

Karaciğer Kanser Hücrelerinin Büyüme, Çoğalma ve Morfolojileri Üzerine Farklı Kültür Yüzeylerinin Etkisi

The Effect of Different Cell Culture Surfaces on the Growth Proliferation Rate and Morphology of the Hepatocellular Carcinoma Cells

Hatice İsan¹, Önder Tombuş², Meltem Elif Göklü³, Kübra Tüfekçi³, Ranan Gülhan Aktaş⁵

¹Msc., Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi.

²Yrd. Doç. Dr. Önder Tombuş, Endüstri Mühendisliği, Maltepe Üniversitesi, İstanbul.

³Dönem III, Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İstanbul.

⁴Prof. Dr., Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, İstanbul.

İletişim: Hatice İsan, Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, Maltepe, İstanbul. E-posta: htcsn@gmail.com

ÖZET

Amaç: Hücrelerin farklı kültür yüzey koşullarında gelişim ve proliferasyon süreci değişkenlik göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla; hücre tipine özel en uygun kültür yüzeyleri saptanmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmada; in vitro kültür deneylerinde en sık kullanılan Schott cam, polistiren, pyrex borosilikat cam yüzeylerin karaciğer kanser hücrelerinin çoğalmaları ve morfolojileri üzerine etkilerinin karşılaştırmalı incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: İki farklı deney grubu oluşturuldu. Birinci grup için cam (otoklavize edilebilen, pyrex borosilikat) petri kapları sterilize edildi, sterilize edilmiş D263M Schott cam lameller yerleştirildi. İkinci deney grubu için ise, polistirenden yapılan steril kültür kapları kullanıldı. Birinci gruptakine benzer şekilde Schott cam lameller yerleştirildi. Hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş bir hastadan izole edilen altıncı pasaj HepG2 hücreleri ekildi. Hücrelerin günlük takipleri yapılarak PrimoVert Invert mikroskop ile farklı büyütmelerde canlı görüntüleri elde edildi. Çekilen fotoğraflar üzerinde hücrelerin bulunduğu alanların ölçümü yapılarak karşılaştırmalı değerlendirildi.

Bulgular: Morfolojik açıdan Pyrex borosilikat cam, D263M Schott cam ve polistiren yüzeylerde büyüyen hücreler arasında belirgin bir farklılık gözlemlenmedi. Ancak hücrelerin kapladığı alanlar ölçülerek karşılaştırıldığında; sırasıyla D263M Schott cam, polistiren ve pyrex borosilikat cam kültür yüzeyler üzerinde çoğalma oranının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış olduğu görüldü.

Sonuçlar: Hücreler, en çok D263M Schott cam üzerinde çoğalmayı tercih etmişlerdir. Hücre çoğalması en az pyrex-borosilikat cam yüzeyler üzerinde olmuştur. Sonuçlarımız; hücre kültür yüzeylerinin kimyasal özelliklerinin in vitro çalışmaların başarısını önemli şekilde etkileyebileceğini göstermektedir. Pyrex-borosilikat yüzeyde çoğalmadaki düşüklük; son yıllarda cam yüzeylerin hücre karakterine uygun kollojen, matrijel ve benzeri maddelerle kaplanması üzerine yapılan çalışmaların önemini ortaya çıkarmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer, adenokarsinoma, histopatoloji, electron mikroskopi.

ABSTRACT

Aim: Cell culture surfaces effects the features of the cells. There are recent studies investigating the most suitable culture surfaces for the certain cell types. This study aims to examine the morphological and proliferative effects of the most three common cell culture surfaces, Schott glass, polystyrene, pyrex borosilicate glass, on the liver cancer cells.

Materials And Methods: There were two experimental groups: For the first group; the sterilized D263M Schott glass coverslips were placed in pyrex borosilicate glass culture dishes. The second group contained polystyrene culture dishes which had sterilized D263M Schott glass coverslips like the first group. HepG2 cells, a hepatocellular carcinoma cell line, were cultured in those dishes. The images were daily captured under PrimoVert Invert phase contrast microscope. The areas containing cells were compared statistically.

Results: No significant difference were observed between the cells on these three different culture surfaces. The statistically significant difference between the proliferation rate of the experimental groups were clear.

Conclusions: Hepatocellular carcinoma cells prefers to adhere to the Schott glass, when it is compared with the other two surfaces. It is likely that pyrex-borosilicate glass surfaces effects the proliferation rate. The chemical features of the cell culture surfaces are crucial for the success of the experiments. Recent studies on the development of the most suitable cell culture environment for different cell types, like collagen application or matrigel usage, are extremely important for in vitro studies.

