

IR spektroskopisi kullanılarak *in vitro* meme kanser kök hücrelerinin araştırılması

Investigation of breast cancer stem cells in vitro by using IR spectroscopy

Günnur Güler¹  Ümmü Güven²  Eda Açıkgöz³  Gülperi Öktem²⁻⁴ 

¹ Biyomedikal Mühendisliği, Mühendislik Fakültesi, İzmir Ekonomi Üniversitesi, İzmir, Türkiye

² Kök Hücre Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, İzmir, Türkiye

³ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

⁴ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Öz

Amaç: Kanser kök hücreleri (KKH), tümör içinde kendi kendilerini yenileme ve diğer hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesi sebebiyle tümörün başlaması, ilerlemesi, nüksetmesi, metastaz ve terapötik direnç yol açmaktadır. Bu nedenle, meme kanser kök hücrelerinin (MKKH) karakteristik özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı, MKKH'lerin akış sitometrisi ile izole edildikten sonra Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi kullanarak hücre biyokimyasındaki farklılaşmalarının moleküler seviyede araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: MCF-7 meme kanser hücre hattındaki CD44+/CD24- yüzey belirteç özelliği gösteren MKKH'ler akış sitometrisi ile izole edilmiştir. MCF10A, MCF-7 kanser hücre (KH) hattı ve bu hattan izole edilen CD44+/CD24- yüzey belirteç özelliklerine sahip MKKH'ler %0,9 NaCl içerisine resuspanse edildikten sonra FTIR spektrometre ile ölçülmüştür.

Bulgular: MCF-7 içerisindeki CD44+/CD24- yüzey belirteç özelliğine sahip KKH'lerinin sort oranı %2,0-2,3 olarak belirlenmiştir. Elde edilen FTIR spektrumlarında, MKKH, meme kanser hücreleri (KH, non-KKH, bulk popülasyon) ve sağlıklı hücreler arasında spektral benzerlikler ve farklılıklar tespit edilmiştir. MKKH'lerde lipid ve protein sinyalleri daha güçlü olup hücre zarı akışkanlığı ve dinamiği fazladır. Sağlıklı hücreler ile kıyaslandığında, KH'lerde α -helikal proteinler ve DNA sinyallerinde azalmaya karşın negatif yüklü karboksil gruplarından kaynaklanan sinyallerde artış gözlenmektedir. Bu veriler, MKKH'lerin, sağlıklı ve KH'lere kıyasla yapı, içerik ve dinamiği bakımından oldukça farklı bir profil sergilediğini göstermektedir.

Sonuç: Bu çalışma, MKKH'lerinin moleküler yapısı ve içeriğindeki değişikliklerin incelemesi vasıtasıyla terapötik hedefli ilaç çalışmaları yapılabileceğini ortaya koymaktadır. FTIR spektroskopisi boyar madde gerektirmeden, hassas ve hızlı ölçüm alınması, örnek hazırlamada kolaylık ve az miktarda örnek gerektirmesi sebebiyle ileri hücre çalışmalarında ve medikal alanda biyolojik örneklerin analizlerinde kullanılabilirliği de gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Meme kanseri, kanser kök hücresi, FTIR spektroskopisi, hücre zarı akışkanlığı.

Abstract

Aim: Cancer stem cells (CSCs) lead to tumor initiation, progression, relapse, metastasis and therapeutic resistance due to the ability of tumor to self-renewal and differentiate into other cell types. Therefore, the characteristic features of breast CSCs need to be determined in detail. The aim of this study was to investigate the differences in cell biochemistry at the molecular level by using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy after breast CSCs were isolated with flow cytometry.

