,69
	100	55,21	61,57	56,87
150 mW, 0dk	100	14,16	38,91	-21,04
	100	10,77	79,60	85,13
150 mW, 30dk	100	31,49	-3,02	27,37
	100	42,33	89,58	89,70
150 mW, 60dk	100	19,67	11,80	26,36
	100	46,04	21,67	48,14
150 mW, 90dk	100	-44,80	21,57	-25,74
	100	9,56	-14,76	-12,29
500 mW, 0dk	100	-138,48	-474,58	-196,62
	100	21,13	62,24	54,88
500 mW, 30dk	100	20,22	60,24	73,03
	100	16,90	24,64	32,71
500 mW, 60dk	100	-179,86	-44,27	-105,15
	100	-12,68	-71,87	-12,80
500 mW, 90dk	100	32,11	36,57	13,15
	100	12,51	17,65	25,96

Tek yönlü varyans analizinin uygulandığı verilerde 0.05 anlamlılık düzeyi temel alınmıştır (IBM-SPSS Statistics v.21). Çoklu karşılaştırmaların için kullanılan Post-Hoc Tukey testi ile gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar araştırılmıştır. Güç ve zaman parametreleri için ayrı ayrı uygulanan testin sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır, fakat özellikle 4. Gün sonuçları esas alındığında 250 mW güç-60 dakika uygulamasının göreceli olarak başarılı olduğu sonucuna varılmıştır (tablo 4.3 ve tablo 4.4).

Tablo 4.3: Güç Parametrelerine Bağlı Post-Hoc Tukey Test Sonuçları.

Tukey HSD

	N	Subset for alpha
Güç		= 0.05
		1
250	8	40,10
150	8	72,80
500	8	114,36
Sig.		,052

Tablo 4.4: Zaman Parametrelerine Bağlı Post-Hoc Tukey Test Sonuçları.

Tukey HSD

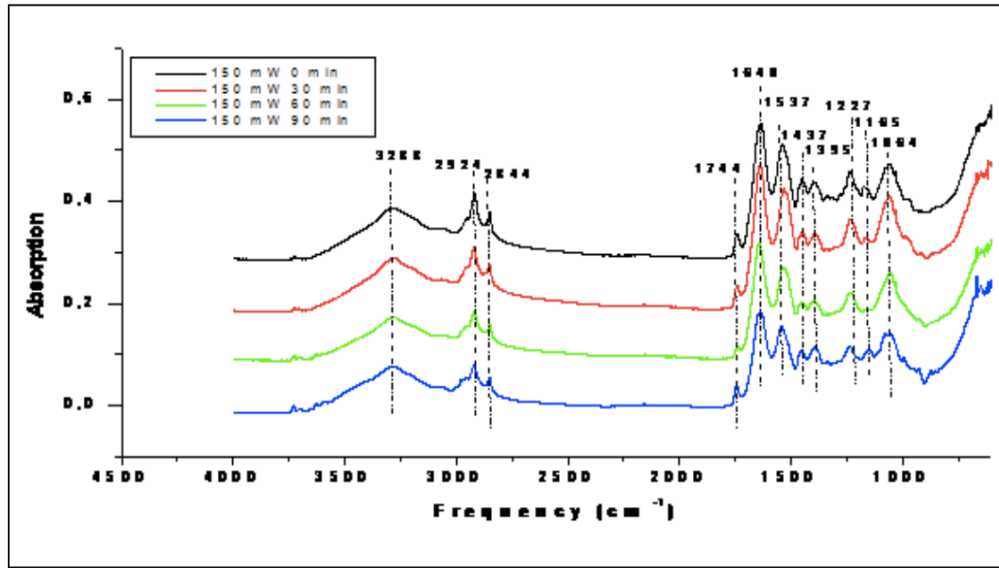
	N	Subset for alpha
Zaman		= 0.05
		1
90	6	43,59
30	6	76,23
60	6	35,65
0	6	97,53
Sig.		,502

250 mW gücündeki uygulamaların tedavi sürecinde meydana gelen tümör küçülme oranları, diğer uygulamalara kıyasla daha tutarlı olduğu gözlemlenmiştir. 250 mW uygulaması için

tümör dokusunun büyümesi gibi bir durumla karşılaşılmamıştır. Oysaki 150 mW ve 500 mW lık gruplarda bazı uygulamalarda tümör dokusunun gelişiminin devam ettiği hatta boyutun ilk ölçülen değere kıyasla 2-3 katına çıkmış olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda 250 mW lık lazer gücünün diğerlerine nispeten daha ideal bir uygulama gücü olduğu sonucu çıkarılmıştır.

4.3. FTIR SPEKTROSKOPİ ANALİZ SONUÇLARI

Çalışmanın bu kısmında FTIR spektroskopisi kullanılarak zamana bağlı olarak değişen uygulamalarla hücre yaşamsallığı arasındaki ilişki ve aynı zamanda meydana gelen biyomoleküler değişiklikler belirlenmiştir. İntraperitonel olarak 5 mg/kg ICG verildikten sonra 150 mW gücünde 0, 30, 60, 90 dakikalarda başlanılan Fotodinamik Terapi uygulamalarından sonra çıkarılarak FT-IR spektroskopisi ile analizleri yapılan dokulardaki hücre ölümleri sırasında biyomolekülerin absorbanlarında meydana gelen değişikliklere ait spektrum Şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.3: FT-IR spektrumları. Şekilde 150 mW gücünde 0, 30, 60 ve 90 dakikalarda yapılan ICG tabanlı Fotodinamik Terapiden sonra dokulardaki biyomoleküllerin absorbanlarında meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir.

150 mW Uygulamasının spektrum analizi;

1. KISIM: 1743cm^{-1} C=O salınım lipidlerden kaynaklanmaktadır. 1456cm^{-1} protein ve lipidlerdeki CH_3 eğilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. İkisi arasındaki oran, normal dokudan tümör dokuya geçildiğinde azalma göstermektedir.

150 mW - 0 dk	150 mW - 30 dk	150 mW - 60 dk	150 mW - 90 dk
0,03487/0,13985=0,2493	0,03489/0,13856=0,2518	0,01285/0,10033=0,1280	0,03895/0,10813=0,3602

2. KISIM: 1657 cm^{-1} amide I proteinin alfa heliks yapısından kaynaklanmaktadır.

1635 cm^{-1} amide I proteinlerinin beta sheet yapısından kaynaklanıyor. 1540 cm^{-1} amide II proteinlerinin beta sheetlerinden kaynaklanıyor. 1553 cm^{-1} amide II proteierinin alfa sheet yapısından kaynaklanıyor. 1657/1635 ve 1553/1540 oranının yüksek olması dokunun karsinom ve fibroödem olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

150 mW - 0 dk	150 mW - 30 dk	150 mW - 60 dk	150 mW - 90 dk	
0,2134/0,2535=0,8418	0,21894/0,26755=0,8183	0,18913/0,20814=0,9086	0,15996/0,18173=0,8802	1657/1635
0,18932/0,20981=0,9023	0,17516/0,21591=0,8112	0,14001/0,16746=0,8360	0,14406/0,15395=0,9357	1553/1540

Malignant dokularda amide I proteinlerinin alfa heliks bandından kaynaklanan frekansın (1657 cm^{-1}) şiddetinde azalma gözlenirken, amide I proteinlerinin beta sheet bandından kaynaklanan frekansında (1635 cm^{-1}) artış gözlenmektedir.

3. KISIM: 3000-3600 cm^{-1} frekans bandları O-H salınımından kaynaklanmaktadır.

150 mW 0 dk		150 mW 30 dk		150 mW 60 dk		150 mW 90 dk		Tümör odak (Negatif kontrol)	
3284	0,0873	3279	0,08877	3275	0,07199	3281,286	0,07648	3289	0,08734

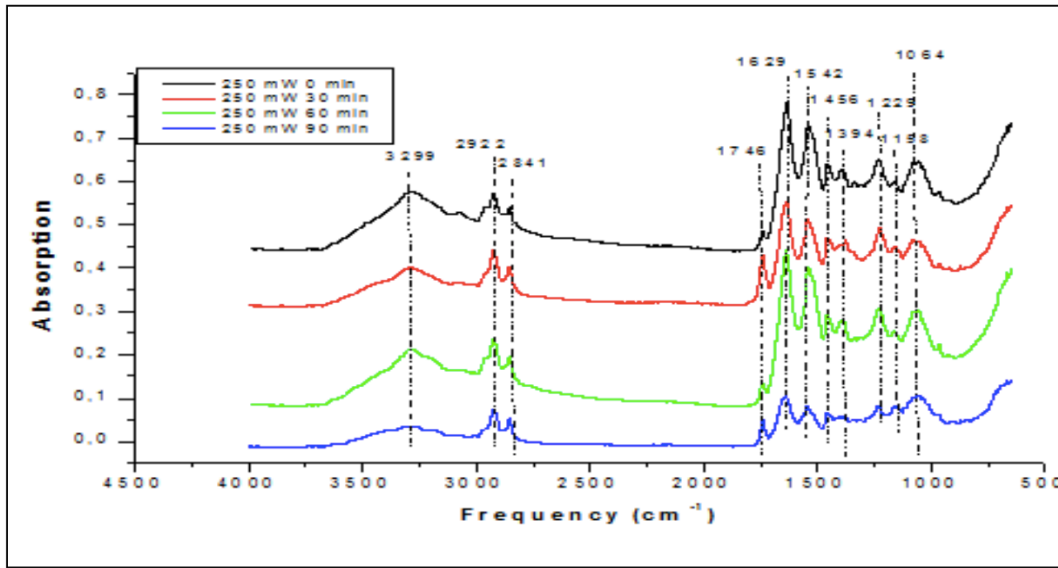
4.KISIM: 2800 ile 3500 cm^{-1} arasında yoğunluğun normal dokuda yüksek olması beklenmektedir (kreatin, fosfolipit ve kolesterolden kaynaklanmaktadır).

5. KISIM: 1050 ile 1080 cm^{-1} arasında oksidatif strese bağlı olarak DNA da oluşan hasarı niteleyen bir tepeciktir. Uygulanan bu tedavi sırasında hücresel oksidatif bir stresin meydana geldiğinin işaretidir.

150 mW 0 dk	150 mW 30 dk	150 mW 60 dk	150 mW 90 dk	
0,17292	0,20973	0,15607	0,1357	1064 cm^{-1}

6. KISIM: 1227 cm^{-1} ve 1165 cm^{-1} olan bantlar nükleik asitlerden kaynaklanmaktadır.

İntraperitoneal olarak 5 mg/kg ICG verildikten sonra 250 mW güçte 0., 30., 60., 90. dakika larda başlanılan Fotodinamik Terapi uygulamalarından sonra çıkarılarak FTIR spektroskopisi ile analizleri yapılan dokulardaki hücre ölümleri sırasında biyomoleküllerin absorpsiyonlarında meydana gelen değişikliklere ait spektrum Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4: FT-IR spektrumları. Şekilde 250 mW güçte 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda yapılan ICG tabanlı Fotodinamik Terapiden sonra dokulardaki biyomoleküllerin absorpsiyonlarında meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir.

250 mW Uygulamasının Spektrum Analizi:

1. KISIM: 1743 cm^{-1} C=O salınımı lipidlerden kaynaklanmaktadır. 1456 cm^{-1} protein ve lipidlerdeki CH_3 eğilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. İkisi arasındaki oran, normal dokudan tümör dokuya geçildiğinde azalma göstermektedir.

250 mW 0 dk	250 mW 30 dk	250 mW 60 dk	250 mW 90 dk
0,02385/0,17722= 0,1345	0,108505/0,14947= 0,7259	0,03544/0,1852= 0,1913	0,0479/0,06632= 0,7222

2. KISIM: 1657 cm^{-1} amide I proteininin alfa heliks yapısından kaynaklanmaktadır.

1635 cm^{-1} amide I proteinlerinin beta sheet yapısından kaynaklanıyor. 1540 cm^{-1} amide II proteinlerinin beta sheetlerinden kaynaklanıyor. 1553 cm^{-1} amide II proteinlerinin alfa sheet yapısından kaynaklanmaktadır. 1657/1635 ve 1553/1540 oranının yüksek olması dokunun karsinom ve fibroödem olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

250 mW 0 dk	250 mW 30 dk	250 mW 60 dk	250 mW 90 dk	
0,25519/0,32205= 0,7923	0,199185/0,233395= 0,8534	0,27669/0,3406= 0,8123	0,09616/0,10356= 0,9281	1657/1635
0,2391/0,26973= 0,8864	0,17481/0,193345= 0,9044	0,25022/0,292= 0,8569	0,07599/0,07862= 0,966	1553/1540

Malignant dokularda amide I proteinlerinin alfa heliks bandından kaynaklanan frekansın (1657 cm^{-1}) şiddetinde azalma gözlenirken, amide I proteinlerinin beta sheet bandından kaynaklanan frekansında (1635 cm^{-1}) artış gözlenmektedir.

3. KISIM: 3000-3600 cm^{-1} frekans bandlarını göstermekte olup O-H salınımından kaynaklanmaktadır.

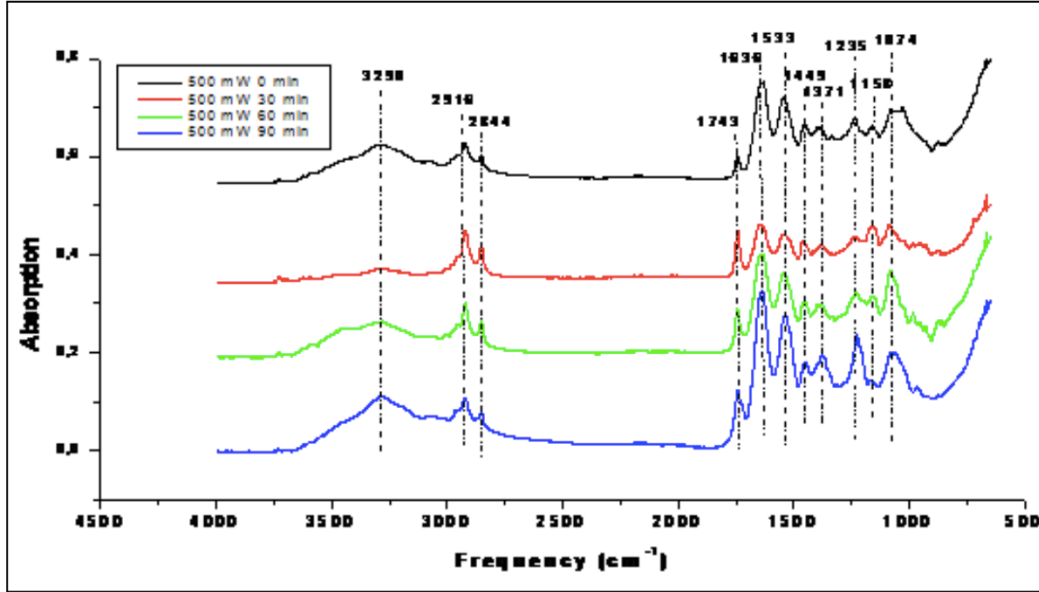
4. KISIM: 2800 ile 3500 cm^{-1} arasında yoğunluğun normal dokuda yüksek olması beklenmektedir (kreatin, fosfolipit ve kolesterolden kaynaklanmaktadır).

5. KISIM: 1050 ile 1080 cm^{-1} arasında oksidatif strese bağlı olarak DNA da oluşan hasarı niteleyen bir tepecedir. Uygulanan bu tedavi sırasında hücrelerde oksidatif bir stresin meydana geldiğinin işaretidir. 1064 cm^{-1} salınımı ribozdan kaynaklanmaktadır.

250 mW 0 dk	250 mW 30 dk	250 mW 60 dk	250 mW 90 dk	
0,18632	0,141245	0,20238	0,10635	1064 cm^{-1}

6. KISIM: 1229 cm^{-1} ve 1158 cm^{-1} nükleik asitlerden kaynaklanan bandlardır.

İntraperitonel olarak 5 mg/kg ICG verildikten sonra 500 mW güçle 0., 30. ve 60. dakikalarda başlanılan Fotodinamik Terapi uygulamalarından sonra çıkarılarak FT-IR spektroskopisi ile analizleri yapılan dokulardaki hücre ölümleri sırasında biyomolekülerin absorpsiyonlarında meydana gelen değişikliklere ait spektrum Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5: FT-IR spektrumları. Şekilde 500 mW güçle 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda yapılan ICG tabanlı Fotodinamik Terapiden sonra dokulardaki biyomoleküllerin absorpsiyonlarında meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir.

500 mW Uygulamasının Spektrum Analizi:

1. KISIM: 1743 cm^{-1} C=O salınımı lipidlerden kaynaklanmaktadır. 1456 cm^{-1} protein ve lipitlerdeki CH_3 eğilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. İki arasında oran, normal dokudan tümör dokuya geçildiğinde azalma göstermektedir.