Keywords: HepG2, Pyrex-borosilicate, D263M Schott glass, polystyrene, cell culture.

GİRİŞ

Hücre kültürü çalışmalarının genetik hastalıklardan kansere kadar tıbbın çok farklı alanlarında tanı ve tedavi üzerine yapılan araştırmalardaki katkısı tartışılmazdır. Bu çalışmalarda, çok farklı kültür yüzeyleri kullanılmaktadır. Kültür kapları; hücrelerin büyüme, çoğalma, morfoloji ve yüzey adezyonu özelliklerini gözlemlenmede vazgeçilmez laboratuvar malzemeleri olmuştur. Kültür kapları ile yapılan in vitro araştırmaların klinik çalışmalarla olan uyumu hem biyofarmatik hem de biyomedikal anlamda çok önemlidir (1).

Farklı hücre tiplerinin farklı yüzeyler üzerinde gelişme ve çoğalma özelliklerinin değişebildiği gösterilmiştir. Son araştırmalar, hücre tiplerinin çoğalma ve farklılaşma özelliklerini uyuracak kültür yüzeyleri tasarımları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu kültür yüzeylerinin üç boyutlu olacak şekilde hücre büyümesine ve farklılaşmasına izin vermesinin başarılı kültür çalışmalarını daha da arttıracığı savunulmaktadır (2).

1907 yılında fare embriyolarından elde edilen sinir liflerinin cam yüzeyler üzerinde normal gelişimini gösterdiğinin kanıtlanması ile ilk hücre kültürü çalışmalarına başlanmıştır (3,4). Geçmişte hücre kültürü çalışmalarında başlıca cam yüzeyler kullanılmıştır. Fakat birçok hücre türünde, özellikle primer hücre kültürlerinde cam yüzeye tutunma oldukça zordur. Bu nedenle yeni hücre kültür kapları tasarımları üzerinde çalışılmıştır. Cam kültür yüzeyleri; yerini plastik materyallere, ardından da polistirene bırakmıştır (5,6,7,8).

Polistiren yüzeylerin hücre kültürü çalışmalarında ilk kullanımı 1960'lı yıllara dayanır. Optik netlik ve sterilizasyon açısından kolaylık sağladığı için en sık tercih edilen in vitro hücre kültür yüzeyi haline gelmiştir (9,10). Polistiren, benzen halkalarının karbona bağlı olduğu uzun bir karbon zincir polimerinden oluşmaktadır. Ancak medyum içerisinde hücre büyütme ve hücre kültür fonksiyonlarının korunmasında yetersiz kaldığına dair sonuçlar ortaya koyan çalışmalar da yayınlanmıştır (11,12).

Cam yüzeyler, polistiren, polydimethylsiloxane (PDMS) ve permanox gibi farklı kimyasallarla kaplı hücre yüzeylerinin hücre kültürlerinin başarısı üzerine yapılan kısıtlı sayıdaki araştırmalar; her bir yüzeyin avantajlarının yanısıra dezavantajlarının da olabileceğini ortaya koymaktadır (9,13,14,15).

Bu araştırmada; cam (pyrex borosilikate), plastik (polistiren), Schott cam olmak üzere üç farklı kültür ortamının karaciğer kanser hücrelerinin morfolojisi ve proliferasyonuna etkisi araştırılmış, sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırmalı değerlendirilmiştir.

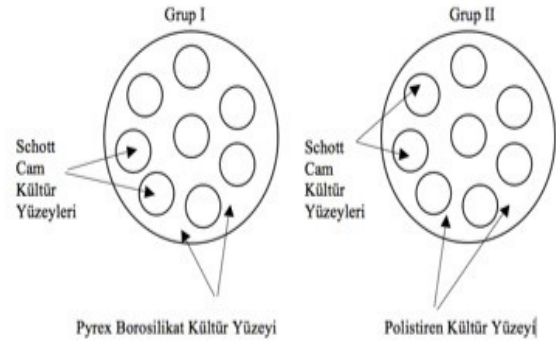
GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel Yöntem

Kültür Yüzeylerinin Hazırlanması:

Çalışma için iki farklı deney grubu oluşturuldu (Şekil 1). Birinci kültür ortamında; cam (otoklavize edilebilen, pyrex borosilikat) petri kapları sterilize edildikten sonra içerisine 11 mm. çapında sterilize edilmiş D263M Schott cam lameller

yerleştirildi. İkinci kültür ortamında ise, polistirenden yapılan steril kültür kapları (TPP, Sigma Aldrich) içerisine birinci gruptakine benzer şekilde 11 mm. çapında sterilize edilmiş D263M Schott cam lameller yerleştirildi. Bu kültür kaplarına hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş bir hastadan izole edilen altıncı pasaj HepG2 hücreleri (American Type Culture Collection, USA) her bir kültür kabına 300.000 hücre kültür ortamında homojen dağılacak şekilde ekildi.



