Erciyes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi
Cilt 37, Sayı 3, 2021

Erciyes University
Journal of Institue Of Science and Technology
Volume 37, Issue 3, 2021

Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (YZRS) ile Ovaryum Kanser İlaç Direncinin İncelenmesi

Ömer Aydın[*1,2,3,4]

[*1] Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği, KAYSERİ
[2] Erciyes Üniversitesi Klinik Mühendislik Araştırma ve Uygulama Merkezi (ERKAM), KAYSERİ
[3] Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (ERNAM), KAYSERİ
[4] NanoThera Lab, Erciyes Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (ERFARMA), KAYSERİ

(Alınış / Received: 10.08.2021, Kabul / Accepted: 04.10.2021, Online Yayınlanma / Published Online: 30.12.2021)

Anahtar Kelimeler
Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (YZRS),
Ovaryum Kanseri,
Sisplatin,
İlaç direnci,
Altın nanoparçacık,
Temel Bileşen Analizi

Öz: Ovaryum kanseri kadınlar arasında yaygın olarak görünen en ölümcül kanserlerdendir. Ovaryum kanserinde sisplatin antikanser ilacı yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat zamanla hücrelerde sisplatine karşı direnç oluşmaktadır. Gelişen bu ilaç direnci tedaviyi olumsuz etkilemektedir. İlaç direncini erken safhada hızlı bir şekilde tespit edilmesi ovaryum kanserinin hem tedavisini hem de sağ kalım oranlarını olumlu etki oluşturacağı açıktır. Bu çalışmada, sisplatin ilacına karşı gelişen direnci A2780 sisplatin dirençli ovaryum kanser hücreleri (A2780cis) ile sisplatine duyarlı A2780 hücre hatları yüzeyde-zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi tekniği (YZRS) ile incelenmiş ve temel bileşen analizi ile iki hücre hattı arasındaki farklılık makine öğrenmesi tekniği ile incelenmiştir. İki hücre hattının YZRS spektrumları birbirine çok benzer olduğu için göz ile ilaç direncini ayırt etmede zorlanılırken temel bileşen analizi sonucu %84 doğruluk ile sisplatine direnç kazanmış hücreler duyarlı hücrelerden ayırt edilmiştir. Bu yöntemin daha da geliştirilerek ileride klinik düzeyde analizlerde kullanılabilme potansiyeli mevcuttur.

Investigation of Drug Resistance of Ovarium Cancer via Surface-enhanced Raman Spectra (SERS)

Keywords
Surface-enhanced Raman Spectra (SERS),
Ovarium Cancer,
Cisplatin,
Drug resistance,
Gold nanoparticles,
Principle Component Analysis (PCA)

Abstract: Ovarian cancer is one of the deadliest cancers commonly seen among women. Cisplatin anticancer drug is widely used in ovarian cancer. However, cells have developed a resistance to cisplatin over time. This developing drug resistance adversely affects the treatment. The rapid detection of drug resistance at an early stage will have a positive effect on both the treatment and survival rates of ovarian cancer. In this study, cisplatin-resistant ovarian cancer cells (A2780cis) and cisplatin-sensitive A2780 cell lines were investigated by surface-enriched Raman Spectroscopy technique (SERS) and analyzed by principal component analysis (PCA). While the SERS spectra of the two cell lines were similar to each other so it is difficult to distinguish by naked eyes, the cells that became resistant to cisplatin with an accuracy of 84% as a result of principal component analysis were distinguished from susceptible cells. This method has the potential to be further developed and used in the clinical analysis in the future.

