MCBU SBED
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ
MANISA CELAL BAYAR UNIVERSITY JOURNAL OF INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE
ISSN: 2147-9607

ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
MCBU-SBED, 2017, 4(4): 1048-1051

Kolon Kanseri Hücresi Kültürü Ortam Değişikliği ve Proliferasyonuna Etkisi

Melike ÖZGÜL ÖNAL[1], Hilal KABADAYI[1], Hafize Seda VATANSEVER[1,2]

Gönderim Tarihi / Received: 28.12.2017
Kabul Tarihi / Accepted: 29.12.2017
1 Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Manisa Türkiye
2Yakın Doğu Üniveristesi, Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs
* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Hafize Seda VATANSEVER, e-mail: sedavatansever@yahoo.com

ÖZ

Amaç: Çalışmada, laboratuvarda rutin olarak kullanılan ve yeni temin edilen hücre kültür vasatlarının ve serumlarının karşılaştırılması için hazırlanan kültür ortamlarının, HT-29 insan kolon kanser hücreleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.
Gereç ve Yöntem: Dört farklı kültür vasatı ile oluşturulan ortamda HT-29 insan kolon kanser hücreleri kültüre edildi ve proliferasyon belirteci Ki-67 ve apoptoz belirteci Kaspaz-3 dağılımları immunohistokimyasal olarak incelenir iken, in vitro yara modelinde farklı ortamın etkileri morfolojik olarak değerlendirildi.
Bulgular: Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 HT-29 hücrelerinde Ki-67 immunoreaktivitesinin kuvvetli (+++) pozitif, Grup 4 HT-29 hücrelerinde ise orta şiddette (++) pozitif olduğu izlendi. Tüm grup HT-29 hücrelerinde aktif Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin zayıf (+) şiddette olduğu tespit edildi. In vitro yara modelinde farklı kültür ortamlarının yara iyileşmesi üzerine etkisinin benzer olduğu görüldü.
Sonuç: Çalışmada kullanılan farklı vasatların HT-29 insan kolon kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve hücre ölümünü etkilemediği, yara modeli gruplarında ise benzer sonuçlar bulunması üzerine, özellikle farklı kültür ortamından ziyade, aynı marka ve serideki ürünlerin aynı anda kullanılmasının önemli olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Kolon kanseri, HT-29, Hücre Kültür Vasatı, İmmunohistokimya, Yara Modeli, Hücre Kültürü.*

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to investigate the effects of culture media prepared for comparison between routinely used in the laboratory and newly obtained cell culture media and serum on HT-29 human colon cancer cells.
Methods: HT-29 human colon cancer cells were cultured in four different culture media, and the proliferation marker Ki-67 and the apoptotic marker Caspase-3 distributions were examined immunohistochemically, while the effects of different media in the in vitro wound healing model were evaluated morphologically.
Results: Ki-67 immunoreactivities were observed that in Group 1, Group 2 and Group 3 HT-29 cells were strongly (+++) positive and in Group 4 HT-29 cells were moderate (++) positive. It was determined that active Kaspase-3 immunoreactivity was weak (+) in all group HT-29 cells. It has been observed that the effect of different culture media on wound healing was similar in the in vitro wound healing model.
Conclusion: It was concluded that the different media used in the study did not affect the proliferation and cell death of HT-29 human colon cancer cells, and that similar results were obtained in groups in the wound healing model. Also we demonstrate that using the same brand and same series products at the same time is important for utilization different culture media.

Keywords: *Colon Cancer, HT-29, Cell Culture Medium, Immunocytochemistry, Wound Healing Model, Cell Culture.*