Şekil 1. Deneyler için kültür kaplarının hazırlanması.

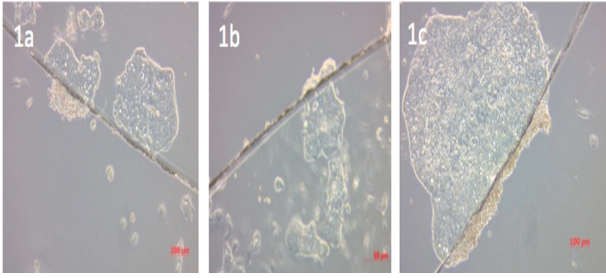
HepG2 Hücre Kültürü:

HepG2 hücrelerinin, 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Capricorn Scientific) ve 1% Streptomisin ve Penisilin (Multicell) içeren 89% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Pan Biotech) içerisinde kültürleri yapıldı. Hücreler 37 °C'de 5% CO₂ içeren inkübatörlerde (Panasonic, İstanbul) kültüre edildi. Tüm gruplara ait hücreler aynı saatte gün aşırı beslenerek bir hafta süre ile gözlemlendi.

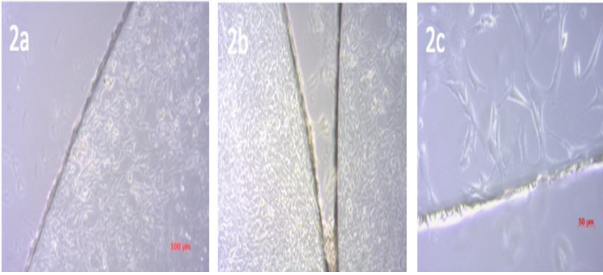
Morfolojik Analiz:

Morfolojik analizler için hem lameller hem de cam (Pyrex borosilikate) ya da polistirenden yapılmış yüzeyler üzerinde büyüyen hücrelerin PrimoVert Invert faz kontrast (Zeiss) mikroskobu ile farklı büyütme oranlarında canlı görüntüleri kaydedildi. Daha sonra, her bir gruptan gerek lamel üzerinde gerekse kültür kabı yüzeyinde büyüyen hücreleri bulduran alanlardan 100 kez büyütülmüş fotoğraflar çekildi. Pyrex borosilikat kültür kapları üzerindeki Schott cam lamellerde kültürü yapılmış karaciğer kanser hücrelerine ait deney grubundan 19, polistiren kültür kapları üzerindeki Schott cam lamellerde kültürü yapılmış karaciğer kanser hücrelerine ait deney grubundan ise 21 farklı alanda büyümüş hücrelerin görüntüleri elde edildi. Hücrelerin bulunduğu alanlar işaretlendi. Ardından Axiovision görüntü analiz programı kullanılarak bu alanlar ölçüldü. Çekilen fotoğraflarda; cam (pyrex borosilikat), plastik (polistiren), Schott cam yüzeyler üzerinde büyüyen hücrelerin çoğalma oranları ve morfolojileri karşılaştırmalı olarak değerlendirildi (Resim 1 a, b, c; 2

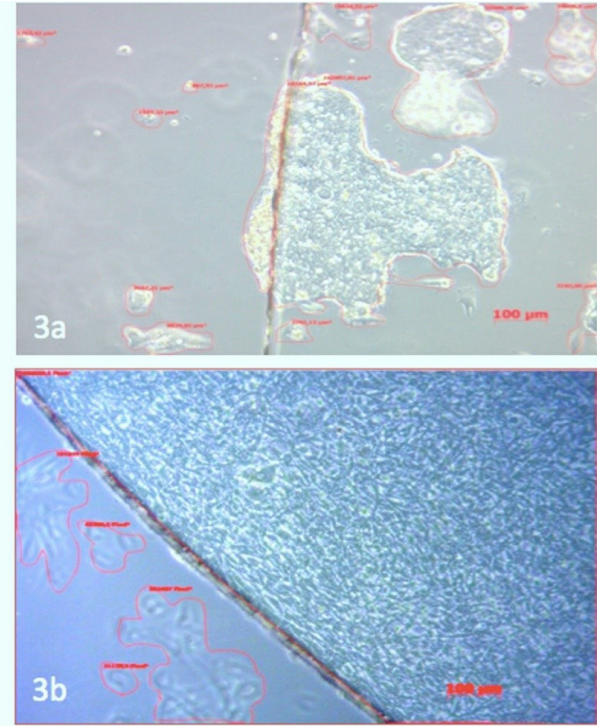
a, b, c; 3 a, b).