***İlgili Yazar, e-mail:** biomer@umich.edu

1. Giriş

Ovaryum kanseri (OC), tüm kadın üreme kanserleri arasında en ölümcül olanıdır ve kanser ölümlerinin beşinci önde gelen nedenidir. Genellikle sessiz katil olarak bilinen OC, belirsiz semptomları nedeniyle ileri bir aşamaya gelene kadar sıklıkla teşhis edilemez ve tedavi edilmesini zorlaştırır. İleri evre OC olan hastaların tedavisi genellikle sito-indirgeyici cerrahi olarak bilinen sağkalımın arttırılmasını sağlamak amacıyla tümör dokusunun mikroskobik boyuta küçültülmesini daha sonrasında cis-diamminedikloro-platin (II) (cis) ve paklitaksel ilaçları ile kombinasyon kemoterapisini içermektedir. Cis yaygın olarak kullanılan inorganik yapıdaki tek antikanser kemoterapi ilacıdır. Tüm kanser hastalarının %10-20' sinin tedavilerinin bir döneminde cis ajanı kullanılmaktadır [1]**.** Cis, hücrelere taşındığında, klorür iyonları hücresel DNA, RNA ve proteinlere bağlanan ve replikasyonu, transkripsiyonu, translasyonu ve DNA onarımını inhibe eden pozitif yüklü platin iyonundan ayrışır. Ancak kemoterapi tedavisinde zamanla oluşan ilaç direnci cis etkinliğini azaltmaktadır [2].
Öte taraftan, OC, Türkiye'deki kadınlarda en sık görülen 10 kanser türü arasında yer almaktadır ve yaşa göre standardize edilmiş hızı 6.4 iken, tüm yaş gruplarında %3,5 dağılım değerine sahiptir [3]. 5 yıllık ortalama sağkalım oranı yaklaşık %40'tır, ancak ilerlemiş hastalığı olan hastalar (FIGO sınıflandırmasına göre III ve IV evreleri) yalnızca %10-20 gibi önemli ölçüde daha düşük bir sağkalım oranına sahiptir [4]. Bu oranlar OC hastaları arasında yüksek mortalite, geç tanı ve kemoterapinin düşük etkinliğinden kaynaklanmaktadır. Hastalığın evresine bakılmaksızın, kemoterapinin ilk aşaması, cis ve taksanın kombine bir kemoterapi rejiminden oluşur [4]. Kanser kemoterapisinin etkinliği, tümörlerin tedaviye direnme veya direnç geliştirme yeteneği ile sınırlıdır [5]. Düşük kemoterapi etkinliğinin temel nedeni kanser hücrelerinin ilaç direncidir. İlaç direncinin hücresel mekanizmaları çeşitlidir. İlacın hücrelerde daha düşük birikimi, hücrede ilacın lokalizasyonunda değişiklik, ilacın daha yavaş inaktivasyonu, ilaç DNA'sı ve hücresel membranlar tarafından hasarın daha hızlı onarımı ve bu hasarlara tolerans için arttırılmış yetenek ve moleküler hedeflerdeki, gen ifadesinde ve apoptozun düzenlenmesindeki değişiklikler, onları ilaçların eylemlerine duyarsız veya daha az duyarlı hale getirir [4].
Normal Raman spektroskopisi biyolojik numunelerin otoflüoresansından ve düşük Raman saçılmasından olumsuz etkilenmektedir. Fakat bu sorunun üstesinden biyolojik molekülün altın veya gümüş gibi kıvrımlı metal yüzeyler üzerinde molekül ve yüzeyin çok yakın bir şekilde yüzey ile etkileşmesi neticesinde üstesinden gelinebilmektedir [6]. Bu olaya Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (YZRS) denilir ve uzun zamandır biyolojik numunelerin analizinde ve tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır [7]. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde 10^{14} kat yüzeyde zenginleştirilmenin olabildiği gösterilmiştir [8]. Bu yükseltgenme kat sayısı ile tek molekülün, moleküler düzeyde tespit edilebileceği iddia edilse de geliştirilen yüzeyler ve nanoparçacıklar ile genel itibari ile 10^5-10^7 arasında sinyal zenginleştirilmesi elde edilebilmektedir [9, 10]. YZRS'nin protein seviyesinden analizlerden, bakteri, antibiyotiğe dirençli bakteri, hücre ve doku farklılaşmasının tespitine kadar çok farklı seviyelerde yaygın olarak kullanılmaktadır [11, 12, 13].
Bu çalışmada, ovaryum kanser hattı (A2780) cis cis dirençli ovaryum kanser hattının (A2780cis) cis karşı ilaç direncinin YZRS ve temel makine öğrenme teknikleri kullanılarak tayin edilip edilemeyeceği araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Altın (III) klorit trihidrat (Sigma Aldrich, ABD), sodyum sitrat dihidrat (Sigma Aldrich, ABD), Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Lonza, İsviçre), RPMI (Lonza, İsviçre), Fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum-FBS) (Biological Industries, İsrail), penisilin/streptomisin (Gibco, İskoçya), Tripsin EDTA (Biological Industries, Israil).

2.1. AuNP sentezi

Altın nanopartiküller (AuNP) Turkevich metodu kullanılarak sentezlendi [14]. Kısaca, 10 mg $HAuCl_4$, 100 mL saf su içerisinde çözüldü ve kaynayıncaya kadar manyetik karıştırıcıda ısıtıldı. %1 hazırlanan sodyum sitrat çözeltisinden 700 µL alınarak hızlı bir şekilde kaynayan çözeltiye eklendi. 15 dakika daha kaynatıldı. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. AuNP'ların absorbsiyon spektrumu 200-700 nm aralığında Perkin Elmer Lambda UV-Görünür Bölge Spektrometre kullanılarak elde edildi. Nanoparçacıkların zeta potansiyeli ve hidrodinamik çapı Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) kullanılarak belirlendi. Nanoparçacıkların konsantrasyonu ve boyut dağılımı nanopartikül izleme analiz (NTA) cihazı Nanosight NS300 (Malvern, UK) kullanılarak belirlendi. Taramalı-Geçirimli Elektron Mikroskopu (STEM) görüntüleri ZEISS GEMİNİ 500 (ZEISS, Germany) cihazı kullanılarak elde edildi.

2.2. Hücre kültürü

İnsan ovaryum kanseri hücre hattı A2780 ve cis dirençli insan ovaryum kanseri hücre hattı A2780cis, Prof. Dr. Hülya AYAR KAYALI (İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İBG) tarafından hediye edilmiştir. Bu hücrelerin orjinali European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) 'dan temin edilmiştir. Cis ilaç direncinin sağlanması için üretici firmanın tavsiyesi üzerine her 3-4 pasajda bir 1 µM cis besi yerine eklenmektedir. A2780 ve A2780cis hücre hattı RPMI besi yerinde kültürlendi. Hücre kültürü ortamı, %10 fetal sığır serumu (FBS), penisilin (100 U / mL) ve streptomisin (100 U / mL) içermektedir ve hücreler, 37 ° C'de %5 CO_2 ile muhafaza edildi.

