

Karaciğer Kanser Hücre Kültürlerinde Pasaj Sayısının Sferoid Oluşumuna Etkisi

The Effects of Passage Number on Spheroid Formation of Liver Cancer Cells

¹Gizem Tatar, ²Esra Şengül, ³Hatice İsan, ³Ranan Gülhan Aktaş

¹Dönem II, Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul.

²İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul.

³Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul.

İletişim: Ranan Gülhan Aktaş, Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, Maltepe, İstanbul.

E-posta: ranagulhan@gmail.com

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada; hücrelerdeki pasaj sayısı artışı ile küresel yapılar yani "sferoid" oluşturma eğilimleri arasındaki ilişkinin incelenmesi, dolayısıyla karaciğer kanserinde pasaj sayısı artışı ile olası kanser kök hücre sayıları arasındaki ilişkinin irdelenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: İkinci, yedinci, sekizinci ve dokuzuncu pasaj HepG2 hücreleri; Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), Fetal Bovine Serum Dulbecco's (FBS) ve %1 streptomisin-penisilin karışımı içeren besiyerlerinde, 37 C ısıdaki ve %5 CO₂ içeren inkübatörlerde kültüre edildi. Tüm yüzeyi kapladıktan sonra 1., 2., 3. ve 4. haftalardaki canlı görüntüleri Zeiss Inverted Faz Kontrast Mikroskobu kullanılarak kaydedildi. Bu periyodların sonunda hücrelerin bir kısmı fikse edilerek Hematoxilin-Eozin ve Toluidin Mavisi ile boyandı. Farklı pasajlardan elde edilen görüntülerde sferoidlerin miktarı, sferoidler içerisindeki ve dışındaki hücrelerin morfolojik yapıları karşılaştırmalı olarak incelendi. Sferoidlerin çapları ve alanları ImageJ analiz programı kullanılarak ölçüldü.

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 borosilicate cam kültür yüzeyleri üzerinde çoğalma oranının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış olduğu görüldü.

Sonuçlar: Çalışmada; pasaj sayısı artışına bağlı olarak sferoid sayısında artış olduğu dikkati çekti. Sferoidlerin içerisindeki sınırlarındaki ya da sferoid dışındaki hücrelerin morfolojileri birbirlerinden farklıydı; ancak pasajlar arasında bir farklılık yoktu. Sferoid çaplarının birbirlerine oldukça yakın olduğu görüldü. Sferoidlerin içerisindeki hücre sayısının kültür süresi arttıkça azaldığı ve hücre içermeyen alanların arttığı gözlemlendi.

ABSTRACT

Aim: The aim of the study was to investigate the relationship between the increase in the number of passages in the cells and the tendencies to create spherical structures, or "spheroids", and therefore to investigate the relationship between the number of passages in liver cancer and possible cancer stem cell numbers.

Materials And Methods: Second, seventh, eighth and ninth passage HepG2 cells; were grown in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), Fetal Bovine Serum Dulbecco's (FBS), and 1% streptomycin-penicillin at 37° C and 5% CO₂ incubator. After confluency, live images at 1, 2, 3 and 4 weeks were recorded by using the Zeiss Inverted Phase Contrast Microscope. Some cells were fixed and stained with Hematoxylin-Eosin and Toluidine Blue. The morphological features of the spheroids were examined comparatively between different passages. Diameters and also the areas of the spheroids were measured by using the ImageJ analysis program.

Results: The number of spheroids increases as the number of passages gets higher. The morphology of the cells at different part of the spheroids differ. However, there is no significant difference between the cells from the different passages at morphological level. The spheroid diameters are similar at different passages. The number of the cells inside the spheroids decrease accordingly with the culture time.

Conclusions: The behavior of hepatocellular carcinoma cells in different passages after the long term culture and spheroid formation has been evaluated for the first time in this study. Increase in the formation of the spheroids might be due to increase at cancer stem cells.

