



# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

## HCT116 ve HT29 Kolon Kanseri Hücrelerinde 5-Florourasil Kaynaklı Hücre Ölümünün Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi ile İncelenmesi

Dilşad ÖZERKAN <sup>a,\*</sup>, Ferdane DANIŞMAN KALINDEMİR TAŞ <sup>b</sup>, Naci TÜZEMEN <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Kastamonu Üniversitesi, Kastamonu TÜRKİYE

<sup>b</sup> Fizyoloji A.B.D., Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıp Fakültesi, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Erzincan, TÜRKİYE

\* Sorumlu yazarın e-posta adresi: dilsadokan@gmail.com

DOI: 10.29130/dubited.993669

### ÖZ

Kolon kanseri, tüm dünyada yaygın olan ve yüksek oranda ölümcül bir kanser tipidir. Tüm kanserlerde olduğu gibi kolon kanserinin seyrinin izlenmesi kritik bir öneme sahiptir. 5-Florourasil (5-FU) kolon kanserlerinde sıklıkla kullanılan bir antikanser ilaçtır ve hücre ölümü esnasında hücrelerde bir takım biyokimyasal ve moleküler farklılıklara neden olmaktadır. Bu çalışmada HCT116 ve HT29 kolon kanseri hücreleri 5-FU kemoterapi ilacı ile inkübe edildikten sonra, 5FU'nun hücreler üzerinde oluşturduğu biyokimyasal değişikliğin tespiti için Fourier transform kızılötesi (FTIR) spektroskopisi kullanılmıştır. 5-FU'nun inhibisyon yüzdesinin 50'ye eşit olduğu konsantrasyonu (IC50), MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. IC50 değeri saptandıktan sonra FTIR ölçümleri alındı. Buna göre, 5-FU IC50 değeri sırasıyla HCT116 hücreleri için 12,69 µg/ml, HT29 hücreleri için 10,10 µg/ml bulunmuştur. 5-FU'nun sebep olduğu hücre ölümünün göstergeleri olduğu söylenen lipid içeriğindeki artış ile nükleik asit oranı, total hücresel proteinlerin α-sarmal ve β-yaprak ikincil yapıları ve aminoasit kalıntılarının azalması, kollajen konformasyonundaki değişiklikler gibi IR biyobelirteçlerindeki değişiklikler FTIR spektroskopisi ile gösterilmiştir. Sonuç olarak hem ucuz ve hem de hızlı bir yöntem olan FTIR ile kanser hücre ölümünün incelenmesi alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Kolon kanseri, 5-florourasil, FTIR

## Investigation of 5-Fluorouracil-Induced Cell Death in HCT116 and HT29 Colon Cancer Cells by Fourier Transform Infrared Spectroscopy

### ABSTRACT

Colon cancer is a common and highly lethal type of cancer all over the world. As with all cancers, monitoring the course of colon cancer is critical. 5-Fluorouracil (5-FU) is an anticancer drug frequently used in colon cancers and causes some biochemical and molecular differences in cells during cell death. In this study, after incubation of HCT116 and HT29 colon cancer cells with 5-FU chemotherapy drug, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to detect the biochemical change caused by 5FU on cells. The concentration (IC50) of 5-FU at which percent inhibition equals 50 was determined using the MTT method. FTIR measurements were taken after the IC50 value was determined. Accordingly, the IC50 value of 5-FU was found to be 12.69 µg/ml for HCT116 cells and 10.10 µg/ml for HT29 cells, respectively. FTIR spectroscopy showed changes in IR biomarkers such as the increase in lipid content, which is said to be indicators of cell death caused by 5-FU, and the nucleic acid ratio, the α-helix and β-sheet secondary structures of total cellular proteins, and the reduction of amino acid

524

residues, and changes in collagen conformation. As a result, examining cancer cell death with FTIR, which is both a cheap and fast method, can be used as an alternative method.

**Keywords:** *Colon cancer, 5-fluorouracil, FTIR*

## **I. GİRİŞ**

Kanserlerin, kendi kendini yenileme yeteneğini korurken, kanserin kaynağı olan dokuya karşılık gelen çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen kanser kök hücreleri (KKH'ler) tarafından yönlendirildiği fikri, artık esas olarak tüm kanserler için yaygın olarak kabul edilmektedir [1]. Tüm kanser türleri arasında kolorektal kanser, en sık görülen maligniteler arasındadır ve gelişmiş ülkelerde kansere bağlı ölümlerin en sık ikinci nedenidir [2, 3]. Cerrahinin yanında kemoterapi de kolorektal kanser tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır ve 5-florourasil (5-FU), kolon kanseri tedavisinde tercih edilen kemoterapötik bir ajandır [4]. 5-FU, Kolorektal kanserler, meme ve baş ve boyun kanserleri dahil olmak üzere katı tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [5]. 5-FU, tümör hücresine girdiğinde, timidilat sentetazın (TS) inhibisyonu yoluyla veya apoptozun aktivasyonuna yol açan RNA ve DNA'ya dahil edilmesi yoluyla sitotoksik etkiler gösterebilir [6, 7].

Titreşimsel spektroskopi teknikleri günümüzde hızla ilerlemektedir ve bu ilerlemelerin ardından tıbbi biyolojideki uygulamaları artmaktadır. Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR), kimyada analitik bir araç olarak kullanılmaktadır [8, 9]. Dahası FTIR, minimal numune hazırlama ile kanseri tespit etmek ve tanımlamak için basit, hızlı ve invaziv olmayan bir yöntem olarak uygulanabilir ve karmaşık bir karışımdaki çeşitli bileşenlerin kalitatif tanımlaması ve kantitatif analizi için kullanılabilir [7, 10-18]. Ancak halen literatürde hücre ölümü ile ilişkili bölgeler tam olarak aydınlatılamamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada HCT116 ve HT29 kolon kanseri hücrelerine 5-FU uygulanarak kemoterapiye dirençli hücreler ile uygulanmamış hücre grupları arasındaki moleküler yapıdaki değişikliklerin ve apoptotik bölgelerin anlaşılması planlanmıştır.