500 mW 0 dk	500 mW 30 dk	500 mW 60 dk	500 mW 90 dk
0.444	1.2802	0.868	0.680

2.KISIM: 1657 cm^{-1} amide I proteinlerinin alfa heliks yapısından kaynaklanıyor. 1635 cm^{-1} amide I proteinlerinin beta sheet yapısından kaynaklanıyor. 1540 cm^{-1} amide II proteinlerinin beta sheetlerinden kaynaklanıyor 1553 cm^{-1} amide II proteierinin alfa sheet yapısından

kaynaklanıyor. 1657/1635 ve 1553/1540 oranının yüksek olması dokunun karsinom ve fibroödem olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Mal igna	500 mW 0 dk		500 mW 30 dk		500 mW 60 dk		500 mW 90 dk		Tümör odağı (negatif kontrol)	
		3278,393	0,07479	3286,589	0,02184	3292,375	0,06312	3280,804	0,11076	3289

nt dokularda amide I proteinlerinin alfa heliks bandından kaynaklanan frekansın (1657 cm^{-1}) şiddetinde azalma gözlenirken, amide I proteinlerinin beta sheet bandından kaynaklanan frekansında (1635 cm^{-1}) artış gözlenmektedir.

3. KISIM: $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ frekans bandlarındaki düşük yoğunluk dokunun karsinom olduğunun başka bir göstergesidir.

500 mW 0 dk	500 mW 30 dk	500 mW 60 dk	500 mW 90 dk	
$0,175335/0,200985=$ 0.872	$0,10236/0,109145=$ 1.0089	$0,181185/0,201105=$ 0.900	$0,27688/0,32486=$ 0.852	1657/1635
$0,15971/0,165725=$ 0.963	$0,084515/0,09045=$ 0.934	$0,15151/0,1631=$ 0.2401	$0,24231/0,27287=$ 0.8880	1553/1540

4. KISIM: 2916 cm^{-1} kreatin ve fosfolipitlerden kaynaklanmaktadır ve normal doku da oranları daha yüksek olması beklenmektedir.

5. KISIM: 2852 cm^{-1} salınımı lipidlerdeki CH₂ moleküllerinden kaynaklanmaktadır.

6. KISIM: 1067 cm^{-1} oksitativ strese bağlı olarak DNA da oluşan hasarı niteleyen bir tepectir. Tedavi sırasında hücrelerde oksitativ bir stresin meydana geldiğinin belirteci kabul

edilmektedir. 1064 cm^{-1} ise ribozdan kaynaklanır. Oksidatif strese bağı mitokondriyal RNA'dan kaynaklanabilir.

500 mW 0 dk	500 mW 30 dk	500 mW 60 dk	500 mW 90 dk	
0,1414	0,094765	0,1487	0,19989	1064 cm^{-1}

7. KISIM: 1235 cm^{-1} ve 1147 cm^{-1} nükleik asitlerden kaynaklanan bandlardır.

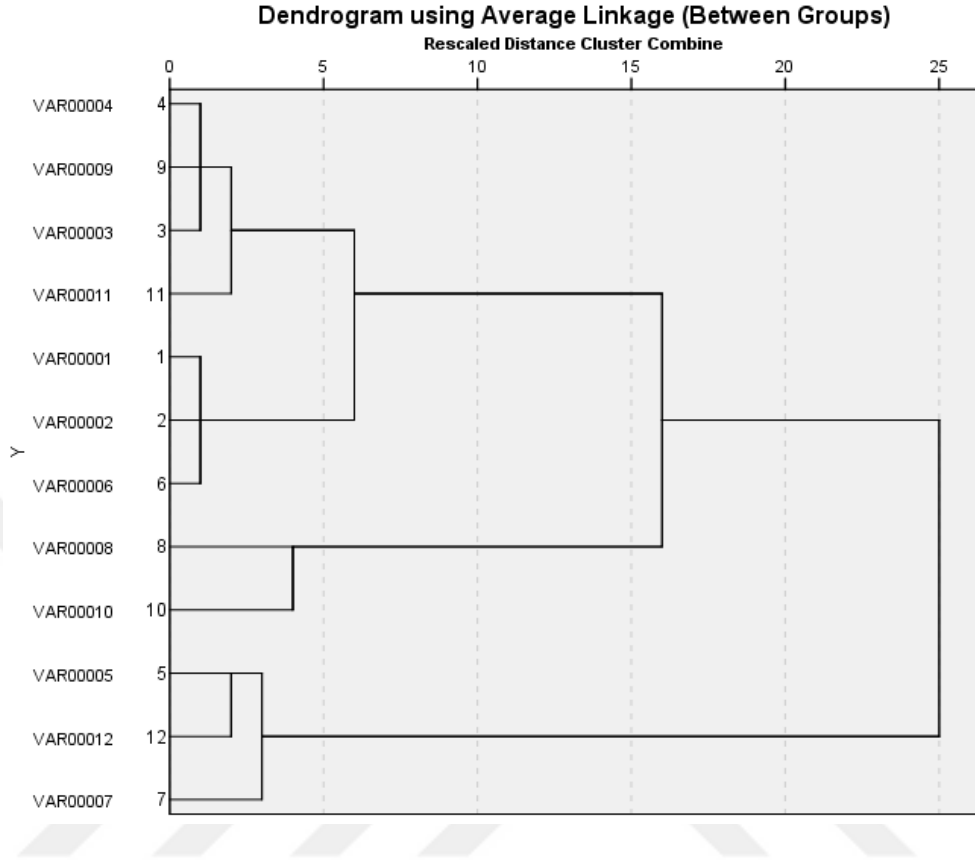
Optimal uygulama parametresini belirleme adına yapılan FTIR çalışmasında incelenen örneklerin tümünün bir tümör doku özelliğini barındırdığı, ilgili moleküllerin bandlarına ve bu bandlardan ilgili olanların oranlarına bakılarak söylenilebilir. Tedavi etkinliği belirlemek için hücre ölüm şeklinin önemli bir kıstas olduğu düşünülmektedir.

Kümeleme analizlerinin yapıldığı dendogram testleri gruplar arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Aşağıda önemli organik moleküller için deneysel grupların bağıntıları incelenmiştir.

Tablo 4.5: Dendogram Küme Analizi Deney Grupları.

VAR00001: 150 mW 0. dk	VAR00005: 250 mW 0. dk	VAR00009: 500 mW 0. dk
VAR00002: 150 mW 30. dk	VAR00006: 250 mW 30. dk	VAR00010: 500 mW 30. dk
VAR00003: 150 mW 60. dk	VAR00007: 250 mW 60. dk	VAR00011: 500 mW 60. dk
VAR00004: 150 mW 90. dk	VAR00008: 250 mW 90. dk	VAR00012: 500 mW 90. dk

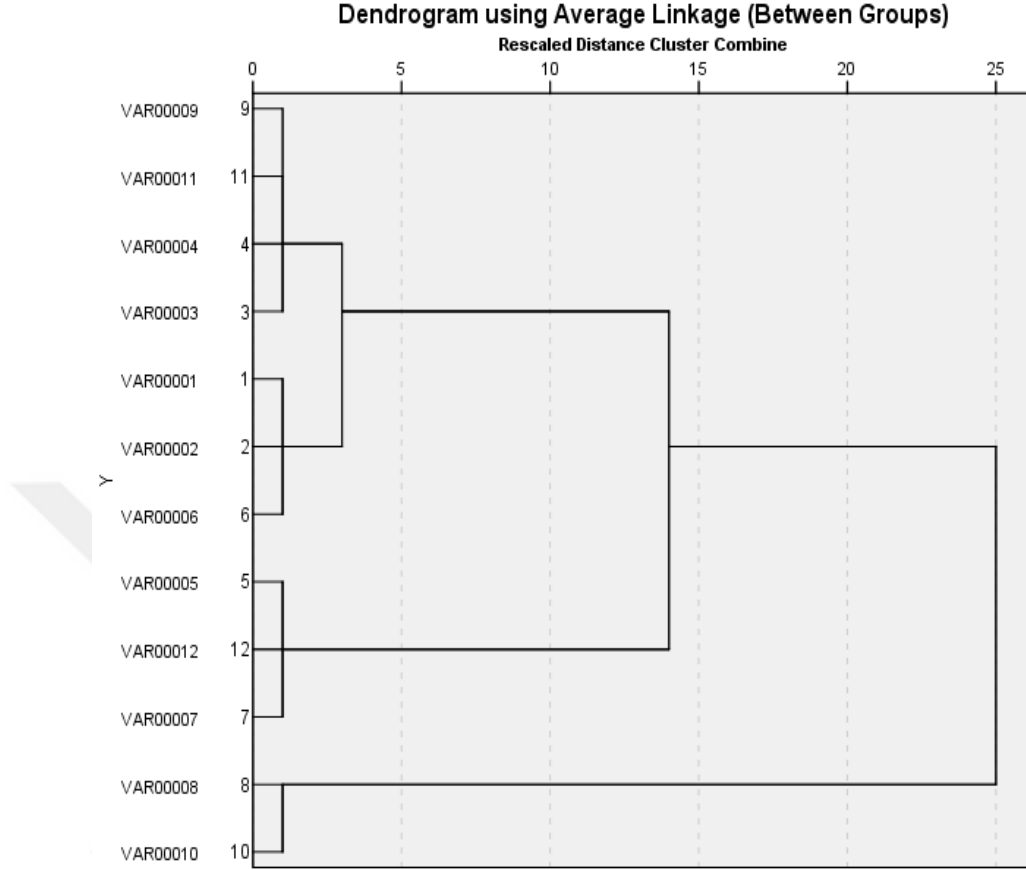
LİPİD BANDI KÜME ANALİZİ:



Şekil 4.6: Optimizasyon Deneylerinin Kızılaltı Spektrumunda Hiyerarşik Küme Analizinin Dendrogram ile gösterimi. Lipit bandı (3120 - 2800cm⁻¹).

Lipit bandı için elde edilen sonuçlar şu şekildedir; 1.KÜME: 250mW 0.dk, 250mW 60.dk ve 500mW 90.dakika. 2.KÜME: 250mW 90.dk ve 500mW 30.dakika. 3. KÜME: 150mW 0-30-60-90. dk; 250 mW 30. dk; 500 mW0. dk; 500 mW 60. dakikadan oluşmaktadır.

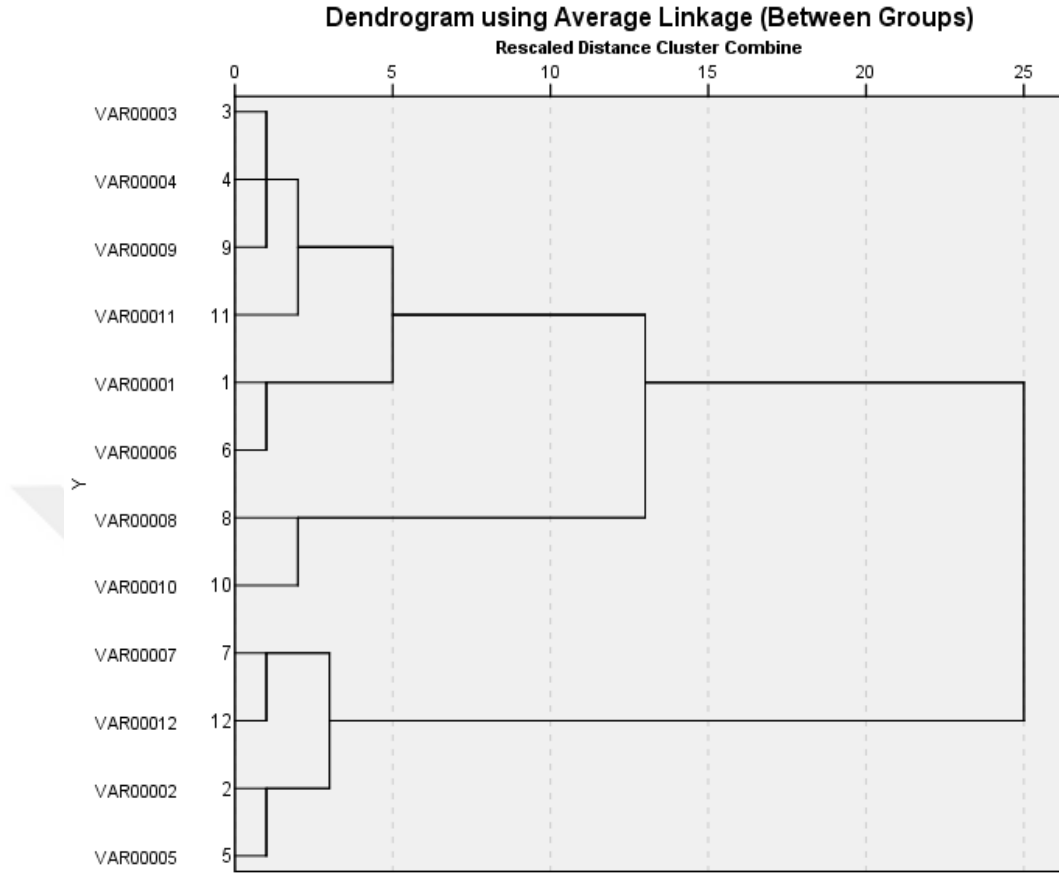
PROTEIN BANDI KÜME ANALİZİ:



Şekil 4.7: Optimizasyon DeneYleri İnfıred Spektrum Analizlerinin Hiyerarşık Küme Analizinin Dendrogram ile gösterimi. Protein bandı ($1700 - 1510\text{cm}^{-1}$).

Protein bandı ile lipit bandı kümelerinin eşdeğer olduğu bulunmuştur.

NÜKLEİK ASİT BANDI KÜME ANALİZİ:



Şekil 4.8: Optimizasyon Deneyle İnfared Spektrum Analizlerinin Hiyerarşik Küme Analizinin Dendrogram ile gösterimi. Nükleik asit bandı ($1290 - 1010 \text{ cm}^{-1}$).

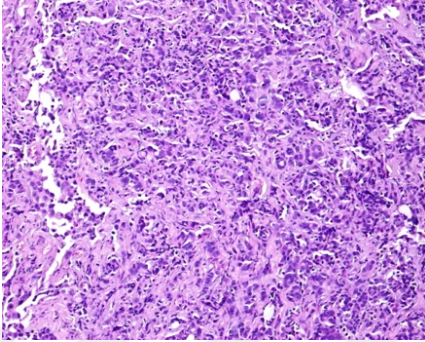
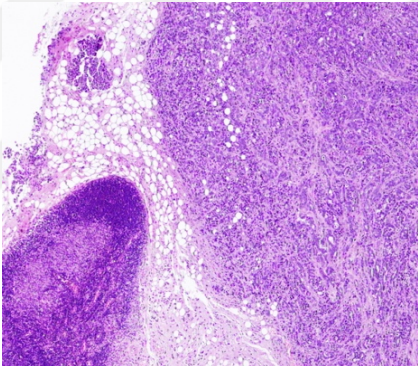
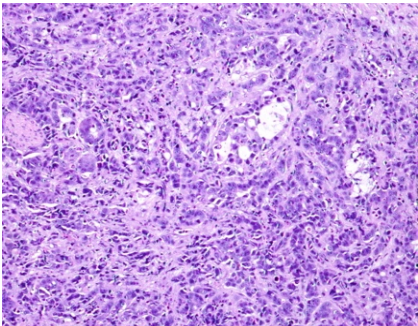
Nükleik asit bandında diğer iki analize kıyasla tek değişiklik 150 mW 30. dk uygulaması 3. kümede değil 1. kümede yer almış olmasıdır.

FTIR Kümeleme Analizi sonuçlarına göre optimal parametreler; 150 mW 30. dk, 250 mW 0. dk, 250 mW 60. dk, ve 500 mW 90 dk uygulamalarıdır. Daha önceki analiz yöntemleri de dikkate alındığından 250 mW uygulamasının seçilmesinin daha uygun olduğu sonucuna varılmaktadır. Bu durumda en iyi sonuçlar; 250 mW 60 dakika ve 250 mW 0 dakika uygulamalarıdır. Floresans görüntüleme sonuçlarında 250 mW 60 dakika uygulaması sonucuna varılmıştı. Patoloji sonuçlarının da değerlendirilmesinden sonra ana deney parametresi seçimi kesinleştirilecektir.