Resim 1 a, b, c . Schott cam ve polistiren yüzeyler üzerinde büyüyen HepG2 hücrelerinin faz kontrast mikroskopta çekilmiş görüntüleri.



Resim 2 a, b, c . Schott cam ve pyrex borosilikat yüzeyler üzerinde büyüyen HepG2 hücrelerinin faz kontrast mikroskopta çekilmiş görüntüleri.



Resim 3 a, b . Axiovision görüntü analiz programı ile hücrelerin kapladığı alanların işaretlenmesi ve ölçülmesi.

İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi için Excel veri çözümüleme aracı kullanıldı. Sonuçlar regresyon ve eşleştirilmiş iki grup arasında t-testi (farklı varyanslar varsayarak) yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı.

Ölçülen yüzey alanları ile hücrelerin kapladığı alanlar arasında regresyon olduğu varsayıldı. Basit regresyon analizi yöntemi kullanılacak şekilde aşağıdaki hipotez test edildi:

$$y = B_0 + B_1x + u$$

y=bağımlı değişken: hücrelerin kapladığı alan

x=bağımsız değişken: tüm yüzey alanı

B₀ =sabit terim: 0 kabul edildi.

B₁ = eğim katsayısı: Ölçümler sırasında hesaplandı.

u = hata terimi: bağımlı değişken y üzerinde etkili olan x'in dışındaki diğer faktörleri temsil eder.

Bu varsayımı desteklemek için aşağıdaki şekilde dört ayrı regresyon testi yapıldı:

1. Her bir fotoğraf için pyrex borosilikat yüzeyin toplam alanı bağımsız değişken, yüzey üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken,
2. Pyrex borosilikat yüzeydeki Schott cam lamelin alanı bağımsız değişken, lamel üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken,
3. Her bir fotoğraf için polistiren yüzeyin tüm alanı bağımsız değişken, yüzey üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken,
4. Polistiren yüzeydeki Schott cam lamelin alanı bağımsız değişken, Schott cam lamel üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken.

Basit regresyon analizi kullanılarak bulunan B₁ değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldükten sonra fotoğraflardaki Schott cam ile cam ya da polistiren alanlar için B₁ değerleri hesaplanarak ikili t-testi ile karşılaştırıldı. Her fotoğrafta ölçülen alanlar kendi içerisinde karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Morfolojik Bulgular:

Her üç deney grubunda da hücrelerin klasik HepG2 hücre karakteri olan kümecikler oluşturarak çoğalma özelliği dikkat çekti. Genel olarak poligonal olan hücrelerin hücre zarı, sitoplazmik karakteristikleri ve çekirdek yapıları arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi (Resim 1 a, b, c, 2; a, b, c).

Cam (pyrex-borosilikat) yüzey, polistiren ve Schott cam lamel yüzeyler üzerinde HepG2 hücrelerinin kapladıkları alanlar incelendiğinde ise yüzey farklılığına paralel şekilde çoğalma oranının etkilenmiş olduğu görüldü. Hücreler en fazla Schott cam lameller üzerinde çoğaldılar. En az çoğalma ise pyrex-borosilikat cam yüzeyinde görüldü. Polistiren yüzeyde çoğalma oranı ise bu iki grup arasındaydı.

İstatistiksel Bulgular:

Deney sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırmalı değerlendirildiği regresyon testleri analizleri aşağıdaki şekildedir:

1. Pyrex borosilikat yüzeyin toplam alanı bağımsız değişken, yüzey üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken olarak etkilediği regresyon analizi yapılmıştır (Tablo 1).
2. Pyrex borosilikat yüzeydeki Schott cam lamelin alanı bağımsız değişken, lamel üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken olarak etkilediği regresyon analizi yapılmıştır (Tablo 2)
3. Polistiren yüzeyin tüm alanı bağımsız değişken, yüzey üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken olarak etkilediği regresyon analizi yapılmıştır (Tablo 3).
4. Polistiren yüzeydeki Schott cam lamelin alanı bağımsız değişken, Schott cam lamel üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken olarak etkilediği regresyon analizi yapılmıştır (Tablo 4).