Keywords: HepG2, hepatocellular carcinoma, cancer stem cell, spheroid

Sonuç: Çalışmamızda ilk kez farklı pasajlardaki hepatosellüler karsinoma hücrelerinin uzun süreli kültürlerdeki davranışı sferoid oluşturma özellikleri açısından karşılaştırmalı değerlendirilmiştir. Sferoid oluşumundaki artma; kanser kök hücreleri niteliğindeki hücre sayısında artış olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: HepG2, karaciğer kanseri, kanser kök hücresi, sferoid

GİRİŞ

Hücre kültürü çalışmalarında; bazı hücre türlerinin kültür yüzeyine yapışarak çoğalmayı tercih ettikleri, bazı türlerin ise ortamda süspansiyon oluşturdukları gözlenmektedir. Yine bazı hücre türleri; "sferoidler" yani küresel yapılar oluşturmayı tercih etmektedirler. Özellikle embriyonik kök hücreler ve kanser kök hücreleri bu şekilde davranırlar. Bu yüzden de; bu hücrelerin kültür ortamında tespiti için "sferoid oluşturma" tekniği kullanılmakta; küresel yapılar oluşturan hücrelerin kök hücre karakteri taşıdığı düşünülmektedir.

Son yıllarda kanser kök hücreleri ile ilgili çok önemli veriler elde edilmiştir. Farklı kanser türlerinde kanserin yayılmasında ve tedaviye direncinde primer sorumlunun bu hücreler olduğunu savunan araştırmalar artmaktadır. Kanser kök hücrelerini hedef alan tedavilerin kanser tedavisinde başarıyı arttıracığına dair güçlü kanıtlar elde edilmesi nedeniyle; bu hücrelerin tümöral yapılar içerisindeki varlığı ve davranışının belirlenmesi üzerine yoğun araştırmalar yürütülmektedir.

HepG2 hücreleri, iyi derecede farklılaşma göstermiş hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş bir hastadan izole edilmiştir. Plazma proteinlerinin büyük bir kısmını üretebilmesi, biyosentetik özelliklerinin normal hepatositlere benzerliği, hücre yüzey reseptörlerini koruyabilmesi, kullanılan proteinleri işleyebilmesi nedeniyle in vitro modellemelerde yaygın şekilde kullanılan bir hücre dizisi olmuştur. Kültür yüzeyine yapışarak üremeyi seven bir hücre tipi olan HepG2 hücreleri; kültür içerisinde kümecikler oluşturmayı tercih etmektedirler. Bu kümecikler tüm kültür yüzeyini kapladıktan sonra farklılaşmaya başlamakta; bazı hücreler küresel yapılar oluşturmakta, ancak bazı hücreler bu küresel yapılar dışında çoğalmayı tercih etmektedir. Hücrelerin tercihini neden bu şekilde olduğu, küresel yapılar oluşturan kanser hücrelerinin özelliklerinin ne olduğu henüz kesin olarak açıklanamamıştır.

Bu araştırmada; pasaj sayısı ile sferoid oluşumu arasındaki ilişkinin incelenmesi ve kanser kök hücrelerinin yoğun olduğu düşünülen sferoidlerin konumlanmasında pasaj sayısına bağlı değişimin gözlemlenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

Hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş bir hastadan izole edilen HepG2 hücreleri (ATCC) ; Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), Fetal Bovine Serum Dulbecco's (FBS), %1 antibiyotik (streptomisin ve penisilin) içeren besi yerlerinde kültüre edildi. 37° C'de ve %5 CO2 içeren inkübatörlerde

ikinci, yedinci, sekizinci ve dokuzuncu pasajdaki HepG2 hücreleri tüm yüzeyi kapladıktan sonraki 1., 2., 3. Ve 4. Haftalarda canlı görüntüleri incelenerek Zeiss Inverted Faz Kontrast Mikroskobu altında fotoğrafları çekildi.