Sorumlu yazar: Günnur Güler
Biyomedikal Mühendisliği, Mühendislik Fakültesi, İzmir
Ekonomi Üniversitesi, İzmir, Türkiye
E-posta: gunnurgorucu@gmail.com
Başvuru tarihi: 04.09.2019 Kabul tarihi: 02.11.2019

Materials and Methods: Breast CSCs with CD44+/CD24- surface marker properties in the MCF-7 cancer cell lines were isolated by using flow cytometry (FACS). MCF10A, MCF-7 breast cancer cell line (cancer non-stem cells or non-CSCs) and breast CSCs were re-suspended into 0.9% NaCl, and each cell type was measured with the FTIR spectrometer.

Results: The portion of breast CSCs with CD44+/CD24- surface marker properties in MCF-7 was 2.0-2.3%. In the FTIR spectra, spectral similarities and differences among breast CSCs, non-CSCs and healthy cells were determined. In breast CSCs, the lipid and protein signals are quite strong accompanied with an increased cell membrane fluidity and dynamics. When non-CSCs are compared with healthy cells, a less amount of both α -helical proteins and DNA is detected while an increase in the signals of negatively charged carboxyl groups is noticed. These data clearly show that breast CSCs exhibit a very different profile in terms of structure, content and dynamics of cellular macromolecules compared to both non-CSCs and healthy cells.

Conclusion: Drug studies (targeted therapy, drug-action mechanism) can be performed by examining small changes in the molecular structure and content of breast CSCs. This study shows that FTIR spectroscopy can be used in advanced cell studies as well as in the analysis of biological samples in medical field due to rapid, label-free and accurate measurement without complex sample preparation procedures.

Keywords: Breast cancer, cancer stem cell, FTIR spectroscopy, cell membrane fluidity.

Giriş

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (GLOBOCAN) tarafından 2018 yılında yayınlanan kanserle ilgili istatistikler ile kadınlarda meme kanserinin oldukça yaygın olduğu ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında oldukça önemli bir yere sahip olduğu rapor edilmiştir (1). Tanı ve tedavideki son gelişmelere rağmen, hastalığın mortalitesinin 2020 yılına kadar %20 oranında artması beklenmektedir (1, 2). Nüks etme, metastaz ve tedaviye direnç kanser tedavisindeki başarısızlığın en önemli nedenleri arasındadır.

Kanser kök hücreleri (KHK), tümör içinde kendi kendilerini yenileme (self-renewal) ve diğer hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesi yüksek olan küçük bir alt popülasyonunu oluşturmaktadır (3). Meme tümörlerinde, kök hücre özelliklerini gösteren küçük hücre popülasyonu meme kanser kök hücreleri (MKKH) olarak bilinmektedir. MKKH'ler tümörün başlaması, ilerlemesi, nüks ve metastazından sorumludur (3, 4). MKKH'ler yüksek ALDH aktivitesinin yanı sıra, CD44+/CD24- fenotipik özellikleri ile karakterizedir. CD44+/CD24- özelliğe sahip popülasyonun daha tümörojenik olduğu ve normal kök hücrelere benzer özellikler sergilediği gösterilmiştir (5).

Vücuttaki hücre tipleri kendi iç dinamikleri veya çevresel faktörlerin etkisi ile farklı davranış paternleri sergilemektedir. Bu durum büyük oranda hücre makromoleküllerin değişimleri ile ilişkilendirilmektedir. Normal hücreler veya dokular kanserleşme sürecine girdiğinde makromoleküllerin içeriği ve yapısal konformasyonu

büyük oranlarda değişime uğramaktadır (6, 7). Bu değişimlerin ortaya çıkarılması hastalığın erken tanı ve tedavisinde önemli avantajlar sağlamaktadır.

