

ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
CBU-SBED, 2025, 12 (2):256-260

Farklı Doku İskeleleri ve Hücre Hatları Kullanarak 3D Kanser İnvazyon Mekanizmasının İncelenmesi

Investigation of 3D Cancer Invasion Mechanisms Using Different Tissue Scaffolds and Cell Lines

Remziye Kendirci-Katirci¹, Ertan Katirci², Aylin Sendemir Urkmez³, Esin Hames³, H. Seda

Vatansever^{4,5*1} Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,

Antalya, Türkiye

² Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kırşehir, Türkiye

³Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye

⁴Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

⁵Yakın Doğu Üniversitesi, DESAM Araştırma Enstitüsü, Mersin 10, Türkiye

e-mail: adakendirci@gmail.com, ertankatirci07@gmail.com, aylin.sendemir@ege.edu.tr, esin.hames@ege.edu.tr, sedavatansever@yahoo.com

ORCID: 0000-0002-3781-9162

ORCID: 0000-0002-6839-8823

ORCID: 0000-0003-1818-6651

ORCID: 0000-0001-7302-4781

ORCID: 0000-0002-7415-9618

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: H. Seda Vatansever

Gönderim Tarihi / Received:21.10.2024

Kabul Tarihi / Accepted:25.11.2024

DOI: 10.34087/cbusbed.1566095

Öz

Amaç: İnvazyon, embriyonun uterus epiteline implantasyonu gibi normal gelişim sürecinde olabildiği gibi kanser hücrelerinin yayılması gibi patolojik olaylarda da görülmektedir. Kanser hücrelerinin invazyon mekanizmalarını anlayabilmek için, hücreleri *in vivo* ortamlarına yakın bir ortamda araştırmak gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı, kanser hücrelerinin invazyon araştırmalarında kullanılabilecek *in vivo* ortamı taklit eden yeni bir *in vitro* kültür ortamının geliştirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: İnsan metastatik meme adenokarsinom (M4A4) ve insan primer kolon karsinoma (HCT-116) hücre dizileri kültüre edilmiştir. İki farklı biyoyumlu doku iskelesi amacıyla bakteriyel selüloz ve kollajen köpük kullanılmıştır. Hücreler doku iskelelerine ekildikten sonra 3D kanser invazyon kültür modelleri oluşturulmuştur. Hücre morfolojisi değerlendirilmiş, Hematoksilen-Eozin boyasıyla histolojik incelemeler yapılmıştır.

Bulgular: M4A4 hücreleri, bakteriyel selüloz iskelelerinde fibroblastik morfolojiyi korurken, kollajen köpük iskelelerinde kümelenip çoğalmıştır. HCT-116 hücreleri ise bakteriyel selüloz iskelelerinde yoğun kümelenme ve çoğalma, kollajen köpük iskelelerinde ise fibroblastik morfoloji sergilemiştir. Histolojik incelemeler, HCT-116 hücrelerinin bakteriyel selüloz iskelelerinde, M4A4 hücrelerinin ise kollajen köpük iskelelerinde daha yüksek invazyon ve koloni oluşumu gösterdiğini ortaya koymuştur.

Sonuç: Çalışmanın bulguları, iskele seçiminin kanser araştırmalarında hücre davranışı ve çoğalması üzerindeki önemli etkisini vurgulamaktadır. Histolojik sonuçlar, bakteriyel selüloz ve kollajen köpük iskelelerinin farklı kanser hücre hatlarıyla etkileşimlerini ve invaziv davranışlarını etkilediğini göstermektedir. Bu bilgiler, kanser

hücreleri etkileşimlerinin ve davranışlarının karmaşıklığını anlamak ve incelemek için özel iskele seçimine duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır.

Anahtar kelimeler: 3D kültür sistemleri, bakteriyel selüloz, kollajen köpük, M4A4 hücreleri, HCT-116 hücreleri

Abstract

Aim: Invasion can occur in normal developmental processes such as implantation of the embryo into the uterine epithelium, but also in pathological events such as the spread of cancer cells. In order to understand the mechanisms of invasion of cancer cells, it is necessary to investigate the cells in an environment close to their *in vivo* environment. The aim of this study is to develop a new *in vitro* culture medium that mimics the *in vivo* environment that can be used in cancer cell invasion studies.