Tablo 1

| Regresyon İstatistikleri | | | | |
|--------------------------|-------------|---------------|---------------|--------|
| Çoklu R | R Kare | Ayarlı R Kare | Standart Hata | Gözlem |
| 0,645371439 | 0,416504294 | 0,360948739 | 12691,54827 | 19 |

ANOVA

| | Df | SS | MS | F | Anlam-lılık F |
|-----------|----|------------|----------|----------|--------------------|
| Regresyon | 1 | 2069586278 | 2,07E+09 | 12,84856 | 0,002284533 |
| Fark | 18 | 2899357154 | 1,61E+08 | | |
| Toplam | 19 | 4968943432 | | | |

| | Katsayılar | Standart hata | t stat | p değeri | Düşük %95 | Yüksek %95 |
|-----------|-------------|---------------|----------|----------|-------------|------------|
| B_0 | 0 | - | - | - | - | - |
| $B_{1,x}$ | 0,011158692 | 0,00311305 | 3,584488 | 0,002119 | 0,004618416 | 0,01769897 |

Tablo 1. Pyrex borosilikat yüzeyin toplam alanı bağımsız değişken, yüzey üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken olarak etkilediği regresyon analizi sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 2

| Regresyon İstatistikleri | | | | |
|--------------------------|----------|---------------|---------------|--------|
| Çoklu R | R Kare | Ayarlı R Kare | Standart Hata | Gözlem |
| 0,78031 | 0,608884 | 0,5533288 | 125597,6 | 19 |

ANOVA

| | Df | SS | MS | F | Anlam-lılık F |
|-----------|----|----------|----------|----------|-----------------|
| Regresyon | 1 | 4,42E+11 | 4,42E+11 | 28,02211 | 5,96E-05 |
| Fark | 18 | 2,84E+11 | 1,58E+10 | | |
| Toplam | 19 | 7,26E+11 | | | |

| | Katsayılar | Standart hata | t stat | p değeri | Düşük %95 | Yüksek %95 |
|-----------|------------|---------------|----------|----------|-----------|------------|
| B_0 | 0 | - | - | - | - | - |
| $B_{1,x}$ | 0,077139 | 0,014572 | 5,293592 | 4,94E-05 | 0,046524 | 0,01769897 |

Tablo 2. Pyrex borosilikat yüzeydeki Schott cam lamelin alanı bağımsız değişken, lamel üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken olarak etkilediği regresyon analizi sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 3

| Regresyon İstatistikleri | | | | |
|--------------------------|----------|---------------|---------------|--------|
| Çoklu R | R Kare | Ayarlı R Kare | Standart Hata | Gözlem |
| 0,798113 | 0,636985 | 0,5869855 | 20913,41 | 21 |

ANOVA

| | Df | SS | MS | F | Anlam-lılık F |
|-----------|----|----------|----------|----------|-----------------|
| Regresyon | 1 | 1,53E+10 | 1,53E+10 | 35,09411 | 1,06E-05 |
| Fark | 20 | 8,75E+09 | 4,37E+08 | | |
| Toplam | 21 | 2,41E+10 | | | |

| | Katsayılar | Standart hata | t stat | p değeri | Düşük %95 | Yüksek %95 |
|-----------|------------|---------------|----------|----------|-----------|------------|
| B_0 | 0 | - | - | - | - | - |
| $B_{1,x}$ | 0,072234 | 0,012193 | 5,924028 | 8,56E-06 | 0,046799 | 0,097669 |

Tablo 3. Polistiren yüzeyin tüm alanı bağımsız değişken, yüzey üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken olarak etkilediği regresyon analizi sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 4

| Regresyon İstatistikleri | | | | |
|--------------------------|-------------|---------------|---------------|--------|
| Çoklu R | R Kare | Ayarlı R Kare | Standart Hata | Gözlem |
| 0,748792686 | 0,748792686 | 0,748792686 | 88844,74727 | 21 |

