

Tip I kollajenin hepasellular karsinoma hücre hattı (HepG2) proliferasyonuna etkisi

Effect of type I collagen on hepacellular carcinoma cell line (HepG2) proliferation

Damla Gökçeoğlu Kayalı¹, Zeynep Akbulut¹, Hatice Maraş¹, Reyhan Kahveci Ulugöl¹, Ranan Gülhan Aktaş¹

¹Maltepe Üniversitesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: DGK 0000-0003-0674-090X
ZA 0000-0002-7526-8496
HM 0000-0002-4451-6813
RKU 0000-0003-4756-9758
RGA 0000-0002-4474-7371

İletişim: Damla Gökçeoğlu Kayalı
Maltepe Üniversitesi, Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye
e-mail: damlakayali@maltepe.edu.tr

Gönderim Tarihi: 10 Aralık 2020, Kabul Tarihi: 24 Aralık 2020

ÖZET

Amaç: Hücre dışı matriksin en yaygın bileşenlerinden biri olan tip 1 kollajenin, Hepatosellüler Karsinoma (HSK) hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde morfoloji ve proliferasyonu üzerine etkilerini incelemek amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metodlar: Klasik kültür ve iki boyutlu tip I kollajen kaplı kültür kaplarında HepG2 hücreler 37°C ve %5CO₂ varlığında kültüre edildi. Hücreler 72. Saat sonunda %60-80 konfluent oldukları zaman inverted mikroskop altında morfolojik değişimleri görüntülendi ve proliferasyon hızları MTT yöntem ile incelendi.

Bulgular: Tip I kollajen varlığında kültüre edilen hücrelerde morfolojik olarak iğsi bir form gözlenirken, proliferasyon kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır.

Sonuç: Tip I kollajen HepG2 hücrelerin, morfolojik özelliklerini değiştirmenin yanında proliferasyon hızlarına da etki göstermektedir.

Anahtar kelimeler: ekstrasellüler matriks, HepG2, tip I kollajen

SUMMARY

Aim: The study aims to examine the effects of type I collagen, one of the most common components of the extracellular matrix on HepG2 cell line morphology and proliferation rate.

Material and Methods: Two-dimensional HepG2 cell cultures were maintained in both classical culture conditions and type I collagen-coated culture vessels at 37°C and 5% CO₂ culture conduction. A comparative examination of morphological changes and proliferation rate were performed after 72nd hours when the cells %60-80 confluent form.

Results: HepG2 cell morphologies changed to a spindle structure and their proliferation rates increase on type I collagen-coated surfaces compared to conventional culture cells (* : p<0,05)

Conclusion: Type I collagen affects the morphological characteristics and proliferation of HepG2 cells.

Keywords: extracellular matrix, HepG2 cell line, type I collagen

GİRİŞ

Hepatosellüler Karsinoma (HSK) karaciğerin en sık görülen primer malign tümörüdür. Dünya genelinde en çok görülen kanser türlerinden erkeklerde beşinci, kadınlarda yedinci sıradadır ve yarım milyondan fazla yeni vaka tespit edilmiştir (1). Hepatoma hücreleri hem karaciğer kanseri fenotiplerini hem de sağlıklı ve hastalıklı durumlarda hepatosit hücrelerin fenotipini anlamakta kullanılan en yaygın hücrelerdir. İnsan hepatoma hücre hatları arasında, HepG2 hücreler en iyi karakterize edilendir. Bu hücrelerin çok yönlü oluşu ve fonksiyonu, karaciğer fonksiyonu için bir model sistem olmasını oldukça kullanışlı kılmaktadır (2). Hücrelerin normal fonksiyonlarını gösterebilmeleri için mikroçevre bileşenlerinin gereken miktar ve düzende olması gerekmektedir. Bu nedenle hem normal doku, hem kanserli doku için mikroçevre oldukça önemlidir. Mikroçevrenin en önemli bileşenlerinden olan ekstrasellüler matris (ECM) ve bu bileşenler içerisinde yer alan kollajenin önemli bir etkisi bulunmaktadır. Hepatositler in vitro ortamda, Tip I kollajen ya da bazal membran proteinleri içeren esnek ECM türevli bileşenlerle kültürlendiğinde, kültür tabanı hücrelerin farklı şekillerini almasına izin verir ve karaciğere özgü genlerin ekspresyonu yüksektir. Aksine, hepatositler plastik yüzeylerde kültüre edildiğinde, ayrımsız, düzleştirilmiş bir şekil göstermektedirler ve karaciğere özgü genlerin ifadesinde ciddi azalma vardır (3,4).