Method: Human metastatic breast adenocarcinoma (M4A4) and human primary colon carcinoma (HCT-116) cell lines were cultured. Bacterial cellulose and collagen foam were used to produce two different biocompatible tissue scaffolds. Cells were seeded onto these scaffolds and 3D cancer invasion culture models were created. Cell morphology was evaluated and histological examinations were performed with Hematoxylin-Eosin stain.

Results: M4A4 cells retained fibroblastic morphology in bacterial cellulose scaffolds, but clustered and proliferated in collagen foam scaffolds. HCT-116 cells exhibited dense clustering and proliferation in bacterial cellulose scaffolds and fibroblastic morphology in collagen foam scaffolds. Histological examinations revealed that HCT-116 cells showed higher invasion and colony formation in bacterial cellulose scaffolds and M4A4 cells showed higher invasion and colony formation in collagen foam scaffolds.

Conclusion: The findings of the study highlight the important impact of scaffold selection on cell behaviour and proliferation in cancer research. Histological results show that bacterial cellulose and collagen foam scaffolds affect interactions with different cancer cell lines and their invasive behaviour. This information highlights the need for specific scaffold selection to understand and study the complexity of cancer cell interactions and behaviours.

Keywords: 3D culture systems, bacterial cellulose, collagen foam, M4A4 cells, HCT-116 cells

1. Giriş

İnvazyon, embriyonik süreçte embriyonun uterus epitelinden implantasyonu sırasında normal gelişimsel süreçte görülebildiği gibi, kanser hücrelerinin epitelyal veya bağ dokusu içerisine yayılması gibi patolojik olaylarda da görülebilmektedir. İster embriyonun endometriyumdan implantasyonu sırasındaki normal gelişim sürecinde, ister kanser hücrelerinin epitel veya bağ dokusuna yayıldığı patolojik olaylarda olsun, invazyon sürecinde, epitel ve bağ dokusu hücreleri ile birlikte çevreden salınan çeşitli faktörler invazyon sürecini kontrol eder. Ancak, hem normal hem de patolojik koşullarda bu süreci düzenleyen mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır (1). Kanser hücrelerinin invazyonunu araştırmak için, *in vivo* ortamı taklit eden bir *in vitro* ortam geliştirilmesi çok önemlidir. Üç boyutlu (3D) kültür sistemleri, hücrelerin çevreleriyle ve diğer hücrelerle canlı dokuya daha benzer şekilde etkileşime girmesine izin verdiği için 2D sistemlere kıyasla fizyolojik olarak uygun bir ortam sağlar (2).

Bu çalışmada, *in vitro* ortamda invazyon modelinin çalışılmasına olanak sağlayacak, *in vivo* ya benzer yeni bir kültür ortamının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bakteriyel selüloz (BS) ve kollajen köpük (KK) doku iskelelerine, primer ve metastatik kanser hücre hatlarının ekilmesiyle 3D

kültür modeli kurulması ve kanser invazyon modelinde kullanılabilecek yeni bir *in vitro* ortamın geliştirilmesi hedeflenmiştir. Hücre proliferasyonunu destekleyen ve durağan fazdaki hücrelerin büyümesini teşvik eden *Gluconacetobacter xylinus* suşundan elde edilen biyoyumlu doku iskelesi BC ile içerdiği çapraz bağlar ve gözenekli yapısı sayesinde hücrelerin özgün polarite özelliği sergilemesine yardımcı olan biyoyumlu, kollajen tip I içeren doku iskelesi 3D kültür modeli için kullanılmıştır. Bu doku iskelelerine insan metastatik meme adenokarsinom hücre dizisi (M4A4) ve insan primer kolon karsinoma hücre dizisi (HCT-116) ekilerek 3D kanser hücre invazyon modeli kurulmuştur. Her iki hücre hattı metastatik özelliklerinden dolayı çalışmada kullanılması tercih edilmiştir.