Morfolojik Analiz

İkinci, yedinci, sekizinci ve dokuzuncu pasajlara ait dört deney grubu dahilindeki hücreler; kültür yüzeylerini kapladıktan sonraki birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftaların sonunda -20 C 'da 10 dak. aseton ile fikse edildi. Ardından, hematoksilin ve eozin ya da toluidin mavisi ile boyandı. Boyanmış örneklerin farklı büyütme oranlarında fotoğrafları çekildi. Farklı pasajlarda; aynı yüzeyler üzerinde oluşmuş sferoid sayısı saptandı. Sferoidlerin merkezindeki, sınırındaki ve sferoidler dışındaki hücrelerin morfolojik özellikleri karşılaştırıldı.

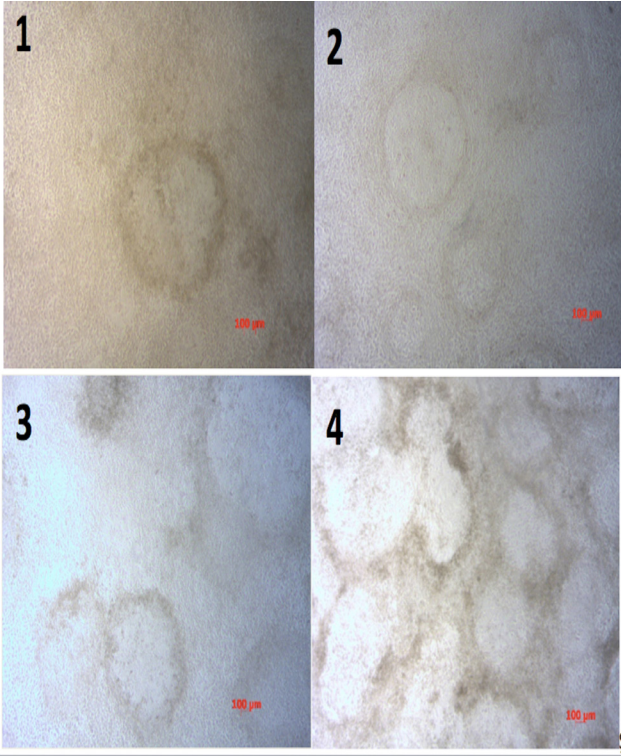
Görüntü Analizi

Çekilen fotoğraflarda görüntülenen sferoidlerin çapları ve alanları ImageJ (Image Processing and Analyzing in Java) görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü.