## **II. MATERYAL ve METOD**

### **A. HÜCRE KÜLTÜRÜ**

#### **A. 1. Besiyeri Hazırlanması**

17.7 g/100 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma Kat. No: D 2902) üzerine 3.024 g/100 mL NaHCO<sub>3</sub> (Sigma Kat. No: S 5761) ilave edilmiştir. %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma Kat. No: F 4135) ve %1 penisilin/streptomisin (Merck Kat No: 11074440001) eklendi. +40 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **A. 2. Kolon Hücre Hatlarının Hazırlanması**

Çalışma için insan kolon kanseri (ATCC) hücre hatları, HT29 ve HCT116 kullanıldı. Hücreler, 50 ve 250 mL'lik kültür şişelerinde %10 FBS içeren DMEM'de büyütüldü ve toplam hücre sayısı  $1 \times 10^5$ /mL olarak belirlendi. Daha sonra 96'lık düz tabanlı mikropalakaya aktarıldı ve nemli ortamda (NuAire US) %5 CO<sub>2</sub> içeren bir inkübatörde 37 °C'de 1 gün inkübe edildi.

#### **A. 3. 5-FU Uygulanması Sonrası Hücre Canlılığı Analizi**

MTT, canlı hücrelerin 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromürü formazana indirgeme yeteneğine dayanan kolorimetrik bir tahlildir. Sitotoksik etkileri belirlemek için laboratuvarımız tarafından modifiye edilen MTT'nin bir versiyonu olan Mosmann yöntemi kullanıldı [18]. 5-FU (10, 20, 30, 50 µg/mL) uygulamasına T25 kültür şişelerinde büyütülen HCT116 ve HT-29 hücreleri %85 konfluent hale geldiğinde (yaklaşık  $2 \times 10^6$  hücre) başlandı. Belirlenen dozlar hücrelere ilave edildikten

sonra, 3 gün 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletilmiştir. 3 günün sonunda 10 µl MTT reaktifi ilave edilerek, 4 saat inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda isopropil alkol ile formazan çözülerek ELISA okuyucuda (BioTek, ABD) 570 nm'de platedeki kuyucukların absorbanları ölçülmüştür. MTT analizlerinin sonucunda doz/cevap eğrileri hazırlanmış, bileşiklerin IC<sub>50</sub> (hücrelerin %50'sinin büyümesini inhibe eden konsantrasyon) hesaplanmış ve bu parametreye göre 5-FU'nun etkinliği karşılaştırılmıştır.

## **B. FTIR SPEKTROSKOPİSİ İÇİN NUMUNE HAZIRLAMA**

FTIR analizi, 5-FU için belirlenen IC<sub>50</sub> konsantrasyonu kullanılarak yapılmıştır. Gruplar; kontrol grupları (HCT116 ve HT29) ve 5-FU uygulanmış HCT116 ve HT29 grupları olarak belirlenmiştir. HCT116 ve HT29 hücreleri 6'lı kuyucuklara ekilmiştir. Hücreler %80 konfluensiye ulaştığında, IC<sub>50</sub> değeri belirlenmiş ve 5-FU konsantrasyon oranında kuyucuklara ilave edilmiştir. 72 saat 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde, nemli ortamda inkübasyona bırakılmıştır. 72 saatin sonunda inkübe edilen hücreler tripsin ile zeminden kaldırılmış ve 3 kez PBS ile santrifüjlenerek yıkanarak süpernatant atılmıştır. Pellet 1 ml PBS içerisinde çözülmüş ve önceden etiketlenen cam lamlar üzerine yayılmıştır. Lam üzerindeki hücre süspansiyonları kurumaları için 24-48 saat çeker ocakta bekletilmiştir. Kuruyan örnekler, ependorf tüpleri içerisinde alınarak analize hazır hale getirilmiştir. Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan ATR-FTIR (Bruker Alpha) cihazında analiz edilmiştir.

## **C. İSTATİKSEL ANALİZ**

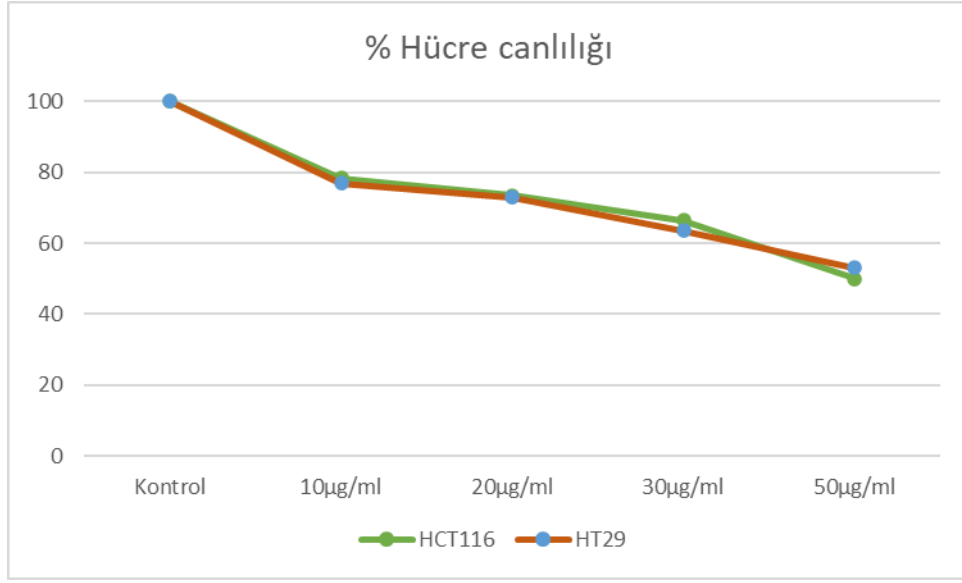
IC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesi için Graphpad Prism 5.0.1 Programı kullanılmıştır. Programa göre IC<sub>50</sub>'yi belirlemek için bir doz-cevap eğrisi oluşturulur. Öncelikle bir XY veri tablosu oluşturulmuş, veri girişi yapıldıktan sonra, sırasıyla logaritmik değerler transforme ve normalize edildikten sonra analiz kısmından “non-linear regression (curve fit) kısmı seçilmiştir. Ardından “dose-response inhibition” kısmından IC<sub>50</sub> değeri ve doz cevap eğrisi belirlenmiştir.