2. Yöntem

2.1. Hücre Kültürü

İnsan metastatik meme adenokarsinom (M4A4, CRL-2914) ve insan primer kolon karsinoma (HCT-116, CCL-247) hücre dizileri ticari olarak ATCC'den satın alınmış ve %10 FBS (Capricorn Scientific, FB_100H/100), %1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B) ve %1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLNB) ile desteklenmiş DMEM:F12 (Biosera, LM_D12221500) kültür ortamında kültür

edilmiştir. Tüm kültür koşulları inkübatörde (ESCO, CCL-170B-8) %5 CO₂ ile 37°C'de standardize edilmiştir. Ortam her iki günde bir değiştirilmiş ve hücreler ters mikroskop (Olympus, IX71) altında gözlemlenmiştir.

2.2. Doku İskelelerinin Üretimi

İki farklı biyoyumlu doku iskelesi Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı ve Mikrobiyoloji Laboratuvarında üretilmiştir.

Bakteriyel selüloz üretmek için Glucanoacetobacter xylinus suşu (ATCC 700178) kullanılmıştır. G. xylinus suşu, üretim öncesinde steril Hestrin&Schramm (HS) sıvı ortamında 30 °C'de ve 150 rpm çalkalama hızında 1-2 gün boyunca aktive edilmiştir. HS besiyeri distile su, % 2 glukoz (MERCK 108347), % 0,5 maya ekstraktı (MERCK 103753), % 0,5 bakteriyolojik pepton (MERCK 107214), % 0,115 sitrik asit (MERCK 100244) ve % 0,27 Na₂HPO₄ (MERCK 106580) içermektedir. Aktivasyonun ardından peletler, %3 oranında parçalanmış %5 agar solüsyonu (Oxoid LP0011) içeren HS sıvı besiyerine (1:1) enjekte edilmiş ve 5 gün boyunca hareket etmeden inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından oluşan BC distile suda durulanmış, 0,1 M NaOH (MERCK 106462) ile saflaştırılmış ve 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır.

Kollajen köpük doku iskelesi liyofilizasyon işlemi kullanılarak oluşturulmuştur. Hücre kültürü plakaları (6-12 veya 24 kuyu) kollajen tip 1 (Santa Cruz Biotechnology, sc136157) %5 asetik asit çözeltisi ile muamele edilmiştir. Dondurulmuş çözelti, KK doku iskeleleri üretmek için 8 saat boyunca liyofilize edilmiştir. İskeleler ihtiyaç duyulana kadar bir desikatörde saklanmıştır. Kullanmadan önce numune %70 etanol solüsyonu (Sigma, 32221) kullanılarak sterilize edilmiştir.

2.3. 3D kültür modelinin oluşturulması

BS ve KK doku iskeleleri hücre ekiminden 1 gün önce 24 kuyucuklu kültür kaplarına alınmış ve 1 gece boyunca hücresiz 500 µl kültür ortamı ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda 5x10⁶ h/ml M4A4 ve HCT-116 hücreleri doku iskeleleri üzerine ekilerek ve 3D kültür modeli oluşturulmuştur. Hücreler kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde gözlemlenmiş ve kültür süresinin sonunda %4 paraformaldehit (Merck, TP704404) ile tespit edildikten sonra +4 C°'de 30 dk tutulmuştur. Daha sonra örnekler fosfat tamponu (PBS) ile 3 defa yıkandıktan sonra ileri frozen kesit için gömme aşamasına geçilmiştir. Deneyler üç bağımsız biyolojik örnekte (n=3) bağımsız olarak üç kez tekrarlanmıştır.

2.4. Frozen Kesitlerin Alınması

Hücre içeren BS ve KK iskeleleri OCT (Jung, 020108926) frozen gömme solüsyonu ile -20 C°'de 5-10 dakika tutularak hazırlanmıştır. Frozen bloklardan 7 µm'lik kesitler kriyostat (Leica, CM1100) ile alınmıştır.

Hematoksilen & Eozin Boyaması

Frozen kesitler distile su ile 1-2 dakika yıkandıktan sonra, hematoksin (1051752500, Merck) ile 1-1,5 dakika süreyle boyanmıştır. Kesitler, akan musluk suyu altında yıkanarak hematoksinin fazlası uzaklaştırılmıştır. Ardından kesitler, % 0.1 asit alkol (100327, Merck) batırılıp çıkarılmış ve akan musluk suyu altında yıkanarak, eozin (1170811000, Merck) çözeltisinde 1-2 dk boyanmıştır. Akan musluk suda yıkanan kesitler, ardışık etanol (100971, Merck) alkol serilerinden (%70, %80, %95, %100) hızla geçirilerek, ksilolde (108297, Merck) 10'ar dakika süreyle bekletilmiştir. Boyanmanın ardından kesitler, kapatma mediumu (107961, Merck) ile kapatılarak ışık mikroskobu (Olympus BX40, Japonya) kullanılarak görüntülenmiştir.