2.3. YZRS ölçümü

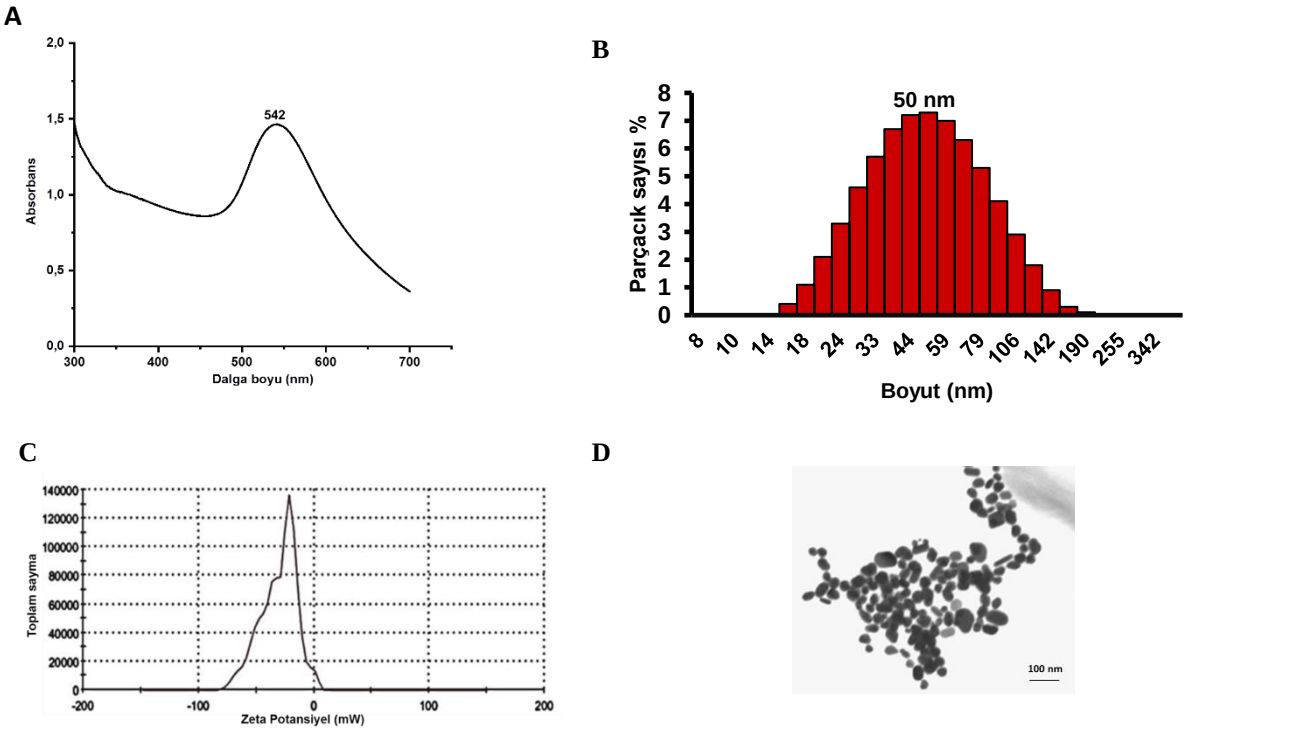
6 kuyucuklu hücre kabının her bir kuyucuğuna 7500 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücrelerin ekimleri gerçekleştirildi [2, 3]. Ekimi gerçekleştirilen hücrelere AuNP verilmesi için, kuyucuk içerisindeki besi ortamı uzaklaştırıldı ve bir kez PBS ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrası her bir kuyucuğa 750 µL FBS içermeyen besi ortamı ile 250 µL ($1{,}15x10^{11}$ parçacık/mL) AuNP çözeltisi eklendi. 4 saat hücreler besin açlığına bırakıldı ve 4 saat sonrasında üzerlerine FBS içeren besi ortamı ilave edildi. Hücreler 24 saat AuNP'lar ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerden YZRS spektrumları toplayabilmek için kuyucuk içerisindeki besi ortamı uzaklaştırıldı. PBS ile bir kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrası kuyucuğa tripsin ilave edilerek hücrelerin kültüre edildikleri kuyucuklardan ayrılması sağlandı. Hücre içeren besi ortamından 20 µL hacminde alınarak CaF_2 üzerine damlatıldı ve YZRS spektrumları elde edildi. Bütün YZRS ölçümleri WITech alpha M+ Raman Mikroskop Sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. 50x objektif lens ile hücreler 10 mW lazer gücünde yakın infrared 785 nm diyot lazer kullanılarak uyarıldı. Örnek üzerinde lazerin kalma süresi 2 sn olarak ayarlandı.