# **III. BULGULAR ve TARTIŞMA**

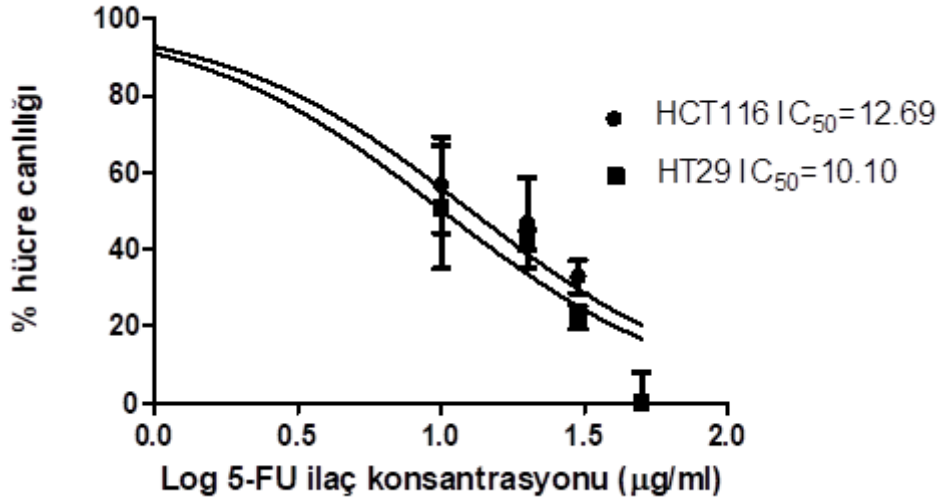
HCT116 agresif bir yapı gösterirken HT29 agresif değildir. HCT116 farklılaşma yeteneğine sahip değildir, bu nedenle HT29, koloni oluşturma kabiliyetine sahip hücelere dönüşebilir [19-21]. Bu farklı özellikleri nedeniyle çalışmamızda 2 farklı kolon hücre hattı seçilmiş ve sonuçları her yönden karşılaştırılmıştır.

## **A. HÜCRE CANLILIĞI**

5-FU dozları 10, 20, 30 ve 50µg/ml aralığında seçilerek HCT116 ve HT29 hücrelerine uygulanmıştır. Buna göre her iki hücre hattında da 50µg/ml dozu hücre canlılığını %50 inhibe etmiştir (Şekil 1). Buna göre veriler Graphpad Prism 5.0.1 Programında analiz edilerek IC<sub>50</sub> değeri HCT116 için 12,69 µg/ml; HT29 için 10,10 µg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 2). 5-FU için literatür ile benzer dozlar seçilmiş ve hücre canlılığı benzer şekilde azalmıştır [22, 23].



Şekil 1. 5-FU uygulanmış HCT116 ve HT29 kolon kanseri hücrelerinde %canlılık grafiği.



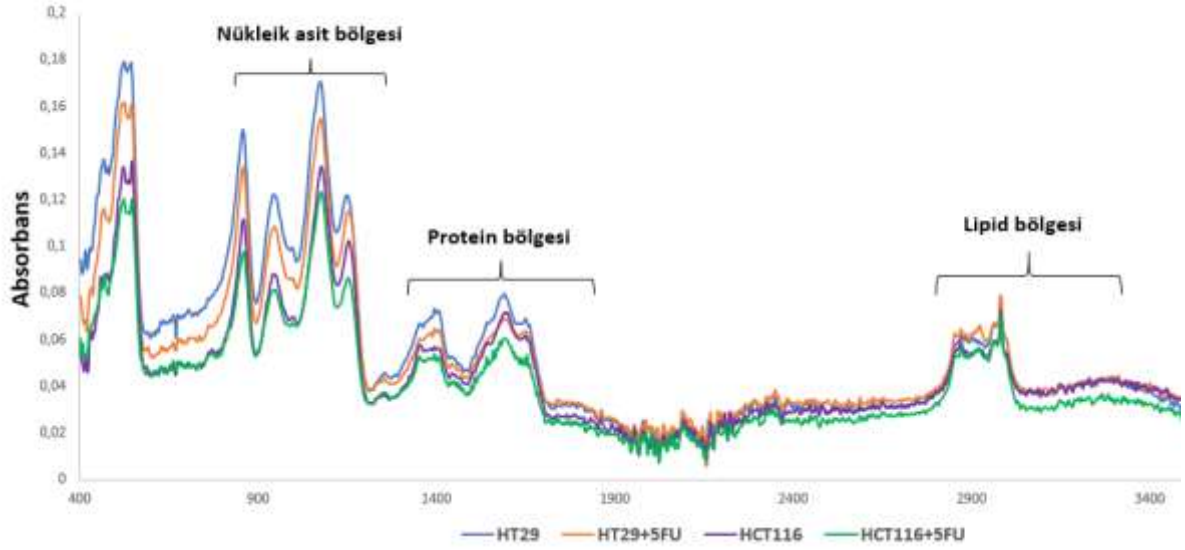
Şekil 2. 72 saatlik 5-FU uygulaması sonrasında HCT116 ve HT29 kolon kanseri hücre dizilerinde IC50 analizi. (Hücreler, 10, 20, 30 ve 50 µM dozlar kullanılarak 5-FU ile veya 5-FU olmadan inkübe edildi ve MTT tahlili ile inkübasyondan sonra hücre süspansiyonunun absorbansı ölçülerek canlı hücre miktarı tespit edildi. Bu verilere göre normalize değerler belirlenerek IC<sub>50</sub> değeri Graphpad Prism 5 programı kullanılarak belirlendi.).

## B. FTIR ANALİZİ

Araştırmada, bireysel fonksiyonel grupların absorbans değerindeki farklılıkları ve tepe noktalarının kaymasını incelenmiştir. Kontrol gruplarından HCT116 ve HT29 kolon kanseri hücrelerinin ve 72 saat boyunca 5-FU ile muamele edilen hücrelerin absorbans spektrumları Şekil 3'te, tüm bölgelerdeki FTIR pikleri ve anlamları ise Tablo 1'de gösterilmektedir.

**Tablo 1.** HCT116 ve HT29 kontrol grupları ve 5-FU uygulanmış deney gruplarının ortalama IR spektrumunun önceden tanımlanması.

