

Fourier Transform Infrared Mikrospektroskopi Tekniği

Fourier Transform Infrared Microspectroscopy Technique: Review

Dr. Neslihan TOYRAN^a

^aFizyoloji AD,
Bařkent Üniversitesi Tıp Fakóltesi,
Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 23.03.2007
Kabul Tarihi/Accepted: 05.11.2007

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Neslihan TOYRAN
Bařkent Üniversitesi Tıp Fakóltesi,
Temel Tıp Bilimleri Bölümü,
Fizyoloji AD, Ankara
TÜRKİYE/TURKEY
toyran@baskent.edu.tr

ÖZET “Fourier Transform Infrared (FTIR)” spektroskopi tekniğinde, hücrenel bileşenlere zarar vermediği bilinen IR ışının soğurulması, moleküle özđü titreşime ve bunun sonucu olarak da belirli frekans değerlerinde karakteristik sinyallerin (bantların) oluşmasına neden olmaktadır. Bu sinyallerin şiddetinde, bant genişliğinde ve frekans değerinde meydana gelen değişiklikler, incelenen sistem hakkında moleküler düzeyde önemli bilgiler vermektedir. FTIR mikrospektroskopi, FTIR spektroskopiye mikroskop eklenmesi ile elde edilen, yüksek yerel ve spektral çözünürlüğe sahip bir tekniktir. Astronomiden organik kimyaya kadar birçok farklı alanda yıllarca kullanılmış olan FTIR spektroskopinin kullanım alanı, mikrospektroskopideki hızlı teknolojik gelişmeler ile paralel olarak son yıllarda oldukça genişlemiştir. Bu tekniğin tıpta kullanımındaki gelişmeler; özellikle patoloji, klinik biyokimya ve IR görüntüleme alanlarında olmuştur. Mikrometre kalınlığındaki ince bir doku diliminin istenilen bir bölgesinin nokta-nokta biyokimyasal haritasının çıkarılmasına olanak sağlayan bu teknik ile birçok hastalığın neden olduğu biyokimyasal değişiklikler hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Ayrıca teşhis amaçlı da kullanılabilen bu mikrospektroskopik teknik ile herhangi bir boyama, ekstraksiyon ya da saflaştırma işlemine gerek olmadığı için incelenen sistemin moleküler yapı bütünlüğu bozulmamaktadır. Bu derlemede elektromanyetik dalgaların genel özellikleri ve IR mikrospektroskopi tekniğinin temel prensipleri, bu tekniğin deneysel hazırlık yöntemleri özetlenmiş; medikal alandaki başlıca uygulamaları derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Spektroskopi, fourier transform infrared; moleküler etki mekanizması

ABSTRACT In the Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy technique, the absorption of infrared (IR) radiation, which is known to be a harmless electromagnetic wave to the cellular components, causes specific molecular vibrations. As a result, characteristic signals (bands) appear at particular frequency values. The changes in the intensity, bandwidth and frequency values of these bands give valuable information at molecular level on the investigated system. The combination of a microscope with a FTIR spectrometer results in FTIR microspectroscopy, which has a high spatial and spectral resolution. FTIR spectroscopy has been used in many different fields ranging from astronomy to chemistry for many years. In the last years, in parallel with the rapid advances in microspectroscopy technology, the number of its application areas increased remarkably. The advances in the application of FTIR microspectroscopy in medicine occurred particularly in pathology, clinical biochemistry and IR imaging. This technique, which enables us to obtain point-by-point biochemical map using a thin tissue slide having thickness in μm values, can be used to have information about the biochemical changes induced by many diseases. In addition, this technique can also be used for diagnostic purposes. Since there is no need for any kind of staining, extraction or purification procedures in this microspectroscopic technique, the investigated system remains intact in terms of its molecular structure. In this review, general properties of electromagnetic waves, the basic principles of FTIR microspectroscopy and its experimental preparation methods were summarized and its main applications in the medical field were reviewed.

Key Words: Spectroscopy, fourier transform infrared;
molecular mechanisms of pharmacological action

Spektroskopi, çeşitli tipte ışınların madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalı için kullanılan genel bir terimdir. Spektroskopik tekniklerden biri olan kızılötesi "Infrared (IR)" spektroskopi tekniği 1800'lü yıllarda İngiliz gökbilimci William Herschel'in elektromanyetik spektrumda IR bölgeyi keşfetmesi ile gelişmeye başlamıştır.¹ Bunu takip eden 35 yıl içinde ilk orta-IR spektrometre yapılmıştır.¹ 90 yıl içinde bu teknik astronomi, fizikokimya, organik kimya gibi alanlarda uygulanmaya başlanmıştır.¹ 1949 yılında Blout ve Mellors; Woernly, insan ve hayvan dokularından elde edilen IR spektrumlarının dokunun yapısı ile ilgili bilgi verdiğini gösteren öncü çalışmaları gerçekleştirmişlerdir.^{2,3} 1960'lı yıllarda Elliot ve Ambrose, IR spektroskopi tekniğinin protein konformasyon çalışmalarında kullanılabilirliğini göstermişlerdir.⁴ Yine aynı yıllarda lipid/membran yapısı ve dinamiğinin, özellikle lipid faz davranışlarının incelendiği çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.^{1,5,6} IR spektroskopi tekniği kullanılarak 1968 yılında, DNA'nın yapısı incelenmeye başlamıştır.⁵ Bu teknik Mantsch ve McElhaney tarafından 1991 yılında lipid-protein etkileşimlerini incelemek için kullanılmıştır.⁶ Özellikle son 10 yılda IR spektroskopinin metodolojisindeki büyük gelişmeler sayesinde bu tekniğin biyomedikal alandaki kullanımını yaygınlaştırmıştır. Bu teknik ile veriler elektronik ortamda toplandığı için amaca bağlı olarak, birçok matematiksel ve istatistiksel işlem yapmak mümkündür. Değişik hastalıkların moleküler mekanizmalarını anlamının yanı sıra teşhis amaçlı da kullanılabilen bu teknik, özellikle histolojik tekniklere göre üstün olan yönleri ile dikkat çekmektedir.¹ Bir doku kesitinde histolojik yöntemler ile tespit edilmesi mümkün olmayan, başlangıç safhasındaki anormal bir proliferasyonu tespit edebilmesi; objektivite sağlanması; doku kesitlerinin histolojik olarak değerlendirilmesinde kullanılan boyama işlemlerine gerek olmaması nedeni ile incelenen dokuya hiçbir şekilde zarar verilmemesi; aynı anda birçok makromolekülün analizinin doğal ortamlarında, yapıları bozulmadan ve dışardan herhangi bir işaretleyicinin kullanılmasına gerek kalınmadan yapılabilmesi, bu tekniğin başta gelen avantajlarından biridir.^{1,7} Bu

derlemede, IR mikrospektroskopinin özelliklerinin ve biyomedikal alandaki yerinin belirtilmesi amaçlanmıştır.