ANOVA

| | Df | SS | MS | F | Anlam-lılık F |
|-----------|----|-------------|----------|----------|------------------|
| Regresyon | 1 | 2,01487E+11 | 2,01E+11 | 25,52599 | 7,074E-05 |
| Fark | 20 | 1,57868E+11 | 7,89E+09 | | |
| Toplam | 21 | 3,59354E+11 | | | |

| | Katsayılar | Standart hata | t stat | p değeri | Düşük %95 | Yüksek %95 |
|-----------|-------------|---------------|----------|----------|-----------|------------|
| B_0 | 0 | - | - | - | - | - |
| $B_{1,x}$ | 0,240771489 | 0,047655581 | 5,052325 | 6,09E-05 | 0,1413637 | 0,34017929 |

Tablo 4. Polistiren yüzeydeki Schott cam lamelin alanı bağımsız değişken, Schott cam lamel üstündeki hücrelerin alanı bağımlı değişken olarak etkilediği regresyon analizi sonuçlarını göstermektedir.

Regresyon analizlerinde çıkan sonuçlara göre polistiren, pyrex borosilikat ve Schott cam lamel üstünde gelişen hücre alanlarının toplam yüzey alanlarına oranları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve bu oran hücre proliferasyon oranı olarak adlandırılmıştır. Bundan yola çıkarak lamel üstündeki hücre gelişim oranı ile lamel dışındaki hücre gelişim oranı

arasındaki fark eşleştirilmiş iki grup arasında t-testi (farklı varyanslar varsayarak) yöntemi kullanılarak test edilmiştir.

Bu testin H₀ hipotezi ikisi arasında fark olmadığını, H₁ hipotezi ise lamel üstündeki alanların oranının lamel dışındaki alanların oranından büyük olduğu şeklinde tanımlanmıştır. Schott cam ve pyrex borosilikat cam üzerinde hücrelerin büyüme oranlarını karşılaştıran t- testi sonuçları Tablo-5'te, Schott cam ve polistiren üzerinde hücrelerin büyüme oranlarını karşılaştıran t-testi sonuçları Tablo-6'da özetlenmiştir.

Tablo 5

| t-test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek | | |
|--|-------------|-------------------------|
| | Lamel oranı | pyrex borosilikat oranı |
| Ortalama | 0,169201598 | 0,023482222 |
| Varyans | 0,008660679 | 0,000641531 |
| Gözlem | 19 | 19 |
| Öngörülen Ortalama Farkı | 0 | |
| Df | 21 | |
| t Stat | 6,585686184 | |
| P(T<=t) tek-uçlu | 8,01073E-07 | |
| t Kritik tek-uçlu | 1,720742903 | |
| P(T<=t) iki-uçlu | 1,60215E-06 | |
| t Kritik iki-uçlu | 2,079613845 | |

Tablo 5. Schott cam ve pyrex borosilikat üzerinde hücrelerin büyüme oranlarını karşılaştıran t-testi sonuçlarını özetlemektedir.

Tablo 5

| t-test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek | | |
|--|-------------|-------------------------|
| | Lamel oranı | pyrex borosilikat oranı |
| Ortalama | 0,2423406 | 0,079622698 |
| Varyans | 0,049963693 | 0,00396321 |
| Gözlem | 21 | 21 |
| Öngörülen Ortalama Farkı | 0 | |
| Df | 23 | |
| t Stat | 3,211014312 | |
| P(T<=t) tek-uçlu | 0,001937644 | |
| t Kritik tek-uçlu | 1,713871528 | |
| P(T<=t) iki-uçlu | 0,003875288 | |
| t Kritik iki-uçlu | 2,06865761 | |

Tablo 6. Schott cam ve polistiren üzerinde hücrelerin büyüme oranlarını karşılaştıran t testi sonuçlarını özetlemektedir. Bütün regresyon testlerinde pozitif korelasyon gözlemlendi. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görüldü ($p < 0.003$). Pyrex borosilikat yüzey ve Schott cam lamel üzerinde hücre proliferasyon düzeyini karşılaştırdığımız t-testi; farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdi

($p < 0.001$). Polistiren ve Schott cam lamel üzerinde hücre proliferasyon düzeyini karşılaştırdığımız t-testine göre H₁ hipotezinin reddi için p değeri 0.001'den küçük çıktı. İstatistiksel verilerin genel sonuçları; hücre proliferasyon hızının sırasıyla Schott cam lameller, polistiren ve pyrex-borosilikat cam kültür ortamlarında giderek azaldığını gösterdi.