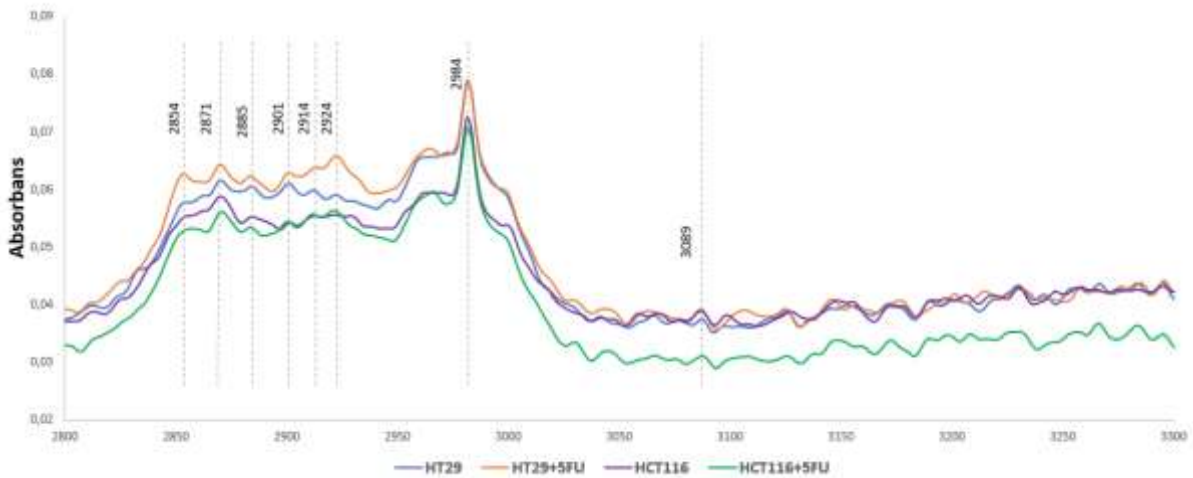
FTIR Piki	Anlamı	Kaynakça
942cm <sup>-1</sup>	Oksazin halkası	[14]
1075 cm <sup>-1</sup>	Simetrik fosfat germe modları veya n( PO <sub>2</sub> ) sym.	[15]
1150 cm <sup>-1</sup>	Tahmini karbonhidrat konsantrasyonları verir (malign hücrelerde daha düşük)	[24,25]
1254 cm <sup>-1</sup>	Amid III	[26,27].
1352 cm <sup>-1</sup>	C-O germe ve düzlem içi C-O-H bükme	[28]
1395 cm <sup>-1</sup>	Amino asit kalıntılarının alifatik yan grupları	[26]
1651 cm <sup>-1</sup>	Amid I	[29,30]
1592 cm <sup>-1</sup>	Amid II	[30]
2854 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>2</sub> simetrik germe	[31]
2871 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>3</sub> simetrik germe	[32]
2885 cm <sup>-1</sup>	C-H germe	[17]
2901 cm <sup>-1</sup>	v, CH	[33]
2914 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>2</sub> bandı	[35]
2924 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>2</sub> asymmetric	[35]
2984 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>a,a'</sub> germe	[17]
3089 cm <sup>-1</sup>	C=C	[36]



**Şekil 3.** Kontrol ve 5-FU ile muamele edilmiş HCT116 ve HT29 kolon kanseri gruplarının ortalama IR spektrumları gösterilmektedir.

### B.1. Lipitlerle ilgili Bant Değişiklikleri

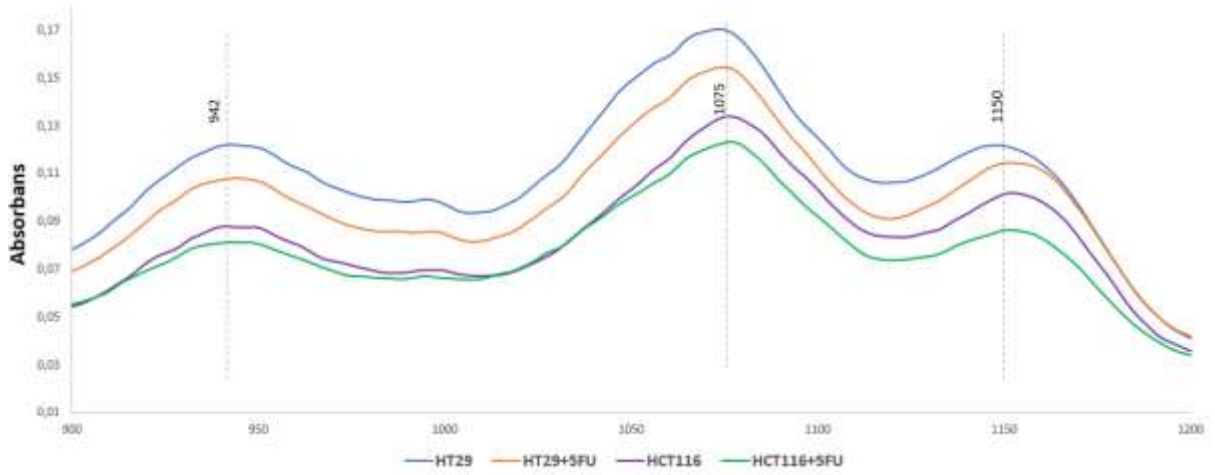
Ana fonksiyonel grupların nispi yoğunluk oranlarındaki değişiklikler Şekil 4'de gösterilmektedir. Hücre lipidleri ile bağlantılı bantlar esas olarak 3089, 2984, 2924, 2914, 2901, 2885, 2871 ve 2854  $\text{cm}^{-1}$ 'de meydana geldi. Lipit bölgesinde yer alan piklerin spektral özellikleri, hücresel membranlardaki yağ asitlerinde bulunan  $\text{CH}_2$  ve  $\text{CH}_3$  metilen gruplarının asimetric ve simetric C-H germe titreşimlerinin absorpsiyon bantlarıdır. Bu bantlardaki değişiklikler doku ve hücrelerdeki lipid değişikliklerini yansıtabilir [37]. 5-FU uygulanmış ve uygulanmamış HCT116 ve HT29 hücrelerinde meydana gelen pikler karşılaştırılmıştır. Buna göre 2854, 2874, 2885, 2984 ve 3089  $\text{cm}^{-1}$  bölgelerinde 5-FU uygulanan HCT116 gruplarında uygulanmayanlara göre düşük bulunurken; 2901 ve 2914 ve 2924  $\text{cm}^{-1}$  absorbans pikleri benzerdir. HT29 gruplarında ise tüm lipit bölgesi pikleri 5-FU uygulananlarda yüksek bulunmuştur. Li ve arkadaşları, kanser hastalarının serumunda, ilerlemiş kolon kanserli hastalarda trigliserit ve HDL kolesterol seviyesinin, erken evre hastalığı veya sağlıklı olanlardan önemli ölçüde düşük olduğunu göstermiştir [38]. Bu iki lipid fraksiyonu,  $\text{CH}_2$  ve  $\text{CH}_3$  gruplarıyla uzun karbon zincirleri tarafından oluşturulmuştur [39].