Bir titreşim spektroskopisi olan Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi moleküllerin fonksiyonel grupları ile molekül içi/moleküller arası bağlar hakkında doğrudan bilgi sağlamaktadır. IR spektroskopi doku, hücre ve diğer biyolojik örneklerin araştırmalarında yaygın olarak kullanılan biyofiziksel tekniklerden biridir (8–16). Bu çalışmamızda, MCF-7 meme kanser hücre hattındaki CD44+/CD24- yüzey belirteç özelliği gösteren MKKH'lerin akış sitometrisi ile izole edildikten sonra FTIR spektroskopisi ile hücre biyokimyasındaki farklılaşmalarının ortaya çıkarılması ve moleküler mekanizmanın aydınlatılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre kültürü

Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilen MCF10A sağlıklı meme epitel hücreleri ve MCF-7 insan meme kanser hücre hattı kullanılmıştır. MCF10A hücreleri 25 cm²lik steril filtreli flask içerisinde %5 at serum, epitelyal büyüme faktörü (EGF) (20 ng/ml), insülin (10 µg/ml), hidrokortizon (0,5 mg/ml), kolera toksini (100 ng/ml) ve penisilin/streptomisin (100 µg/ml) bulunan DMEM/F12 besi ortamı içerisinde çoğaltılmıştır. MCF-7 hücre hattının üretilmesi ve çoğaltılması amacıyla içerisinde %10 oranında eklenmiş ısı ile inaktive edilmiş fetal bovin serumu ile penisilin/streptomisin (100 µg/ml)

bulunan RPMI-1640 besi ortamı kullanılmıştır. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücrelerin genel durumları "inverted" mikroskopta izlenmiştir. Yaklaşık %80-85'in üzerindeki hücre yoğunluğunda pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

CD44+/CD24- MKKH'lerin izolasyonu

Kanser kök hücre izolasyonunda CD44 ve CD24 hücre yüzey belirteçleri kullanılmıştır. MCF-7 hücre hattındaki CD44+/CD24- fenotip özelliğine sahip olan hücre popülasyonu floresan aktif hücre ayırma (FACS) ile izole edilmiştir. Tripsin ile flask yüzeyinden kaldırılan hücreler içerisinde %0,5 bovin serum albümin bulunan fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Hücreler (1x10⁵ hücre/ml) 10'ar µl FITC işaretli CD44 ve PE işaretli CD24 antikolar ile karanlık ortamda +4°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında, hücreler FACS tamponu ile üç defa yıkanarak FACS Aria akış sitometrisi (BD Biosciences, USA) kullanılarak CD44+/CD24- özelliğine sahip olan hücrelerin ayırımı yapılmıştır.

Hücre örneklerinin FTIR için hazırlanması

MCF10A, MCF-7 hücre hattı ve bu hattan izole edilen CD44+/CD24- hücreleri ortamdaki hücre atıkların uzaklaştırılması amacıyla (1x10⁶ hücre/ml) %0,9 NaCl içerisinde üç defa yıkanmıştır. Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra izotonik solüsyon içerisinde yeniden çözdürülmüştür.

ATR-FTIR ölçümleri

MCF-7 kanser hücresi (insan meme adenokarsinoma hücre) ve MCF10A sağlıklı hücre (insan meme tümörojenik olmayan epitel hücre) hattı kullanılmıştır. MCF-7 akış sitometrisi ile ayırtıldıktan sonra hücre alt-popülasyonları (MKKH, KH), DLATGS detektörü ile donatılmış ve zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) ünitesine sahip IRTracer-100 FTIR spektrometresi (Shimadzu, Japonya) ile ölçülmüştür. Hücre süspansiyonunun 1,8 µl'si (~1x10⁶ hücre/ml) ATR kristali üzerinde ~12 dakika kurutulmaya bırakılmıştır. Bağımsız olarak yetiştirilen her bir kültürden alınan üç numune farklı zamanlarda üçer kez kaydedilerek FTIR ölçümleri üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir. Her interferogram için 4 cm⁻¹ spektral çözünürlükte toplam 128 tarama ortalaması alınmıştır. Arka plan spektrumu olarak ATR kristali boş olduğunda hava spektrumu kaydedilmiştir (8, 10, 17).