Kollajen pek çok hücre tipinde etkilidir. Hücre farklılaşmasında da etki eder. Bu etkiler plastik yüzeylerde kültüre edilen hücrelerde de görülür ancak kollajen substrat üzerinde büyütülen hücrelerde daha hızlı meydana gelmektedir. (5).

Bu çalışmada HepG2 hücrelerinde, kültür ortamında yer alan tip I kollajenin klasik kültür ortamındaki hücrelere göre morfolojik özelliklerinde ve hücrelerin çoğalma (proliferasyon) hızları üzerinde nasıl bir etki gösterdiğini incelemek amaçlanmaktadır.

MATERYAL ve METODLAR

Hücre Kültürü Çalışmamızda ATCC (American Type Culture Collection, USA) firmasından temin edilen insan hepatosellüler karsinom hücre dizisi (HepG2) kullanılmıştır. Hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomycin) ilave edilmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Bioser) içerisinde kültüre edilmiştir. Öncül çalışmalarda yapıldığı gibi, canlı hücre morfolojilerini göstermek için 6 kuyucuklu steril kültür kapları kullanılarak; 4x10⁵ hücre/kuyucuk konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. Proliferasyon hızlarının gösterilmesi için ise 96 kuyucuklu steril kültür kaplarına 1x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekilmiştir. Her iki kültür

kaplarında kontrol grubu olarak; klasik kültür ortamında HepG2 hücreler, test grubunda ise HepG2 hücreler tip I kollajen (Corning) ile kaplanmış kültür kaplarına pasajlandılar. Kültüre edilen hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ varlığı inkübatörlerde kültüre edildiler. Hücreler %60-80 arasında konfluent gösterdikleri zamanda analiz edildi.

Morfolojik Analizler

HepG2 hücreleri hem klasik kültür ortamında hem de tip I kollajen kaplı kültür ortamında 6 kuyucuklu steril kültür kaplarında günlük olarak inverted mikroskop (Primovert, Zeiss) altında canlı olarak görüntülendiler. Hücreler kültür yüzeylerinin %60-80 oranında kapladıkları konfluent öncesi (çoğalma) dönemde mikroskop altında farklı büyütmelerde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

Hücre Proliferasyon Analizi

Hücreler 96 kuyucuklu plakalara 100µL 'de 9 × 10⁴ hücre/kuyucuk yoğunlukta hücre olacak şekilde ekildi. MTT solüsyonu 10 µL/kuyucuk eklenip ve 4 saat 37°C' de inkübe edildikten sonra, formazan kristallerini çözmek için, kristal çözücü solüsyon 100 µL/kuyucuk eklenerek 4 saat 37°C' de inkübe edildi Hücre metabolik aktivitesi belirlenmesi için, 'direkt temas test metodu' uygulanıp, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazilyum bromid içeren MTT maddesi ile (Cayman Chemical item no:10009365) hücre canlılık oranları tüm deney gruplarında %60-80 konfluent döneminde değerlendirildi. Örnekler, spektrofotometrik, mikropate okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülerek ortamdaki canlı hücre sayısı tespit edildi.