**Şekil 4.** Lipid bölgesi 3300-2800  $\text{cm}^{-1}$  aralığına ayarlanmıştır. 5-FU'nun HCT116 ve HT29 kolon kanseri hücrelerine uygulanması sonucunda görülen FTIR pik değerleri.

## B.2. Nükleik Asitlerle İlgili Bant Değişiklikleri

Ana fonksiyonel grupların nispi yoğunluk oranlarındaki değişiklikler Şekil 5'te gösterilmektedir.  $1075\text{ cm}^{-1}$  bölgesindeki bant, esas olarak fosfodiester gruplarının simetrik modlarından kaynaklanmaktadır. Fosfat germe modları, nükleik asitlerdeki fosfodiester gruplarından kaynaklanır ve malign dokulardaki nükleik asitlerde bir artış olduğunu gösterir [15]. Bu bant, bir hücrenin nükleik asit içeriği ile ilişkilidir [40].  $1075\text{ cm}^{-1}$  de ki pik incelendiğinde 5-FU uygulanmış HCT116 ve HT29 gruplarında uygulanmayanlara göre bir düşüş izlenmiştir. Bu durum hücre ölümünün herhangi bir aşamasında kaybedilen nükleik asit içeriğiyle olabilir. Altta yatan nedenleri araştırmak için daha fazla araştırma gereklidir.



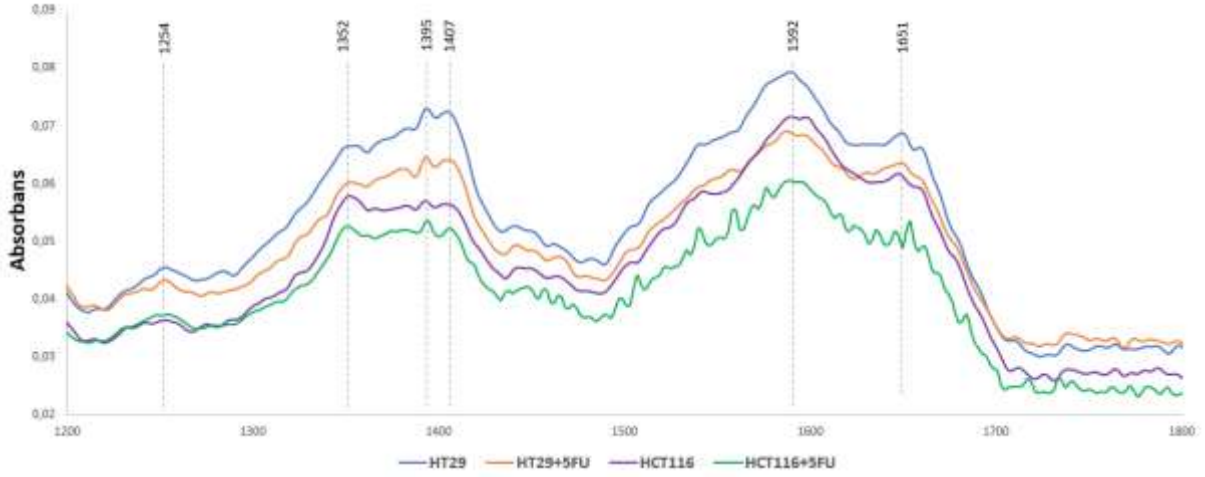
Şekil 5. Nükleik asit bölgesi  $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  aralığına ayarlanmıştır. 5-FU'nun HCT116 ve HT29 kolon kanseri hücrelerine uygulanması sonucunda FTIR pik değerleri görülmektedir.

## B.3. Proteinlerle İlgili Bant Değişiklikleri

Ana fonksiyonel grupların nispi yoğunluk oranlarındaki değişiklikler Şekil 6'da gösterilmektedir.  $1395\text{ cm}^{-1}$  titreşim bantları, sırasıyla ser, thr ve tirozin C-O (H) germe titreşiminden kaynaklanmaktadır. Bu durum hücrelerin dış lipid tabakası üzerindeki fosfatidilserin maruziyetini arttırdığını göstermektedir. 5-FU uygulanan HCT116 grubunda, kontrol grubuna kıyasla piklerde bir artış söz konusuken; 5-FU uygulanmış HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna göre bir azalma görülmüştür. Amino asit kalıntılarının alifatik yan gruplarını temsil eden  $1395\text{ cm}^{-1}$  tepe noktasındaki bant, her iki 5-FU uygulanmış hücre gruplarında diğer gruplardakilere kıyasla daha düşük dalga sayılarına kaymıştır.

Tüm spektrumlarında, sırasıyla  $1651\text{ cm}^{-1}$ 'de amid I ve  $1592\text{ cm}^{-1}$  amid II bölgelerindeki absorpsiyonlar için esas pikler gözlemlendi.  $1651\text{ cm}^{-1}$ 'deki titreşim bandı, öncelikle proteinlerin  $\alpha$ -sarmal ikincil yapısı ile [41],  $1592\text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bantları, proteinlerin  $\beta$ -pilili ikincil yapısı ile karakterize edildi [42]. 5-FU uygulanmış HCT116 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde uygulanmayanlara göre pik yoğunluğunda bir azalmanın ve kaymaların olduğu gözlenmektedir. Yoğunluktaki bu azalma, hücre ölümü sonucunda hücre membranındaki proteinlerdeki  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -pilili moleküler içeriğin azaldığını ifade etmektedir.