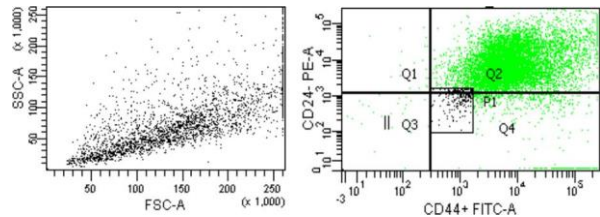
FTIR veri analizleri

Hücre örneklerinin spektrumları spektrometre yazılım programı LabSolutions (Shimadzu, Japonya) ile kaydedildikten sonra, spektral önileme, ikinci derece türev spektrumları, fark spektrumları ve Student t-testleri MATLAB altında çalışan 'Kinetics' yazılımı ile gerçekleştirilmiştir (8, 10, 17). Öncelikle, 1562–1555 cm⁻¹ bandı referans alınarak hücre spektrumundaki atmosferik su buharı sinyalleri çıkarılmıştır. Tüm spektrum üzerinde "baseline düzeltilmesi" yapıldıktan sonra 1585-1483 cm⁻¹ bandı eşit alan için normalize edilmiştir. Her bir hücre örneği için ön işlem görmüş (baseline düzeltilmiş ve normalize edilmiş) absorbans spektrumlarının (en az 15 spektrum) ortalaması alınmıştır.

Bulgular

CD44+/CD24- meme KKH'lerinin izolasyonu

Kanser kök hücreleri spesifik hücre yüzey belirteçlerine göre izole edilmektedir. Çalışmamızda, MCF-7 meme kanser hücre hattı içerisindeki CD44+/CD24- yüzey özelliklerine sahip olan hücreler akış sitometrisi kullanılarak izole edilmiştir (Şekil-1). CD44+/CD24- "sort" oranları %2,0-2,3 arasında değişirken, bunun dışında kalan hücre popülasyon (bulk popülasyon) oranları %97,7-98 arasındadır. İşlem sonrasında, elde edilen hücrelerin saflık düzeylerinin akış sitometrisi ile kontrol edilmiş olup "sort" işleminden sonra saflık oranları >90'dır.

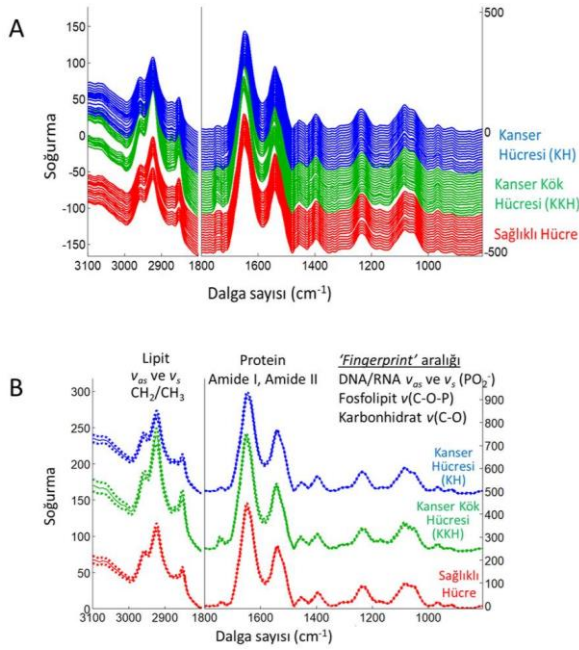


Şekil-1. Meme kanser hücre hattı (MCF-7) içerisindeki CD44+/CD24- özelliğine sahip MKKH popülasyonunun akış sitometrisi ile izolasyonu.