2.5. Hücre ve Koloni Değerlendirilmesi

Çalışmada iki farklı hücre hattı (M4A4 ve HCT-116) biyoyumlu doku iskelelerine ekilmiş ve 3D kültür modelleri oluşturulmuştur. Hücre morfolojisi değerlendirilmiş ve Hematoksin-Eozin (HE) boyaması ile histolojik incelemeler yapılmıştır. İnvazyon ve koloni oluşum düzeyleri, BS ve KK iskelelerinde faz-kontrast görüntüleri ve histolojik incelemelerle belirlenmiştir.

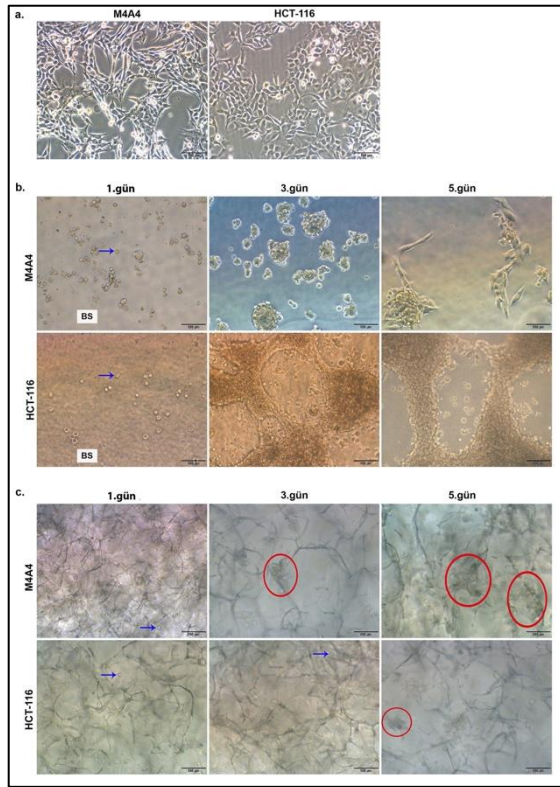
2.6. İstatistiksel Analizler

Shapiro-Wilk testini geçen ve normal dağılan veriler için two tailed student's t-test, normal dağılmayan veriler içinse two tailed Mann Whitney testi yapıldı. Veriler mean ± SEM olarak sunuldu. Tüm istatistiksel analizler için GraphPad Prism yazılımı sürüm 9 kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık P-değeri < 0.05 olarak belirlendi.

3. Bulgular ve Tartışma

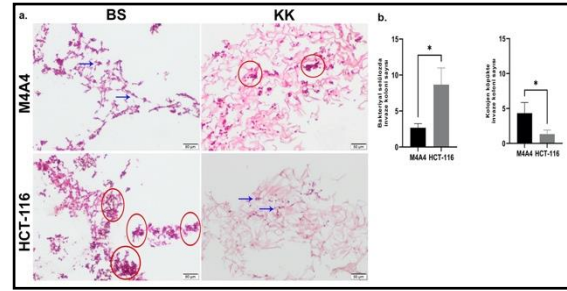
İskeleler üzerinde hücre morfolojisi ve çoğalması üzerine yapılan çalışmamız, M4A4 ve HCT-116 hücrelerinin BS ve KK iskeleler üzerinde kültürlendiğinde farklı davranışlar sergilediğini ortaya koymuştur. M4A4 ve HCT-116 hücrelerinin kültür süresi boyunca fibroblastik karakterde olduğu görülmüştür (**Şekil 1a**). BC iskeleler üzerinde kültüre edilen M4A4 hücrelerinin fibroblastik hücre morfolojilerini korurken, HCT-116 hücrelerinin 3.günden itibaren bir koloni ve kümelenme oluşturduğu görülmüştür (**Şekil 1b**). KK iskeleler üzerinde kültüre edilen M4A4 hücrelerinin 3.günden itibaren bir koloni ve kümelenme oluşturduğu görülürken, HCT-116 hücrelerinin ise fibroblastik hücre morfolojilerini korudukları görülmüştür (**Şekil 1c**). Bu bulgular, iskele malzemesi seçiminin

hücre davranışını ve proliferasyon modellerini etkilediğini göstermektedir (3).