2.4. Veri ön işleme ve çok değişkenli analiz

A2780 ve A2780cis hücre hatlarından 400-1700 cm^{-1} aralığında 20 spektrum toplanmıştır. Veri üzerindeki gürültü bileşenlerini ortadan kaldırmak için spektrumlar üzerinde taban hattı çıkarılması (5. Derece polinomiyal) ve Savitzky Golay filtre ile yumuşatma işlemleri (5. derece 11 noktalı) gerçekleştirilmiştir. Bu adımlar WITec Project Plus 5 üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerin ardından tüm spektral vektörlerin ortalaması 0, standart sapması 1 yapılarak veri üzerinde standardizasyon işlemi yapılmıştır. Temel bileşen analizi, yüksek boyutlu uzayda yer alan spektral vektörlerin daha düşük boyutlu uzayda gösterilmesini sağlayan istatistiksel bir tekniktir. Bu çalışmada temel bileşen analizi, MATLAB (Mathworks, USA) yazılımı kullanılarak 'pca' fonksiyonu ile gerçekleştirilmiştir.

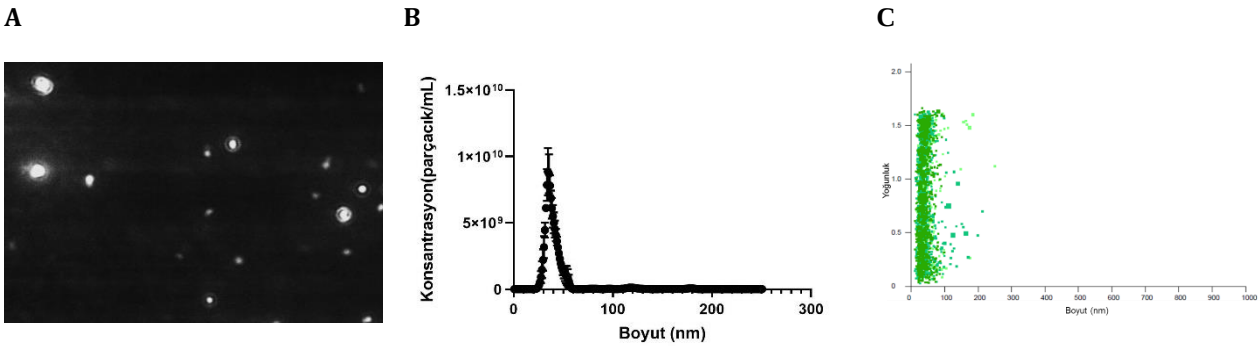
3. Bulgular

YZRS tek hücre analizlerinde, hücresel farklılaşmada ve dokunun fizyolojik değişimlerinde yaygın bir şekilde tercih edilmektedir [12, 13]. Çünkü, YZRS ile tek hücre mertebesinde, yıkıcı ve girişimsel olmadan temassız bir şekilde spektrumlar alınabilmektedir. Özellikle herhangi bir işaretleme yapılmaksızın hücrelerden direkt fizyolojik bilgi edinilebilmesi en önemli avantajıdır. Bunun için hücre içerisinden en etkin bir şekilde Raman sinyali almamızı yarayan 50 nm'lik AuNP'lar sentezlenmiştir. AuNP'ların elde edilmesinde genel kabul görmüş sitrat indirgeme Turkevich yöntemi tercih edilmiştir. Sentezlenen AuNP'lar fotonik, boyut, yük yoğunluğu olarak sırası ile UV-Vis, DLS, zeta-potansiyel, TEM ile karakterize edilmiştir **(Şekil 1)**. 50 nm AuNP'ın karakteristik absorplama piki olan 542 nm görülmektedir **(Şekil 1a)**. Devamında, sentezlenen AuNP'lerin boyut dağılımı 50 nm civarında olduğu DLS ile gösterilmiştir **(Şekil 1b)**. AuNP'lar sitrat ile indirgendiği için negatif yüzey yüküne sahip olduğu (-30.3 mV) Zeta potansiyel ile gösterilmiştir **(Şekil 1c)**. Daha sonra yapılan TEM analizi ile parçacıkların şeklinin küresel olduğu ve 50 nm civarında olduğu görülmektedir (**Şekil 1d**).



Şekil 1. Sentezlenen AuNP'lerin karakterizasyonu. **(A)** UV/Vis spektrumu, **(B)** DLS boyut dağılım grafiği, **(C)** Zeta potansiyel grafiği, (D)TEM görüntüsü (skala çubuğu 100 nm'dir)