ATR-FTIR sonuçları

Kanser kök hücrelerinin, kök hücre olmayan meme kanser hücrelerinin (KH) ve sağlıklı meme hücrelerinin tüm spektrumları Şekil-2A'da gösterilmiştir. Bu grafikten elde edilen FTIR-ortalama absorbans spektrumları her bir hücre örneği (MKKH, KH, sağlıklı) için Şekil-2B'de verilmiştir. Hücresel makromoleküllerin fonksiyonel grupların bağ titreşimlerine karşılık gelen güçlü IR sinyalleri grafikte 3015-2800 ve

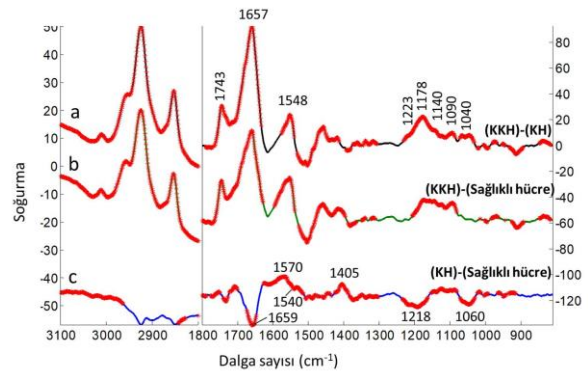
1800-800 cm^{-1} spektral aralığında gösterilmiş olup; 3015-2800 cm^{-1} aralığında lipit (çoğunlukla) ve proteinlerin CH_2/CH_3 yapıları, 1720-1760 cm^{-1} 'de lipit ester $\text{C}=\text{O}$ yapıları, 1700-1600 cm^{-1} 'de protein $\text{C}=\text{O}$ yapıları (Amid I), 1250-1190 cm^{-1} 'de PO_2 yapıları (nükleik asitler, fosfolipitler), 1190-800 cm^{-1} aralığında ise şeker gruplarının (glikojen, oligosakkaritler) COH ve CC yapıları görülmektedir.



Şekil-2. MKKH'lerin, kök hücre olmayan meme kanser hücrelerinin (KH) ve meme sağlıklı hücrelerin (A) absorbans FTIR spektrumları (3015-2800 ve 1800-800 cm^{-1} spektral aralığında). (B) KKH, KH ve sağlıklı hücrelerin (A)'dan hesaplanan ortalama absorbans spektrumları ve Student t-testi (her dalga boyunda $\alpha=0,1$ 'lik anlamlılık seviyesine sahip). Spektrum üzerindeki noktalar istatistiksel olarak anlamlı farkları ifade eder. Daha iyi okunabilirlik için spektrumlar absorbans skalasında dengelenmiştir (rescaled).

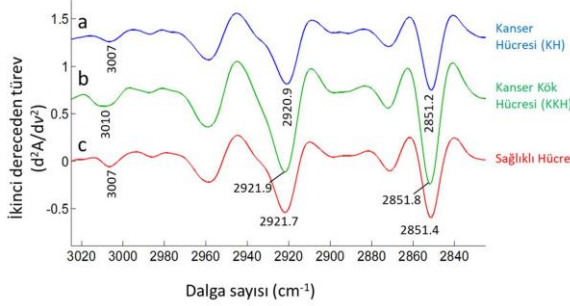
Meme kanser kök hücreleri, KH ve sağlıklı hücreler arasında spektral benzerlikler ve farklılıklar görülmektedir (Şekil-2B). Bu farklılaşmalar lipit bölgesinde (3000-2800 cm^{-1}) daha belirgin olup, MKKH'ye ait lipit sinyalleri diğer hücrelere göre daha güçlüdür. Protein ve 'fingerprint' bölgelerindeki küçük farklılıkları tespit edebilmek amacıyla FTIR-fark spektrumuna ihtiyaç vardır (17). FTIR-fark spektrumları, farklı hücre tipleri ve alt popülasyonları için ortalama absorbans spektrumlarının birbirinden matematiksel olarak çıkarılmasıyla elde edilmiş olup (MKKH)-(KH), (MKKH)-(Sağlıklı hücre) ve