ELEKTROMANYETİK DALGALAR

Elektromanyetik dalgalar, dalga boyu km'ler ile ifade edilen radyo dalgalarından , dalga boyu 10^{-16} m dolaylarına kadar inen γ (gama) ışınlarına kadar geniş bir aralığı kapsar. Elektromanyetik dalgalar, elektrik yükü olan parçacıkların hareketi ile oluşurlar. Elektromanyetik ışığın birçok özelliği dalga boyu, frekans, genlik gibi parametreleri içeren klasik sinüs dalga modeli ile açıklanabildiği gibi; ışın enerjisinin absorpsiyonu (soğurulması) ve emisyonuyla ilgili olayların açıklanmasında elektromanyetik ışının, enerjileri ışın frekansı ile orantılı olan ve foton adı verilen parçacık özelliği kullanılmaktadır. Bu nedenle elektromanyetik dalganın dalga parçacık çift özelliği vardır. En önemli parametreler frekans, dalga boyu ve enerjidir. Frekans, 1 saniyede bir noktadan geçen dalga döngüsü sayısıdır. Bir tam dalga döngüsünün uzunluğuna ise dalga boyu denir. Elektromanyetik dalgalar boşlukta $c = 3 \cdot 10^8$ m/s hız ile birbirine dik doğrultudaki elektriksel ve manyetik alan değişimleri şeklinde yayılırlar. Elektromanyetik dalgaların yayılma hızı boşlukta sabittir. Dalgaların yayılma hızı (c), frekans (ν) ve dalga boyu (λ) arasında,

$$c = \lambda \cdot \nu \quad [\text{m/s}]$$

şeklinde bir ilişki vardır. Foton adı verilen elektromanyetik enerji paketçığının enerjisi, h Planck sabiti olmak üzere,

$$E = h \cdot \nu \quad [\text{J}]$$

şeklinde dir. Frekansı yüksek (dalga boyu küçük) olan fotonların enerjileri yüksektir.⁸

IR spektroskopide yaygın olarak kullanılan dalga sayısı ($\bar{\nu}$), santimetre cinsinden dalga boyunun tersidir. Birimi cm^{-1} 'dir. IR spektroskopide genellikle dalga sayısı skalası kullanılmaktadır. Aslında soğurulan ışığın frekansı soğurma olayının gerçek sorumlusu olan molekülün titreşim frekansıdır. Ancak birimin büyüklüğünün uygunsuzluğu nedeni ile frekans yatay ekseninde nadiren kullanılır.

Elektromanyetik spektrumda yer alan ışınlar-dan kızılötesi, görünür ve morötesi ışınlarının soğurum ölçümleri çok sayıda bileşiğin kantitatif analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Dalga boyları 0.8 μm -125 μm arasında olan bu ışınlar IR spektroskopide ışın kaynağı olarak kullanılırlar. IR spektrumu, yakın (0.8 μm -2.5 μm), orta (2.5 μm -50 μm) ve uzak (50 μm -100 μm) olmak üzere 3'e ayrılır. Sıcak yüzeylerden salınan bu ışınların salınması veya soğurulması, moleküler sistemlerdeki dönme ve titreşim enerji düzeylerinin değişmeleri ile ilgilidir.⁸ Bir molekülün kızılötesi ışınını soğurulabilmesi için titreşim veya dönme hareketi sonucunda, molekülün dipol momentinde net bir değişiklik olması gerekir. Kızılötesi soğurma spektrumları, özellikle moleküler madde analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kızılötesi ışınlar iyonlaşmaya neden olmadıkları için etkileştikleri biyolojik moleküllere zarar vermezler. Elektromanyetik spektrumda kızılötesi ışınlardan sonra yer alan görünür ışığın dalga boyu 360 nm-800 nm'dir. Görünür ışık, atomlardaki elektronik enerji düzeylerinin değişmesi ile salınır veya soğurulur. Görünür ışık salma ve soğurma spektrumlarının spektrofotometrik olarak incelenmesi ile maddelerin atomik içeriği ile ilgili analiz yapmak mümkündür.⁸ Elektromanyetik spektrumda görünür ışıktan sonra, dalga boyları 2 nm-400 nm olan morötesi ışınları yer almaktadır. Bu ışınlar, atomlarda elektronik enerji düzeyleri arasındaki geçişler ile ilgilidir. Ultraviyole ışınlar olarak da bilinen bu ışınlar proteinler ve nükleik asitler tarafından karakteristik bir şekilde soğurulurlar. Sahip olduğu yüksek enerji nedeni ile etkileştiği maddede iyonlaşmaya neden olur.⁸

FTIR MİKROSPEKTROSKOPI

FTIR mikrospektroskopi, FTIR spektroskopiye mikroskop eklenmesi ile oluşturulmuş, yüksek spektral çözünürlüğe sahip bir tekniktir.^{9,10} IR spektroskopi, IR ışının moleküller üzerinde oluşturduğu titreşimlerin neden olduğu karakteristik frekans değerlerinin kullanılması ile moleküler düzeyde madde analizi yapılmasını sağlar.

Bir IR spektrumu elde etmek için, örneğe IR ışığı gönderilir. Bir molekülün IR ışınını soğurabil-

mesi için, molekülün titreşimi sonucunda molekülün doğal dipol momentinde net bir değişikliğin olması gerekir. Örneğe iletilen ışığın ne kadarının belli bir enerjide soğurulduğuna bakılır. Soğurma spektrumunda bir sinyalin (bandın) elde edildiği enerji, örnek molekülün titreşim frekansını verir. 1980'li yıllardan sonra Fourier transformasyon (dönüşüm) özellikli IR spektrometrelerin gelişmesi ile daha hızlı, güvenilir ve sinyal/gürültü oranı yüksek olan veri elde etmek mümkün olmuştur. Fourier dönüşüm, bir sinyal fonksiyonunun zaman serileri şeklindeki gösteriminin bazı algoritmalar ile frekans spektrumuna dönüştürülmesidir. Bu dönüşüm, sinyal formundaki fiziksel bilginin matematiksel olarak analiz edilmesini kolaylaştırmaktadır. Belirli bir sinyalin frekans bileşenlerinin belirlenmesini sağlayan Fourier dönüşüm, her frekansın sinyale olan katkısının bir çeşit gösterimidir. İncelenen sinyalin sonlu ve kesikli olduğu durumlarda, sinyal işleme sürecinin önemli bir parçası olan "kesikli Fourier dönüşüm" kullanılır. Bu dönüşüm gerçekleşirken özel bir yöntem ile yapılacak olan işlem sayısı azaltılabilir. Kesikli Fourier dönüşümün özel bir durumu olan bu dönüşüme, "hızlı Fourier dönüşüm" denir. Bu dönüşüm, kesikli Fourier dönüşümün daha etkin bir şekilde hesaplanmasını sağlayan bir algoritmadır.¹¹

Bir molekülde bulunan atomların birbirine göre yerleşimleri tam olarak sabit olmayıp, moleküldeki bağlar etrafında çok sayıda titreşim ve dönme sonucu devamlı değişir. Moleküllerin titreşim modları bağ açısına ve uzunluğuna bağlı olarak değişim gösterir. Bu modlar, bağ uzunluklarına göre simetrik ve asimetrik gerilme; bağ açılarına göre de makaslama, salınma, burkulma vb. şeklinde isimlendirilmişlerdir.