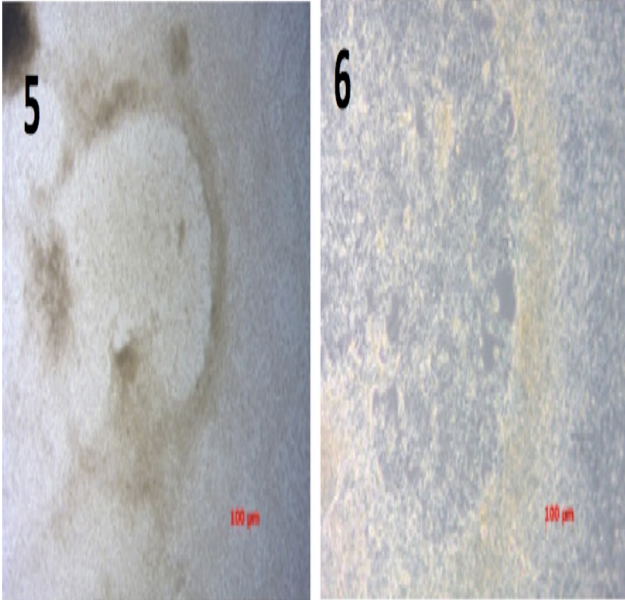
BULGULAR

Pasaj sayısı arttıkça sferoid sayısında artış olduğu dikkati çekiyordu. (Resim 1, 2, 3, 4) . Sferoidin içerisindeki, sınırındaki ve dışındaki hücrelerin morfolojileri arasında belirgin farklılıklar gözlemlendi (Resim 5, 6) Aynı pasajda kültür süresi uzadıkça sferoidleri çevreleyen hücrelerin çok daha kalın bir sınır oluşturdukları görüldü (Resim 5, 6). Sferoidlerin içerisindeki hücre sayısının kültür süresi arttıkça azaldığı ve sferoid içerisinde hücre içermeyen alanların arttığı gözlemlendi (Resim 5, 6, 7, 8). Aynı pasaja ait farklı haftalarda hematoksilin ve eozinle boyanmış preparatlarda ; gerek kültür süresi gerek pasaj sayısı arttığında daha belirgin gözlenen sferoidlerin morfolojik özelliklerinin birbirlerine oldukça benzer olduğu saptandı (Resim 9, 10). Sferoidlerin kültür süresi arttıkça çağlarının çok değişmemesine karşılık, içerdikleri hücre sayısının azaldığı ve sferoid merkezlerinde daha çok boş alanlar gözlemlendi dikkati çekiyordu (Resim 7,8,9,10). Toluidin mavisi ile boyanmış örneklerde de gerek pasajlar, gerek kültür süresi ile bağlantılı olarak sferoid oluşumu, gelişimi, sayısı arasında benzer ilişki gözlemlendi (Resim 11a, b, c).

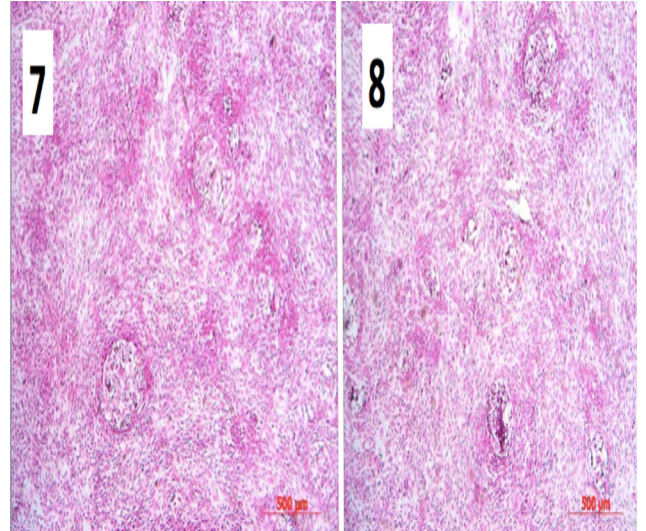
Elde edilen bu görüntüler Image J görüntü analiz programı kullanılarak analiz edildi. Sferoidlerin alanlarının pasaj sayısı ile ilişkisi (Şekil 1) başına düşen hücre sayısı, pasaj sayısı arttıkça sferoid sayısında nasıl bir değişim olduğu (Şekil 2) ve her bir sferoid başına düşen sferoid iç kısmında yer alan hücre sayısı ile pasaj sayısı arasındaki ilişki (Şekil 3) sayısal olarak ortaya konuldu.



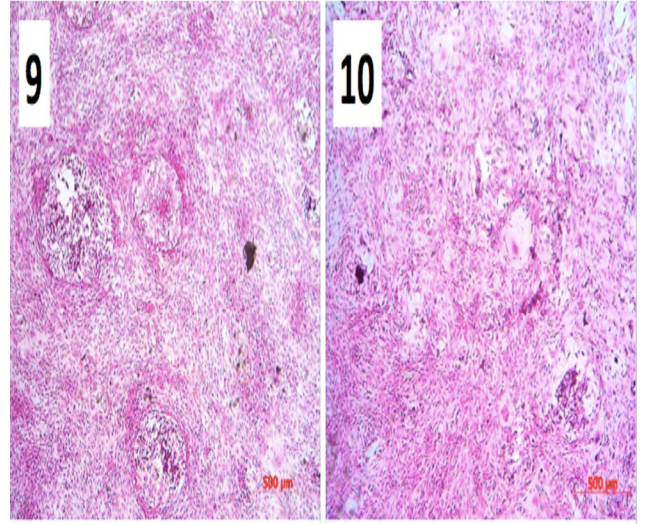
Resim 1, 2, 3 ve 4. Sırasıyla 2. 7. 8. ve 9. pasaja ait HepG2 hücrelerinin birinci hafta sonunda faz kontrast mikroskobu altındaki canlı görüntüleri. Pasaj sayısı arttıkça sferoid sayısında artış olduğu dikkati çekmektedir. 1., 2. ve 3. Resimlerde henüz sınırları tam belirlenmemiş , yeni oluşmaya başlamış sferoidler de görülmektedir. 9. Pasaja (Resim 4)ait hücrelerin oluşturduğu çok sayıda sferoid dikkati çekmektedir.