(KH)-(Sağlıklı hücre) şeklinde gösterilmiştir (Şekil-3). (MKKH)-(KH) fark spektrumunda, KH'lere kıyasla MKKH'lerde lipit, protein, nükleik asit ve karbonhidrat yapılarından kaynaklanan 3015-2800, 1743, 1657, 1548, 1223, 1178, 1140, 1090 ve 1040 cm^{-1} 'de pozitif pikler dikkat çekmektedir (Şekil-3a). IR sinyallerin pozitif yönde artış göstermesi biyomoleküllerin miktarı ile doğrudan ilişkilidir. (MKKH)-(Sağlıklı hücre) fark spektrumunda yine MKKH'lerde benzer biyomoleküllerinin IR sinyallerinde artış gözlenmektedir (Şekil-3b). KH'ler ve sağlıklı hücreler karşılaştırıldığında, MKKH'lerde 1000-800 cm^{-1} aralığında negatif ve pozitif yönlerde küçük spektral farklılaşmalar görülmektedir. Bu bölgedeki IR sinyalleri nükleik asitlerin şeker-fosfat omurgasındaki C-C, C-O, O-P-O gerilmelerinden kaynaklanmaktadır. MKKH'lerde 3010 cm^{-1} 'de (olefinik, =CH) sinyal artışı gözlenmektedir. Ayrıca, MKKH'lerde 1743 cm^{-1} (lipit ester $\text{C}=\text{O}$) ve 1176 cm^{-1} (trigliserit, kolesterol esterleri) bantlarında eşzamanlı pozitif pikler görülmektedir. (KH)-(Sağlıklı hücre) fark spektrumunda (Şekil-3c), spektral farklılıklar protein (1659, 1540 cm^{-1}) ve nükleik asitler (1250-1180 cm^{-1} , 1085-1020 cm^{-1} : fosfodiester bağ titreşimleri) bölgelerindeki negatif sinyallerden ibarettir. Buna karşın, KH'lerde 1570 ve 1405 cm^{-1} 'de artış gösteren COO^- (negatif yüklü karboksil) gruplardan kaynaklanan pozitif sinyaller gözlenmektedir.



Şekil-3. MKKH'lerin, kök hücre olmayan meme kanser hücrelerinin (KH) ve meme sağlıklı hücrelerin FTIR-fark spektrumları ve Student t-testi. (a) (MKKH)-(KH), (b) (MKKH)-(Sağlıklı hücre) ve (c) (KH)-(Sağlıklı hücre). FTIR-fark spektrumları, ortalama absorbans spektrumlarının birbirinden matematiksel olarak çıkarılmasıyla elde edilmiştir. Student t-testi her dalga boyunda $\alpha=0,1$ 'lik anlamlılık seviyesine sahiptir. Spektrum üzerindeki kırmızı noktalar istatistiksel olarak anlamlı farklılaşmayı ifade eder.

FTIR-ikinci derece türev spektrumlarında (Şekil-4), 3025-2825 cm^{-1} spektral aralığında alınan pikler doymuş/doymamış lipitlerden kaynaklanmaktadır. Lipit açıl CH_2/CH_3 sinyallerinin incelenmesi hücre zarının biyofiziksel özellikleri/dinamiği hakkında doğrudan bilgi vermektedir (10). Olefinik (=CH) doymamış lipitler MKKH'lerde 3010 cm^{-1} 'de geniş ve artan bir bant verirken (Şekil-4b), KH ve sağlıklı hücrelerde 3007 cm^{-1} 'de pik vermektedir (Şekil-4a ve 4c). KH ve sağlıklı hücrelere karşın, MKKH'lerde CH_2 asimetrik ve simetrik gerilme vibrasyonlarından kaynaklanan bant pozisyonları yüksek dalga sayısına (upshifted) kaymaktadır (MKKH için $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$: 2921,9 cm^{-1} ; $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$: 2851,8 cm^{-1}). Bu durum, MKKH'lerin daha düzensiz lipit yapısına sahip olduğunu, dolayısıyla hücre zarının akışkanlığını/dinamiğini göstermektedir.



Şekil-4. (a) Meme kanser hücrelerinin (KH), (b) MKKH'lerin ve (c) meme sağlıklı hücrelerinin FTIR ikinci derece türev spektrumları (3025-2825 cm^{-1} spektral aralığında). İkinci derece türev spektrumları Şekil-3'teki ortalama absorpsiyon spektrumlarından elde edilmiştir.