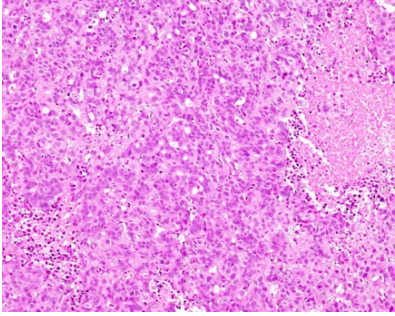
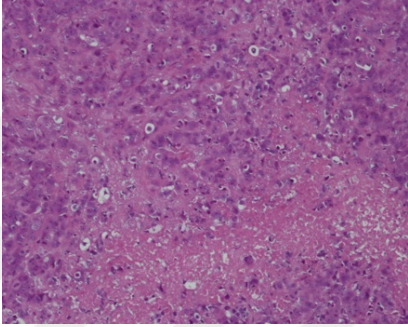
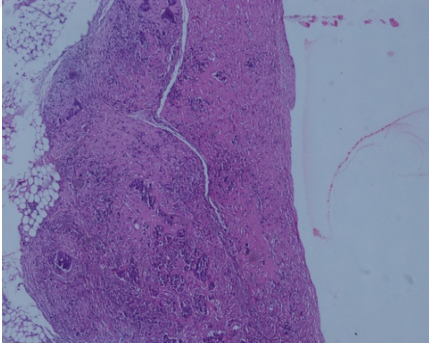
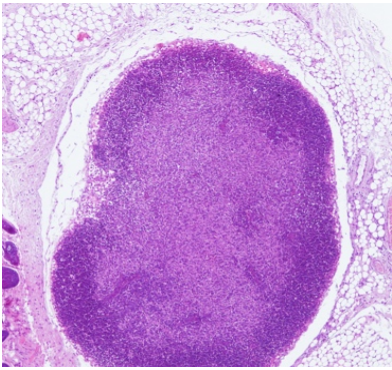
4.4. HİSTOPATOLOJİ SONUÇLARI

Tedavi süreci bittikten deneklerden çıkarılan tümör dokusunun patolojik inceleme raporu tablo 4.6'da sunulmuştur. Tümör doku Payne-Miller Gradlama sistemine göre skorlanmıştır.

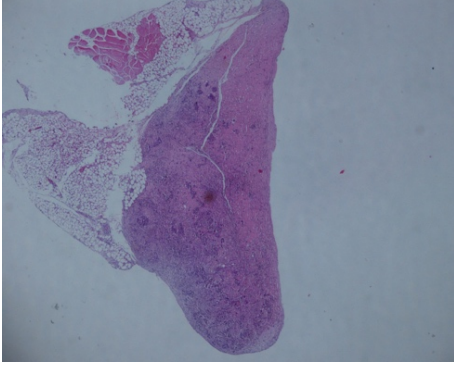
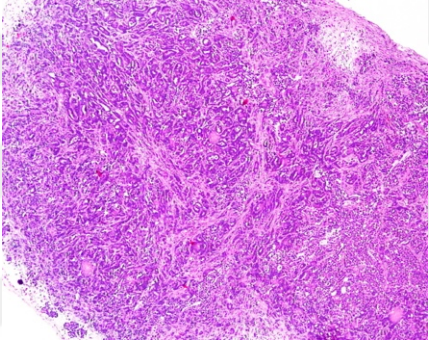
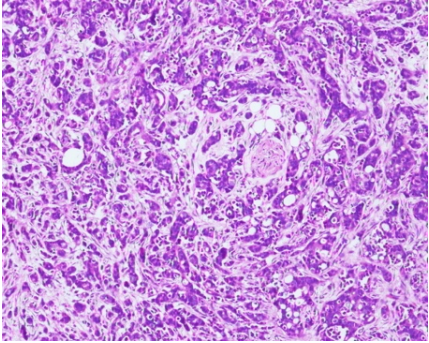
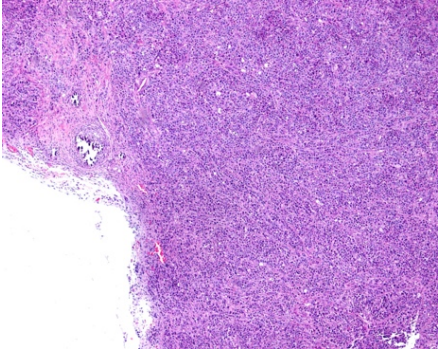
Tablo 4.6: Optimizasyon Deneyleri Histoloji Sonuçları.

DENEK: 150 mW, 0 dk		0,4 cm çapta kanser dokusu. Nekroz görülmedi. Ölüme giden hücreler (apoptoz) var, bağ dokusu artışı var. (Payne Miller 1/5)
DENEK: 150 mW, 30 dk		0,5 cm çapında kanser dokusu komşuluğunda 0,2 cm çaplı lenf bezi kesiti görülüyor. Kanser dokuda nekroz yok, ancak ölüme giden hücreler ve kısmen bağ dokusu artımı var. Lenf nodülü tedaviye yanıt vermiş izlenimi eriyor. (Payne Miller 2/5)
DENEK: 150 mW, 60 dk		0,3 cm çapta kanser dokusu. Nekroz yok/ Bol apoptoz ve bağ dokusu var. (Payne Miller 2/5)

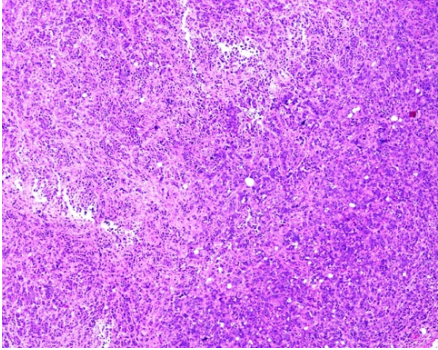
Tablo 4.6 (devam): Optimizasyon Deneyleri Histoloji Sonuçları.

DENEK: 150 mW, 90 dk		2x1,5 cm çapta kanser dokusu. %10 nekroz ve bol apoptoz. (Payne Miller 2/5)
DENEK: 250 mW, 0 dk		0,8 cm çapta itici sınırlarla büyüyen kanser dokusu. %10 nekroz. (Payne Miller 2/5)
DENEK: 250 mW, 30 dk		0,3 cm çaplı tümör. Ekspansil sınırlı/ Nekroz yok/ Tümör dokusunun yerini alan fibroelastotik stroma, tümör dokusu kaybı %50. (Payne-Miller 3/5)
DENEK: 250 mW, 60 dk		0,4 cm çaplı lenf nodülü. Merkezde soluk görünen alanda tedavi ile ortadan kalkmış tümör dokusunun yerini almış izlenimi veren yoğun bağ doku görüntüsü. (Payne Miller 5/5)

Tablo 4.6 (devam): Optimizasyon Deneyleri Histoloji Sonuçları.

DENEK: 250 mW, 90 dk		0,3 cm çaplı kanser dokusu, fibröz doku artışı. Nekroz yok, ölüme giden tek hücre ve gruplar. (Payne Miller 3/5)
DENEK: 500 mW, 0 dk		0,3 cm çaplı tümör dokusu, ekspansil sınırlı, nekroz yok, bol apoptoz var. (Payne-Miller 1/5)
DENEK: 500 mW, 30 dk		0,4 cm çapta kanser dokusu ve tümör dokunun yerini alan fibrozis, apoptoz. (Payne Miller 2/5)
DENEK: 500 mW, 60 dk		0,3 cm çapta kanser dokusu. Tümör dokusunun yerini alan fibrozis, apoptoz. (Payne Miller 2/5)

Tablo 4.6 (devam): Optimizasyon Deneyleri Histoloji Sonuçları.

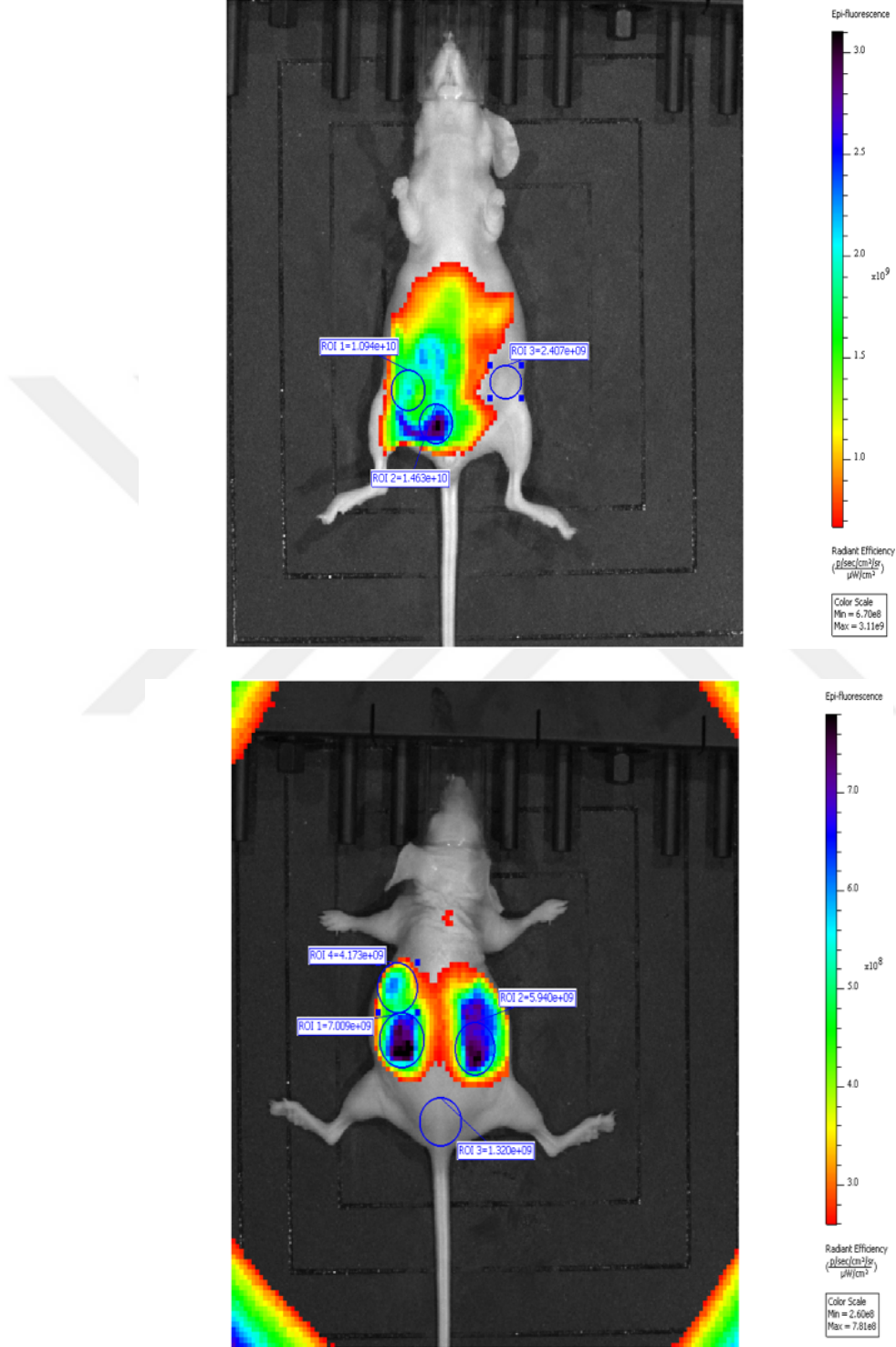
DENEK: 500 mW, 90 dk		0,6 cm çaplı itici sınırlı kanser dokusu. Nekroz görülmedi. Bol apoptoz (ölüme giden tümör hücresi) var. Ara dokuda hafif fibrozis. (Payne Miller 2/5)
-------------------------	---	--

Histoloji analiz sonuçları optimizasyon deneylerinin tamamına yakınında tümörlü dokuda apoptozun veya nekrozun başladığını işaret etmektedir. Histoloji analizleri 250 mW lık uygulamanın oldukça başarılı olduğunu göstermektedir. Özellikle 60 dakikalık uygulamanın sonucunda tüm tümör odağının kaldırılmış olması ve tümörlü dokunun tamamının yerini bağ dokusunun alması bu uygulamalar için tedavinin patolojik tam cevap verdiğini göstermektedir.

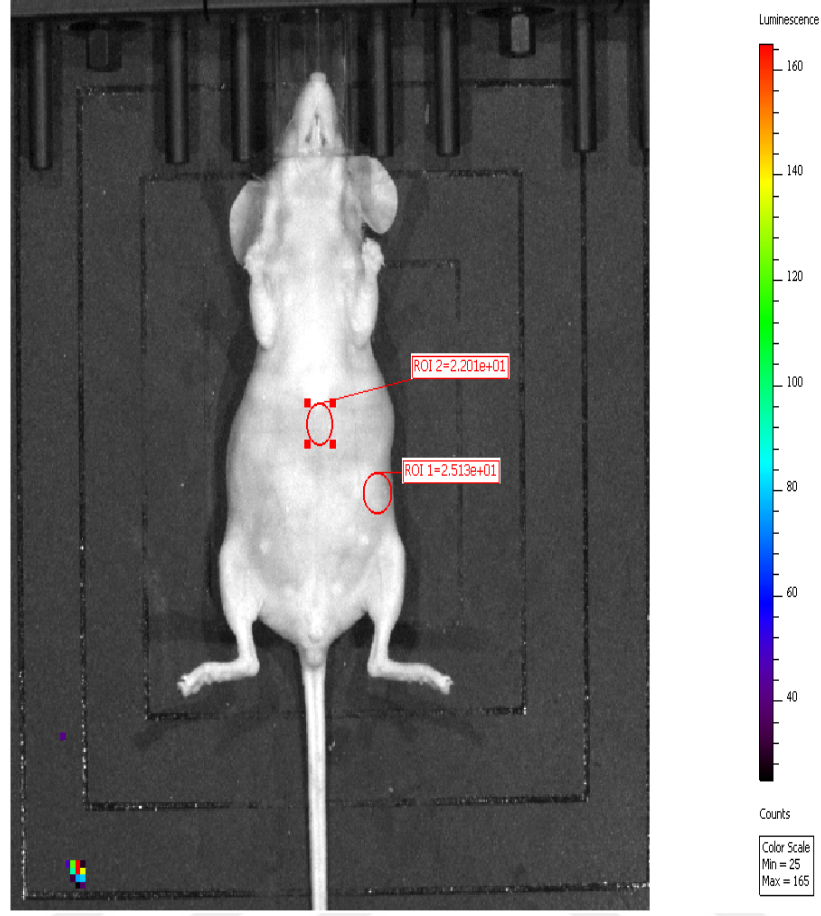
Bu bölümde ön deneylerin kapsamlı analizleri yapılmıştır. Makro tümör analizleri, floresans görüntüleme analizi ve FTIR analizleri istatistiki anlamda net bir parametre ortaya koyamamış olsa da özellikle 250 mW lık uygulamaların umut vaat edici olduğunu söyleyebiliriz (Tukey testinde anlamlılık değerlerinin 0.05 ten büyük olmasına rağmen güç ve zaman parametrelerinde 250 mW ve 60 dk. nin en düşük değerlerde olması, FTIR analizinde en iyi kümede 250 mW lık iki uygulama bulunması). Histoloji analizleri ilk iki denemeyi destekleyici nitelikte olmuştur. Yukarıda bahsi geçen, tümör dokusunun tamamının temizlendiği çalışma 250 mW – 60 dk. uygulamasının ana deneyler için kullanılabilir optimal bir parametre olduğu tezini güçlendirmiştir.

4.5. ANA DENEYLERİN SONUÇLARI VE ANALİZİ

4.5.1. In Vivo Floresans Görüntüleme Analizi



Şekil 4.9: Intraperitoneal ICG enjeksiyonun 60 dakika sonrasındaki akümülyasyonun dorsoventral ve dorsal ölçümleri ile değerleri sağ skalada vermiştir, color table: rainbow 2 mod ile denekler görüntülenmiştir.



Şekil 4.10: ICG enjeksiyonu yapılmadan sadece çıplak tümörün autofloresansı fare dorsoventral pozisyonda iken ölçülmüştür. Değer skalası sağda verilmiştir.