ÖRNEK HAZIRLAMA YÖNTEMİ

FTIR mikrospektroskopi tekniği ile spektral harita çıkarma deneylerini yapabilmek için, kriyotom kullanılarak dokunun incelenecek bölgesinden μm kalınlığında seri olarak en az 2'şer kesit alınır. Kesit alma işlemi sırasında dokuyu sabitlemek için, doku ile etkileşime girmeyen bir dondurucu madde kullanılır. İlgili bölgelerden alınan kesitlerden birincisi FTIR mikrospektroskopi ölçümü yapabil-

mek için CaF_2 , BaF_2 gibi IR ışığına geçirgen olan ve suda çözünmeyen özel lamlara alınır. Ölçümler yapılabildiği kadar, alınan örnekler bir desikatör içinde kuru ortamda muhafaza edilir. Mikroskoba bağlı olan bilgisayar ile kontrol edilebilen x/y platformu ile doku diliminin incelenmek istenen bölgesinin, belirli mikrometre aralıklarla yüksel yerel çözünürlüğe sahip spektral haritasını çıkarmak mümkündür. Böylece, doku kesitinde incelenmek istenen bölgenin tamamını kapsayacak IR verisi elde edilmiş olur. Normal lam üzerine alınan diğer kesitler, kesitlerdeki yapıların tanımlanabilmesi için hematoksilin ve eozin (H&E) gibi, amaca bağlı olarak değişik histolojik boyama teknikleri kullanılarak boyanır.^{9,10}

VERİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Spektral veri analizleri bilgisayar ortamında (OPUS 3.0 gibi uygun bilgisayar programları kullanılarak) gerçekleştirilir. Veri analizi yapılırken takip edilmesi gereken başlıca basamaklar şunlardır: Spektral kalite testi, türev hesapları, sinyallerin normalizasyonu, kümeleme analizleri, spektrumlarının ortalama hesapları ve değişik fonksiyonel gruplara göre yapılan kimyasal haritalar. Kümeleme analizleri, kalite testini başarı ile geçen spektrumların önce türevi alınarak, daha sonra da belirli spektral aralıklarda normalizasyonu yapılarak elde edilen spektrumlar ile gerçekleştirilir. Kümeleme analizi ile benzer spektral özelliğe sahip olan spektrumlar aynı sınıflarda toplanabilmekte ve böylece farklı doku yapılarını spektral olarak ayırt etmek mümkün olabilmektedir. Kümeleme analizi sonucunda elde edilen ve değişik kümelere ait olan spektrumlar kaydedilir. Kalite testi analizi yapılırken göz önüne alınması gereken başlıca kriterler şunlardır:

1- Su buharının varlığı: Su buharı 1800-1450 cm^{-1} (Orta-IR) spektral aralıkta, özellikle 1750-1800 cm^{-1} 'de, çok güçlü sinyaller verir. Güvenilir sinyal analizi yapabilmek için, asıl incelenmek istenen moleküllerin sinyallerini bozan su buharı sinyallerinin ortamda yer almadığından emin olmak gerekir. Örneklerde su buharı sinyalleri tespit edilirse, örnekle aynı koşullar altında çekilmiş olan su buharı spektrumu, örnek spektrumdan bilgisayar

ortamında çıkarılır. Böylece su buharının etkisi ortadan kaldırılmış olur.

2- Örnek kalınlığı: Doku kesiti kalınlığı, soğurma değerini doğrudan etkileyen önemli bir faktördür. 950-1750 cm^{-1} spektral aralığındaki soğurmaların integralleri hesaplanarak örnek kalınlığı hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Bu yöntem ile kesitte, ayarlanan kalınlık değerinden daha kalın ya da daha ince (tekniksel nedenlerle) olan bölgeler belirlenebilmekte ve böylece bu bölgelerden gelen sinyaller analiz dışı bırakılmaktadır.

3- Kesit alınırken kullanılan maddenin varlığı: Kriyotom ile düzgün doku kesiti elde etmek için kullanılan özel maddenin, spektral analiz yapılacak doku bölgelerine bulaşmamış olması gerekmektedir. Bundan emin olmak için bu maddenin spektrumu çekilir ve ilgili bantların örnek spektrumunda olup olmadığı kontrol edilir. Bu maddenin bulaştığı bölgelerden gelen sinyaller analiz dışı bırakılır.^{9,10}

FTIR MİKROSPEKTROSKOPİNİN BAŞLICA UYGULAMA ALANLARI

Moleküler düzeyde çok değerli bilgiler veren FTIR spektroskopinin tıptaki genel uygulama alanları diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, kanser, osteoporoz, Alzheimer ve ateroskleroz gibi değişik hastalıklardır.^{9,12-16}

Diyabet

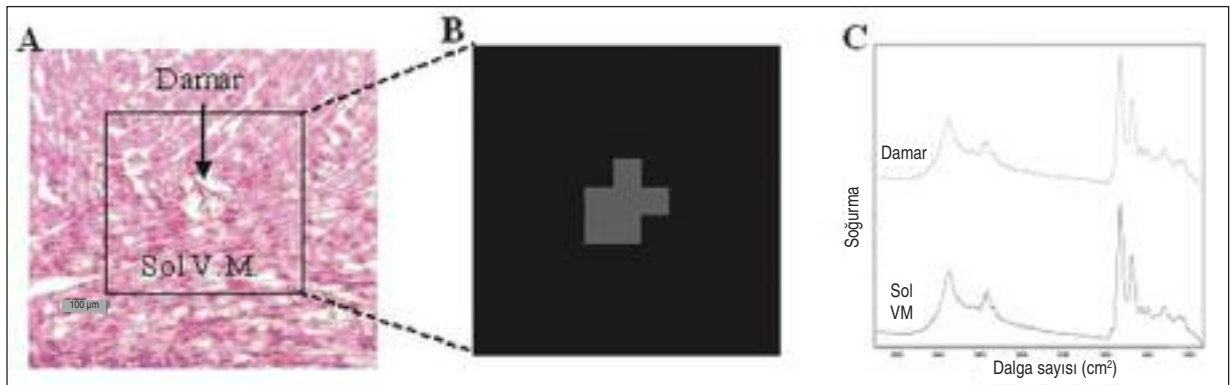
Diabetes mellitus, insülin eksikliği, yoksunluğu ve/veya direnci durumlarında ortaya çıkan; kardiyovasküler sistem başta olmak üzere birçok sistemi olumsuz yönde etkileyen metabolik bir hastalıktır. Toyran ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, tip 1 diyabet yapılmış yetişkin Winstar sıçan kalplerinin sol ve sağ ventrikül miyokardiyumunda ve sol ventrikül miyokardiyumunda bulunan damarlarda (venlerde) oluşan değişiklikler FTIR mikrospektroskopi tekniği kullanılarak moleküler düzeyde incelenmiştir.⁹ Bu teknik ile mikrometre kalınlığındaki bir doku diliminin istenilen bir bölgesinin moleküler analizi yapılabilmektedir. Her kalpten alınan 9 μm kalınlığındaki 2'şer seri kesitten birincisi FTIR mikrospektroskopi çalışmaları