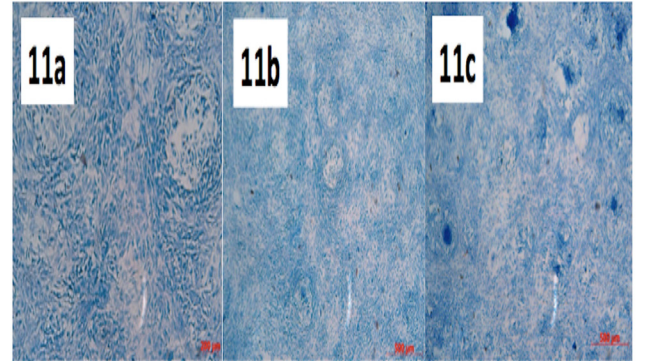
Resim 5, 6. Yedinci pasaja ait HepG2 hücrelerinin ikinci haftada (Resim 5) ve dördüncü haftada (Resim 6) kaydedilmiş canlı görüntülerinde iki ayrı sferoid gözlenmekte.



Resim 7, 8. Sekizinci pasaja ait HepG2 hücrelerinin birinci hafta (şekil 7) ve ikinci hafta (şekil 8) sonundaki görüntüleri.

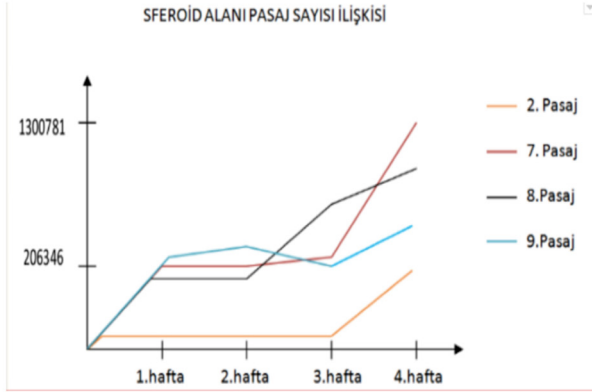


Resim 9, 10. 8. pasaja ait HepG2 hücrelerinin üçüncü hafta (Resim 9) ve dördüncü hafta (Resim 10) daki görüntüleri.

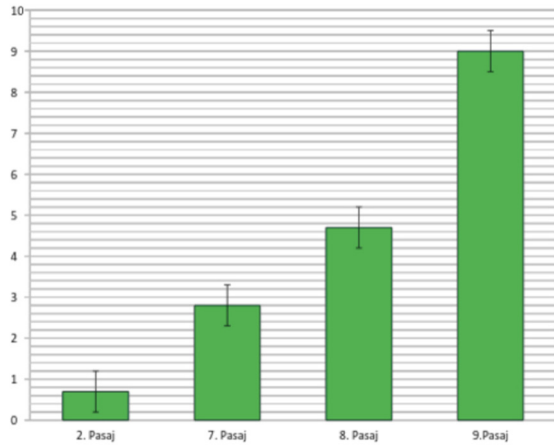


Resim 11 a, b, c. Toluidin mavisi ile boyanmış örneklerde 7. pasaj HepG2 hücrelerinin beşinci (Resim 11a), ikinci (Resim 11b) ve üçüncü haftalarda (Resim 11c) oluşturdukları sferoidler görülmektedir.