Optimizasyon çalışmasının sonucunda 250 mW 60 parametresi optimum bulunduğu için denek fareye i.p. ICG enjeksiyonu yapıp 60 dakika karanlıkta tutulduktan sonra dorsoventral ve dorsal olarak tümör bölgesi, enjeksiyon yeri ve backgroundda ROI değerleri skalada verilen formülasyon olan 4.1'e göre cihaz tarafından hesaplanıp görüntüler üzerinde verilmiştir. ICG verilmeden (şekil 4.10) tümör çıplak iken görüntülediğinde ışığa elde edilememiştir.

$$\text{Radiant Efficiency (Erkesel Verim)} = \frac{\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}}{\mu\text{W/cm}^2} \quad (4.1)$$

4.5.2. Makro Tümör Gelişim Analizi

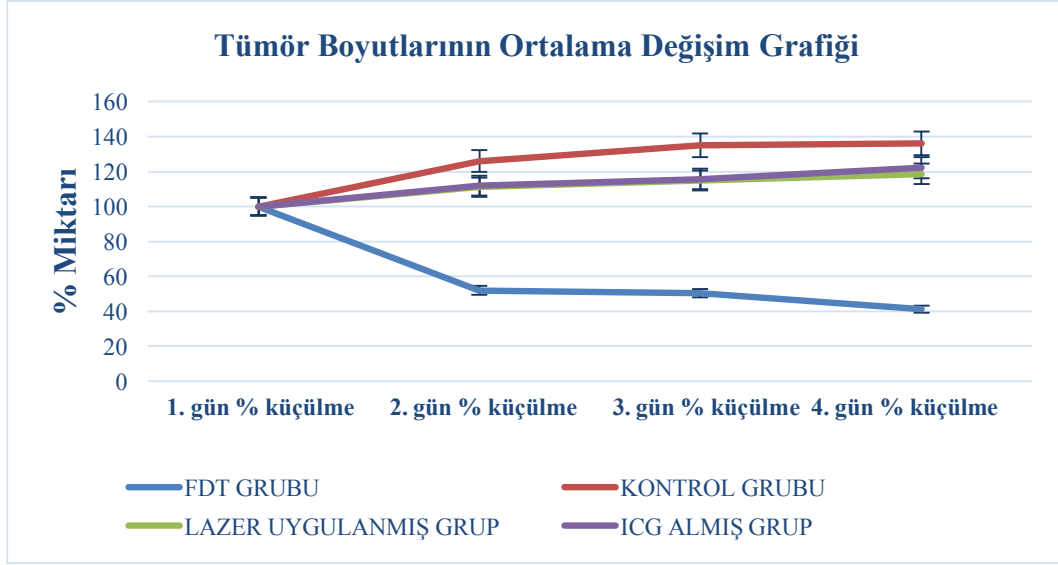
Dört gün boyunca uygulanan tedavi süresince R1-R2 çap ve derinlik ölçümleri elektronik kumpas ile alınmıştır. Bu ölçümlere karşılık gelen elipsoit hacimleri de hesaplanarak tümörün tahmini-yaklaşık boyutları ve buna bağlı yüzde küçülme miktarları aşağıdaki tablolarda belirtilmiştir (Tablo 4.7 ve Tablo 4.8).

Tablo 4.7: Ana Deney Kontrol Gruplarına ait elipsoit hacimlerinin 4 günlük takip süresince elde edilen sonuçlarını göstermektedir.

Parametre	1. gün %100	2. gün % küçülme	3. gün % küçülme	4. gün % küçülme
Kontrol Grubu (tümör)	100	-26.04	-35.37	-36.80
Kontrol Grubu (tümör)	100	-25.34	-30.32	-33.5
Kontrol Grubu (tümör)	100	-26.40	-27.39	-38.3
Lazer uygulanmış grup (250 mW)	100	-11.14	-14.78	-18.69
Lazer uygulanmış grup (250 mW)	100	-21.61	-27.46	-20.31
Lazer uygulanmış grup (250 mW)	100	-15.46	-17.21	-20.48
ICG Almış Grup (60 dk akümülayon süresi)	100	-11.87	-15.75	-22.25
ICG Almış Grup (60 dk akümülayon süresi)	100	-0.02	-10.35	-13.41
ICG Almış Grup (60 dk akümülayon süresi)	100	-6.44	-2.78	-17.04

Tablo 4.8: Ana Deney Grubunun FDT tedavisine ait elipsoit hacimlerinin 4 günlük takip süresince elde edilen sonuçlarını göstermektedir

Parametre	1. gün %100	2. gün % küçülme	3. gün % küçülme	4. gün % küçülme
FDT 250 mW 60 dk	100	54.23	50.41	41,23
FDT 250 mW 60 dk	100	64.33	50.59	43,11
FDT 250 mW 60 dk	100	44.50	39.87	39.02
FDT 250 mW 60 dk	100	55.68	41.80	37,28
FDT 250 mW 60 dk	100	49.45	46.86	44,06
FDT 250 mW 60 dk	100	65.37	55.60	47,67
FDT 250 mW 60 dk	100	56.23	45.50	43,37
FDT 250 mW 60 dk	100	67.24	64.25	59,45



Şekil 4.11: Tümör boyutlarının yüzde (%) değişimlerinin kontrol grupları ile karşılaştırılması yapılmıştır.

Kontrol (Tümör) boyutları 4. günün sonunda %40 lara kadar artış gösterirken LAZER ve ICG gruplarında bu oran yaklaşık olarak %20 civarlarında kalmıştır. FDT grubunda ise 4. gün sonunda tümör çapının yaklaşık olarak %60 küçüldüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.11).

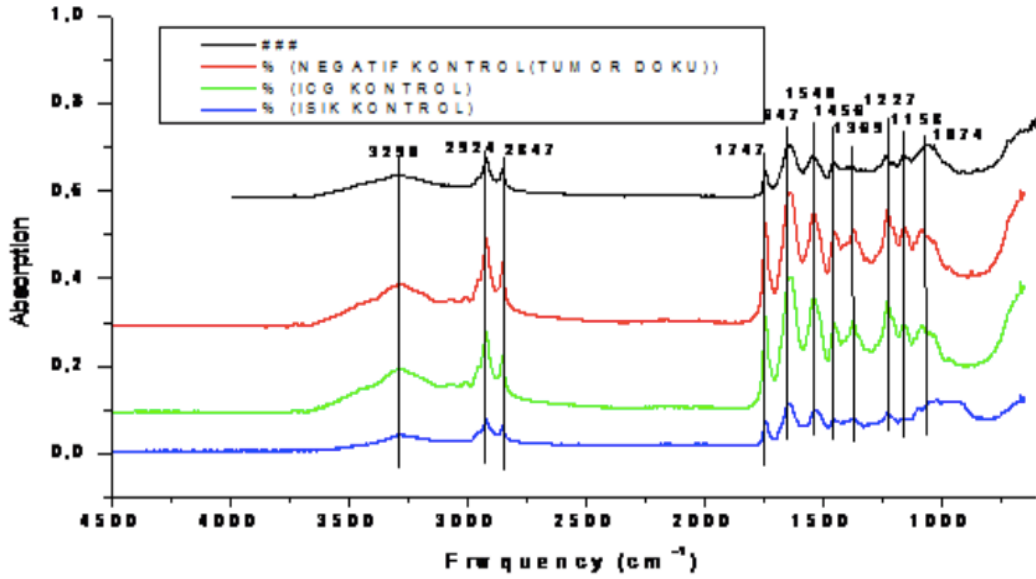
Grup içerisinde ve gruplar arasında varyans çok düşük olduğu (bazı durumlarda olmadığı) için ANOVA testi sağlıklı bir sonuç vermemiştir. Grupların ikili olarak karşılaştırıldığı Paired- Sample T-Test uygulanmış ve aşağıdaki tabloda verilen anlamlılık değerleri elde edilmiştir.

Tablo 4.9: Paired Sample T-Test Sonuçları Tablosu.

	Paired Differences	t	df	Sig. (2-tailed)
	95% Confidence Interval of the Difference			
	Upper			
Pair 1 TUMOR2 - ICG2	40,27972	6,768	7	,000
Pair 2 TUMOR2-LASER2	39,62372	4,259	7	,004
Pair 3 TUMOR2 - PDT2	63,53429	8,346	7	,000
Pair 4 ICG2 - LASER2	7,46575	-,873	7	,411
Pair 5 ICG2 - PDT2	30,46637	4,300	7	,004
Pair 6 LASER2 - PDT2	39,77390	3,609	7	,009
Pair 7 TUMOR3 - ICG3	51,64319	5,271	7	,001
Pair 8 TUMOR3-LASER3	48,73524	5,174	7	,001
Pair 9 TUMOR3 - PDT3	104,01595	8,999	7	,000
Pair 10 ICG3 - LASER3	5,21578	-,702	7	,506
Pair 11 ICG3 - PDT3	62,95508	6,805	7	,000
Pair 12 LASER3 - PDT3	60,56981	9,931	7	,000
Pair 13 TUMOR4 - ICG4	42,89880	4,947	7	,002
Pair 14 TUMOR4-LASER4	44,62879	7,094	7	,000
Pair 15 TUMOR4 - PDT4	122,27338	15,531	7	,000
Pair 16 ICG4 - LASER4	10,69050	1,685	7	,136
Pair 17 ICG4 - PDT4	90,09589	14,019	7	,000
Pair 18 LASER4 - PDT4	81,49668	19,406	7	,000

Karşılaştırmaların yapıldığı 2., 3. ve 4. günler için istatistiksel olarak farklılık göstermeyen ikili grup ICG-LAZER çifti olmuştur. Diğer bütün durumlarda gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmiştir.

4.5.3. FTIR Spektroskopi Analiz Sonuçları

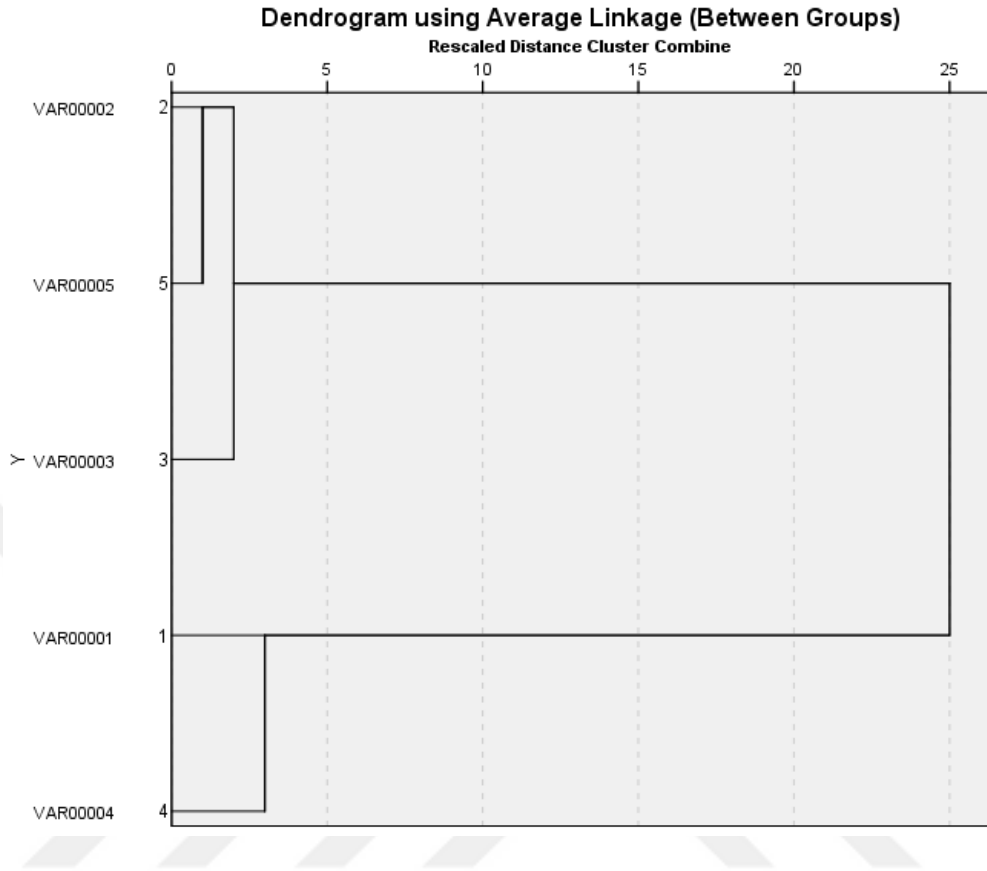


Şekil 4.12: Ana Deney gruplarından alınan dokulardaki biyomoleküllerin absorpsanlarında meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir (Siyah çizgi FDT 250 mw-60 dk uygulamasını göstermektedir).

250 mW 60 dk	Tümör Doku (Kontrol)	ICG Almış Grup	Lazer Uygulanmış Grup	
0,21235	0,0233	0,018085	0,011272	1064 cm ⁻¹

1050 ile 1080 cm⁻¹ arasında oksidatif strese bağlı olarak DNA da oluşan hasarı niteleyen bir tepectir. Tedavi sırasında hücrelerde oksidatif bir stresin meydana geldiğini optimizasyon deneyleri sırasındaki değerlendirmelerimizde belirtmiştik. Riboz kaynaklı 1064 cm⁻¹ salınım intensitesi en çok 250 mW 60 dakikalık uygulamada (0.21235) gözlemlenmiştir. Apoptotik hücre ölümünün göstergesi olarak kabul edilmektedir. Kontrol gruplarında ise 1064 cm⁻¹ salınımına bağlı oluşan intensite çok düşük seviyelerdedir (Şekil 4.12).

ANA DENEY DENDOGRAM-KÜME ANALİZİ



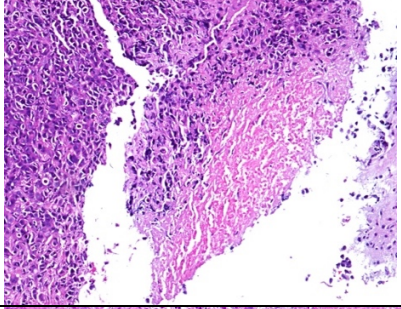
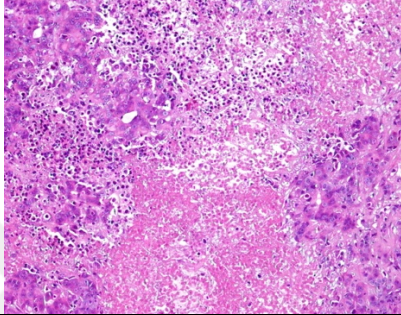
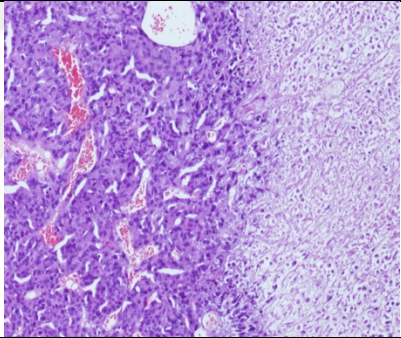
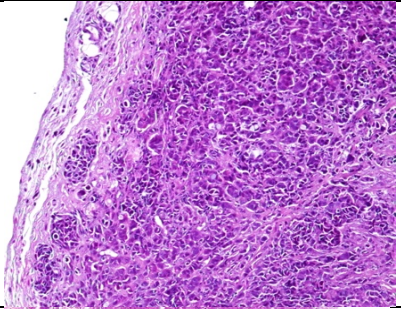
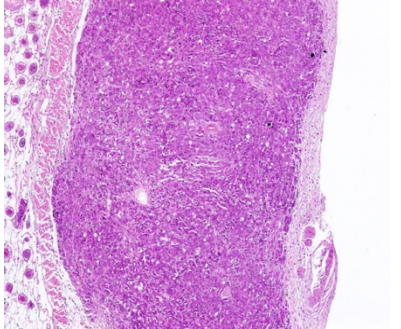
Şekil 4.13: Ana Deneyle İfrared Spektrum Analizlerinin Hiyerarşik Küme Analizinin Dendrogram ile gösterimi. Lipit, Protein ve Nükleik asit bandlarında aynı sonuçlar gözlemlenmiştir. (1: 250 mW 60 dk. Grubunu, 2: Tümör Doku Grubunu, 3: Sağlıklı Doku Grubunu, 4: Lazer Uygulanmış Grubu, 5: ICG Almış Grubu göstermektedir.

Tümör doku ve sadece ICG uygulanan denekler ilk kümelenemeyi göstermiştir en yakın komşulardır. Bu kümeye daha sonra sağlıklı doku grubu eklenmiştir. Diğer bir küme de ise 250 mW 60 dk. uygulaması yer almaktadır. Daha sonra bu kümeye sadece lazer uygulanan grup dahil olmuştur (şekil 4.13).