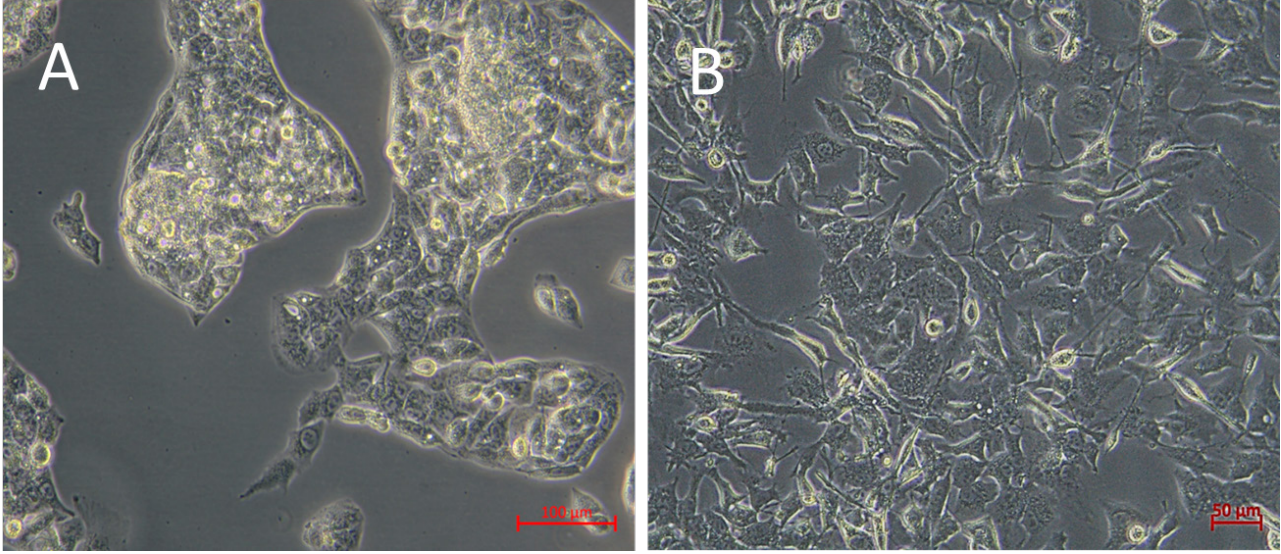
İstatistiksel Analiz

Proliferasyon analizinden alınan verilerin değerlendirmesi Graph-Pad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analizler için çift yönlü ANOVA ve Tukey/Bonferroni post Hoc testleri ile student t testi kullanılmıştır.

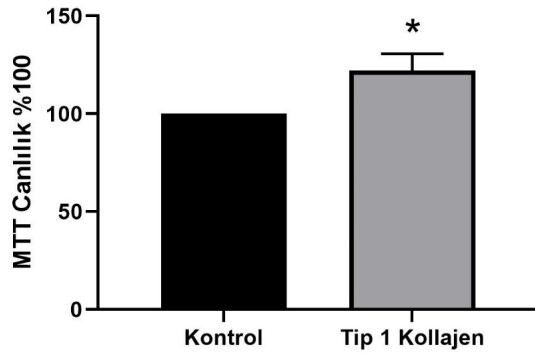
BULGULAR

Normal kültür şartlarında (37°C, %5CO₂) ve tip I kollajen bulunmayan kontrol grubu HepG2 hücreler normal hücre morfolojisi (poligonal) gösterirken, tip I kollajen bulunan kültür kaplarında kültüre edilen test grubu HepG2 hücrelerde kollajen varlığına bağlı olarak iğsi formlar görülmüş, hücreler arası yakınlaşma ve etkileşim kontrol grubuna göre morfolojik olarak daha fazla görünür duruma gelmiştir (Figür 1).

Hücre proliferasyon analizi sonucuna göre; tip I kollajen varlığında HepG2 hücreleri klasik kültüre edilmiş hücrelere kıyasla proliferasyonu anlamlı bir artış göstermiştir (p<0,05). (Figür 2)



Figür 1. HepG2 hücrelerinin faz kontrast mikroskopta çekilmiş görüntüleri. A, Klasik kültür ortamı, B Tip 1 Kollajen bulunan kültür ortamı.



TARTIŞMA

Tümör mikroçevresi, çözümlü proteinler, ekstrasellüler matris (ECM) ile birlikte farklı hücre tiplerinden meydana gelmektedir. Tümör ile ilişkili ekstrasellüler matris; bileşimi, artmış kollajen çapraz bağlantıları, yapısal değişiklikler gibi özelliklerinden dolayı fiziksel ve biyokimyasal özellikleri normal doku stromasından farklıdır (8).

Hücreler, farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi süreçleri belirleyen ECM ile çevrilidir (5). Mikroçevre normal dokuda olduğu gibi kanserli doku için de çok önemlidir. Ekstrasellüler matris içeriği veya yapısındaki değişimler tümör gelişimi, angiogenez ve metastatik süreci tetikler yöndedir (9). In vivo ortamda ekstrasellüler matrisin baskın bileşiminden biri olan kollajen, aynı şekilde in vitro ortamda da ekstrasellüler matrisi taklit etmesi yönünden çalışmalarda kullanılmaktadır. Tip I

kollajen ise, karaciğer ekstrasellüler matris bileşenleri arasında oldukça önemlidir (10).