$1254\text{ cm}^{-1}$  amid III piki, kollajen konformasyonu ile ilişkilidir [43]. Hücre ölümü ile kollajen yoğunluğunda değişiklikler söz konusudur. 5-FU uygulanması sonucunda, her iki kolon kanseri hücre hattında kollajen konformasyonunda ciddi değişiklikler meydana gelmiştir.



**Şekil 6.** Protein bölgesi 1200-1800  $cm^{-1}$  aralığına ayarlanmıştır. 5-FU'nun HCT116 ve HT29 kolon kanseri hücrelerine uygulanması sonucunda görülen FTIR pik değerleri şekilde gösterilmiştir.

## IV. SONUÇ

Hücre hatları, birincil insan dokusunun aksine, zaman içinde tekrar tekrar kullanılabilen değerli bir kaynağı temsil eder. Mutasyon içeriği [44] ve mRNA ekspresyonu açısından kolaylıkla karakterize edilebilirler. Ayrıca, birincil insan dokusundan elde edilen verilerin yorumlanmasını etkileyebilecek stromal doku ile kontamine değildirler [45]. Hücre hatlarının orijinal olarak izole edildikleri tümörleri temsil ettiğine dair güçlü kanıtlar vardır [46] ve orijinal dokuda bulunanlara benzer yapılar geliştirebilir [47]. Veriler, HCT116'nın yüksek düzeyde agresif ve farklılaşmayan, lümen oluşturan kolonilere yol açmayan karakterizasyonu tutarlıdır. Ancak, HT29 en azından bir miktar farklılaşma kapasitesini korumuştur [48]. Kemoterapinin kanser üzerindeki iyileştirici etkisini izlemek ve değerlendirmek için birçok yöntem bulunmasına rağmen, kolon kanseri, kanser hastaları arasında en sık ölüm nedeni olmaya devam etmektedir. Bu nedenle kolon kanseri kemoterapisini izlemek için yeni tekniklerin araştırılması klinik öneme sahiptir. Son yıllarda, biyolojik makromoleküllerin yapısını belirlemek için Fourier Dönüşümü Kızılötesi spektroskopisinin kullanıldığı çok fazla çalışma bulunmaktadır. CT (bilgisayarlı tomografi), MRI (manyetik rezonanslı görüntüleme) ya da PET (nükleer tıbbi görüntüleme) gibi görüntüleme yöntemlerle karşılaştırıldığında, IR yöntemi nispeten ucuzdur, hızlıdır ve herhangi bir reaktifte ihtiyaç duyulmamaktadır. Diğer bir taraftan, yüksek çözünürlükte bir proteinin tam üç boyutlu yapısı, X-ışını kristalografisi ile belirlenebilir. Bu teknik, molekülün tüm proteinler için uygun olmayan iyi düzenlenmiş bir kristal oluşturmasını gerektirir. X-ışını kristalografisine bir alternatif, çok boyutlu nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisidir. NMR spektroskopisi kullanılarak proteinlerin çözeltideki yapıları belirlenebilir. Büyük proteinlerin NMR spektrumlarının yorumlanması çok karmaşıktır, bu nedenle mevcut uygulaması küçük proteinlerle (~15-25 kDa) sınırlıdır. Bu sınırlamalar, atomik çözünürlükte yapılar üretemeyen ancak aynı zamanda proteinler hakkında (özellikle ikincil yapı hakkında) yapısal bilgi sağlayan alternatif yöntemlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu yöntemler dairesel dikroizm (CD) ve titreşim (kızılötesi ve RAMAN) spektroskopisini içerir. FTIR spektroskopisinin tekniği, çeşitli ortamlarda sadece az miktarda protein (1mM) gerektirir. Bu nedenle, yüksek kaliteli spektrumlar, arka plan floresansı, ışık saçılması ve proteinlerin boyutuyla ilgili problemler olmadan nispeten kolay bir şekilde elde edilebilir. Her yerde bulunan su emilimi matematiksel yaklaşımlarla çıkarılabilir. Proteinlerin spektrumlarında örtüşen alt bileşenleri ayırabilen yöntemler artık mevcuttur. Bu gerçekler, pratik biyolojik sistemleri FTIR spektroskopisi ile yapılan çalışmalara uygun hale getirmiştir [49, 50]. Bununla birlikte halen araştırılması gereken çok fazla kısım bulunmaktadır. Farklı yöntemlerin uygulanmasına rağmen, FTIR spektrumlarının özdeş alanlarının piklerinin tanımlanmasında önemli bir benzerlik olduğu görülmektedir. Bu çalışma ile biri tümörojenik, diğeri non-tümörojenik olan kolon hücrelerinde bulunan önemli piklerin tespit edilerek, 5-FU



uygulamasının bu pikleri nasıl değişikliğe uğrattığını göstermekti. Araştırmamızda FTIR spektroskopisinin ayrıca, hücre membranındaki lipit/nükleik asit/kollajen konformasyonundaki ve protein ikincil yapısındaki değişikliklere bağlı olarak hücre ölümünü ayırt edebildiğini de gösterilmiştir. Sonuç olarak, FTIR spektroskopik çalışmalarda karşılaşılan frekansların benzersiz bir koleksiyonunun hazırlanmasının, gelecekteki çalışmalar için önemli yardım sağlayabileceğine inanılmaktadır.

**TEŞEKKÜR:** Çalışmada gerek laboratuvar imkanları gerek fikirleriyle bize yol gösteren sayın Prof. Dr. D. Serap KURUCA'ya teşekkürlerimizi iletiriz.