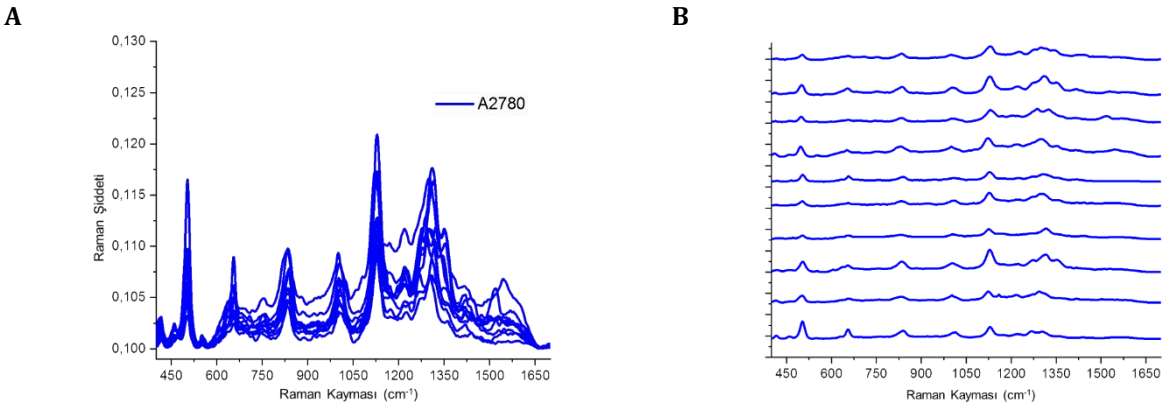
Hücresel YZRS analizlerinde parçacığın boyutu önem ihtiva etmektedir literatürde de belirtildiği üzere tek hücre ve 3B hücre analizlerinde 50 nm boyutundaki AuNP'ler daha fazla YZRS etkinliği göstermektedir [15]. Bundan dolayı parçacık boyutu nanoparçacık izleme analiz (Nanoparticle Tracking Analysis) cihazı ile ayrıca incelenmiştir. **Şekil 2'de** görüldüğü üzere parçacıklar 50 nm civarında dağılım göstermekte DLS ile görülemeyen büyük parçacıkların (100-200 nm aralığında) ihmal edilebilir ölçekte olduğu anlaşılmaktadır. NTA sisteminin boyut analizi her bir parçacığı tek tek hareketini analiz ettiği için DLS'e göre daha doğru sonuçlar verebilmektedir.



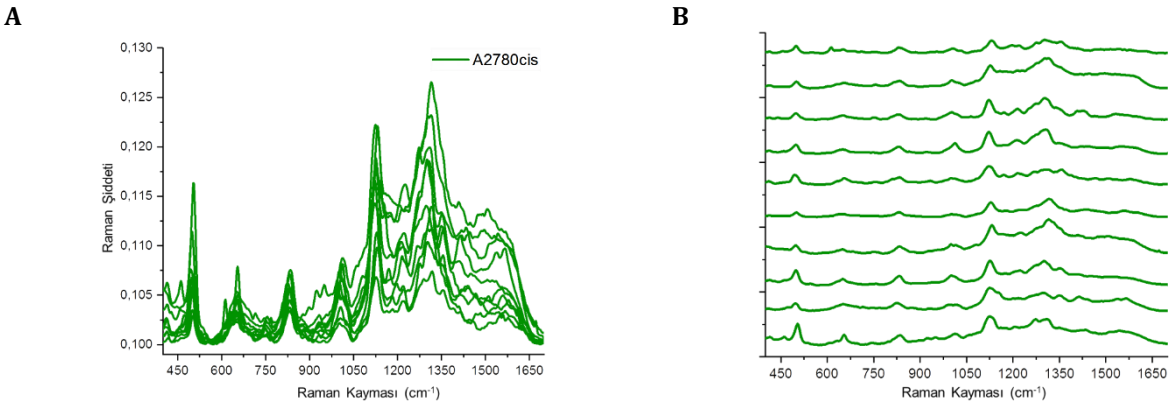
Şekil 2. Parçacığın NTA boyut analizleri, **(A)** NTA video görüntüsünden bir kesit, **(B)** NTA cihazı tarafından üretilen AuNP boyuta bağlı konsantrasyon grafiği, **(C)** NTA cihazı tarafından üretilen tanecikli boyut dağılımı.

Hem A2780 hem de A2780cis hücrelerinden YZRS ile spektrumlar toplamadan evvel hücreler PBS ile yıkanmış ve 4 saat boyunca FBS'siz besi yerinde besin açlığına bırakılarak tüm kültür edilen hücrelerin benzer hücresel döngüde olması sağlanmıştır. Hücreler besin açlığında iken her plakaya eşit sayıda ($1{,}15x10^{11}$ parçacık/mL) AuNP'lar konulmuştur ve 24 saat boyunca muamele edilmiştir. 24 saatin ardından besi yeri uzaklaştırılıp en az 10 farklı hücreden YZRS ölçümleri yapılmıştır. Şekil 3 ve Şekil 4'ten de görüldüğü gibi her iki hücre hattından farklı 10 noktadan alınan spektrumlar her hücre hattı içerisinde tekrarlanabilir olarak gelmektedir. Elde edilen bu 10'ar tane spektrumların ortalamasının grafiği çizilerek A2780, A2780cis hücre hatları arasındaki benzerlik ve farklılıklar Şekil 5'te gösterilmiştir. Şekil 5B'de de spektrum ortalaması siyah çizgi ile çizilirken alınan spektrumların standart ortalaması gri çizgiler ile ifade edilmiştir. Burada bir noktayı vurgulamakta fayda var. A2780cis hücre hattının cis direncini sağlayabilmek için her 3-4 pasajda bir 1 µM cis besi yerine eklenmektedir.