Erhmann ve Gey 1956 yılında ilk kez cam ve kollajen üzerindeki proliferasyonu karşılaştırmışlar ve kollajen jelin hücre üzerindeki etkisinin daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Kollajenin hücre morfolojisini, migrasyon, adezyon ve farklılaşması üzerinde etkisi olduğunu gösteren çalışmalar yapılmış, spesifik glikoproteinlerin hücreleri stratuma veya kollajen matrisine bağladığını ileri sürmüşlerdir (11).

Hücrelerin normal olarak hayatta kalmaları ve bölünmeleri için kültür ortamında bir substrata bağlanması gerektiği iyi bilinmektedir. Uygun koşullar altında matrise tutunmada kollajen protein tanımlanmıştır. Kollajen matrisler hücre kültüründe büyümeyi değiştirir ve hücreyi dönüştürmeyi sağlar. Hepatositler, korneal endotelial hücreler, meme epitel hücreleri ve epidermal hücreler gibi hücreler, plastikten daha uzun bir süre kollajenöz substrat üzerinde yaşayabilir bir durumda kalırlar (5).

Bu çalışmada ; tip I kollajenin HepG2 hücrelerinde proliferasyon oranının, plastik yüzeylerde kültüre edilen hücrelere oranla daha yüksek bulunmasının, kanser hücre mikroçevresinde kollajenin hücre büyümesini desteklediği yöndeki çalışmalarla uyum göstermektedir. Godoy ve ark. kollajen monolayer ve sandviç tiplerini kullandıkları araştırmada, hepatosit hücrelerde her iki tip kollajen kültür ortamının apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (12).

KAYNAKLAR

1. Mittal S, and El-Serag BH. Epidemiology of HCC: Consider the Population. *J Clin Gastroenterol* 2013;47(0):2-6.
2. Burley MR and Roth CM. Effects of Retinoik Acid on Proliferation and Differentiation of HepG2 Cells. *The Open Biotechnology Journal* 2017;1: 47-51.
3. Moghe PV, Berthiaume F, Ezzell RM, Toner M, Tompkins RG, Yarmush ML. Culture Matrix Configuration and Composition in the Maintenance of Hepatocyte Polarity and Function. *Biomaterials* 1996; 17: 3.
4. Dipersio M, Jakson DA, ZaretK S. The Extracellular Matrix Coordinately Modulates Liver Transcription Factors and Hepatocyte Morphology. *Molecular and Cellular Biology* 1991; 4405-4414.
5. Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR. Role of Collagenous Matrices in the Adhesion and Growth of Cells. *J Cell Bio* 1988; 88:473-485.
6. Zhou M, Zhang Q, Zhao J, Liao M, Wen S and Yang M. Phosphorylation of Bcl-2 plays an important role in glycochenodeoxycholate-induced survival and chemoresistance in HCC. *Oncology Reports* 2017;38:1742-50.
7. Deniz G ve Yanikkaya Demirel G. *Akan Hücre Ölçer*. 1. Baskı. Yelken Matbaacılık: İstanbul; 2014.
8. Rieder CL, Cole RW. Cold-shock and the Mammalian cell cycle. *Cell cycle* 2002;1(3): 169-75.
9. Roobol A, Carden MJ, Newsam RJ, Smales MJ. Biochemical insights into the mechanisms central to the response of mammalian cells to cold stres and subsequent rewarming. *FEBS J* 2009;276(1):286-30
10. Sapudom J and Pompe T. Biomimetic tumor microenvironments based on collagen matrices. *Biomater Sci* 2018;6:2009-24.
11. Ehrmann RL and Gey GO. The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. *J Natl Cancer Inst* 1956; 16(6): 1375-403.
12. Godoy P, Hengstler JG, Ilkavets I, Meyer C, Bachmann A, Muller A et al. Extracellular Matrix Modulates Sensitivity of Hepatocytes to Fibroblastoid Dedifferentiation and Transforming Growth Factor β -Induced Apoptosis. *Hepatology* 2009; 49: 2031-43.