Şekil 1: M4A4 ve HCT-116 hücrelerinin kültürün farklı günlerinde BS ve KK doku iskelelerinde kültürü. (a) fibroblastik karakterde olan M4A4 ve HCT-116 hücrelerinin faz-kontrast görüntüsü. (b) Bakteriyal selüloz (BS) doku iskelesinde M4A4 ve HCT-116 hücrelerinin kültürün 1., 3. ve 5. günlerindeki faz-kontrast görüntüleri. Mavi ok: hücreleri göstermektedir. (c) Kollajen köpük (KK) doku iskelesinde M4A4 ve HCT-116 hücrelerinin kültürün 3. ve 5. günlerindeki faz-kontrast görüntüleri. Mavi ok: hücreleri göstermektedir. Kırmızı halka: koloni ve kümelenme gösteren hücreleri işaret etmektedir. Ölçek: 100 µm.

HE boyama kullanılarak yapılan histolojik inceleme, BS ve KK iskelelerindeki hücre davranışındaki farklılıkları daha da desteklemiştir (**Şekil 2a**). HCT-116 hücreleri, M4A4 hücrelerine kıyasla BS iskelelerinde önemli ölçüde daha yüksek invazyon ve koloni oluşumu sergilemiştir ($p<0.05$) (**Şekil 2b**); bu da BS iskelelerinin kolon kanseri hücrelerinin tipik invaziv davranışını daha iyi destekleyebileceğini göstermektedir. Tersine, M4A4 hücreleri KK iskelelerinde HCT-116 hücrelerine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek invazyon ve koloni oluşumu sergilemiştir ($p<0.05$) (**Şekil 2b**); bu da KK iskelelerinin meme kanseri hücrelerinin metastatik potansiyelini desteklemeye daha elverişli olabileceğini düşündürmektedir (3).



Şekil 2: 3D kanser invazyon modelinde HE boyaması. (a) Bakteriyal selüloz (BS) ve kollajen köpük (KK) doku iskelesinde M4A4 ve HCT-116 hücrelerinin HE boyanması. Mavi ok: hücreleri göstermektedir. Kırmızı halka: koloni ve kümelenme gösteren hücreleri işaret etmektedir. (b) Bakteriyal selüloz ve kollajen köpük doku iskelesinde invaze koloni sayısı. Ölçek: 50 µm.

In vivo ortamın karmaşık mikro çevresini daha iyi taklit etmek için 2D kültürden, 3D kültür sistemlerine geçiş çok önemlidir. Bununla birlikte, 3D kültür modellerinde, kullanılan materyalin hücresel davranış üzerinde farklı etkiler yaratabileceği de unutulmamalıdır (4). 2D kültürlerde hücreler sınırlı etkileşimlerle tek katmanlı olarak büyürken, 3D iskeleler hücre davranışını önemli ölçüde değiştirebilen daha doğal bir hücre dışı matrix (ESM) benzeri ortam sağlarlar. BS ve KK iskelelerindeki M4A4 ve HCT-116 hücrelerinin spesifik davranışlarına ilişkin bulgular, iskele malzemesi seçiminin hücre davranışını modüle etmede önemli bir rol oynadığını desteklemektedir. KK iskelelerindeki M4A4 hücrelerinin kümelenme eğilimi, kollajenin ESM'yi taklit etmedeki, hücre-hücre etkileşimlerini teşvik etmedeki ve kümelenme-çoğalmaya elverişli biyokimyasal sinyaller sağlamadaki rolünün altını çizmektedir. Öte yandan, HCT-116 hücrelerinin morfolojiyi koruma ve KK iskeleleri üzerinde çoğalma yeteneği, kollajen iskelelerin farklı büyüme modellerine sahip farklı hücre tiplerini barındırmadaki çok yönlülüğünü göstermektedir (5). BS iskeleler üzerindeki gözlemler, hem M4A4 hem de HCT-116 hücrelerinin farklı davranışlar sergilediğini, M4A4 hücrelerinin morfolojilerini ve çoğalmalarını korurken, HCT-116 hücrelerinin yoğun kümelenme gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu davranışlar, iskelenin özellikle kolorektal kanser çalışmalarında görülen hücre kümelenmesini destekleme kabiliyetini yansıtmakta ve BS iskelelerinin kanser araştırmalarında doğru bir model olabileceğini göstermektedir (6).