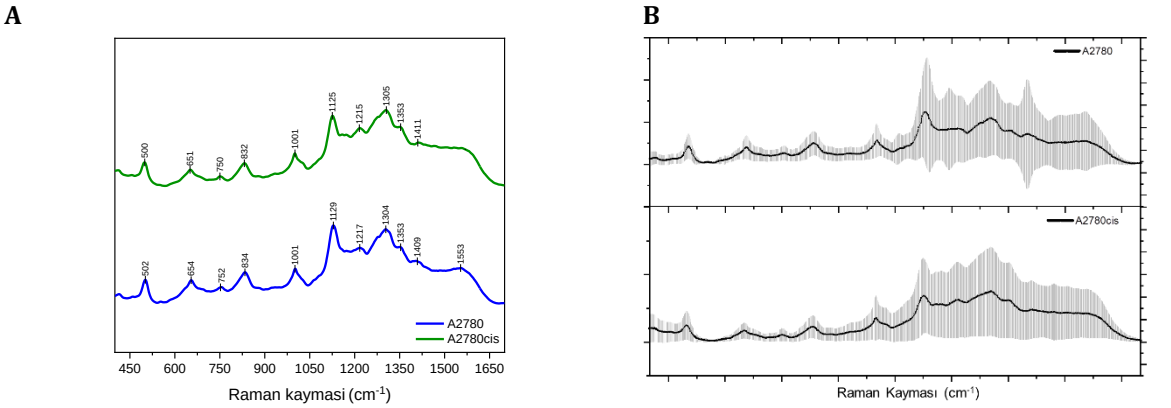
Bu değer A2780cis hücre hattının bizim hesapladığımız 12 µM IC50 değerinin çok altındadır. Ayrıca cis ilacından bir girişinim gözlemlenmemiştir.



Şekil 3. (A) 10 farklı A2780 hücresinden elde edilen tekrarlanabilir YZRS spektrumları, **(B)** A2780 spektrumları arasına off-set değer konularak daha ayrıntılı bir şekilde 10 ölçüm arasındaki benzerliklerin gösterimi.

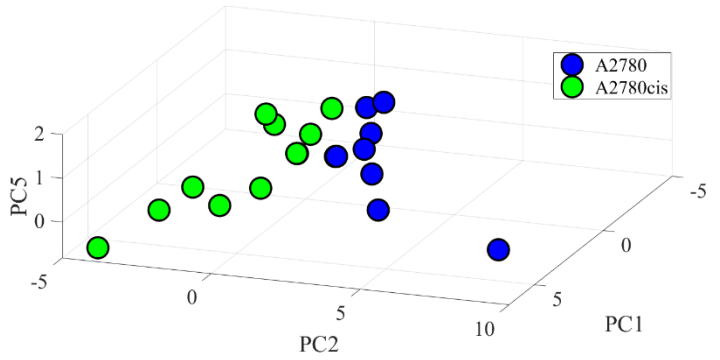


Şekil 4. (A) 10 farklı A2780cis hücresinden elde edilen tekrarlanabilir YZRS spektrumları, **(B)** A2780cis spektrumları arasına off-set değer konularak daha ayrıntılı bir şekilde 10 ölçüm arasındaki benzerliklerin gösterimi



Şekil 5. (A) A2780 ve A2780 hücre hatlarından elde edilen spektrumların ortalamalarının karşılaştırılması, **(B)** A2780 ve A2780cis hücrelerinden elde edilen YZRS spektrumları. Siyah çizgiler spektrumların ortalamalarını, gri çizgiler standart sapmayı göstermektedir.

İlaca dirençli ve duyarlı hücre hatlarına ait spektrumlar tek tek incelendiğinde YZRS ortalamaları spekturumları gözle ayırt edilemeyecek seviyede birbirine benzemektedirler. Bundan dolayı temel bileşen analizi (PCA) gerçekleştirilmiştir. Analiz neticesinde A2780 ve A2780cis hücre hatları birbirinden başarıyla ayrılabilmiştir **Şekil 6.**



Şekil 6. A2780 ve A2780cis YZRS spektrumlarının PCA analiz grafiği

4. Tartışma ve Sonuç

Ovaryum kanser kadınlar arasında en yaygın görülen kanser olduğu için ve cis gibi kemoterapi ajanları ile tedavi edildikçe zamanla kanser hücreleri cis'e karşı direnç kazanmaktadır. Kazanılan bu ilaç direncinin hızlı ve ucuz bir şekilde tespit edilmesi şüphesiz ki tedaviye önemli katkı sağlayacaktır. YZRS'nin sahip olduğu avantajlar ile hücresel seviyede bu ilaç direncini tespit edebilme potansiyeli mevcuttur. Altın ve gümüş gibi metalik nanoparçacıklar YZRS uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [10, 11, 12, 13, 15]. 50 nm boyutundaki altın nanoparçacıkların etkin bir şekilde hücreye endositoz ile alındığı literatürde vurgulanmıştır [16]. Ayıca 50-nm altın nanoparçacığın diğer metalik nanoparçacıklar içerisinde en etkin YZRS aktivite gösterdiği yine literatürce gösterilmiştir [15]. Bu sebeplerden dolayı çalışmada 50 nm boyutunda AuNP başarı ile sentezlenmiştir **(Şekil 1 ve Şekil 2)**. Boyut analizi hem DLS hem SEM hem de NTA ile gösterilmiştir. Sentezlenen bu AuNP'lar YZRS ile hücre analizleri için uygun boyutlardadır.