için, ikincisi ise H&E ile boyanarak karşılaştırma yapmak için kullanılmıştır. Şekil 1A'da sıçan kalbinin sol ventrikül kasından elde edilen kesitin H&E ile boyama sonucu ışık mikroskopunda 100x büyütmedeki görüntüsü, FTIR mikroskobu ile ölçüm yapılan bölge kare içine alınarak verilmiştir. Şekil 1B'de, ölçüm yapılan bölgeden elde edilen spektrumların kümeleme analizi yapıldıktan sonra elde edilen görüntüsü verilmiştir. Şekil 1C'de ise, kümeleme analizi sonucu elde edilen sinyaller verilmiştir. Şekil 1B'deki gri renk, sol ventrikül kasındaki damara ait olan bölgedir ve Şekil 1C'de de aynı renk ile gösterilmiştir. Siyah renk ise sol ventrikül kasını göstermektedir ve bu bölgeden gelen spektrum yine siyah renk ile gösterilmiştir. Kümeleme analizi her grup için gerçekleştirilmiştir ve elde edilen orijinal soğurma spektrumlarının ortalamaları kaydedilmiştir. Bu ortalama spektrumlar OPUS^{NT} programına yüklendikten sonra 2. türevleri alınmış ve daha sonra değişik spektral bölgelere göre vektör normalizasyonları yapılmıştır. Bu işlemlerden sonra da kontrol ve diyabet grupları spektral olarak birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

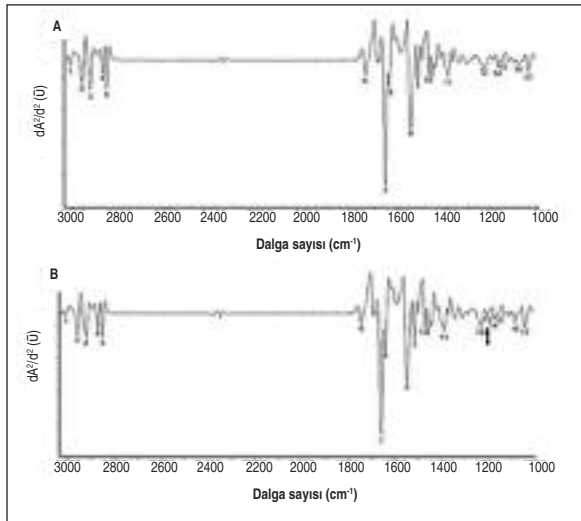
Sağ ventrikül kası için kümeleme analizi yapılmamıştır. Çünkü spektral çekim yapılan alan sadece sağ ventrikül miyokardiyumu içermekte, farklı kümeler ayrılması beklenen farklı yapılar içermemektedir.⁹

IR ışınının soğurulması sonucu belirli frekans değerlerinde ortaya çıkan karakteristik sinyaller Şekil 2'de verilmiştir. Spektral değişikliklerin karşılaştırılması, ortalamaları hesaplanan spektrumların 2. türevleri kullanılarak yapılmıştır. Orijinal soğurma spektrumlarının 2. türevleri alındığında sinyallerin maksimum olan noktaları minimuma dönüşür ve daralan sinyaller daha belirgin hale gelir.^{9,10} Birbirine çok yakın frekans değerlerine sahip olan fonksiyonel gruplardan kaynaklanan sinyaller, orijinal soğurma spektrumunda üst üste binmiş durumda ortaya çıkarlar. Bu spektrumların 2. türevleri alındığında, üst üste binmiş olan sinyaller daralarak birbirlerinden kolaylıkla ayırt edilebilecek duruma gelirler ve böylece daha sağlıklı sinyal analizi yapmak mümkün olur. Bu çalışmada, Şekil 2A'da kontrol sol ventrikül miyokardiyumundan elde edilen orijinal soğurma sinyalinin 2. türevi verilmiştir. Sağ ventrikül kasına ait spektrumda da benzer sinyaller görülmüştür. Şekil 2B'de ise kontrol sol ventrikül miyokardiyumunda bulunan damardan (venden) elde edilen orijinal soğurma sinyalinin 2. türevi görülmektedir.

Şekil 2A ve B'de görülen sinyaller birbirlerine benzerlik göstermektedir. Ancak sol ventrikül kasında bulunan damardan elde edilen spektrumda $\sim 1201 \text{ cm}^{-1}$ de dokudaki kolajene ait yeni bir bandın ortaya çıktığı görülmektedir (Şekil 2B'de ok ile işaretli). Şekil 2'de görülen karakteristik sinyaller-



ŞEKİL 1: Sıçan kalbinin sol ventrikül kasından elde edilen kesitin H&E boyama sonucu ışık mikroskopunda 100x büyütmedeki görüntüsü (haritası çıkarılan bölge kare içine alınmıştır) (A), kümeleme analizi sonucu oluşan harita (B), ve farklı kümelerle ait ortalama spektrumları (C). (Toyran, 2006'dan "9" değiştirilerek çizilmiştir).



ŞEKİL 2: Sıçan kalbinin kontrol sol ventrikül miyokardiyumuna ait ikinci türev (A) spektrumu, kontrol sol ventrikül miyokardiyumunda bulunan damara ait ikinci türev (B) spektrumu. (Toyran, 2006'dan "9" değiştirilerek çizilmiştir).

den CH_3 asimetrik ve simetrik gerilme, CH_2 asimetrik ve simetrik gerilme bantlarını içeren $2800\text{-}3030\text{ cm}^{-1}$ spektral bölge (1. bölge); Amid I ve Amid II gerilme bantlarının içeren $1480\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ spektral bölge (2. bölge); başlıca PO_2 gerilme, C-O geril-

me, C-N gerilme, CO-O-C gerilme bantlarını içeren $1000\text{-}1270\text{ cm}^{-1}$ spektral bölge (3. bölge) incelenmiştir. Bu gerilme modlarının frekans değerleri ve karşılık gelen fonksiyonel grupların açıklaması Tablo 1'de verilmiştir. 1. spektral bölge, çoğunlukla lipidlerden kaynaklanan sinyalleri, 2. spektral bölge çoğunlukla proteinden kaynaklanan sinyalleri ve 3. spektral bölge çoğunlukla lipidlerden, glikojenlerden, glikolipidlerden, sakkaritlerden, kolajenden, kaynaklanan sinyalleri içermektedir.