Tartışma

Kanser kök hücreleri morfolojik, fonksiyonel ve moleküler açıdan tümör dokusu içerisindeki diğer hücrelerden farklı özellikler sergilemektedir. Bu özelliklerin ortaya çıkarılması kanser tanı ve tedavisi için önem arz etmektedir. Kanser kök hücrelerinin hayatta kalma ve yayılmasında avantaj sağlayan moleküler yapı özelliklerini anlamak, potansiyel hedef noktalarının belirlenmesini sağlayacaktır. Çalışmamızda, MKKH'lerin sağlıklı hücrelerden ve tümör dokusu içerisindeki diğer hücre popülasyonundan farklı kılan makromolekül profillerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Kanser kök hücreleri normal ve farklılaşmış hücrelere kıyasla farklı metabolik profiller sergilemektedir. Proliferasyon kapasitesi oldukça

yüksek olan KKH'lerin yaşamlarını sürdürdüğü mikro çevresel koşullar yetersiz kan damarı, hipoksi, asidik ve besin yönünden zayıf ortamlar olarak karakterize edilebilir. Bu nedenle, KKH'lerin mikro ortamlarda hayatta kalabilmek için hücresel biyoenerjisini etkili bir şekilde adapte etmesi gerekmektedir. Protein, lipit, karbonhidrat yapılarındaki değişim ile karakterize edilen metabolik yeniden düzenleme aynı zamanda hücre sinyal yolak akışını önemli ölçüde etkilemektedir (18).

Lipit sentez, lipit satürasyon düzeyleri ve yağ asidi oksidasyonundaki değişikliklerin tümü KKH metabolizmasının düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır (19–21). Lipit metabolizmasındaki değişiklikler, KKH'lerin sadece enerji ihtiyacı ve biyokütle üretimini karşılamakla kalmaz aynı zamanda birçok önemli onkogenik sinyal yolunun aktivasyonuna da katkıda bulunmaktadır. Çalışmada elde edilen lipit profilleri MKKH'lerin hem sağlıklı hücre hem de KH'lere kıyasla farklı özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. En belirgin farklılıklar doymamış yağ asitlerinde saptanmıştır. KKH'lerinde doymamış yağ asit düzeylerindeki artış birçok biyolojik fonksiyon ile ilişkilendirilebilir. Lipitlerinin doymuşluk düzeyi hücre zarı akışkanlığını etkilemektedir. Hücre zarı mekanik özellikleri hücre bölünmesi, migrasyon, metastaz ve sinyal iletimi için kritiktir (21, 22). Yapılan bir çalışmada, hücre zarı akışkanlığının azaltılmasının meme kanserinin metastatik kapasitesini olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (23).

Sonuç

Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar, MKKH'lerin, sağlıklı ve KH'lere kıyasla yapı, içerik ve dinamiği bakımından oldukça farklı özellikler sergilediğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte bu çalışmamız, etiketsiz (label-free), hızlı ve hassas ölçüm alınması, örnek hazırlama kolaylığı ve az miktarda örnek gerektirmesi sayesinde kanser tanı ve tedavisi amacıyla ileri hücre çalışmalarında ve medikal alanda FTIR tekniğinin kullanılabilirliğini göstermektedir.

Teşekkür

ATR-FTIR spektroskopisi ölçümleri, İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi'nde yapılmış olup Prof. Dr. Ercüment Karasulu'ya, ve temin edilen 'Kinetics' yazılımı için Prof. Dr. Erik Goormaghtigh'e teşekkür ediyoruz.