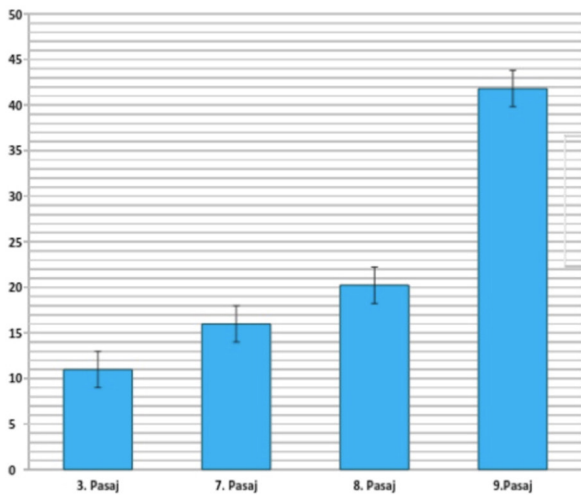
Aşağıdaki grafik de her bir sferoid başına düşen sferoid iç kısmında yer alan hücre sayısı ilişkisini göstermektedir.

ŞEKİL 1**ŞEKİL 2**

PASAJ SAYISI-SFEROİD SAYISI İLİŞKİSİ

**ŞEKİL 3**

PASAJ SAYISI-SFEROİD BAŞINA DÜŞEN HÜCRE SAYISI İLİŞKİSİ

**TARTIŞMA**

Gerek embriyonik kök hücrelerinin, gerekse kanser kök hücrelerinin "sferoid" olarak isimlendirilen küresel yapılar oluşturmaya eğilimli olduğu bildirilmiştir. Hatta bu bir teknik olarak kullanılmakta; hücre kültürlerinde uygun şekilde kültürleri yapılan hücreler arasında sferoid oluşturanların embriyonik kök hücreler olarak izole edilebileceği düşünülmektedir.

Sukach ve ark.; büyüme faktörleri ile takviye edilmiş serum içermeyen bir ortamda kültürlerini yapılmış kanser kök hücrelerinin kültür ortamında yüzen sferoidler oluşturduğunu göstermiştir (1). Sferoidlerin, çok yönlü şekilleri, kanser hücrelerinin varlığı ve tümör topluluğuna kıyasla kanser kök hücrelerinin in vitro genişlemesini teşvik etme kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur (2,3). Tek hücreli düzeyde kendini yenileme ve farklılaşma yeteneklerini değerlendirmeye izin verdiği için, sferoid oluşumu kanser hücreleri araştırmasında geniş bir popülerite kazanmıştır.

Lu Cao ve ark.(11) yaptıkları deneyde sferoid oluşturan hücrelerin kök hücre olabileceğini göstermişlerdir. Deneylerinde ayrı kültür ortamlarına HepG2, MHCC97H, PLC/PRF/5 hücreleri ekmişlerdir ve daha sonra hücreleri sadece oluşan sferoidlerden aldıkları hücrelerle 12 kereden fazla pasajlanmışlardır. Pasajlamaların sonucunda sferoidlerden alınan hücrelerin tek başına yeniden bir sferoid oluşturabildiği görülmüştür. Parental hücrelere göre pasaj sayısı arttıkça hem kendini yenileme de ve dayanıklılıkta artış olmuştur. Daha sonra parental hücreler ve sferoid oluşturan hücreler farklı dozlarda, farelere enjekte edilmiştir. HepG2 lar için deney sonucu dikkat çeker parental hücrelerde gözle görülür bir heterograft oluşumu görülmezken sferoid oluşturan hücreler aynı sürede heterograft tümör oluşturur.