HE boyama sonuçlarında gözlemlenen invazyon ve koloni oluşumu eğilimleri, BS ve KK iskelelerinin belirli kanser hücresi tipleriyle nasıl etkileşime girdiğine dair katkı sağlamaktadır. HCT-116 hücrelerinin BS iskeleleri üzerinde M4A4 hücrelerine kıyasla daha fazla invazyon ve koloni oluşturması, BS iskelelerinin kolon kanseri hücrelerinin tipik agresif invaziv davranışını daha iyi destekleyebileceğini düşündürmektedir. Buna

karşın, KK iskelelerindeki M4A4 hücrelerinin HCT-116 hücrelerine kıyasla daha yüksek invazyon ve koloni oluşumu, KK iskelelerinin meme kanseri hücrelerinin metastatik potansiyelini daha iyi destekleyebileceğini göstermektedir. Bu bulgular, kanser biyolojisinin belirli yönlerini etkili bir şekilde incelemek için uygun iskele malzemesini seçmenin önemini vurgulamaktadır (7).

4. Sonuç

Çalışmamızın bulguları, iskele seçiminin kanser araştırmalarında hücre davranışı ve çoğalması üzerinde etkili olabileceğini vurgulamaktadır. M4A4 ve HCT-116 hücrelerinin BS ve KK iskeleleri üzerindeki farklı tepkileri, belirli kanser hücreleri davranışlarının modellenmesinde iskele özelliklerinin dikkate alınmasının önemini altını çizmektedir. Histolojik sonuçlar da bu gözlemleri destekleyerek BS ve KK iskelelerinin kolon ve meme kanseri hücreleriyle farklı şekilde etkileşime girerek invaziv ve koloni oluşturma yeteneklerini etkilediğini göstermektedir. Bu bilgiler, kanser hücreleri etkileşimlerinin ve davranışlarının karmaşıklığını etkili bir şekilde incelemek ve anlamak için özel iskele seçimine ihtiyaç olabileceğini vurgulamaktadır (8).

Referanslar

1. Sommerová L, Michalová E, Hrstka R. New Approaches for Chemosensitivity Testing in Malignant Diseases. *Klinická Onkologie*. 2018;31(2).
2. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noël G. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(3):5517-27.
3. Amiri FZ, Pashandi Z, Lotfibakhshaiesh N, Mirzaei-Parsa MJ, Ghanbari H, Faridi-Majidi R. Cell Attachment Effects of Collagen Nanoparticles on Crosslinked Electrospun Nanofibers. *The International Journal of Artificial Organs*. 2020;44(3):199-207.
4. Evlashin SA, Dyakonov PV, Tarkhov MA ve ark. Flexible Polycaprolactone and Polycaprolactone/Graphene Scaffolds for Tissue Engineering. *Materials*. 2019;12(18):2991.
5. Renó CO, Lima BFAS, Sousa Ed, Bertran CA, Motisuke M. Scaffolds of Calcium Phosphate Cement Containing Chitosan and Gelatin. *Materials Research*. 2013;16(6):1362-5.
6. Beran M, Berkova E, Musílková J, Sedlář A, Slepíčka P, Fajstavr D. Mineralised Polylactide and Polycaprolactone Soft Foams With Hierarchical Micro-Macro Porous Structure for Tissue Engineering. 2021.
7. McAllister B, Thajudeen M, Phelan SA, Sundarram SS. Study on Dual Pore Network Polylactic Acid Scaffolds for Growth of McF7 Human Breast Cancer Cells. *Advanced Engineering Materials*. 2022;24(9).

8. Sharma C, Dinda AK, Mishra NC. Fabrication and Characterization of Natural Origin Chitosan- Gelatin-alginate Composite Scaffold by Foaming Method Without Using Surfactant. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012;127(4):3228-41.