## **V. KAYNAKLAR**

- [1] T. Reya, S.J. Morrison, M.F. Clarke, and I.L. Weissman, "Stem cells, cancer, and cancer stem cells," *Nature*, vol. 414, pp. 105–111, 2001.
- [2] L.H. Kushi, T. Byers, C. Doyle, C. L. Rock, W. Demark-Wahnefried, E. V. Bandera, *et al.* "American cancer society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity," *CA Cancer J Clin*, vol. 56, pp. 254-281, 2006.
- [3] F. Bray, J. Ferlay, I Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 68, pp. 394-424, 2018.
- [4] K. Sasaki, N.H. Tsuno, E. Sunami, G. Tsurita, K. Kawai, Y. Okaji, *et al.* "Chloroquine potentiates the anti cancer effect of 5 fluorouracil on colon cancer cells," *BMC Cancer*, vol. 10, pp. 370, 2010.
- [5] G. Folprecht and C.H. Kohne, "The role of new agents in the treatment of colorectal cancer," *Oncology*, vol. 66, pp. 1-17, 2004.
- [6] M.D. Wyatt and D.M. Wilson, "Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil," *Cell Mol Life Sci*, vol. 66, no.3, pp. 788-799, 2009.
- [7] A.L. Stelling, D. Toher, O. Uckermann, J. Tavkin, E. Leipnitz, J. Schweizer, *et al.* "Infrared spectroscopic studies of cells and tissues: triple helix proteins as a potential biomarker for tumors," *PLoS One*, vol. 8, pp. e58332, 2013.
- [8] M.J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, R. Bhargava, H. J. Butler, *et al.* (2014). "Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials," *Nature protocols*, vol.9(8), pp. 1771-1791, 2014.
- [9] A. Dazzi, C. B. Prater, "AFM-IR: Technology and applications in nanoscale infrared spectroscopy and chemical imaging." *Chemical reviews*, vol. 117, no.7, pp. 5146-5173, 2017.
- [10] G. Bellisola and C. Sorio, "Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis," *Am J Cancer Res*, vol. 2, pp. 121, 2012.
- [11] G. Güler, E. Acikgoz, N.Ü.K. Yavasoglu, B. Bakan, E. Goormaghtigh ve H. Aktug, "Deciphering the biochemical similarities and differences among mouse embryonic stem cells, somatic and cancer cells using ATR-FTIR spectroscopy," *Analyst*, vol. 143, no. 7, pp. 1624-1634, 2018.

- [12] A. Sala, D.J. Anderson, P.M. Brennan, H.J. Butler, J.M. Cameron, M.D. Jenkinson, *et al.* "Biofluid diagnostics by FTIR spectroscopy: A platform technology for cancer detection," *Cancer letters*, vol. 477, pp. 122-130, 2020.
- [13] P. Giamougiannis, C.L. Morais, B. Rodriguez, N.J. Wood, P. L. Martin-Hirsch, and F. L. Martin, "Detection of ovarian cancer ( $\pm$ neo-adjuvant chemotherapy effects) via ATR-FTIR spectroscopy: comparative analysis of blood and urine biofluids in a large patient cohort," *Analytical and bioanalytical chemistry*, pp. 1-13, 2021.
- [14] P. Thirukumar, A. Shakila, S. Muthusamy, "Synthesis and characterization of novel bio-based benzoxazines from eugenol," *Rsc Advances*, vol. 4, no. 16, pp. 7959-7966, 2014.
- [15] C. Junhom, N. Weerapreeyakul, W. Tanthanuch, K. Thumanu, "FTIR microspectroscopy defines early drug resistant human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells," *Exp. cell Res*, vol. 340, no. 1, pp. 71-80, 2016.
- [16] P. G. Andrus and R.D. Strickland, "Cancer grading by Fourier transform infrared spectroscopy," *Biospectros.* vol. 4, no. 1, pp. 37-46, 1998.
- [17] X. Li, J. Lin, J. Ding, S. Wang, Q. Liu and S. Qing, "Raman spectroscopy and fluorescence for the detection of liver cancer and abnormal liver tissue," In Engineering in Medicine and Biology Society, IEMBS'04, 26th Annual International Conference of the IEEE, San Francisco, CA, 2004, pp. 212-215.
- [18] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *J Immunol Methods*, vol. 65, pp. 55-63, 1983.
- [19] S. Chakrabarty, "Regulation of human colon-carcinoma cell adhesion to extracellular matrix by transforming growth factor beta 1," *Int J Cancer*, vol. 50, no. 6, pp. 968-73, 1992.
- [20] S.R. Choi, M. Cho, H.R. Kim, D.H. Ahn, M.H. Slesinger, Y.S. Kim, "Biological properties and expression of mucins in 5-fluorouracil resistant HT29 human colon cancer cells," *Int J Oncol*, vol. 17(1), pp. 141-147, 2000.
- [21] M.J. Demers, S. Thibodeau, D. Noël, N. Fujita, T. Tsuruo *et al.* "Gauthier R, Arguin M, Vachon PH. Intestinal epithelial cancer cell anoikis resistance: EGFR-mediated -sustained activation of Src overrides Fak-dependent signaling to MEK/Erk and/or PI3-K/Akt-1," *J Cell Biochem*, vol. 107, no. 4, pp. 639-654, 2009.
- [22] F. Lokiec, F. Ghiringhelli, A. Bernard, A. "Isolated Lung Perfusion as an Adjuvant Treatment of Colorectal Cancer Lung Metastases: A Preclinical Study in a Pig Model," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e59485, 2013.
- [23] G. B. Park, Y. H. Chung, D. Kim, "2-Deoxy-D-glucose suppresses the migration and reverses the drug resistance of colon cancer cells through ADAM expression regulation," *Anti-Cancer Drugs*, vol. 28, no. 4, pp. 410-420, 2017.
- [24] M. Khanmohammadi, and A. B. Garmarudi, "Infrared spectroscopy provides a green analytical chemistry tool for direct diagnosis of cancer," *TrAC Trends Analytical Chem*, vol. 30, no. 6, pp. 864-874, 2011.
- [25] G. E. Menzies, H. R. Fox, C. Marnane, L. Pope, V. Prabhu, S. Winter, P. D. Lewis, "Fourier transform infrared for noninvasive optical diagnosis of oral, oropharyngeal, and laryngeal cancer," *Translational Res*, vol. 163, no. 1, pp. 19-26, 2014.