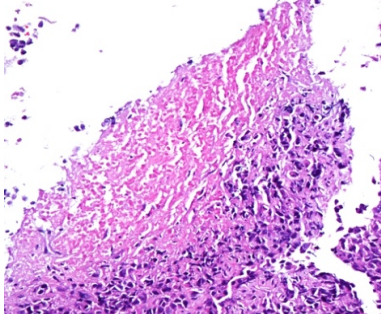
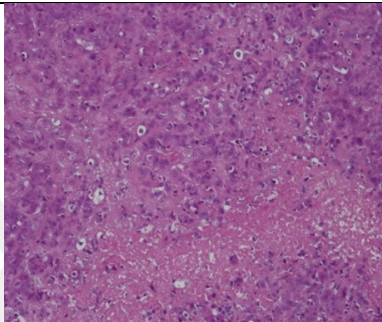
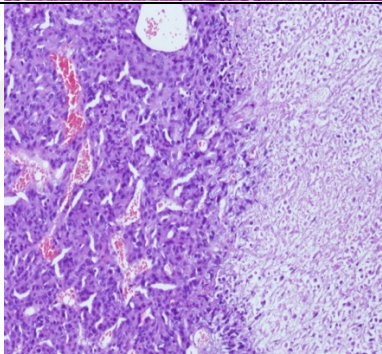
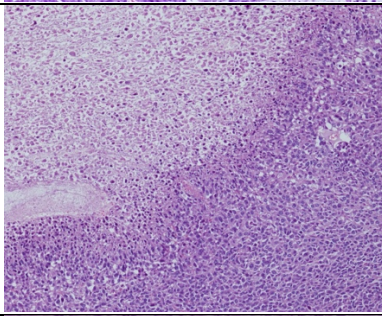
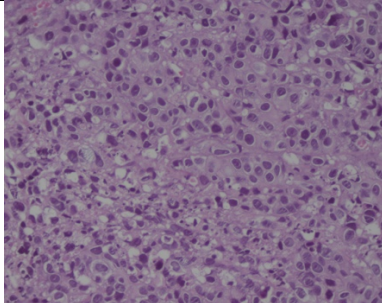
4.5.4. Histopatolojik Analiz

Tablo 4.10'da Kontrol grubu, ICG almış grup, Lazer uygulanan grup ve FDT grubunun histopatoloji sonuçları verilmiştir.

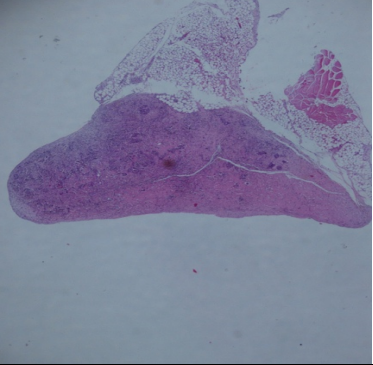
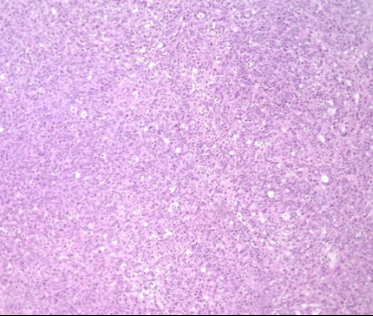
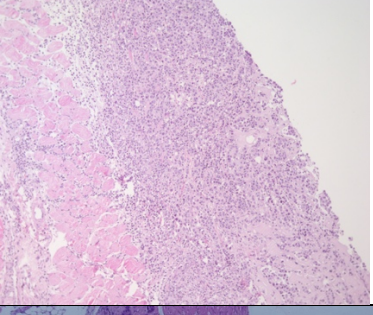
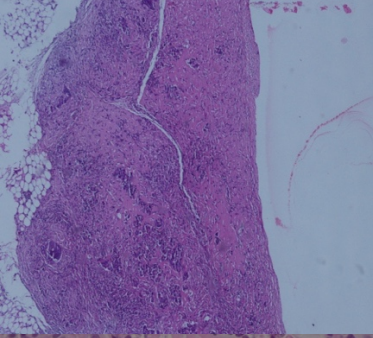
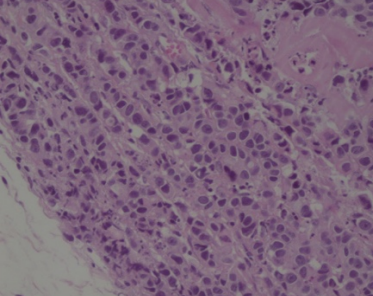
Tablo 4.10: Ana Deney Grubuna ait Tedavi Sonrası Histoloji Görüntüleri.

DENEK: KONTROL		0,4 cm çaplı itici (ekspansil) kanser dokusu, santralde geniş nekroz. (Payne-Miller 1/5)
DENEK: KONTROL		0,6 cm çaplı itici kanser dokusu. %25 nekroz dokusu. (Payne Miller 1/5)
DENEK: KONTROL		4x3 cm çapta düzgün şekilli itici sınırlarla büyüyen ortası nekrozlu kanser dokusu. Nekroz oranı %25. (Payne Miller 2/5)
DENEK: ICG ALMIŞ GRUP		0,3 cm çapta kanser dokusu, az sayıda ölüme giden hücreler. Kısmi kalsifikasyon (Payne Miller 1/5)
DENEK: ICG ALMIŞ GRUP		0,3 cm çaplı kanser dokusu, fibröz doku artışı. (Payne Miller 1/5)

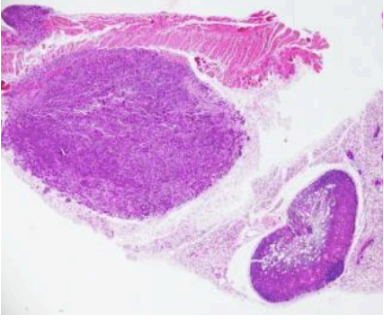
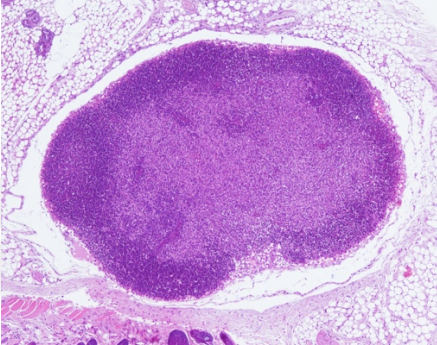
Tablo 4.10 (devam): Ana Deney Grubuna ait Tedavi Sonrası Histoloji Görüntüleri.

DENEK: ICG ALMIŞ GRUP		0,4 cm çaplı tümör dokusu santralde geniş nekroz. (Payne Miller 2/5)
DENEK: LAZER UYGULANMIŞ GRUP		0,8 cm çapta itici sınırlarla büyüyen kanser dokusu. %10 nekroz. (Payne Miller 1/5)
DENEK: LAZER UYGULANMIŞ GRUP		4x3 cm çapta düzgün şekilli itici sınırlarla büyüyen ortası nekrozlu kanser dokusu. Nekroz oranı %25. (Payne Miller 2/5)
DENEK: LAZER UYGULANMIŞ GRUP		2,4x2 cm çaplı itici sınırlı kanser dokusu. Santralde nekroz %25. (Payne Miller 2/5)
DENEK: FDT GRUBU 250 mW - 60 DK		0,3 cm çaplı tümör dokusu %30 apopitoz nekroz görülmedi. (Payne Miller 3/5)

Tablo 4.10 (devam): Ana Deney Grubuna ait Tedavi Sonrası Histoloji Görüntüleri.

DENEK: FDT GRUBU 250 mW - 60 DK		0,4 cm çaplı tümör dokusu geniş apopitoz, nekroz görülmedi. (Payne Miller 4/5)
DENEK: FDT GRUBU 250 mW - 60 DK		0,5 cm çaplı tümör dokusu %30 apopitoz fokal %10 nekroz. (Payne Miller 3/5)
DENEK: FDT GRUBU 250 mW - 60 DK		0,6 cm çaplı tümör dokusu %35 apopitoz fokal %10 nekroz. (Payne Miller 3/5)
DENEK: FDT GRUBU 250 mW - 60 DK		0,4 cm çaplı tümör dokusu %45 apopitoz nekroz görülmedi. Tümör dokusunun yerini alan fibroelastotik stroma. (Payne Miller 4/5)
DENEK: FDT GRUBU 250 mW - 60 DK		0,3 cm çaplı tümör dokusu %30 apopitoz nekroz görülmedi. (Payne Miller 3/5)

Tablo 4.10 (devam): Ana Deney Grubuna ait Tedavi Sonrası Histoloji Görüntüleri.

<p>DENEK: FDT GRUBU 250 mW - 60 DK</p>		<p>0,5 cm çapta tümör dokusu ve 0,3 cm çapta lenf bezi. %40 apoptoz nekroz görülmedi. (Payne Miller 4/5)</p>
<p>DENEK: FDT GRUBU 250 mW - 60 DK</p>		<p>0,3 cm çaplı lenf nodülü. Merkezi kısmında daha soluk görünen alanda tedavi etkisi ile ortadan kalkmış tümör dokusunu yerini almış izlenimi veren yoğun bağ dokusu hücresi çoğalması Tümör dokusu yok. (Payne Miller 5/5)</p>

Elde edilen veriler Kontrol, ICG ve LAZER uygulanmış gruplarda herhangi bir tedavi etkisinin olmadığını göstermektedir. FDT uygulamasının ise tümör hücrelerini apoptoza sürüklediği ve nekroz oluşturmadığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fotodinamik reaksiyon, bir PS ile oksijen varlığında spesifik bir dalga boyundaki fotonlar (ışık kaynağından çıkan) arasındaki etkileşimden kaynaklanır. Bu etkileşim ile sitotoksik türler, özellikle de singlet oksijen serbest kalmaktadır. Ve sonucunda ise moleküler, hücre içi ve vasküler değişiklikler tümörün nekrozisi ve/veya apoptozisi oluşmaktadır [129]. PS, ışık kaynağı, uygulanan güç ve akümülyasyon süresi gibi FDT'nin ayrı bileşenlerinin parametrelerinin doğru modülyasyonu ile hücre (doğrudan) veya vasküler ölüm elde edilebilir. Fakat ışık ve fotoduyarlı maddenin tek başına tümör üzerinde lethal bir etkisi olmadığından, kullanılacak ışık kaynağının ve PS'in biyolojik sistemdeki etkilerini iyi tanımlanması, terapinin başarılı olması için gereklidir [130].

Tez kapsamında öncelikle literatürde eksikliği tespit edilen *in vivo* hayvan modeli üzerinden bu çalışma tasarlanmıştır. Literatür incelendiğinde ICG tabanlı fotodinamik terapinin *in vitro* etkilerinin çeşitli meme kanseri hücre hatlarında ve birçok farklı kanser hattındaki etkilerinin araştırıldığı görülmüştür [7, 83, 85, 96, 131-136]. Genel sonuç olarak FDT'nin hücre canlılığını inhibe ettiği ve hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiş olsa da hücre ölümünün sebebinin fototermal mi yoksa fotokimyasal mı olduğu halen tam olarak açıklanamamıştır [96, 97, 106, 116, 133].

800 nm civarında maksimum emilime sahip olan ICG, derin tümörlerin FDT ile tedavisi için ideal bir moleküldür. Penetrasyon derinliği sebebiyle *in vitro* çalışmalardan sonra ICG tabanlı *in vivo* hayvan modelleri üzerinde çalışmalar yapılmaya başlamıştır. ICG tabanlı FDT'nin etkisinin araştırıldığı *in vivo* hayvan modelleri konusunda yapılan çalışmalar kısıtlı sayıdadır [104, 137-140]. Özellikle meme kanserinde ICG tabanlı FDT'nin *in vivo* etkilerinin araştırıldığı sadece birkaç çalışmaya rastlanmıştır [141, 142] bunlardan insan meme kanser hücreleri ile oluşturulan ksenograft çalışmalar ise çok sınırlıdır [138].

Sunulan tez çalışması optimizasyon ve ana deney olmak üzere iki kısım olarak gerçekleştirilmiştir. FDT'nin başarısı için güç ve akümülyasyon süresinin tespiti amacıyla öncelikle uygulanacak ışığın gücünün belirlenmesi için 150- 250 ve 500 mW olmak üzere 3 farklı lazer parametresi belirlenmiştir. Akümülyasyon süresi olarak 0- 30- 60 ve 90 dakika olmak üzere 4 farklı zaman parametresi belirlenmiştir. Bu parametreler üzerinden optimizasyon kısmı gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının in vitro kısmında MCF-7 hücreleri hücre kültürü laboratuvarında yetiştirilmesi yer almaktadır. Nude farelerde insan meme tümörü oluşturmak için yetiştirilen MCF-7 hücreleri nude farelere 3.11.1. kısımda detaylı anlatılan prosedür ile ekilmiştir. Şekil 3.6'da farklı boyutlarda tümör oluşmuş iki ayrı denek görüntüsü de mevcuttur. Tümör oluşumun ardından optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon kısmında yer alan deneylerin sonuçlarını değerlendirmek için in vivo floresans görüntüleme, makroskopik tümör gelişim analizi, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi analizi ve histopatolojik analiz yapılmıştır.

In vivo floresans görüntüleme analizinde amaç denek farelere verilen ICG'nin akümülyasyonun optimum olduğu zaman periyodunun tespit edilmesidir. Denek farelere FDT'de kullanılan PS dozu olan 5 mg/kg konsantrasyonda ICG verildikten sonra dört parametre incelenmiştir. Bunlar; tümörde birikim yapıp yapmadığı, enjeksiyon bölgesinden temizlenme süresi, tümörün maksimum floresans yaptığı uygulama ve diğer normal dokulardaki birikimidir.

Elde edilen floresans görüntülerine göre (Şekil 4.1, 4.2) 0 dakika uygulamasında enjeksiyon bölgesindeki floresans ışınım miktarı $ROI = 2.6e+09$ iken tümörlü bölgede $ROI = 2.1e+09$, normal dokuda $1.5e+09$ 'dur. 0. dakika uygulaması göstermektedir ki enjekte edilen ICG'nin hedeflenen tümör bölgesine erişmesi için zaman gerekmektedir. 30. dakika uygulamasında ise enjeksiyon bölgesindeki değeri $ROI = 8.1e+09$, normal dokuda $1.5e+09$ tümörde ise $5.7e+09$ olduğu görülmüştür. 30. dakika uygulaması sonrası halen tümör bölgesinde istenilen birikimin oluşmadığı görülmektedir. Fakat 0 dk uygulamasıyla kıyaslandığında tümör bölgesinde birikimin 3 kat arttığı görülmektedir.

60. dakika uygulamasında enjeksiyon bölgesindeki $ROI = 8.6e+09$, tümör bölgesinde $6.9e+09$, normal dokuda ise $2.1e+09$ 'dur. Enjeksiyon bölgesindeki ICG miktarı hala beklenen değerden fazla olsa da 0 dk uygulamasına kıyasla tümör bölgesindeki floresans miktarı 3,5 kat artmıştır.

90. dakika uygulamasında ise enjeksiyon bölgesinde $ROI = 4.1e+09$, tümör bölgesinde $5.6e+09$ normal dokuda ise $1.82e+09$ değerindedir. 90. dk uygulamasında ICG'nin enjeksiyon bölgesinden 30. ve 60. Dk uygulamalarına kıyasla yarı yarıya azaldığı ölçülürken, tümör bölgesindeki ışınımında azaldığı görülmektedir. 0.dk uygulamasına kıyasla sadece 2.8 kat tümörde ışınım miktarı fazla tespit edilmiştir. ICG'nin 90. Dk uygulaması ilk bakışta en iyi

sonuç gibi görünsede aslında yanılıcıdır. 90. Dakika uygulamasında ICG'nin enjeksiyon bölgesinden temizlenirken aynı zamanda tümörden temizlenmeye başladığı görülmektedir. Deneğin vücudunda birikim süresi tamamlanmış artık ICG metabolize olup atılmaya başlamıştır. 30. ve 60. dakika uygulamalarında elde edilen floresans ışımaya miktarları yakın olsa da 60 dakika uygulamasındaki floresans şiddeti daha fazladır. Şekil 4.2 de bu 2 akümülyasyon süresindeki floresans ölçümleri dorsoventral açıdan tekrar ölçülmüştür. Bu açıdan elde edilen görüntüde çekumda ICG'nin birikim yaptığı net olarak görünmektedir. Enjeksiyon bölgesi çekum ve tümördeki ROI miktarları topluca değerlendirildiğinde 60. dakika uygulamasının daha başarılı olduğu kanısına varılmıştır. Çekumdaki miktarı ve enjeksiyon bölgesindeki ışımaya 30. Dakika kıyasla daha düşük ölçülmüştür bununla birlikte tümör bölgesinin yaptığı ışımaya değerleri oldukça yakındır.

In vivo floresans görüntüleme analizine göre; intraperitonel ICG uygulaması ile in vivo tümör görüntülemesi yapmak mümkündür. Özellikle vücut dışından görünmeyen, iç organlarda büyütülen tümörlerin görüntülenmesinde ICG'nin floresans görüntüleme ajanı olarak kullanılması mümkündür.

Bu çalışmada makroskopik olarak palpe edilen tümör varlığı bir defada in vivo görüntüleme ile doğrulanmıştır. ICG tümör bölgesinde hedeflendiği gibi birikim yapmaktadır (PS olarak istenilen bir özellik). Vücuttan atılım sürecinin başlaması ile en çok birikim yaptığı sürenin ölçülmesi için daha fazla denek üzerinde 60 ile 90 dakika bekleme süresinin arasındaki sürelerde de ölçüm yapmak fotodinamik reaksiyon (PDR) başarısının dolayısıyla tedavinin başarısını arttırabilir. 0- 30- 60 ve 90 dakika olmak üzere 4 farklı zaman periyodu olarak bu çalışmada denenen akümülyasyon sürelerinden en başarılı sonuçların ICG verildikten 60 dakika sonra yapılan ölçüm sonucunda elde edildiği bulunmuştur.