Tüm optiksel spektroskopik tekniklerinde olduğu gibi IR soğurmalarının sinyal şiddetleri ve/veya eğri altında kalan alan, adı geçen fonksiyonel grubun konsantrasyonu hakkında bilgi verir.^{10,17-19} Frekans değerlerinde görülen değişiklikler, sistemin yapı ve konformasyonunda meydana gelen değişiklikleri gösterirken, bant genişliğindeki değişiklikler sistemin dinamiği hakkında bilgi verir.²⁰⁻²⁴ Yapılan sinyal analizi sonucunda, spektrumda yer alan bazı bantların sinyal şiddetlerine, kontrol ve diyabet grupları arasında istatistiksel bakımdan önemli değişikliklerin olduğu bulunmuştur.⁹ Kalbin incelenen her bölgesinde diyabet hastalığının lipid miktarında artışı; α -heliks miktarında azalış

TABLO 1: $3015\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ aralığında titreşim frekanslarından kaynaklanan başlıca fonksiyonel gruplar ve karşılık gelen dalga sayıları.^{9,11}

Bant Numarası	Karşılığı	Frekans (cm^{-1})
1	Olefinik=CH gerilme: Doymamış yağ asitleri	3012
2	CH_3 asimetrik gerilme: Lipid	2956
3	CH_2 asimetrik gerilme: Lipid	2925
4	CH_3 simetrik gerilme: Çoğunlukla protein	2873
5	CH_2 simetrik gerilme: Lipid	2854
6	C=O gerilme: Lipidlerdeki ester gruplar	1733-1739
7	Amid I: (protein C=O gerilme), α -heliks	1655
8	Amid I: β -plakalı tabakalı yapı	1638
9	Amid II: (protein N-H bükülme, C-N gerilme), α -heliks	1545
10	CH_2 makaslama: Lipid	1468
11	CH_3 bükülme: Lipid	1386
12	PO_2^- asimetrik gerilme: Fosfolipidler, nükleik asitler	1228
13	Kolajen	1201
14	CO-O-C asimetrik gerilme: Kolesterol esterdeki ester bağları	1173
15	C-O gerilme: Glikojen, nükleik asitler	1156
16	PO_2^- simetrik gerilme: Fosfolipidler, nükleik asitler C-O gerilme: Glikojen, oligosakkarit, glikolipid	1080-1085
17	C-O gerilme: Oligosakkarit, polisakkarit	1041

ve β plakalı tabakalı yapı miktarında artışa neden olacak şekilde proteinlerin ikincil yapı profilinde değişikliğe; glikojen ve glikolipid miktarında artışa neden olduğu görülmüştür. Ayrıca diyabetin sol ventrikül kasında bulunan damarda, kolajen miktarında artış olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma diyabetin, sol ve sağ ventrikül miyokardiyumu ve sol ventrikül miyokardiyumunda bulunan damarları üzerine olan kısa dönem (5 hafta) etkilerini moleküler göstermesi bakımından önem taşımaktadır.

İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

Crohn hastalığı ve ülseratif kolit, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının çok önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. İnsanda kolon hastalıklarının patolojik özellikleri birbirine çok benzer olduğu için doğru teşhis koymak zordur. Yaşlı hastalarda Crohn hastalığı ve ülseratif kolit, kolonun en aşağı bölgesinde oluşma eğilimindedir. Bu iki hastalığın kansere dönüşme riski taşıması bakımından doğru teşhis edilmesi büyük önem taşımaktadır.^{25,26} Teşhis yöntemlerinden biri olan kolonoskopi, kolonun morfolojik özelliklerini göstermeye yarar, fakat biyokimyasal özelliklerini göstermek için yeterli değildir. Bu iki hastalığın patolojik orijinleri birbirinden farklı olduğu için inflamatuvar bağırsak hastalıklarının kansere dönüşümüne kadar olan dönemdeki biyokimyasal özelliklerinin farklı olması gerekir. İnflamatuvar bağırsak hastalıkları kansere dönüştüğü zaman Crohn hastalığı ve ülseratif kolit birbiri ile aynı özelliklere sahip olacaktır. 2004 yılında Argov ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 20 adet kanser hastası ve 20 adet inflamatuvar bağırsak hastası incelenmiştir.¹² Bu hastaların kolonlarının sağlıklı olan bölgelerinden alınan örnekler kontrol gruplarını oluşturmuştur. Kolonlardan 10 μm 'lik kesitler alınmış, bir patoloğun belirlediği bölge dahilinde rastgele seçilen 5 farklı yerden FTIR mikrospektroskopi ile ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sinyallerin, belirli aralıklarda integralleri alınarak ilgili bölgelerdeki moleküllerin miktarları hesaplanmıştır. İncelenen doku bölgesindeki karbonhidrat miktarını bulmak için 900-1185 cm^{-1} spektral aralığının, nükleik asitlerdeki fosfat gruplarının miktarını bulmak için 1185-1350 cm^{-1} spektral aralığının, fosfolipidlerin ve proteinlerin miktarlarını bulmak için 1350-1475 cm^{-1}

spektral aralığının integralleri alınmıştır. Ayrıca DNA ve RNA'dan kaynaklanan sinyaller incelenerek RNA/DNA oranında oluşan değişiklikler incelenmiştir. Bu metabolitlerden hangilerinin miktarında görülen değişikliklerin teşhis amaçlı kullanılabilceği araştırılmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, normal sağlıklı durumdan inflamatuvar bağırsak hastalıklarına ve kansere geçiş durumunda, özellikle dokudaki karbonhidrat miktarında oluşan değişikliklerin izlenmesini sağlayan 900-1185 cm^{-1} spektral aralığında önemli değişikliklerin olduğu bulunmuştur. Eldeki inflamatuvar bağırsak hastalığı taşıyan dokuları normal ve kanserli olmak üzere 2 gruba ayırmak mümkün olmuştur. FTIR mikrospektroskopi tekniği sayesinde Crohn hastalığı ve ülseratif kolit hastalığı olan bireylerden hangilerinin kanser olmaya eğilimli olduğunu saptamak mümkün olmuştur. Crohn hastası olan 10 kişiden 3 tanesinin, ülseratif kolit olan 10 kişiden 7 tanesinin ilerde kanser olma ihtimalinin yüksek olduğu (premalin aşamada olduğu) sonucuna varılmıştır.¹²