Çıkar çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394–424.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 7–30.
3. Chen K, Huang Y, Chen J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34: 732–40.
4. Palomeras S, Ruiz-Martínez S, Puig T. Targeting Breast Cancer Stem Cells to Overcome Treatment Resistance. *Molecules* 2018; 23: 2193.
5. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 3983–8.
6. Shetty G, Kendall C, Shepherd N, Stone N, Barr H. Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. *Br J Cancer* 2006; 94: 1460–4.
7. Kumar S, Desmedt C, Larsimont D, Sotiriou C, Goormaghtigh E. Change in the microenvironment of breast cancer studied by FTIR imaging. *Analyst* 2013; 138: 4058–65.
8. Güler G, Guven U, Oktem G. Characterization of CD133+/CD44+ human prostate cancer stem cells with ATR-FTIR spectroscopy. *Analyst* 2019; 144: 2138–49.
9. Ozdil B, Güler G, Acikgoz E, Kocaturk, DC, Aktug H. The effect of extracellular matrix on the differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Biochem* doi: 10.1002/jcb.29159.
10. Güler G, Acikgoz E, Karabay Yavasoglu NÜ, Bakan B, Goormaghtigh E, Aktug H. Deciphering the biochemical similarities and differences among mouse embryonic stem cells, somatic and cancer cells using ATR-FTIR spectroscopy. *Analyst* 2018; 143: 1624–34.
11. Güler G, Vorob'Ev MM, Vogel V, Mäntele W. Proteolytically-induced changes of secondary structural protein conformation of bovine serum albumin monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy. *Spectrochim Acta-Part A Mol Biomol Spectrosc* 2016; 161:8–18.
12. Smolina M, Goormaghtigh E. Infrared imaging of MDA-MB-231 breast cancer cell line phenotypes in 2D and 3D cultures. *Analyst* 2015; 140: 2336–43.
13. Benard A, Desmedt C, Smolina M, et al. Infrared imaging in breast cancer: automated tissue component recognition and spectral characterization of breast cancer cells as well as the tumor microenvironment. *Analyst* 2014;139:1044–56.
14. Kumar S, Shabi TS, Goormaghtigh E. A FTIR imaging characterization of fibroblasts stimulated by various breast cancer cell lines. *PLoS One* 2014; 9: e111137.
15. Zhao R, Quaroni L, Casson AG. Fourier transform infrared (FTIR) spectromicroscopic characterization of stem-like cell populations in human esophageal normal and adenocarcinoma cell lines. *Analyst* 2010; 135: 53–61.
16. Hughes C, Liew M, Sachdeva A, et al. SR-FTIR spectroscopy of renal epithelial carcinoma side population cells displaying stem cell-like characteristics. *Analyst* 2010; 135: 3133-41.
17. Güler G, Acikgoz E, Öktem G. Determination of cellular differences of CD133+/CD44+ prostate cancer stem cells in two-dimensional and three-dimensional media by Fourier transformation infrared spectroscopy. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2019; 33: 45–56.
18. Lue H, Podolak J, Kolahi K, et al. Metabolic reprogramming ensures cancer cell survival despite oncogenic signaling blockade. *Genes Dev* 2017; 31: 2067–84.
19. Kuo CY, Ann DK. When fats commit crimes: fatty acid metabolism, cancer stemness and therapeutic resistance. *Cancer Commun* 2018; 38: 47.
20. Mukherjee A, Kenny HA, Lengyel E. Unsaturated Fatty Acids Maintain Cancer Cell Stemness. *Cell Stem Cell* 2017; 20: 291–2.
21. Yi M, Li J, Chen S, Cai J, et al. Emerging role of lipid metabolism alterations in Cancer stem cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2018; 37: 118.
22. Tarabozetti G, Perin L, Bottazzi B, Mantovani A, Giavazzi R, Salmona M. Membrane fluidity affects tumor-cell motility, invasion and lung-colonizing potential. *Int J Cancer* 1989; 44: 707–13.
23. Zhao W, Prijic S, Urban BC, et al. Candidate antimetastasis drugs suppress the metastatic capacity of breast cancer cells by reducing membrane fluidity. *Cancer Res* 2016; 76: 2037–49.