Fumiko Karikusa ve Yoshio Sawasaki(12) ise 30 pasaja kadar seri şekilde pasajlanmış hepatositlerde pasaj sayısı artışına bağlı olarak kaybedilen özelliklerin sferoid oluşumuyla geri kazanıldığını göstermişlerdir. İlk 19 pasajda hücreler sferoid oluşumuna izin vermeyecek şekilde pasajlanmıştır. 20. pasajla beraber hücrelerin sferoid oluşturmaya izin verilmiştir. 20. pasaja kadar hücrelerde pasaj sayısı arttıkça hepatositlere özgü markerlarda kaybolma görülmüştür. 20. pasajla birlikte sferoid oluşturulan pasajlarda kaybolan metabolik özelliklerin daha genç sferoid oluşturmaya pasajlarla kıyaslanabilecek kadar geri kazanıldığı görülmüştür.

Çalışmamızda 2.7.8 ve 9. pasaja ait hücreler dört hafta süreyle incelendi ve yapılan morfolojik analizler ve image j görüntü analiz sisteminin verileri doğrultusunda; sferoid oluşumunun pasaj sayısı ile doğru orantılı olarak artmış olduğu görüldü. Bunun sonucunda da pasaj sayısı arttıkça; kök hücrelerin sferoid oluşturmaya eğilimli olduklarının bilinmesi nedeniyle kanser kök hücrelerinin de artmış olabileceği düşünüldü.

SONUÇLAR

Çalışmada; farklı pasajlardaki hepatositler karsinoma hücrelerinin uzun süreli kültürlerdeki davranışı; ilk kez sferoid oluşturma özellikleri açısından karşılaştırmalı olarak değer

lendirilmiştir. Pasaj sayısı ve kültür süreci ile doğru orantılı olarak sferoid sayısında artış olduğu gözlenmiştir. Önceki araştırmalarda kanser kök hücrelerinin sferoid oluşturma eğiliminin göstermesi nedeniyle; karaciğer kanseri hücreleri arasındaki bu özelleşmiş hücrelerin kanser kök hücreleri olabileceği düşünülmüştür.

Kanserli dokular içerisinde kanser kök hücrelerinin miktarı ve davranışı kanser türüne bağlı değişkenlik göstermektedir. Kanserli hücrelerle ilgili in vitro çalışmalarda sferoid oluşumu ve kanser kök hücre varlığı; kanser türüne, üzerinde çalışan hücre dizisine, kültür ortamının özelliklerine bağlı olarak değişebilir. Bir diğer deyişle; yapılacak araştırmalarla sferoid oluşumundaki artışın nedenlerinin tam olarak belirlenmesi gerekmektedir, çok farklı parametrelerden etkilenebilir. Bu tür araştırmalar; kanser kök hücrelerinin hangi tür kanserlerde, hangi ortamlarda ve hangi koşullarda sayılarının daha yüksek olabileceği konusunda önemli veriler ortaya çıkaracaktır.

Kaynaklar

1. Sukach A, Ivanov E. Formation of spherical colonies as a property of stem cells. *Cell and Tissue Biology*, 2007;1:476–481.
2. Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 2015; 17; 1–15.
3. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch, F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 8: 486–498.
4. Svendsen, C. N., et al. A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 1998;85;141–152.
5. Singh, S. K., et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004; 432; 396–401.
6. Farnie, G., et al. Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: role of notch and epidermal growth factor receptor signaling pathways. *Journal of the National Cancer Institute* 2007; 99; 616–627
7. Kakarala, M., et al. Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. *Breast Cancer Research and Treatment* 2010;122;777–785.
8. Vermeulen, L., et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105: 13427–13432.
9. Ricci-Vitiani, L., et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445; 111–115.
10. Lu Cao, Yanming Zhou, Beibei Zhai, et al. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterology* 2011, 11:71.
11. Karikusa F, Sawasaki Y. The Restoration Of The Functions Of Serially Passaged Calf Hepatocytes By Spheroid Formation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 1996,2:30-37.