GİRİŞ

Kolorektal kanser, çekum, kolon ve rektum üzerine etkili bir kanserdir. Kolonun sıklıkla lümen yüzeyinde başlayıp dışına doğru ilerleyen polip oluşması ve sonrasında tümör dokusunun tüm kolona yayılması şeklinde görülen patolojik duruma ‘’kolon kanseri’’ denir (1). Kolon ve rektum kanserleri bu organların iç yüzeyini örten tabakayı oluşturan hücrelerden gelişir. Kolon kanserinin sebebi kesin olarak bilinmemekle birlikte bazı risk faktörleri vardır. Ailede kolorektal kanser öyküsü olması, yakalanma riskini ve daha erken yaşta görülme olasılığını arttırır. Belli genlerdeki bozukluklar da kolorektal kanser için risktir. Kolon kanseri Amerika’da en sık görülen üçüncü kanser tipi iken, kanser ilişkili ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Amerikan Kanser Derneği'ne göre, 2014 yılında, 71.830 erkek ve 65.000 kadına kolorektal kanser teşhisi konulmuştur, 26.270 erkek ve 24.040 kadın bu hastalıktan ölmüştür (2, 3). Bu sebeple kolon kanseri tespit ve tedavisi ile ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu anlamda birçok hücre kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalarda en sık kullanılan ticari hücre hatlarından biri olan HT-29 hücre hattıdır. HT-29’un in vitro ortamda in vivo’ya benzer sonuçlar elde edilmesi bakımından oldukça kullanışlı olduğu bildirilmiştir (4). HT-29 hücreleri mikrovillus, mikrofilament, koyu renkli granüllere sahip mitokondri, serbest ribozomlara sahip granülsüz ve granüllü endoplazmik retikulum, lipid damlacıkları ve lizozom içerir (5).

Hücre kültür vasatları, hücre büyümesi çoğalması için önemlidir. Bir çalışmada aynı markanın aynı üretim serisine ait ürünler kullanılmalıdır. Farklı markalara ait farklı kültür vasatlarının hücreler üzerine farklı etkileri olabilmektedir. Bu çalışma ile ülkemizde bir inovasyon girişimi olarak üretilen Serox markasına ait yeni vasat ve serumunun çalışılması amaçlandı. Burada kullanılan hücre kültür ürünlerinin hücre morfolojilerine, fenotipine, proliferayon potansiyellerine ve apoptoza gitme durumlarına olan etkilerine bakıldı.

Ki-67, proliferasyon belirteci olarak kullanılan nükleer bir proteindir. Ki-67 polimeraz I bağımlı ribozomal RNA sentezinin erken aşamalarında tanımlanmıştır. Ki-67’nin hücre bölünmesinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Ayrıca ekspresyonu birçok kanserin varlığı ile bağlantılı bulunmuştur ve tümör evreleri ile ilişkilendirilmiştir (6).

Kaspazlar ise, programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) önemli aracılardır. Bunların arasında, kaspaz-3, sıklıkla aktive edilmiş bir ölüm proteaz olup apoptotik yolağın son ürünü olup, hücre ölümünün sonladığının bir göstergesidir. Kaspaz-3 aktivasyonuna yönelik yollar, mitokondrial sitokrom c salınımına ve kaspaz-9 fonksiyonuna bağımlı veya bunlardan bağımsız olarak tanımlanmıştır. Kaspaz-3 incelenen tüm hücre tiplerinde apoptotik kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması için gereklidir. Dolayısıyla, kaspaz-3, hücrenin parçalanması ve apoptotik cisimlerin oluşması ile bağlantılıdır (7).

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

Çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvar'ında gerçekleştirildi. Anabilim dalı stok hücresi HT-29 (ATCC®HTB-38™ ATCC, Manassas, VA, USA) insan kolon kanser hücre hattı kültürü için 2 farklı firmaya ait DMEM F-12 ve %10 Fötal Bovine Serum (FBS) ile aynı firmaya ait 2 mM L-Glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B) içeren dört farklı kültür vasatı hazırlandı ve hücre kültür grupları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturularak hücreler kültüre edildi.

Grup 1: DMEM F-12 (Capricorn Scientific, DMEM-12-HXA) ve FBS (Gibco, 10082139)

Grup 2: DMEM F-12 (Capricorn Scientific, DMEM-12-HXA) ve FBS (Serox, SRX181G-100)

Grup 3: DMEM F-12 (Serox, SRX0092-500) ve FBS (Gibco, 10082139)

Grup 4: DMEM F-12 (Serox, SRX0092-500) ve FBS (Serox, SRX181G-100)

Hücrelerin kültür kabına ekildikleri ilk gün sayımı yapılarak sıfırıncı gün olarak kabul edildi ve 96 saat sonunda hücrelerin sayımı tekrar yapıldı ve ortalama değerler belirlendi.

Yara Modeli

Kültür ortamlarının, yara iyileşmesi üzerine olan etkisinin tespiti için farklı kültür ortamlarında kültür edilen HT-29 insan kolon kanser hücre hattında yara modeli oluşturuldu. HT-29 hücreleri 24 gözlü kültür kabına her bir göze 1x106 hücre olacak şekilde ekildi ve 37 0C, %5 CO2'li ortamda 24 saat kültüre edildi. Konfluent olan hücrelerde steril pipet ucu yardımı ile yara modeli oluşturuldu ve hücrelerin kültürüne 36 saat devam edildi (8). Yara modeli oluşturulduktan hemen sonra, 24 ve 36 saat sonra tüm gruplarda hücrelerin morfolojik olarak görüntülenmesi faz kontrast ataçmanlı inverted mikroskopta (CK40-F200, Olympus, Japonya) yapıldı.