TARTIŞMA:

Bu araştırmada; karaciğer kanserli bir hastadan izole edilmiş HepG2 hücrelerinin pyrex-borosilikat cam, Schott cam ve polistiren yüzeyler üzerinde büyüme ve çoğalma özelliklerinin karşılaştırmalı incelenmesi amaçlanmıştır. Farklı yüzeylerin hücre kültürlerinde bu tür etkileri üzerine yapılmış araştırmalar kısıtlıdır. Bu araştırmaların; çalışmamızla ilgili olanlarından elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmektedir:

Murray ve ark. 2015 yılında yaptıkları bir araştırmada; cam (pyrex borosilikat), polistiren, polimetilsiloksan (PDMS) ve permanox yüzeylerinin C2C12 myoblast hücreleri üzerine olan etkilerini proliferasyon ve farklılaşma özelliklerini incelemişlerdir. Çalışmalarında; 72. saatte en hızlı proliferasyonun polistiren yüzeyler üzerinde olduğunu bildirmişlerdir. Farklılaşma özelliklerine baktıklarında ise; polistiren ve ardından cam yüzeyler üzerinde farklılaşmanın daha fazla olduğunu gözlemişlerdir. Bu sonucun, polistiren ve cam yüzeylerin diğer yüzeylere oranla daha fazla hidrofilik karakter taşımalarına bağlı olduğu sonucuna varmışlardır(16).

Matheson ve ark. (2007) ise; polistiren, PDMS ve çeşitli yüzeylerin U937 hücrelerinin fonksiyonları üzerine etkilerini karşılaştırmıştır. Polistiren yüzeylerde büyüyen hücrelerin en yüksek monosit spesifik esterase (MSE), hidrolitik enzim (CE) ve intrasellüler esterase aktivitelerine sahip olduğunu göstermişlerdir. Tüm yüzeyler arasında intrasellüler asit fosfataz etkinlikleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışmalarının sonucunda; her iki kimyasalla kaplı yüzeylerin pek çok kültür çalışmasında kullanılmasına rağmen in vivo hücre yüzeyi gibi aktif ve hareketli bir yapıya sahip olmadıkları için gerçek anlamda hücrelerin doku içindeki davranışını göstermede uzak kalabileceklerini vurgulamışlardır (12).

Pyrex-borosilikat cam, Schott cam ve polistiren yüzeyler üzerinde büyüyen HepG2 hücrelerinin proliferasyonu ve gelişim süreci bir hafta boyunca her gün incelendiği bu araştırmada; HepG2 hücreleri en hızlı olarak Schott cam lamel kültür yüzeyinde daha sonra sırasıyla polistiren ve pyrex borosilikat cam yüzeylerde üremişlerdir. Çalışmanın sonuçları; karaciğer kanser hücrelerinin Schott cam lameller üzerindeki proliferasyonu, polistiren ($p < 0,05$) ve cam ($p < 0,05$) yüzeylere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu göstermiştir. Polistiren ve pyrex borosilikat cam yüzeyler karşılaştırıldığında ise; aralarında proliferasyon açısından anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Yukarıda bahsedilen ve farklı hücre tipleri ile yapılan araştırmaların sonuçları; bu çalışmada kullanılan yüzeylerden farklı olarak (PDMS, permanox) incelenmiş ve polistiren yüzeylerin daha üstün olduğu görüşü ortaya konulmuştur. Çalışmamızda da; polistiren yüzeylerde karaciğer kanser hücrelerinin sağlıklı şekilde büyüyüp çoğalabildikleri gözlemlenmiştir. Polistiren yüzeyler üzerindeki HepG2 hücreleri, cam pyrex-borosilikat yüzeylerdekine göre daha hızlı üremektedirler. Ancak Schott cam üzerinde polistiren yüzeye oranla çok daha hızlı üreme dikkati çekmiştir. Morfolojik olarak ise; bu üç grup arasında bir farklılık gözlemlenmemiştir. Tüm bu araştırmaların sonuçları; farklı kültür yüzeylerinin farklı hücre türlerinin davranışını etkileyebileceği ve bunun da deneysel araştırmaların sonuçlarını etkileyebileceğini göstermektedir.