Makroskopik tümör gelişimi analizi ile tümör çapları ve derinlikleri 4 günlük uygulama süresince ölçülerek tümörün hacimsel değişiminin tespiti yapılmıştır. Tedaviye başlanan 1. güne ait tümör hacmi 100 kabul edilmiştir. Uygulanan ard arda 4 günlük tedavi protokolü sonrası optimizasyon deney gruplarındaki hacimsel değişim tablo 4.2'de verilmiştir. 150 mW 0 dk uygulaması sonucunda tümör hacmi yaklaşık % 103 büyüme, 30 dk uygulamasında %58 küçülme, 60 dk uygulamasında %37 küçülme ve 90 dk uygulamasında %118 büyüme olarak ölçülmüştür. 250 mW 0 dk. uygulaması sonucunda tümör hacmi %45 küçülme, 30 dk uygulamasında %57 küçülme, 60 dk uygulamasında %64,5 küçülme ve 90 dk uygulamasında %60 küçülme olarak ölçülmüştür. 500 mW 0 dk. uygulaması sonucunda tümör hacmi

yaklaşık %175 büyüme, 30 dk uygulamasında %52,5 küçülme, 60 dk uygulamasında %158 büyüme ve 90 dk uygulamasında %19 küçülme olarak ölçülmüştür.

Tek yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Çoklu karşılaştırmaların için kullanılan Post-Hoc Tukey testi ile gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar araştırılmıştır. Güç ve zaman parametreleri için ayrı ayrı uygulanan testin sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır, fakat özellikle 4. gün sonuçları esas alındığında 250 mW güç - 60 dakika uygulamasının göreceli olarak başarılı olduğu sonucuna varılmıştır (tablo 4.3 ve tablo 4.4).

250 mW gücündeki uygulamaların tedavi sürecinde meydana gelen tümör küçülme oranları, diğer uygulamalara kıyasla daha tutarlı olduğu gözlemlenmiştir. 250 mW uygulaması için tümör dokusunun büyümesi gibi bir durumla karşılaşılmamıştır. Oysaki 150 mW ve 500 mW lık gruplarda bazı uygulamalarda tümör dokusunun gelişiminin devam ettiği hatta boyutun ilk ölçülen değere kıyasla 2-3 katına çıkmış olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda 250 mW lık lazer gücünün diğerlerine nispeten daha ideal bir uygulama gücü olduğu sonucu çıkarılmıştır.

FTIR spektroskopisi analizi ile tümörlü dokuda yer alan nükleik asitler, amid-I ve amid-II proteinleri, lipitler, amid-A ve amid-B proteinlerinin farklı güç ve süredeki değişim durumları gözlemlenmiştir. Her bir güç değerine ait farklı uygulamalar sonucu biyomoleküllerin absorbanlarında meydana gelen değişiklikler grafik olarak sunulup kantitatif karşılaştırmaları yapılmıştır. 150 mW 0- 30- 60- 90. dakika uygulamaları sonrasındaki absorban grafikleri şekil 4.3'de gösterilmiştir. 500 ile 4500 cm^{-1} aralığında özellikle farklılık görülen frekans değerleri işaretlenmiştir. Bu işaretlenen frekans değerlerini değerlendirirsek ilk olarak 1743 cm^{-1} ile 1456 cm^{-1} salınımı arasındaki oranın azalması dokunun tümör özellikleri gösterdiğinin belirteci olarak kabul edillir, 150 mW gücünde 4 farklı uygulama süresinde bu oran hesaplandığında 60. dakika uygulamasının en düşük değere sahip olduğu (0,128) 90. dakika uygulamasının en yüksek değere sahip (0,360) olduğu bulunmuştur. 1657/1635 cm^{-1} ve 1553/1540 cm^{-1} oranının yüksek olması dokunun karsinom fibroödem olduğunu gösteren bir değer kabul edilmektedir. 150 mW gücünde 4 farklı uygulama süresinde sırasıyla bu oranlar hesaplandığında 60 dk uygulamasının (0,908) en yüksek değere 30 dk uygulamasının (0,818) ile en düşük değere sahip olduğu bulunmuştur. 1553/1540 cm^{-1} oranında ise en düşük değer 30 dk uygulamasında (0,811), en yüksek değer (0,935) 90 dakika uygulamasında ölçülmüştür. 150 mW gücündeki uygulamalar sonrası doku hala malignant özellik göstermektedir. Bu güç ve sürelerde tedaviye yanıtın düşük olduğunu söyleyebiliriz.

1050 ile 1080 cm^{-1} arasında oksidatif strese bağlı olarak DNA da oluşan hasarı niteleyen bir tepecik oluşur 150 mw bizim uygulamasında bu tepecik görülmüştür. Bu durumda tedavi sırasında hücrelerde oksidatif bir stresin meydana geldiğini ortaya çıkmaktadır. Bu da tedavi sırasında oluşan ölüm şeklinin oksidatif strese bağlı apoptoz olduğunu göstermektedir. 1064 cm^{-1} salınımı ribozdan kaynaklanmaktadır. Hücre lm ve ortamdaki riboza miktarına bağlı olarak ICG'nin mitokondride toplandığını söyleyebiliriz. Hedeflediğimiz lm şeklinin sonucu olarak ortamdaki RNA miktarının artmasına bağlı olarak oluşan banttaki yoğunluğun artış oranının en yüksek değerinin 30 dakika (0,209) uygulamasında olduğu görülmüştür.

250 mW 0- 30- 60- 90. dakika uygulamaları sonrasındaki FTIR spektrum grafiği şekil 4.4'de gösterilmiştir. 500 ile 4500 cm^{-1} aralığında özellikle farklılık görülen frekans değerleri işaretlenmiştir. Bu işaretlenen frekans değerlerini değerlendirirsek ilk olarak 1743 cm^{-1} ile 1456 cm^{-1} salınımı arasındaki oranın azalması dokunun tümör özellikleri gösterdiğinin belirteci olarak kabul edillir, 250 mW gücünde 4 farklı uygulama süresinde bu oran hesaplandığında 0. dakika uygulamasının en düşük değere sahip olduğu (0,134) 60. dakika uygulamasının (0,1961), 90 dk uygulamasının (0,722) ve 30 dk uygulamasının (0,725) ile en yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur. 1657/1635 cm^{-1} ve 1553/1540 cm^{-1} oranının yüksek olması dokunun karsinom fibroödem olduğunu gösteren bir değer kabul edilmektedir. 250 mW gücünde 4 farklı uygulama süresinde sırasıyla bu oranlar hesaplandığında 90 dk uygulamasının (0,928) en yüksek değere 0 dk uygulamasının (0,792) ile en düşük değere sahip olduğu bulunmuştur. 1553/1540 cm^{-1} oranında ise en düşük değer 60 dk uygulamasında (0,856), en yüksek değer (0,966) 90 dakika uygulamasında ölçülmüştür. 250 mW gücündeki uygulamalardan özellikle 60 dk uygulamasında diğer srelere kıyasla dokunun malignant özellikle azalma olduğu görülmektedir.

1050 ile 1080 cm^{-1} arasında oksidatif strese bağlı olarak DNA da oluşan hasarı niteleyen bir tepecik oluşur 250 mW uygulamasında bu tepecik görülmüştür. Bu durumda tedavi sırasında hücrelerde oksidatif bir stresin meydana geldiğini ortaya çıkmaktadır. Bu da tedavi sırasında oluşan ölüm şeklinin oksidatif strese bağlı apoptoz olduğunu göstermektedir. 1064 cm^{-1} salınımı ribozdan kaynaklanmaktadır. Hücre lm ve ortamdaki riboza miktarına bağlı olarak ICG'nin mitokondride toplandığını söyleyebiliriz. Hedeflediğimiz lm şeklinin sonucu olarak ortamdaki RNA miktarının artmasına bağlı olarak oluşan banttaki yoğunluğun artış oranının en yüksek değerinin 60 dakika (0,202) uygulamasında olduğu görülmüştür.

ICG verildikten 90 dakika sonra yapılan 250 mW güçteki lazer uygulamasında elde edilen spektrumunda dokudaki nükleik asit, Amid I-II, lipit ve Amid A-B proteinlerinin konsantrasyonlarında diğer uygulamalara kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir. Uygulamalardan sonra hücresel yapının bozulması ve hücre zarının kaybolması dokudaki lipit konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu söylenebilir. Aynı zamanda protein konsantrasyonundaki değişiklikler hücresel proteinlerin denatüre olamaya başladığının göstergesidir.

Dokudaki nükleik asit konsantrasyonunun azalması DNA'nın parçalanmasından kaynaklanabilir, bu durum aynı zamanda hücrenin apoptoza girdiğinin belirtisi şeklinde yorumlanabilir. ICG verildikten 30 dakika sonra yapılan lazer uygulamasında elde edilen spektrumlarında dokudaki nükleik asit, Amid I-II, lipit ve Amid A-B proteinlerinin konsantrasyonlarının beklenenden yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni 30 dakikalık sürenin ICG'nin tümör dokuda birikmesi için yeterli bir zaman periyodu olmaması olabilir. Kesin yargıya varmak için denek sayısının artırılması ve değerlerin tekrar değerlendirilmesi ile mümkün olabilir.

500 mW 0- 30- 60- 90. dakika uygulamaları sonrasındaki FTIR spektrum grafiği şekil 4.5'de gösterilmiştir. 500 ile 4500 cm^{-1} aralığında özellikle farklılık görülen frekans değerleri işaretlenmiştir. Bu işaretlenen frekans değerlerini değerlendirirsek ilk olarak 1743 cm^{-1} ile 1456 cm^{-1} salınımı arasındaki oranın azalması dokunun tümör özellikleri gösterdiğinin belirteci olarak kabul edillir, 500 mW gücünde 4 farklı uygulama süresinde bu oran hesaplandığında 0. dakika uygulamasının en düşük değere sahip olduğu (0,444) 30. dakika uygulamasının (1,280) en yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur. 1657/1635 cm^{-1} ve 1553/1540 cm^{-1} oranının yüksek olması dokunun karsinom fibroödem olduğunu gösteren bir değer kabul edilmektedir. 500 mW gücünde 4 farklı uygulama süresinde sırasıyla bu oranlar hesaplandığında 30 dk uygulamasının (1,008) en yüksek değere 90 dk uygulamasının (0,852) ile en düşük değere sahip olduğu bulunmuştur. 1553/1540 cm^{-1} oranında ise en düşük değer 60 dk uygulamasında (0,240), en yüksek değer (0,943) 0 dakika uygulamasında ölçülmüştür. Değerlendirme neticesinde bu band aralığındaki frekanslarda özellikle O-H salınımından meydana gelen tepe yoğunluklarında 30. ve 60.dakikalarda tümörlü dokuya kıyasla azalma gözlemlenmiştir.

1050 ile 1080 cm^{-1} arasında oksidatif strese bağlı olarak DNA da oluşan hasarı niteleyen bir tepicik oluşur 500 mW uygulamasında bu tepicik görülmüştür. Bu durumda tedavi sırasında hücrelerde oksidatif bir stresin meydana geldiğini ortaya çıkmaktadır. Bu da tedavi sırasında

oluşan ölüm şeklinin oksidatif strese bağlı apoptoz olduğunu göstermektedir. 1064 cm^{-1} salınımı ribozdan kaynaklanmaktadır. Hücre ölümü ve ortamdaki riboza miktarına bağlı olarak ICG'nin mitokondride toplandığını söyleyebiliriz. Hedeflediğimiz ölüm şeklinin sonucu olarak ortamdaki RNA miktarının artmasına bağlı olarak oluşan banttaki yoğunluğun artış oranının en yüksek değerinin 90 dakika (0,199) uygulamasında olduğu görülmüştür.

ICG verildikten 60. dakikadan sonra yapılan 500 mW güçteki tedavi uygulamasında elde edilen spektrumda dokudaki nükleik asit ve lipit konsantrasyonlarında diğer uygulamalara kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir. Uygulamalardan sonra hücresel yapının bozulması ve hücre zarının kaybolması dokudaki lipit konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu söylenebilir. Dokudaki nükleik asit konsantrasyonunun azalması DNA'nın parçalanmasından kaynaklanabilir, bu durum aynı zamanda hücrenin apoptoza girdiğinin belirtisi olabilir (Şekil 4.5).

Lipit, protein ve nükleik asitlere ait bandlara dendogram kümeleme analizi yapılmıştır (Şekil 4.6, 4.7, 4.8). Dendogram analizi değerlendirildiğinde nispeten tümör dokunun azaldığının belirteçlerini görüldüğü tedavi gruplarının aynı kümede yer aldığı tespit edilmiştir. Lipit ve protein bandı için elde edilen sonuçlarda; 1.KÜME: 250mW 0.dk, 250mW 60. dk ve 500mW 90.dakika. 2.KÜME: 250mW 90.dk ve 500mW 30.dakika. 3. KÜME: 150mW 0-30-60-90. dk; 250 mW 30. dk; 500 mW 0. dk; 500 mW 60. Dakikadan oluşmaktadır. Nükleik asit bandında ise 150 mW 30. dk uygulaması 1. kümeye geçmiştir. FTIR kümeleme analizi ve önceki spektrum değerlendirmeleri sonuçlarına göre optimal parametreler; 150 mW 30. dk, 250 mW 0. dk, 250 mW 60. dk, ve 500 mW 90 dk uygulamalarıdır.

Son analiz metodu olarak histopatoloji yapılmıştır. Tedavi süreci bittikten deneklerden çıkarılan tümör dokusunun patolojik inceleme sonuçları tablo 4.6'da verilmiştir. Her bir güç değerindeki 4 akümülyasyon süresine bağlı olarak tedaviye verilen cevaplar uzman patolog tarafından değerlendirilmiştir. Her bir grupta incelenen dokunun çapı, apoptoz ve/veya nekroz cevabı ve Payne&Miller gradlama skoru verilmiştir.

150 mW gücündeki 0, 30, 60 ve 90 dk akümülyasyon gruplarında Payne Miller skorunun Grad 2 olduğu yani invaziv tümör hücrelerinde minimal azalma ancak hala hücre yoğunluğunun yüksek (<30) olduğu görülmüştür. Tedaviye cevap vermemiş denilemez ancak kısmi bir cevap alındığı söylenebilir.

250 mW gücündeki 0, 30, 60 ve 90 dk akümülyasyon gruplarında Payne Miller skorunun yükseldiği görülmüştür. Özellikle 60 dk grubunda tümör dokusunun yerini almış izlenimi

veren yoğun bağ doku görüntüsü elde edilmiştir ve Grad 5 olmuştur. Yani primer tümör bölgesinde invaziv hücreler tespit edilemediği sadece makrofaj içeren vasküler fibroelastik stroma görüldüğü durumdur. Tedaviye bu grubun tam yanıt verdiği sonucuna varılabilir.

500 mW 0gücündeki 0, 30, 60 ve 90 dk akümülyasyon gruplarında Payne Miller skorunun tekrar azaldığı görülmektedir. Grad 2 nin hakim olduğu yani invaziv tümör hücresinde minimal azalma ancak hala hücre yoğunluğunun yüksek (<%30) olduğu görülmüştür. Tedaviye cevap vermemiş denilemez ancak kısmi bir cevap alındığı söylenebilir.

Histopatolojide en çok ölüm apoptoz-nekroz miktarı, Payne Miller skoru, FTIR analizinde yine benzer şekilde tümör dokunun azalıp normal doku miktarının artması ve apoptoz belirteçleri varlığı, makroskopik tümör çapı küçülmesi ile ICG'nin tümör dokuda birikme akümülyasyon süresi tüm analiz yöntemlerinde değerlendirildiğinde güç değeri olarak 250 mW ICG akümülyasyon (birikim süresi) zamanı olarak ta 60 dakikanın en optimal parametre olduğu sonucuna varılmıştır.