Bu çalışmada, ilaca dirençli ve duyarlı hücreler arasındaki spektral farklılıkları ortaya çıkarmak için çok değişkenli analiz tekniği tercih edildi. PCA, maksimum varyans miktarını koruyarak verilerin boyutunu azaltmak için oldukça kullanışlı, denetimsiz bir makine öğrenimi tekniğidir. Karmaşık çok değişkenli verileri, temel bileşenler adı verilen az sayıda yeni değişkene dönüştürür. İlk ana bileşen, veri kümesinde olası en yüksek varyansa sahiptir ve varyans, ilk bileşenden son ana bileşene doğru azalır. Burada PCA, grafiksel temsil sağlamak için veri setini daha düşük boyutlu uzayda görselleştirmek için kullanılmıştır. Üç boyutlu PCA grafiği temel bileşen 1 (PC1), temel bileşen 2 (PC2) ve temel bileşen 5 (PC5) olarak (**Şekil 6'da)** çizilmiştir. 3 boyutlu PCA grafiğinde; PC1, PC2 ve PC5 veri setindeki varyansın %84 ile büyük bir kısmını taşımaktadır. Şekil 6'da görüldüğü gibi A2780 ile A2780cis arasında net bir ayrım vardır.

Tablo 1'de de YZRS spektrumlarındaki piklerin hangi yapılardan geldiği kısaca özetlenmiştir. Tablo detaylı incelendiğinde hem A2780 hem A2780cis hücrelerinden gelen moleküler sinyallerin birbiri ile yüksek düzeyde benzeştiği net bir şekilde görünmektedir. Fakat DNA'nın yapısı ile ilişkili piklerin yer aldığı 600-900 cm^{-1} bölgesindeki piklerin tepe noktasında kayma söz konusudur [17]. Bu piklerin genliğindeki değişim iki hücre arasında bir farklılığı ortaya koymamaktadır. Fakat A2780 hücre hattından gelen 654, 752 ve 834 cm^{-1} tepe noktalı pikler A2780cis hücre hattında biraz kayarak 651, 750, 832 cm^{-1}'e noktalarında gelmiştir. Burada DNA piklerinin öncül olarak değerlendirilme nedeni, cis antikanser ilacı, kanser hücrelerinde DNA'nın pürin bazlarına çapraz bağlanarak hücrenin bölünmesini engeller. Böylelikle DNA'da hasara neden olur ve hücre apoptoza gider. Cis'e direnç kazanan hücrelerin DNA yapılarında böyle bir pik kayması olasıdır. Ayrıca 654 cm^{-1}'deki pik tirozinin C-C bağları arasındaki bükülmeyi, 752 cm^{-1}'deki pik ise tiriptofandan ve son olarak 834 cm^{-1}'deki pik ise C-C ve NH_3^+ titreşimlerinden geldiği literatürde gösterilmektedir (**Tablo 1'de** referansları ile bulabilirsiniz) Öte taraftan bu piklerin genliğinde gözle ayırt edilebilecek bir değişim söz konusu değildir. Çalışmamızda elde edilen pikler literatürdeki hücre YZRS çalışmaları ile yakınlık göstermektedir [18, 19]. Gözle iki hücre hattının moleküler farklılığını YZRS spektrumları üzerinde ayırt edebilmek oldukça güçtür. Bu noktada PCA analizinin önemi açıkça ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak kanser kemoterapi yaklaşımında en önemli sorunlarından olan ilaca karşı gelişen direncin spektroskopik yöntem olan YZRS ile hızlı bir şekilde tayin edilebilme potansiyeli araştırılmıştır. Bu çalışmada cis'e

duyarlı A2780 ve cis'e dirençli A2780cis hücre hatları YZRS ile Raman Spektrumları alınarak PCA analizi gerçekleştirilmiştir. PCA analizine göre bu iki hücre hattını %84 doğruluk oranı ile birbirinden ayırt edilebilinmektedir. Daha yüksek doğrulukta cis'e direnç kazanmış kanser hücrelerini tespit edebilmek için hücreye spesifik AuNP'lar sentezlenerek ve farklı derin öğrenme yöntemleri kullanılarak yeni sistemler geliştirilebilinir.

Tablo 1: Hücrelerden elde edilen spektrum bilgilerinin moleküler yapı bilgisi.

A2780	A2780cis	Moleküler Yapı
502 cm^{-1}	500 cm^{-1}	Polipeptitlerin S-S titreşimi [20]
654 cm^{-1}	651 cm^{-1}	C-C bükme (Tirozin) [21]
752 cm^{-1}	750 cm^{-1}	Triptofan [22]
834 cm^{-1}	832 cm^{-1}	C-C titreşimi, NH_3^+ titreşimi [20]
1001 cm^{-1}	1001 cm^{-1}	Fenilalanin C–C iskeleti [21, 22, 23]
1129 cm^{-1}	1125 cm^{-1}	C–N protein gerilmesi; C–C lipid gerilmesi [22]
1217 cm^{-1}	1215 cm^{-1}	PO_2^- asimetrik titreşimi [20]
1304 cm^{-1}	1305 cm^{-1}	Lipidlerin C-H deformasyonu [22]
1353 cm^{-1}-1409 cm^{-1}	1353 cm^{-1}-1411 cm^{-1}	CH_2 sallanması, C=N titreşimi [20]
1553 cm^{-1}	1553 cm^{-1} (az)	Triptofan [22]

Teşekkür

Bu çalışmada grafiklerin çizimi ve analizinde destek veren öğrencilerim Münevver Akdeniz ile Fatma Uysal Çiloğlu'na teşekkürü bir borç bilirim.