Kanser

Kriptler, kolonda bulunan doku tabakaları boyunca uzanan tüp şeklindeki bezlerdir. Bu kriptlerin taban bölgesinde bulunan aktif kök hücreleri, bağırsak epitelinin yenilenmesinden sorumludur. Kolonda normal olmayan kript proliferasyonu ve gelişimi, kolon kanserinin premalin basamağı olarak kabul edilmektedir.²⁷ 2004 yılında FTIR mikrospektroskopi kullanılarak yapılan bir çalışmada, 21 tane kolon kanseri hastasının kolonlarından 10 μm 'lik kesitler alınmıştır.¹³ Kanserli bölgenin uzatından alınan, normal histopatolojik özelliklere sahip olan kolon biyopsilerindeki kriptler incelenmiştir. Histolojik olarak normal kabul edilen kolon biyopsilerinde, FTIR mikrospektroskopi tekniği ile anormal proliferasyonun varlığını tespit etmek mümkün olmuştur. Normal histopatolojik özelliklere sahip olan kolon biyopsilerinin incelendiği bu çalışmada, biyopsilerde bulunan normal ve normal olmayan kriptler spektral olarak birbirinden ayırt edilebilmiştir. Kriptler, kript boyunca ilerledikçe, IR'da görülen spektral desenler açısından 3 gruba ayrılmıştır: i) Tüm biyokimyasal bileşenler açısından normal spektral desene sahip

olanlar, ii) Bazı biyokimyasal bileşenler açısından normal spektral desene sahip olanlar, iii) Tüm ya da birçok biyokimyasal bileşenler açısından normal olmayan spektral desene sahip olanlar. Özellikle kanserli bölgenin tamamen uzağından alınan biyopsi örneklerinde, histolojik olarak tamamen normal görünen kripler incelenmiştir. Bu çalışmada, dokudaki tirozinde oluşan değişiklikleri analiz etmek için 1515 cm^{-1} bandı, karbonhidrat miktarında oluşan değişiklikleri analiz etmek için $900\text{-}1185\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığı, fosfat miktarında oluşan değişiklikleri analiz etmek için $1185\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığı, fosfolipid miktarında oluşan değişiklikleri analiz etmek için $1350\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığı, nükleik asit miktarında oluşan değişiklikleri analiz etmek için ise 1121 ve 1020 cm^{-1} de sinyal veren RNA ve DNA'dan kaynaklanan bandlar incelenmiştir. Birçok molekülün kısa sürede eş zamanlı analizine olanak sağlayan bu teknik ile elde edilen sonuçlar, klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. Çünkü elde edilen bulgular, özellikle kanser işaretleyici (marker) enzimlerin kullanılmadığı durumlarda FTIR mikrospektroskopinin, kolon biyopsilerinde normal histopatolojik özelliklere sahipmiş gibi görüldüğü halde, premalin aşamada olan yapıların teşhisinde teşhis amaçlı kullanılabilceği ortaya çıkmıştır. Bu bulgu, kolon kanseri ameliyatlarında kolostomi sınırını daha doğru belirlemek için FTIR mikrospektroskopi tekniğinin kullanılabilceğini göstermektedir. Ayrıca bu teknik kullanıldığında, yalancı negatif sonuçların çıkma riski de minimuma indirilmiş olmaktadır.¹³

Osteoporoz

Kemiğin dayanıklılığını belirleyen başlıca faktörler kemik yoğunluğu, yapısı ve kimyasal içeriğidir.²⁸ Osteoporozda oluşan kemik kaybında bu faktörlerde ciddi değişikliklerin olması beklenir.²⁹ Huang ve ark. tarafından 2003 yılında yapılan bir çalışmada, menopozal osteoporoz modeli oluşturmak için dişi maymunların yumurtalıkları cerrahi yöntemlerle çıkarılmıştır.¹⁴ Proksimal tibiadan alınan $5\text{ }\mu\text{m}$ kalınlığındaki kesitler kullanılarak yapılan bu çalışmada, osteoporozda oluşan kimyasal içerik değişikliğinin yanı sıra, hücre yıkımını basılayıcı etkiye sahip ilaçların osteoporoz üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ke-

mikteki fosfattan ($500\text{-}650\text{ cm}^{-1}$), karbonattan ($825\text{-}905\text{ cm}^{-1}$) ve kolajenden ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) kaynaklanan sinyaller incelenmiştir. Fosfat miktarında gözlenen değişiklikler, kemik dokusundaki mineralizasyon miktarı hakkında; fosfat/protein oranında gözlenen değişiklikler, mineral/matriks oranı hakkında; karbonat/protein oranında gözlenen değişiklikler ise karbonat birikimi hakkında bilgi vermektedir. Yapılan sinyal analizi sonucunda, osteoporozda, kortikal kemikte fosfat miktarının arttığı, karbonat miktarının azaldığı; trabeküler kemikte ise fosfat miktarının değişmediği, karbonat miktarının azaldığı görülmüştür. Bunun yanı sıra ilaç uygulamasının, osteoporoz oluşturulan grupta, kortikal kemikte oluşan olumsuz değişiklikleri düzelttiği görülmüştür. FTIR mikrospektroskopinin kullanıldığı bu çalışmada, kemiğin farklı bölgelerinde oluşan biyokimyasal değişiklikleri, incelenen dokunun bütünlüğü ve yapısı bozulmadan, moleküler düzeyde tespit etmek mümkün olmuştur. Ayrıca bu çalışmanın sonuçları, osteoporoz tedavisinde kullanılan ilaçların, kemiğin farklı bölgesinde farklı etki yapabileceği gerçeğini ortaya koyması açısından önem taşımaktadır.¹⁴

Alzheimer

Demansın en sık görülen formu Alzheimer hastalığıdır.^{30,31} Alzheimer hastalarının beyinde gri maddede ve hücre dışında, çözünmeyen amiloid (protein ve peptitten oluşan) birikintilerinin olduğu ve bu birikintilerin çevresinde normal olmayan nöronal işlemlerin gerçekleştiği bilinmektedir.³² Bu amiloid birikintilerinin Alzheimer hastalığı patolojisinde önemli olduğu bilinmektedir.^{33,34} Bu birikintiler çoğunlukla amiloid β -peptitlerden oluşur. Bu peptit, amiloid β -öncül proteininden türemektedir.³⁵ Bu proteinin anormal bir şekilde bölünmesi amiloid β -peptitlerin birikmesine neden olur.¹⁵ Alzheimer'ın klinik semptomlarının oluşmasında amiloid β -peptitlerin rolü tam olarak anlaşılamamış, sadece bazı çalışmalarda nörotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir.³⁶ Bu hastalığın erken teşhis ve tedavisi için yapı-fonksiyon ilişkisinin kurulabileceği düşünüldüğünden, yapısının bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalarda Dairesel Dikroizm (CD), Nükleer Magnetik Rezo-

nans (NMR) spektroskopisi, X-ışını difraksiyonu ve FTIR spektroskopisi teknikleri kullanılmıştır.³⁷⁻⁴⁴ Bu yapı analiz çalışmalarında, izole edilmiş ya da kimyasal olarak sentezlenmiş amiloid β -peptitler kullanılmıştır. Sentetik amiloid β -peptitler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, kullanılan çözelti şartlarına bağlı olarak bu peptitin β -plakalı tabakalı yapı, α -heliks ve düzensiz (unordered) yapılarından oluştuğu bulunmuştur.¹⁵ Bu çalışmalar, protein agregatlarını çözmek için kullanılan fizyolojik olmayan koşullara sahip çözeltiler içinde gerçekleştirildiği için, elde edilen yapı bulguları amiloid β -peptitlerin beyindeki gerçek yapısını yansıtmıyor olabilir. 1996 yılında yapılan bir FTIR mikrospektroskopisi çalışmasında, Alzheimer hastalarından (otopsi) alınan 8 μ m kalınlığındaki beyin dokusu kesitleri Kongo kırmızısı ile boyanarak birikintiler belirgin hale getirilmiştir.¹⁵ Belirgin hale gelmiş olan ilgili bölgeler FTIR mikrospektroskopisi tekniği ile incelendiğinde, birikintilerden kaynaklanan protein bantları görülmüştür. Elde edilen spektral bulgular, gri maddede bulunan proteinlerin α -heliks ve/veya düzensiz yapıda olduğunu; amiloid birikintilerde, β -plakalı tabakalı yapısının baskın olduğunu ortaya koymuştur.¹⁵