Ana deneyde 250 mW 60 dakika parametresi 8 FDT, 3'er pozitif ve negatif kontrol grupları olmak üzere 17 denek fare üzerinde uygulanmıştır. Sonuçlar optimizasyon deneylerindeki analiz yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

İn vivo floresans görüntüleme analiz sonrası çıplak tümör ile ICG enjeksiyonu yapıp 60 dk. beklenildikten sonra ölçümü yapılan denekler arasındaki farklılık şekil 4.9 ve 4.10'da verilmiştir. Makro tümör gelişim analizinde ise Kontrol (tümör) boyutları 4. günün sonunda %40 lara kadar artış gösterirken LAZER ve ICG gruplarında bu oran yaklaşık olarak %20 civarlarında kalmıştır. FDT grubunda ise 4. gün sonunda tümör çapının yaklaşık olarak %60 küçüldüğünü ölçülmüştür (Şekil 4.11). Paired sample T test sonuçlarına göre ikili gruplar arasında (tablo 4.9) ICG-Lazer çifti dışında anlamlı farkın gözlenmiştir. FTIR spektroskopi analizinde ise 250 mW 60 dakika ana deney parametresi, tümör doku, ICG almış grup ve Lazer uygulanmış gruptaki biyomoleküllerin absorbanlarında meydana gelen değişiklikler şekil 4.11'de gösterilmiştir. Tedavinin etkinliğini değerlendirmede bir kriter olarak ele aldığımız 1050 ile 1080 cm^{-1} arasında oksidatif strese bağlı olarak DNA da oluşan hasarı niteleyen bir tepeliğin varlığı araştırılmıştır. Riboz kaynaklı 1064 cm^{-1} salınım intensitesi en çok 250 mW 60 dakikalık uygulamada (0.21235) gözlemlenmiştir. Apoptotik hücre ölümünün göstergesi olarak kabul edilmektedir. Kontrol gruplarında ise 1064 cm^{-1} salınımına bağlı intensite çok düşük seviyelerdedir (Şekil 4.11).

Dendogram analizinde ise tümör doku ile ICG almış grubun beraber kümelendiği sonradan bu gruba sağlıklı dokunun eklendiği görülmektedir. Sonradan eklenme farklılığın temsili olarak kabul edilmektedir. Diğer bir kümede FDT grubu yer almaktadır. Bu kümeye Lazer almış grup eklenmiştir. Her 2 kümenin benzeşme oranı %25 civarında denilebilir.

Histopatoloji analizinde Payne&Miller gradlama sistemi skorlarından da tümör hücresi yoğunluğunda ve sayısında FDT grubunda diğer gruplara kıyasla yoğun bir azalma olduğu tespit edilmiştir. En az cevap veren deneklerdeki skor olan 3/5'ün anlamı %30 ile %90 arasında tümör hücresi kaybı anlamında olduğundan FDT grubunda tedaviye yanıtın tüm deneklerde büyük oranda elde edildiği sonucu çıkarılabilir. Kontrol gruplarında grad skoru yaygın olarak 1 bazı deneklerde 2 olduğu görülmüştür.

Elde edilen veriler Kontrol, ICG ve LAZER uygulanmış gruplarda herhangi bir tedavi etkisinin olmadığını göstermektedir. FDT uygulamasının ise tümör hücrelerini apoptoza sürüklediği ve nekroz oluşturmadığı sonucunu vermektedir.

Bulgularımız ICG'nin yakın kızılötesi ışıkla birlikte kullanıldığında insan meme kanseri hücreleri ile meme tümörü oluşturulmuş nude fareler üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. İn vivo bir çalışma olması klinik için ön veri anlamı taşımaktadır.

Lezyona direkt olarak yaklaşmak mümkün olduğu için FDT meme kanserinde uygulanabilir. Literatürde de bahsedildiği üzere meme kanseri için ilk seçenек tedavi ameliyattır ve bu bu tedavi memenin görüntüsünde değişikliklere neden olabilmektedir. Bu nedenle, invaziv olmayan tedavi edici bir prosedür varsa hastalar tarafından ilk tercih olmaktadır.

Meme kanserinin birinci basamak tedavisi olarak ICG- FDT hakkında mevcut yayın olmasa da FDT'nin diğer PS'ler ile uygulandığı bazı çalışmalar lokal FDT'nin lokal tekrarlayan meme kanserinde veya göğüs duvarı rekürrensinde güvenilir etkileri olduğunu göstermiştir [143-148]. Bu veriler aracılığıyla meme kanseri hücrelerinin FDT ile yok edilebileceğini varsayabiliriz. Yine, ameliyat sırasında FDT uygulanabilir ya da mastektomiden sonra nüksü önlemek için önceki lezyonun yatağına FDT uygulanabilir. Bununla birlikte, insanlara FDT uygulamak için daha teknik uygulama ve klinik verilere ihtiyaç olduğunu bu konudaki çalışmaların sayısının artması gerektiği kanısındayız.

Sonuç olarak, tez çalışması ile elde edilen sonuçların literatüre özgün katkılar sağlamanın yanı sıra ileride yapılan çalışmalara temel teşkil edeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*, 66(1), 7-30.
- [2]. Gültekin, M., and Boztaş G., 2014, *Türkiye kanser istatistikleri*, Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.
- [3]. Bartelink, H., Benz, C., Cleveland, D., Dorn, R., Gralow, J., Gradishar, W.J., Grant, K., Heimann, R., Hellman, S., Hudis, C., Kerbel, R., Lippman, M., Lung, J., Posner, M.C., Steeg, P., Vestal, R., Weichselbaum, R.R., Zetter, B., 2003, Expedition inspiration fund for breast cancer research, *Breast Cancer Res Treat*, 80(2), 139-144s
- [4]. Pecorino, L., 2005, *Molecular Biology Of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*, Oxford University Press, Oxford, UK.
- [5]. Ferlay, J., et al., 2004, *Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*, IARC Cancer Base No. 5, version 2.0. IARC Press, Lyon.
- [6]. Institute, N.C., 2007, Radiation Therapy and you; A guide to self-help during cancer treatment, *National Institutes of Health USA*.
- [7]. Montazerabadi, A.R., et al., 2012, The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells, *J Photochem Photobiol B*, 109, 42-9.
- [8]. Szostak, M.J. and N. Kyprianou, 2000, Radiation-induced apoptosis: predictive and therapeutic significance in radiotherapy of prostate cancer (review), *Oncology Reports*, 7(4), 699-706.
- [9]. Bentzen, S.M., 2006, Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology, *Nature Reviews Cancer*, 6(9), 702-713.
- [10]. Dolmans, D.E., Fukumura, D., & Jain, R. K. and I., 2003, 690, Photodynamic therapy for cancer, *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 380-387.
- [11]. Robertson, C.A., D.H. Evans, and H. Abrahamse, 2009, Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 1-8.
- [12]. Strachan T., Read AP., 1999, *Human Molecular Genetics 2.1*, USA: BIOS Scientific Publishers.
- [13]. Futreal PA, K.A., Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton M, 2001, Cancer and genomics, *Nature*, 6822: 850-2.

- [14]. Topal, T., Şükrü Öter, and Ahmet Korkmaz., 2009, Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 19(3), 137-143.
- [15]. Kopnin, B. P., 2000, Targets of onkogenes and tümör suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis, *Biochemistry (Mosc)*, 1, 2-27.
- [16]. Corn PG, E.-D.W., 2002, Derangement of growth and differentiation control in onkogenesis, *Bioessays*, 1, 83-90.
- [17]. Yokuş, B. and Çakır D. Ü., 2012, Kanser biyokimyası, *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 1(2), 7-18.
- [18]. Albertson D.G, C.C., McCormick F, Gray J.W., 2003, Chromosome aberrations in solid tumors, *Nat. Genet.*, 34:369–76.
- [19]. Weir B, Z.X., Meyerson M., 2004, Somatic alterations in the human cancer genome, *Cancer Cell*, 6:433–38.
- [20]. McCormick, F., 2004, Cancer: survival pathways meet their end, *Nature*, 428, 267–69.
- [21]. Tlsty, T.D. and L.M. Coussens, 2006, Tumor stroma and regulation of cancer development, *Annu Rev Pathol*, 1, 119-50.
- [22]. Hanahan, D. and R.A. Weinberg., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100(1), 57-70.
- [23]. Hanahan D. and W. RA., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144(5), 646-674.
- [24]. Lowitz, B.B., Casciato, D.A, 2004, *Medical oncology & principles of cancer biology*, Lippincott Williams & Wilkins Press.
- [25]. Kohler, B.A., et al., 2015, Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State, *J Natl Cancer Inst*, 107(6).
- [26]. DeSantis, C.E., et al., 2015, International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 24(10), 1495-506.
- [27]. Parkin DM, Bray F, and F. J. et. al., 2002, Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 2002. 55:74–108.
- [28]. Health, T.R.M.O., 2002, *Cancer fighting politics and cancer data 1995-1999*, Ankara, Turkey.
- [29]. Curado M, et al., 2007, Cancer Incidence in Five Continents, ed. M.P.E. Lyon: IARC Scientific Publications.
- [30]. American Cancer Society, 2017, *Cancer Facts and Figures 2017*, Atlanta, G.A.C.S., [Ziyaret tarihi: 13Ocak 2017].

- [31]. Kaaks, R., Berrino, F., Key, T., Rinaldi, S., Dossus, L., Biessy, C., ... & de Mesquita, H. B. B., 2005, Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), *Journal of the National Cancer Institute*, 97 (10): 755-65.
- [32]. Key, T.J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Roddam, A. W., Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J., & Kaaks, R., 2011, Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. *British journal of cancer*, 105(5), 709-722.
- [33]. Key, T., Appleby, P., Barnes, I., & Reeves, G., 2002, Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies, *J Natl Cancer Inst*, 94(8), 606-616.
- [34]. Martin AM, W.B., 2000, Genetic and hormonal risk factors in breast cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 92: 1126-1135.
- [35]. Martin SP, P.M., Ross RK, Jones PA, Henderson BE., 1990, Increased cell division as a cause of human cancer, *Cancer Research*, 50, 7415-7421.
- [36]. Altekruse, S.F., Kosary, C. L., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Waldron, W., ... & Mariotto, A., 2010, SEER cancer statistics review, 1975–2007, Bethesda, MD: *National Cancer Institute*, 7.
- [37]. Razzaghi, H., et al., 2012, Mammographic density and breast cancer risk in White and African American Women, *Breast cancer research and treatment*, 135(2), 571-580.
- [38]. Goodwin, P.J., et al., 2012, Breast cancer prognosis in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an International Prospective Breast Cancer Family Registry population-based cohort study, *J Clin Oncol*, 30(1),19-26.
- [39]. Colditz G. A., K.K., Hankinson S. E, et al., 2012, Family history and risk of breast cancer: nurses' health study, *Breast cancer research and treatment*, 133(3),1097-10104.
- [40]. Cybulski, C., W. D., Jakubowska A., et al., 2011, Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer, *J Clin Oncol*, 29 (28), 3747-52.
- [41]. Colditz, G.A., et al., 1996, Risk factors for breast cancer according to family history of breast cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 88(6), 365-371.
- [42]. Kotsopoulos, J., et al., 2010, Risk factors for ductal and lobular breast cancer: results from the nurses' health study, *Breast Cancer Res*,12(6), 106.
- [43]. McCormack, V. A. and I. dos Santos Silva, 2006, Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*,15(6), 1159-1169.

- [44]. Boyd, N.F., et al., 2009, Mammographic density: a heritable risk factor for breast cancer, *Methods Mol Biol*, 472, 343-60.
- [45]. Kabat, G.C., Jones, J. G., Olson, N., Negassa, A., Duggan, C., Ginsberg, M., ... & Rohan, T. E., 2010, A multi-center prospective cohort study of benign breast disease and risk of subsequent breast cancer, *Cancer Causes&Control*, 21(6), 821-828.
- [46]. Pearlman MD, G.J., 2010, Benign breast disease, *Obstet Gynecol*, 116 (3), 747-58.
- [47]. Degnim, A. C., V.D., Berman, H.K., et al,2007, Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study, *J Clin Oncol*, 25 (19), 2671-7, 2007.
- [48]. Pike, M.C., Henderson, B. E., Casagrande, J. T., Rosario, I., & Gray, G. E., 1981, Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women, *British journal of cancer*, 43(1), 72.
- [49]. Henderson BE, R.R., Judd HL, Kralio MD, Pike MC., 1985, Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk ? *Cancer*, 56 (5),1206-1208.
- [50]. Brinton, L.A., Hoover, R., & Fraumeni Jr, J. F., 1983, Reproductive factors in the aetiology of breast cancer, *British Journal of Cancer*, 47(6), 757.
- [51]. Andrieu, N., Easton, D. F., Chang-Claude, J., Rookus, M. A., Brohet, R., Cardis, E., Peock, S., 2006, Effect of chest X-rays on the risk of breast cancer among BRCA1/2 mutation carriers in the international BRCA1/2 carrier cohort study: a report from the EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON, and IBCCS Collaborators' Group, *Journal of Clinical Oncology*, 24(21), 3361-3366.
- [52]. Lambe, M., et al., 1994, Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth, *New England Journal of Medicine*, 331(1), 5-9.
- [53]. Veronesi, U., Goldhirsch, A., & Yarnold, J.,1995, *Breast Cancer*, Peckham M. Pinedo HM Veronesi U. eds. Oxford Textbook of Oncology, 2, 1243-1289.
- [54]. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002, Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease, *The Lancet*, 360.9328, 187-195.
- [55]. Newcomb, P.A., Storer, B. E., Longnecker, M. P., Mittendorf, R., Greenberg, E. R., Clapp, R. W.,& MacMahon, B., 1994, Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer, *New England Journal of Medicine*, 330(2), 81-87.
- [56]. Collaborators., M.W.S.,2003, Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study, *The Lancet*, 362(9382), 419-427.
- [57]. Ross, R.K., Paganini-Hill, A., Wan, P. C., & Pike, M. C., 2000, Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: Estrogen versus estrogen plus progestin, *Journal of the National Cancer Institute*, 92(4), 328-332.

- [58]. Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Calle, E. E., Heath Jr, C. W., & Koetsawang, S, 2002, Alcohol, tobacco and breast cancer collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease, *Br J Cancer*, 87(11), 1234-45.
- [59]. Reichman, M.E., et al., 1993, Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women, *J Natl Cancer Inst*, 85(9), 722.
- [60]. Wolin KY, C.K., Colditz GA, 2010, Obesity and cancer, *Oncologist*, 15(6), 556-65.
- [61]. Tretli, S., T. Haldorsen, and L. Ottestad, 1990, The effect of pre-morbid height and weight on the survival of breast cancer patients, *Br J Cancer*, 62(2), 299-303.
- [62]. Bernstein, L., et al., 1994, Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women, *J Natl Cancer Inst*, 86(18), 1403-8.
- [63]. Gandini, S., et al., 2000, Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients, *Eur J Cancer*, 36(5), 636-46.
- [64]. DeSantis, C., R. Siegel, and A. Jemal, 2008, Breast Cancer Facts & Figures 2007-2008, *Am Cancer Society*, 1(32).
- [65]. Singletary, S.E., et al., 2002, Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer, *J Clin Oncol*, 20(17), 3628-36.
- [66]. Edge, S.B. and C.C. Compton, 2010, The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM, *Ann Surg Oncol*, 17(6), 1471-4.
- [67]. Goldhirsch, A., Ingle, J. N., Gelber, R. D., Coates, A. S., Thürlimann, B., & Senn, H. J., 2009, Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer, *Annals of Oncology*, 20(8), 1319-1329.
- [68]. Ferlay, J., Héry, C., Autier, P., & Sankaranarayanan, R., 2010, Global burden of breast cancer, *In Breast cancer epidemiology*, Springer New York, 1-19.
- [69]. Van Dongen, J.A., et al., 2000, Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 trial, *J Natl Cancer Inst*, 92(14), 1143-50.
- [70]. Group, E.B.C.T.C., 2006, Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials, *The Lancet*, 366(9503), 2087-2106.
- [71]. Martin, M., et al., 2005, Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer, *New England Journal of Medicine*, 352(22), 2302-2313.

- [72]. Thor, A. D., et al., 1998, ErbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer, *J Natl Cancer Inst*, 90(18), 1346-60.
- [73]. Goldhirsch, A., et al., 2013, Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer, *Ann Oncol*, 24(9), 2206-23.
- [74]. Hutchins, L.F., Green, S. J., Ravdin, P. M., Lew, D., Martino, S., Abeloff, M., ... & Osborne, C. K., 2005, Randomized, controlled trial of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil versus cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil with and without tamoxifen for high-risk, node-negative breast cancer: treatment results of Intergroup Protocol INT-0102, *Journal of Clinical Oncology*, 23(33), 8313-8321.
- [75]. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., et al., 2011, Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials, *The Lancet*, 378(9804), 1707-16.
- [76]. National Comprehensive Cancer Network, 2014, *NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer*, Version 3.
- [77]. Chan, S., Friedrichs, K., Noel, D., Pinter, T., Van Belle, S., Vorobiof, D., & Yelle, L., 1999, Prospective randomized trial of docetaxel versus doxorubicin in patients with metastatic breast cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 17(8), 2341-2341.
- [78]. Ackroyd, R.K., C.; Brown, N. Reed, M., 2001, The history of photodetection and photodynamic therapy, *Photochem Photobiol*, 74 (5), 656-69.
- [79]. J. Moan, Q.P., 2003, *An outline of the history of PDT*, ed. T. Patrice, Photodynamic Therapy, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- [80]. T.J. Dougherty, J.E.K., A. Goldfarb, K.R. Weishaupt, D. Boyle, A. Mittleman, , 1978, Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors, *Cancer Research*, 1978. 38, 2628-2635.
- [81]. Celli, J. P., et al., 2010, Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization, *Chem Rev*, 110(5), 2795-838.
- [82]. D. Kessel, 2006, Death pathways associated with photodynamic therapy, *Medical Laser Appl*, (21), 219-224.
- [83]. Abo Zeid, M.A., et al., 2013, Molecular cytogenetic evaluation of the efficacy of photodynamic therapy by indocyanine green in breast adenocarcinoma MCF-7 cells, *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 10(2),194 -202.
- [84]. Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S. I., Ikeda, A., & Joh, T., 2011, Current states and future views in photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12(1), 46-67.