Kaynakça

[1] Dasari, S., Tchounwou, P. B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur J Pharmacol, 5;740:364-78.

[2] Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., Kroemer, G. 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene, 31(15):1869-83.

[3] Anonim, 2018. Türkiye Kanser İstatistikleri 2015. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Trkiye_Kanser_statistikleri_2015.pdf (Erişim Tarihi: 08.08.2021).

[4] Januchowski, R., Zawierucha, P., Ruciński, M., Nowicki, M., Zabel, M. 2014. Extracellular matrix proteins expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. Biomed Res Int., 2014:365867.

[5] Herod, J. J. O., Eliopoulos, A. G., Warwick, J., Niedobitek, G., Young, L. S., Kerr, D. J. 1996. The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. Cancer Res, 56(9):2178–84.

[6] Kahraman, M., Aydin, O., Culha, M. 2009. Size effect of 3D aggregates assembled from silver nanoparticles on surface-enhanced Raman scattering. Chemphyschem, 10(3):537-42.

[7] Kahraman, M., Mullen, E.R., Korkmaz, A., Wachsmann-Hogiu, S. 2017. Fundamentals and applications of SERS-based bioanalytical sensing. Nanophotonics, 6(5), 831-852.

[8] Nie, S., Emory, S. R. 1997. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. Science, 275(5303):1102-6.

[9] Suzuki, M., Niidome, Y., Kuwahara, Y., Terasaki, N., Inoue, K., Yamada, S., 2004. Surface-enhanced nonresonance Raman scattering from size-and morphology-controlled gold nanoparticle films. The Journal of Physical Chemistry B, 108(31), 11660-11665.

[10] Chattopadhyay, S., Lo, H.C., Hsu, C.H., Chen, L. C., Chen, K.H. 2005. Surface-enhanced Raman spectroscopy using self-assembled silver nanoparticles on silicon nanotips. Chemistry of materials, 17(3), 553-559.

[11] Ciloglu, F.U., Saridag, A.M., Kilic, I.H., Tokmakci, M., Kahraman, M., Aydin, O. 2020. Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy and machine learning techniques. Analyst, 145(23), 7559-7570.

[12] Aydin, Ö., Kahraman, M., Kiliç, E., Çulha, M., 2009. Surface-enhanced Raman scattering of rat tissues. Applied spectroscopy, 63(6), 662-668.

[13] Aydin, Ö., Altaş, M., Kahraman, M., Bayrak, Ö. F., Çulha, M. 2009. Differentiation of healthy brain tissue and tumors using surface-enhanced Raman scattering. Applied spectroscopy, 63(10), 1095-1100.

[14] Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J., 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discussions of the Faraday Society, 11, 55-75.

[15] Altunbek, M., Kuku, G., Culha, M., 2016. Gold nanoparticles in single-cell analysis for surface enhanced Raman scattering. Molecules, 21(12), 1617.

[16] Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. Nano letters, 6(4), 662-668.

[17] Huang J., Z. M. Mansoureh, Zhao Y., Hubarevich A., Omeis F., Giovannini G., Schütte M., Garoli D., De Angelis F. 2019. SERS discrimination of single DNA bases in single oligonucleotides by electro-plasmonic trapping. Nature Communications, 10(1), 1-10.

[18] Kuku, G., Altunbek, M., Culha, M., 2017. Surface-enhanced Raman scattering for label-free living single cell analysis. Analytical chemistry, 89(21), 11160-11166.

[19] Altunbek, M., Çetin, D., Suludere, Z., Çulha, M. 2019. Surface-enhanced Raman spectroscopy based 3D spheroid culture for drug discovery studies. Talanta, 191:390-9.

[20] Huefner, A., Kuan, W.L., Müller, K.H., Skepper, J.N., Barker, R.A., Mahajan, S. 2016. Characterization and visualization of vesicles in the endo-lysosomal pathway with surface-enhanced Raman spectroscopy and chemometrics. ACS nano, 10(1), 307-316.

[21] Yılmaz, D., Culha, M. 2021. Investigation of the pathway dependent endocytosis of gold nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. Talanta, 225, 122071.

[22] Moradi, H., Ahmad, A., Shepherdson, D., Vuong, N.H., Niedbala, G., Eapen, L., Vanderhyden, B., Nyiri, B., Murugkar, S. 2017. Raman micro-spectroscopy applied to treatment resistant and sensitive human ovarian cancer cells. Journal of biophotonics, 10(10), 1327-1334.

[23] Öztaş, D.Y., Altunbek, M., Uzunoglu, D., Yılmaz, H., Çetin, D., Suludere, Z., Çulha, M. 2019. Tracing size and surface chemistry-dependent endosomal uptake of gold nanoparticles using surface-enhanced Raman scattering. Langmuir, 35(11), 4020-4028.