Ateroskleroz

Günümüzde sıkça kullanılan medikal teşhis yöntemlerinden ultrason ve manyetik rezonans görüntüleme teknikleri ile aterosklerotik plakların lokasyonu, büyüklüğü ve şekli ile ilgili bilgi elde etmek mümkün iken bu plakaların yapısının kimyasal içeriği hakkında bilgi sahibi olmak olanaksızdır.¹⁶ Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu plakların stabilitesini ve hastalığın ilerlemesini etkileyen faktörlerin anatomik yapıdan çok mikroskopik morfolojisinin ve kimyasal içeriğinin olduğunu göstermiştir.⁴⁵ Aterosklerotik arterlerde farklı bileşenlerin dağılımı hakkında hem kimyasal hem de yerel bilgiye ihtiyaç vardır. Gerekli bu bilgileri FTIR mikrospektroskopisi tekniği kullanarak elde etmek mümkündür. Aterosklerotik plaklarda, protein matrikse gömülü halde bulunan kolesterol ester kümeleri vardır.¹⁶ Aterosklerozun gözle görülen erken belirtisi, kolesterol esterlerin birikmesi sonucunda görülen kalınlaşmadır.¹⁶ FTIR mikrospek-

troskopisi kullanılarak yapılan bir çalışmada, aterosklerotik tavşan aortundan alınan 10 μ m kalınlığındaki enine kesitler üzerindeki tunica medianın elastik lameli ve heterojen dağılım gösteren kolesterol ester kümeleri incelenmiştir.¹⁶ Aterosklerotik plağın hemen yakınından, uzağından ve plak bölgesinden spektral çekim yapılmıştır. Elde edilen spektrumlar incelendiğinde, aterosklerotik plağın hemen yakınından ve uzağından elde edilen spektrumların birbirine benzer özellikte sinyaller içerdiği, plak bölgesinden elde edilen spektrumda ise protein bantlarının yanı sıra kolesterol ester ile ilişkin yeni bantların ortaya çıktığı görülmüştür. En önemli değişikliklerin görüldüğü kolesterol ester ve amid II bantlarına göre kimyasal haritalar yapılarak, bu iki önemli maddenin dokudaki dağılımları incelenmiştir.¹⁸ Böylece aterosklerotik arterdeki kimyasalların içerikleri ve dağılımları hakkında detaylı bilgi sahibi olmak mümkün olmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda teknolojiye görülen hızlı gelişme ile birlikte FTIR mikrospektroskopisi tekniği tıp alanında kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik ile değişik dokulardan elde edilmiş olan spektrumlar, çok miktarda değerli bilgi içermektedir. Elde edilen bilgi miktarı, önümüzdeki yüzyılda patolojinin işleyişini etkileyecek düzeydedir. Kanseri dokuların biyokimyasal analizinde sıkça kullanılan bu teknoloji son yıllarda damarsal patolojide kullanımı ile de dikkat çekmektedir. Özellikle patolojik damar dokusunun kimyasal içeriğinde ve bu kimyasalların dokudaki dağılım profillerinde oluşan değişimlerin incelenmesinde başarı ile kullanılmaktadır.¹⁶ FTIR mikrospektroskopinin bilgisayara bağlı dijital bir teknik olması nedeni ile doku değerlendirme işlemleri otomatik olarak yapılabilmekte ve dokuya ait spektral veri tabanları oluşturulabilmektedir. FTIR mikrospektroskopisi tekniği, hızlı gelişen teknoloji ile paralel olarak önümüzdeki günlerde yeterli spektral veri tabanlarının oluşturulması ile tıpta yaygın olarak kullanılan ucuz ve önemli bir tanı yöntemi haline gelecektir.

Çoğunlukla dokulardan elde edilen mikrometre kalınlığında kesitler kullanılarak yapılan FTIR

mikrospektroskopi çalışmalarının canlı dokularda da yapılabilmesi konusunda bazı kısıtlayıcı faktörler bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi canlı dokuda bulunan sudur. Su, yaklaşık olarak 3410 cm^{-1} ve 1645 cm^{-1} 'de güçlü soğurma bandları vermektedir. Bu bandlar, lipidlerin C-H ve C=O gerilme modları ile proteinlerin amid bandları ile çakışarak bu önemli moleküllere ait bandların analizlerini zorlaştırmaktadır. Bu soruna bir çözüm olarak, incelenen dokuda bulunan sıvının spektrumu çekilmekte ve dokuya ait spektrumdan dijital ortamda çıkartılmaktadır. Böylece suya ait soğurma bandlarının, dokuya ait soğurma bandları üzerine olan olumsuz etkisi ortadan kaldırılmaktadır. Ayrıca kızılötesi bölgesinin yüksek sönüm katsayısı nedeni ile canlı dokunun in-situ analizi de bir problem ola-

rak karşımıza çıkmaktadır. Sadece yakın-IR bölgesinde radyasyonun dokudaki penetrasyon derinliği 1 mm 'yi geçebilmektedir.¹ FTIR mikrospektroskopi tekniğinin kemik ve diş gibi sert dokuların incelenmesinde de uygulaması sınırlıdır, çünkü sert dokulardan gereken incelikte kesit almak her zaman mümkün olmamaktadır. Bu gibi durumlarda bu probleme kısmi bir çözüm olarak sert dokulara demineralizasyon işlemi uygulanmaktadır.¹