- [85]. El-Daly, S.M., et al., 2013, Photodynamic therapeutic activity of indocyanine green entrapped in polymeric nanoparticles, *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 10(2),173-85.
- [86]. B.W. Pogue, K.S.S., S.L. Gibbs-Strauss, S.C. Davis, 2010, Fluorescent molecular imaging and dosimetry tools in photodynamic therapy, *Methods Mol. Biol.*, 635, 207–222.
- [87]. Benson, J., 2016, Indocyanine Green Fluorescence for Sentinel Lymph Node Detection in Early Breast Cancer, *Ann Surg Oncol*, 23(1), 6-8.
- [88]. Etrych, T., Lucas, H., Janouskova, O., Chytil, P., Mueller, T., & Mader, K., 2016, Fluorescence optical imaging in anticancer drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 226, 168-181.
- [89]. Kufe, D.W., Pollock R. E., Weichselbaum R. R., Bast R. C., and Gansler T. S., 2003, *Cancer Medicine*, Vol. 6th ed., USA: BC Decker Inc.
- [90]. Agostinis, P., et al., 2011, Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250-281.
- [91]. Hopper, C., 2000, Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer, *The lancet oncology*, 1(4), 212-219.
- [92]. Zhao, B. and Y. He, 2010, Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy, *Expert review of anticancer therapy*, 10(11), 1797-1809.
- [93]. Josefsen, L. B., and R. W. Boyle, 2008, Photodynamic therapy: novel third- generation photosensitizers one step closer?, *British journal of pharmacology*, 154.1, 1-3.
- [94]. J.D. Spikes, i.R.V.B., G. Jori, E.J. Land, 1985, *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*, ed. T.H. Truscott, New York: Plenum Press, 209–227.
- [95]. Anand, S., et al., 2012, Biomodulatory approaches to photodynamic therapy for solid tumors, *Cancer Letters*, 326(1), 8-16.
- [96]. Baumler, W., et al., 1999, Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light, *British Journal of Cancer*, 80(3-4), 360.
- [97]. Hirano, T., et al., 2007, Singlet oxygen generation by irradiation of Indocyanine green (ICG) and its effect to tissues, *J Jpn Soc Laser Surg Med*, 28,122-128.
- [98]. Desmettre, T., Devoisselle, J. M. & Mordon, S., 2000, Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography, *Surv. Ophthalmol.*, 45, 15–27
- [99]. Wang, Y.G., Kim, H., Mun, S., Kim, D., & Choi, Y., 2013, Indocyanine green-loaded perfluorocarbon nanoemulsions for bimodal 19 F-magnetic resonance/ nearinfrared fluorescence imaging and subsequent phototherapy, *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 3(3), 132-140.

- [100]. Moan, J., Peng, Q., Sorensen, R., Iani, V., & Nesland, J., 1998, The biophysical foundations of photodynamic therapy: Photodynamic Diagnosis and Therapy, *Endoscopy*, 30(4), 387-391.
- [101]. Mang, T.S., 2004, Lasers and light sources for PDT: past, present and future, *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(1), 43-48.
- [102]. Brown, S.B., E. A. Brown, and I. Walker, 2004, The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment, *Lancet Oncol*, (5), 497- 508.
- [103]. Brancalion, L., and Moseley, H., 2002, Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy, *Lasers in medical science*, 17(3), 173-186.
- [104]. Chen, B., Pogue, B. W., Zhou, X., O'Hara, J. A., Solban, N., Demidenko, E., & Hasan, T., 2005, Effect of tumor host microenvironment on photodynamic therapy in a rat prostate tumor model, *Clinical Cancer Research*, 11(2), 720-727.
- [105]. Foster, T. H., Murant, R. S., Bryant, R. G., Knox, R. S., Gibson, S. L., & Hilf, R., 1991, Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy, *Radiation research*, 126(3), 296-303.
- [106]. Chen, B., et al., 2006, Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy, *Critical Review in Eukaryotic Gene Expression*, 16(4).
- [107]. Ortel, B., Shea, C. R., & Calzavara-Pinton, P., 2008, *Molecular mechanisms of photodynamic therapy*, *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 14, 4157-4172.
- [108]. Nowis, D., Makowski, M., Stokłosa, T., Legat, M., Issat, T., & Gołąb, J., 2005, Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy, *Acta Biochimica Polonica*, 52(2), 339-352.
- [109]. Mroz, P., et al., 2011, Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer, *Cancers*, 3(2), 2516-2539.
- [110]. Pettigrew, C.A., and Cotter, T. G., 2009, Deregulation of cell death (apoptosis): implications for tumor development, *Discovery Medicine*, 8(41), 61-63.
- [111]. Rustin, P., 2002, Mitochondria, from cell death to proliferation, *Nature Genetics*, 30(4), 352-354.
- [112]. Rathmell, J.C.T., C.B., 1999 The central effectors of cell death in the immune system, *Annu. Rev. Immunol.*, 17, 781-828.
- [113]. Savill, J., and Valerie Fadok., 2000, Corpse clearance defines the meaning of cell death, *Nature*, 407.6805, 784-788.
- [114]. Igney, F.H.K., P.H., 2002, Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis, *Nat. Rev. Cancer*, 2, 277-288.

- [115]. Danial, N. K., and S. J., 2004, Cell death: Critical control points, *Cell*, 116, 205-219.
- [116]. Buytaert, E.D., M., Agostinis, P., 2007, Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy, *Biochim. Biophys. Acta*, 1776, 86-107.
- [117]. Mathew, R. K., W., V., White, E., 2007, Role of autophagy in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 7, 961-967.
- [118]. Kroemer, G.J., M., 2005, Lysosomes and autophagy in cell death control, *Nat. Rev. Cancer*, 5, 886-897.
- [119]. Kondo, Y.K., T., Sawaya, R., Kondo, S., 2005, The role of autophagy in cancer development and response to therapy, *Nat. Rev. Cancer*, 5, 726-734.
- [120]. Maiuri, Maria Chiara, Alfredo Criollo, and Guido Kroemer, 2010, Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome, *The EMBO Journal*, 29 (3), 515-516.
- [121]. Kessel, D.V., M.G., Reiners, J. Jr., 2006, Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy, *Lasers Surg. Med*, 38, 482-488.
- [122]. Kessel, D. O., N. L., 2009, Initiation of autophagy by photodynamic therapy, *Methods Enzymol.*, 453,1-16.
- [123]. Kallenbach Thieltges, Angela., et al., 2013, Immunohistochemistry, histopathology and infrared spectral histopathology of colon cancer tissue sections, *J. Biophotonics*, 6, 88-100
- [124]. Naumann, D., 2001, FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research, *Appl Spectrosc Rev*, 36(2-3), 239-98.
- [125]. Rodriguez, M. P. Q., 2000, Fourier transform infrared (FTIR) technology for the identification of organisms, *Clinical Microbiology Newsletter* ,22.8, 57-61.
- [126]. Sood, R., 2006, *Textbook of medical laboratory technology*, Jaypee Brothers Medical Publishers.
- [127]. Ogston K. N, M. I., Payne S, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I, Schofield A, Heys SD, 2003, A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival, *Breast*, 12(5), 320-7).
- [128]. Ward Jr, Joe H., 1963, Hierarchical grouping to optimise an objective function, *J. Am. Stat. Assoc*, 58, 236- 244.
- [129]. Hasan, T., et al., 2003, Photodynamic therapy of cancer, *Cancer medicine*, 7, 537-48.
- [130]. Allison, R.R. and K. Moghissi, 2013, Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms, *Clin Endosc*, 46(1), 24-9.

- [131]. Shemesh, C.S., et al., 2014, Indocyanine green loaded liposome nanocarriers for photodynamic therapy using human triple negative breast cancer cells, *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 11(2),193-203.
- [132]. Abels, C., et al., 2000, Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photo oxidation, *Archives of dermatological research*, 292, 404–11.
- [133]. Tseng, W.W., R. E. Saxton, A. Deganutti, and C. D. Liu, 2003, Infrared laser activation of indocyanine green inhibits growth in human pancreatic cancer, *Pancreas*, 27, 42–5.
- [134]. Crescenzi, E., et al., 2004, Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells, *Mol Cancer Ther*, 3(5), 537-44.
- [135]. Lim HJ, O.C., 2011, Indocyanine green-based photodynamic therapy with 785 nm light emitting diode for oral squamous cancer cells, *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 8(4):337–42.
- [136]. Bozkulak, O., Yamaci, R. F., Tabakoglu, O., & Gulsoy, M., 2009, Photo-toxic effects of 809-nm diode laser and indocyanine green on MDA-MB231 breast cancer cells, *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 6(2), 117-121.
- [137]. Onoyama, M., et al., 2014, Effects of photodynamic hyperthermal therapy with indocyanine green on tumor growth in a colon 26 tumor-bearing mouse model, *Oncol Letters*, 7(4),1147-1150.
- [138]. Shemesh, C.S., D. Moshkelani, and H. Zhang, 2015, Thermosensitive liposome formulated indocyanine green for near-infrared triggered photodynamic therapy: in vivo evaluation for triple-negative breast cancer, *Pharm Res*, 32(5),1604-14.
- [139]. Gamal-Eldeen AM, E.-D.S., Borai I.H, Wafay H. A, Abdel-Ghaffar AR., 2013, Photodynamic therapeutic effect of indocyanine green entrapped in polymeric nanoparticles and their anti-EGFR-conjugate in skin cancer in CD1 mice, *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 10(4), 446–59.
- [140]. Funayama, T., Sakane, M., Abe, T., & Ochiai, N., 2012, Photodynamic therapy with indocyanine green injection and near-infrared light irradiation has phototoxic effects and delays paralysis in spinal metastasis, *Photomedicine and laser surgery*, 30(1), 47-53.
- [141]. Chen W. R., A. R., Higgins A. K., Bartels K. E., Nordquist R.E., 1996, Photothermal effects on murine mammary tumors using indocyanine green and an 808-nm diode laser: an in vivo efficacy study, *Cancer Letters*, 98(2),169-73.
- [142]. Shafirstein G, B.W., Hennings LJ, Siegel ER, Friedman R, Moreno MA, et al., 2012, Indocyanine green enhanced near-infrared laser treatment of murine mammary carcinoma, *Int J Cancer*, 130(5),1208–15.

- [143]. Cuenca, R.E., et al., 2004, Breast cancer with chest wall progression: treatment with photodynamic therapy, *Ann Surg Oncol*, 11(3), 322-7.
- [144]. Allison, R., et al., 2001, Photodynamic therapy for chest wall progression from breast carcinoma is an underutilized treatment modality, *Cancer*, 91(1), 1-8.
- [145]. Taber, S.W., V.H. Fingar, and T.J. Wieman, 1998, Photodynamic therapy for palliation of chest wall recurrence in patients with breast cancer, *J Surg Oncol*, 68(4), 209-14.
- [146]. Schuh, M., et al., 1987, Photodynamic therapy for palliation of locally recurrent breast carcinoma, *Journal of Clinical Oncology*, 5(11), 1766-1770.
- [147]. Wyss, P., et al., 2001, Photodynamic therapy of locoregional breast cancer recurrences using a chlorin- type photosensitizer, *International Journal of Cancer*, 93(5), 720-724.
- [148]. Sperduto, P.W., et al., 1991, Photodynamic therapy for chest wall recurrence in breast cancer, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 21(2), 441-6.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Tuğba Kiriş Aydoğan
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	20.04.1988
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
E-Posta Adresi	tugbakiris9@gmail.com

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Kocaeli Üniversitesi
Fakülte	Fen- Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Fizik
Mezuniyet Yılı	07.07.2010

Yüksek Lisans	
Üniversite	Fatih Üniversitesi
Enstitü Adı	Biyomedikal Mühendisliği Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı
Programı	Biyomedikal Mühendisliği Programı
Mezuniyet Tarihi	13.09.2013

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı
Programı	Biyomedikal Mühendisliği Programı
Mezuniyet Tarihi	05.06.2017

Makale ve Bildiriler	
[1]. Kiriş, T., ve diğerleri, 2017, Chlorine e6 tabanlı Fotodinamik Terapinin MiaPaCa-2 ve MRC-5 hücreleri üzerindeki etkisi, <i>Archives of Clinical And Experimental Medicine ACEM</i> , 2(2).	
[2]. Hasbahceci, M., Kiriş, T., Çipe, G., Sharifov, R., Gücin, Z., Kara, S., Onaran, Ö., Müslümanoğlu M., 2017, Ehrlich Asit Karsinomu Oluşturulmuş Farelerde Yüksek Yoğunluklu Odaklanmış Ultrason Dalgaları (HIFU) Etkinliğinin in vivo Araştırılması, <i>Bezmialem Science</i> , (DOI: 10.14235/bs.2017.1417).	

- [3]. Kiris, T., 2015, Photodynamic therapy application of PAMAM-porphyrin molecule on stomach cancer cells, *Proceedings of SPIE Vol. 9308*, 93080X.
- [4]. Sroka, R., Kiris, T., 2014, Investigation on the impact of pulse duration for laser induced lithotripsy, *Proceedings of SPIE Vol. 8926*, 89261G.
- [5]. Kiris, T., 2015, Optical characterization of pancreatic normal and tumor tissues with double integrating sphere system, *Optical Interactions with Tissue and Cells XXVI*, Proceedings of SPIE Vol. 9321, 932116.
- [6]. Kiris, T., ve diğ erleri, 2014 Antalya, İleri evre pankreas t um orlerinde deneysel bir yaklaşım, *Proceedings of 19. Ulusal Cerrahi Kongresi*.
- [7]. Tabakoğ lu, H.Ö., Kiriş, T., Kiriş, A., ve diğ erleri, 2016, *Biyomedikal Optik ve Lazerler*, Biyomedikal Mühendisliğ inin Temelleri, Asyalı M. H. (ed), Nobel Akademik Yayıncılık, 623-653.
- [8]. Kiris, A., Akbulut, S., Kiris, T., ve diğ erleri, 2014 Antalya, Primer Meme kanserinde Fotodinamik Terapi ve Kemoterapinin Etkisi, *19. Ulusal Cerrahi Kongresi*.
- [9]. Rencüzoğ ulları, Ç., Bireller, E. S., Engin, C., Kiriş, T., ve diğ erleri, 2013 İ zmir, Volume :1, Investigation On Corilagin and Photodynamic Therapy On Brain Glioblastoma Cell Lines, *1st Cell Death Research Congress with International Participation*.
- [10]. Bireller, E. S., Engin, C., Rencüzoğ ulları, Ç., Kiriş, T., ve diğ erleri, 2013 İ zmir, Volume:1, Investigation of succinic acid and photodynamic therapy on AGS and HGC27 cell line, *1st Cell Death Research Congress with International Participation*.
- [11]. Engin, C., Rencüzoğ ulları, Ç., Bireller, E.S., Kiriş, T., ve diğ erleri, 2013 İ zmir, Volume:1, Investigation of hesperidin and photodynamic therapy on U87 glioblastoma cell line, *1st Cell Death Research Congress with International Participation*.
- [12]. Karatepe, O., Kiris, T., ve diğ erleri, 2013 Antalya, Çift toplayıcı küre sistemi ile t um örlü ve sağ lıklı pankreas dokusunun optik özelliklerinin karakterizasyonu: prospektif klinik çalışmanın erken dönem sonuçları, Volume:1, *Proceedings of 11. Ulusal Hepatopankreatobiliyer Cerrahi Kongresi*.
- [13]. Kiriş, T., ve diğ erleri 2012 Antalya, In-Vitro Under the Reproducible Conditions Investigation on Ho:YAG Laser Applications for Stone Fragmentation, *Proceedings of Tıp Teknoloji*.
- [14]. Kiris, T., 2013, *PAMAM Modified Porphyrin Mediated Photodynamic Therapy Effects on AGS stomach Cancer Cell Lines; In vitro Study*, Thesis (MSc.), Biyomedikal Mühendislik Enstitüsü, Fatih University.

- [15]. Kiris, T., ve diğeri, 2015 Muğla, Characterization Effectiveness of Photodynamic Therapy Treatment on Breast Cancer Formed Nude Mice based on FT-Raman and FT-IR Spectroscopy: Preliminary Results, *Proceedings of TipTekno '15*.