SONUÇ

Çalışmamızın sonuçları kültür yüzeylerindeki farklılıkların karaciğer kanser hücrelerinin morfolojisini etkilemediğini göstermektedir. Diğer araştırmalarda gözlemlendiği gibi; karaciğer kanser hücrelerinin de polistiren yüzeyler üzerinde rahatça üreyebildikleri ve deneysel çalışmalarda bu yüzeylerin rahatlıkla kullanılabilmesi görülmüştür. Klasik cam yüzeylerle karşılaştırıldığında polistiren yüzeylerin kültür ortamı yaratmada çok daha başarılı olduğu saptanmıştır. Ancak, hücreler, en çok D263M Schott cam üzerine yapışarak çoğalmayı tercih etmişlerdir. Hücre çoğalması en az pyrex-borosilikat camlar üzerinde olmuştur. Schott cam üzerinde hücrelerin çoğalma hızının daha yüksek olması, farklı cam karakterlerindeki kültür yüzeylerinin hücrelerin karakteristik özelliklerini ve proliferasyon oranlarını anlamlı şekilde etkileyebileceğini düşündürmüştür.

Sonuçlarımız; hücre kültür yüzeylerinin kimyasal özelliklerinin in vitro çalışmaların başarısını önemli şekilde etkileyebileceğini göstermektedir. Klasik laboratuvar çalışmalarında kullanılan D263M Schott cam lameller rahatlıkla araştırmalar için sterilize edilerek kullanılabilir. Yüzeyin hücre çoğalması üzerine belirgin etkilerini gösteren bu çalışma; son yıllarda kültür yüzeylerin hücre karakterine uygun olarak kollajen, matrijel ve benzeri maddelerle kaplanması üzerine yapılan araştırmaların da önemini ortaya çıkarmaktadır.

TEŞEKKÜR

Projeyi destekleyen Sağlık ve Sosyal Yardım Vakfı'na ve sevgili öğrencimiz Nazlı Melis Misyacı'ya teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Santerre J.P, Woodhouse K, Laroche G, Labow R.S. Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials*. 2005; 26: 7457-7470.
2. Bokhari M, Carnachan RJ, Cameron NR, Przyborski SA. Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *J Anat*. 2007; 211(4):

567-76.

3. Harrison RG. On the Stereotropism of Embryonic Cells. *Science*. 1911; 34(870): 279-81.
4. Berthier E, Young EW, Beebe D. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. *Lab on a chip*. 2012; 12(7): 1224-37.
5. Amstein C.F, Hartman P.A. Adaption of Plastic Surfaces for Tissue Culture by Glow Discharge. *J. Clinical Microbiology*. 1975; 2: 46-54.
6. Curtis A.S.G, Forrester J.V, McInnes C, Lawrie F. Adhesion of Cells to Polystyrene Surfaces. *J. Cell Biology*. 1983; 97: 1500-1506.
7. Hudis, M. Plasma Treatment of Solid Materials. In: Holahan, J.R.; Bell, A.T.; Ed. *Techniques and Applications of Plasma Chemistry*. John Wiley and Sons, New York. 1974: 113-147.
8. Ramsey W.S, Hertl W, Nowlan E.D, Binkowski N.J. Surface Treatments and Cell Attachment. *In Vitro*, Vol. 1984; 20: 802-808.
9. Bonfield TL, Colton E, Anderson JM. Plasma protein adsorbed biomedical polymers: activation of human monocytes and induction of interleukin 1. *Journal of biomedical materials research*. 1989; 23(6): 535-48.
10. Yun JK, DeFife K, Colton E, Stack S, Azeez A, Cahalan L, et al. Human monocyte/macrophage adhesion and cytokine production on surface-modified poly(tetrafluoroethylene/hexafluoropropylene) polymers with and without protein preadsorption. *Journal of biomedical materials research*. 1995; 29(2): 257-68.
11. Reid LM, Rojkind M. New techniques for culturing differentiated cells: reconstituted basement membrane rafts. *Methods in enzymology*. 1979; 58:263-78.
12. Ryan J.A. Evolution of Cell Culture Surfaces. *BioFiles*. 2008; 3:8-21.
13. Matheson LA, McBane JE, Malowany JI, Santerre JP, Labow RS. Is cell culture stressful? Effects of degradable and nondegradable culture surfaces on U937 cell function. *BioTechniques*. 2007; 42(6): 744, 6-50.
14. McNally A.K, Anderson J.M. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am. J. Pathol*. 1995; 147: 1487-1499.
15. Reid L.M, Rojkind M. New Techniques for Culturing Differentiated Cells: Reconstituted Basement Membrane Rafts. In Jakoby, W. B.; Pastan, I. H.; Ed. *Cell Culture*. Volume 58 *Methods in Enzymology*, Chapter 21, Academic Press, New York. 1979; 263-278.
16. Murray LM, Nock V, Evans JJ, Alkai MM. The use of substrate materials and topography to modify growth patterns and rates of differentiation of muscle cells. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2016; 104(7): 1638-45.