Uygulamada karşılaşılan bazı kısıtlayıcı faktörlere rağmen FTIR mikrospektroskopi tekniği ile çok yakın bir gelecekte daha yüksek kalitede IR spektral haritaların elde edilmesi, yeni gelişmekte olan "hiperspektral analiz" gibi hesaplama yöntemleri ile daha üstün ayırıcı güce sahip grafiksel gösterimlerin gelişmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- Jackson M, Sowa MG, Mantsch HH. Infrared spectroscopy: a new frontier in medicine. *Biochem Chem* 1997;68:109-25.
- Blout ER, Mellors RC. Infrared spectra of tissues. *Science* 1949;110:137-8.
- Woernley DI. Infrared absorption curves for normal and neoplastic tissues and related biological substances. *Cancer Res* 1952;12:516-23.
- Elliott A, Ambrose EJ. Structure of synthetic polypeptides. *Nature* 1950;165:921-2.
- Tsuboi M, Shuto K, Higuchi S. Infrared spectrum of deoxyribonucleic acid. Effects of base composition and of N15-substitution. *Bull Chem Soc Jpn* 1968;41:1821-9.
- Mantsch HH, McElhaney RN. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem Phys Lipids* 1991;57:213-26.
- Fujjoka N, Morimoto Y, Arai T, Kikuchi M. Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cancer Detect Prev* 2004;28:32-6.
- Pehlivan F. Radyasyonun biyofiziği. *Biyofizik*. 2. Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Yayınevi; 1997. p.344-5.
- Toyran N, Lasch P, Naumann D, Turan B, Severcan F. Early alterations in myocardia and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study. *Biochem J* 2006;397:427-36.
- Toyran N, Turan B, Severcan F. Selenium alters the lipid content and protein profile of rat heart: an FTIR microspectroscopic study. *Arch Biochem Biophys* 2007;458:184-93.
- Phillips CL, Parr JM. Signals, systems, and transforms. *Fourier Transforms of Discrete Time Signals*. 2nd ed. New Jersey: Prentice Hall; 1999. p. 524-600.
- Argov S, Sahu RK, Bernshtain E, Salman A, Shohat G, Zelig U, et al. Inflammatory bowel diseases as an intermediate stage between normal and cancer: a FTIR-microspectroscopy approach. *Biopolymers* 2004;75:384-92.
- Sahu RK, Argov S, Bernshtain E, Salman A, Walfisch S, Goldstein J, et al. Detection of abnormal proliferation in histologically 'normal' colonic biopsies using FTIR-microspectroscopy. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:557-66.
- Huang RY, Miller LM, Carlson CS, Chance MR. In situ chemistry of osteoporosis revealed by synchrotron infrared microspectroscopy. *Bone* 2003;33:514-21.
- Choo LP, Wetzel DL, Halliday WC, Jackson M, LeVine SM, Mantsch HH. In situ characterization of beta-amyloid in Alzheimer's diseased tissue by synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biophys J* 1996;71:1672-9.
- Colley CS, Kazarian SG, Weinberg PD, Lever MJ. Spectroscopic imaging of arteries and atherosclerotic plaques. *Biopolymers* 2004;74:328-35.
- Severcan F, Toyran N, Kaptan N, Turan B. Fourier transform infrared study of the effect of diabetes on rat liver and heart tissues in the C---H region. *Talanta* 2000;53:55-9.
- Toyran N, Zorlu F, Severcan F. Effect of stereotactic radiosurgery on lipids and proteins of normal and hypoperfused rat brain homogenates: a Fourier transform infrared spectroscopy study. *Int J Radiat Biol* 2005;81:911-8.
- Toyran N, Zorlu F, Dönmez G, Oğe K, Severcan F. Chronic hypoperfusion alters the content and structure of proteins and lipids of rat brain homogenates: a Fourier transform infrared spectroscopy study. *Eur Biophys J* 2004;33:549-54.
- Toyran N, Severcan F. Interaction between vitamin D2 and magnesium in liposomes: Differential scanning calorimetry and FTIR spectroscopy studies. *J Mol Structure* 2007;839:19-27.
- Toyran N, Severcan F. Competitive effect of vitamin D2 and Ca²⁺ on phospholipid model membranes: an FTIR study. *Chem Phys Lipids* 2003;123:165-76.
- Toyran N, Severcan F. Infrared spectroscopic studies on the dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer interactions with calcium phosphate: Effect of vitamin D2. *Spectroscopy-An Int J* 2002;16:399-408.
- Kazancı N, Toyran N, Haris PI, Severcan F. Vitamin D2 at high and low concentrations exert opposing effects on molecular order and dynamics of dipalmitoyl phosphatidylcholine membranes. *Spectroscopy-An Int J* 2001;15:47-55.
- Toyran N, Severcan F. The effect of magnesium ions on vitamin D2-phospholipid model membrane interactions in the presence of different buffer media. *Talanta* 2000;53:23-7.

25. Winkler R, Wittmer A, Heusermann U. [Cancer and Crohn's disease]. *Z Gastroenterol* 2002; 40:569-76.
26. Judge TA, Lewis JD, Lichtenstein GR. Colonic dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2002;12:495-523.
27. Lipkin M. Proliferation and differentiation of normal and diseased gastrointestinal cells. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 2nd ed. New York: Raven Pres; 1987. p.255-84.
28. Burstein AH, Zika JM, Heiple KG, Klein L. Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. *J Bone Joint Surg Am* 1975;57:956-61.
29. Gemalmaz A, Dişçigil G, Söylemez A. [Osteoporosis screening in an urban district: frequency and related factors]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27:695-700.
30. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939-44.
31. Katzman R, Jackson JE. Alzheimer disease: basic and clinical advances. *J Am Geriatr Soc* 1991;39:516-25.
32. Mirra SS, Hart MN, Terry RD. Making the diagnosis of Alzheimer's disease. A primer for practicing pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:132-44.
33. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53:438-47.
34. Sisodia SS, Price DL. Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB J* 1995;9:366-70.
35. Maury CP. Molecular pathogenesis of beta-amyloidosis in Alzheimer's disease and other cerebral amyloidoses. *Lab Invest* 1995;72:4-16.
36. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 1989;245:417-20.
37. Barrow CJ, Zagorski MG. Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science* 1991;253:179-82.
38. Otvos L Jr, Szendrei GI, Lee VM, Mantsch HH. Human and rodent Alzheimer beta-amyloid peptides acquire distinct conformations in membrane-mimicking solvents. *Eur J Biochem* 1993;211:249-57.
39. Zagorski MG, Barrow CJ. NMR studies of amyloid beta-peptides: proton assignments, secondary structure, and mechanism of an alpha-helix----beta-sheet conversion for a homologous, 28-residue, N-terminal fragment. *Biochemistry* 1992;31:5621-31.
40. Fraser PE, Nguyen JT, Surewicz WK, Kirschner DA. pH-dependent structural transitions of Alzheimer amyloid peptides. *Biophys J* 1991;60:1190-201.
41. Fraser PE, Nguyen JT, Inouye H, Surewicz WK, Selkoe DJ, Podlisky MB, et al. Fibril formation by primate, rodent, and Dutch-hemorrhagic analogues of Alzheimer amyloid beta-protein. *Biochemistry* 1992;31:10716-23.
42. Fraser PE, Lévesque L, McLachlan DR. Biochemistry of Alzheimer's disease amyloid plaques. *Clin Biochem* 1993;26:339-49.
43. Inouye H, Fraser PE, Kirschner DA. Structure of beta-crystallite assemblies formed by Alzheimer beta-amyloid protein analogues: analysis by x-ray diffraction. *Biophys J* 1993;64:502-19.
44. Fabian H, Szendrei GI, Mantsch HH, Greenberg BD, Otvos L Jr. Synthetic post-translationally modified human A beta peptide exhibits a markedly increased tendency to form beta-pleated sheets in vitro. *Eur J Biochem* 1994;221:959-64.
45. Buschman HP, Motz JT, Deinum G, Römer TJ, Fitzmaurice M, Kramer JR, et al. Diagnosis of human coronary atherosclerosis by morphology-based Raman spectroscopy. *Cardiovasc Pathol* 2001;10:59-68.