- [26] L. Chiriboga, P. Xie, H. Yee, V. Vigorita, D. Zarou, D. Zakim and M. Diem, "Infrared spectroscopy of human tissue. I. Differentiation and maturation of epithelial cells in the human cervix," *Biospectrosc*, vol. 4, no. 1, pp. 47–53, 1998.
- [27] N. Fujioka, Y. Morimoto, T. Arai, M. Kikuchi, "Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy," *Cancer Detect. Prev.*, vol. 28, no. 1, pp. 32–36, 2004.
- [28] J. Liu, Q.H. Zhang, F. Ma, S.F. Zhang, Q. Zhou and A.M. Huang, "Three-step identification of infrared spectra of similar tree species to *Pterocarpus santalinus* covered with beeswax," *Journal of Molecular Structure*, vol. 1218, p. 128484, 2020.
- [29] G.I. Dovbeshko, N.Y. Gridina, E.B. Kruglova and O.P. Pashchuk, "FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage," *Talanta*, vol. 53, no. 1, pp. 233–246, 2000.
- [30] S. Prabhakar, N. Jain and R.A. Singh, "Infrared spectra in monitoring biochemical parameters of human blood," *In Journal of Physics: Conference Series, IOP Publishing, 2012*, vol. 365, no. 1, p. 012059.
- [31] Y. Liu, Y. Xu, Y. Zhang, D. Wang, D. Xiu, Z. Xu and X. Ling, "Detection of cervical metastatic lymph nodes in papillary thyroid carcinoma by Fourier transform infrared spectroscopy," *Br. J. Surg.*, vol. 98, no. 3, pp. 380–384, 2011.
- [32] I. Dreissig, S. Machill, R. Salzer and C. Krafft, "Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression," *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectros.*, vol. 71, no. 5, pp. 2069–2075, 2009.
- [33] N. Q. Trung, P.T. Phuong Nam, N.T. Phuong Chi and N. Van Tuyen, "[Fe (III)(MeO-salen) Cl] complexes and their in vitro cytotoxicity against KB and HepG2 human cancer cells," *Vietnam Journal of Chemistry*, vol. 56, no. 6, pp. 689-694, 2018.
- [34] D.G. Conceição, B.H.R. Gonçalves, F.F.D. Hora, A.S. Faleiro, L.S. Santos and S.P. Ferrão, "Use of FTIR-ATR spectroscopy combined with multivariate analysis as a screening tool to identify adulterants in raw milk," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 30, pp. 780-785, 2019.
- [35] K.M. Ostrowska, A. Garcia, A. D. Meade, A. Malkin, I. Okewumi, J.J. O'Leary, and F.M. Lyng, "Correlation of p16 INK4A expression and HPV copy number with cellular FTIR spectroscopic signatures of cervical cancer cells," *Analyst*, vol. 136, no. 7, pp. 1365–1373, 2011.
- [36] A.R. Garifzyanov, N.V. Davletshina, L.I. Akhmadullina, I.T. Safiullin and R.A. Cherkasov, "Synthesis of New Aminophosphobetaines," *Russian Journal of General Chemistry*, vol. 88, no. 11, pp. 2445-2448. 2018.
- [37] S.W. Fogarty, I.I. Patel, J. Trevisan, T. Nakamura, C. J. Hirschmugl, N. J., Fullwood, and F. L. Martin, "Sub-cellular spectrochemical imaging of isolated human corneal cells employing synchrotron radiation-based Fourier-transform infrared microspectroscopy," *Analyst*, vol. 138, pp. 240-248, 2013.
- [38] T. Li, Y. Qian, H. Li, J. Deng, "Combination of serum lipids and cancer antigens as a novel marker for colon cancer diagnosis," *Lipids Health Dis*, vol. 17, p. 261, 2018.
- [39] F. Probert, V. Ruiz-Rodado, D. Te Vruchte, E.R. Nicoli, T.D.W. Claridge, *et al.* "NMR analysis reveals significant differences in the plasma metabolic profiles of Niemann Pick C1 patients, heterozygous carriers, and healthy controls," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 6320, 2017.

- [40] E. Batard, F. Jamme, D. Boutoille, C. Jacqueline, J. Caillon, G. Potel, and P. Dumas, "Fourier transform infrared microspectroscopy of endocarditis vegetation," *Appl Spectrosc*, vol. 64, pp. 901-906, 2010.
- [41] G.W. Abbott, B. Ramesh and S.K. Srari, "Interaction between soluble and membrane-embedded potassium channel peptides monitored by fourier transform infrared spectroscopy," *PLoS One*, vol. 7, p. e49070, 2012.
- [42] H.H. Mantschn and R.A. Shaw, "Vibrational spectroscopy and medicine: an alliance in the making," *Vib Spectrosc*, vol. 30, pp. 31-41, 2002.
- [43] A. Bonifacio and V. Serg, "Effects of sample orientation in Raman microspectroscopy of collagen fibers and their impact on the interpretation of the amide III band," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 53, no. 2, pp. 314-317, 2010.
- [44] Y. Liu and W.F. Bodmer, "Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 103, pp. 976-981, 2006.
- [45] S.L. Volchenboum, C. Li, S. Li, E. F. Attiyeh, C. P. Reynolds, J. M. Maris, *et al*, "Comparison of primary neuroblastoma tumors and derivative early-passage cell lines using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis," *Cancer Res*, vol. 69, pp. 4143-4149, 2009.
- [46] E.J. Douglas, H. Fiegler, A. Rowan, S. Halford, D. C. Bicknell, W. Bodmer, *et al*. "Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas," *Cancer Res*, vol. 64, pp. 4817-4825, 2004.
- [47] J.K. Willson, G.N. Bittner, T.D. Oberley, L.F. Meisner, and J.L. Weese, "Cell culture of human colon adenomas and carcinomas," *Cancer Res*, vol. 47, pp. 2704-2713, 1987.
- [48] T. M. Yeung, S. C. Gandhi, J. L. Wilding, R. Muschel, and W.F. Bodmer, "Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 8, 3722-3727, 2010.
- [49] J.L. Arrondo, A. Muga, J. Castresana, F.M. Goni, "Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy," *Prog Biophys Mol Biol*. vol. 59, no.1, pp.23-56, 1993.
- [50] J.L. Arrondo, F.M. Goni, "Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy," *Prog Biophys Mol Biol*, vol.72, no. 4, pp.367-405, 1999.