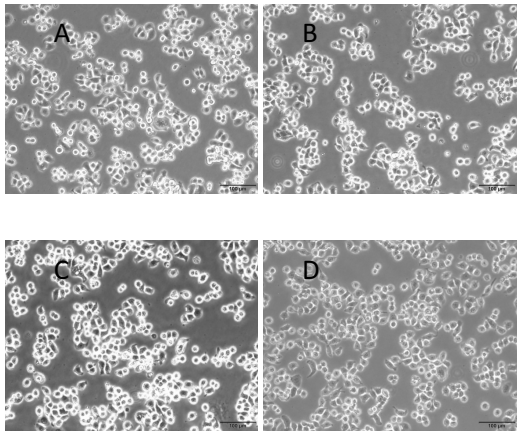
İmmunohistokimyasal Analiz

Farklı kültür ortamlarında kültür edilen HT-29 insan kolon kanser hücre grupları arasında proliferasyon ve apoptoz farklılıklarını ortaya koymak için hücreler %4 paraformaldehit (Merck, TP704404) ile 30 dakika tespit işleminden sonra 3x10 dk fosfat tamponlu solüsyon (PBS-Lonza Biowhittaker, BE17-516F) ile yıkandı. Ardından hücreler % 3'lük H2O2 (Merck, K31355100 303) ile 15 dk inkübe edildi. Tekrar 3x5 dk PBS ile yıkanan hücreler 10 dk % 0.1 Triton-X100 (Applichem, Mt 646, 85g/mol) ile permeabilizasyonu buz üstünde sağlandı ve 3x5 dk PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra bloklama (Invitrogen, 859043) solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübasyonun ardından, PBS ile hazırlanan 1/100 oranında anti-Ki-67 (Biogene, MU370-UC) ve 1/50 oranında anti-Kaspaz-3 (Abcam, ab2302) primer antikorlar ile hücreler 1 gece +4◦C de inkübe edildi. Hücreler PBS ile 3x5 dk yıkandıktan sonra biotin-streptavidin peroksidaz sekonder antikorları (Invitrogen, 859043) ile her bir basamak 30 dk olacak şekilde boyandı. İnkübasyonun ardından diaminobenzidine kromojeni (DAB) (ScyTek, ACC125) ile 5 dk boyama yapıldı. Önce PBS ardından distile su ile yıkama işleminden sonra örnekler 3 dk Mayer's hematoksilen (05-06002/L) ile boyama yapıldıktan sonra immunohistokimya kapatma solüsyonu (Spring bioscience, DMM-125) ile kapatılarak ışık mikroskobu altında incelendi. İmmunoreaktivite şiddetleri zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli (+++) olarak değerlendirildi.

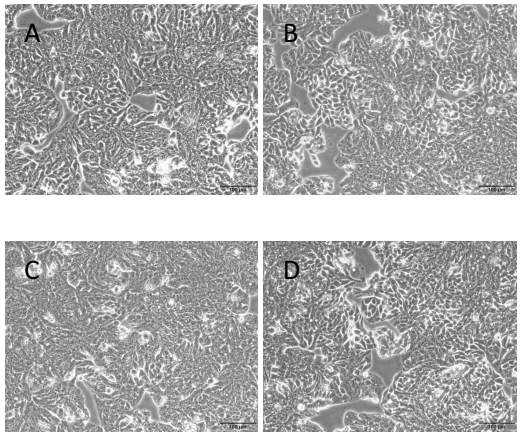
BULGULAR

Hücre Kültürü

HT-29 insan kolon kanser hücreleri açıldıktan sonra Thoma lamı kullanılarak sayıldı ve farklı hücre kültür vasatı bulunan 25 cm2'lik kültür kaplarına 1x107 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin kültür kabının tabanına yapıştıktan sonra epiteloid karakterde oldukları (Resim 1), adherent hücre özellikleri gösterdikleri ve ilerleyen pasajlarda da her grupta bu özellikleri korudukları gözlendi (Resim 2).



Resim 1. Kültürün 1. gününde farklı kültür ortamlarında kültür edilen HT-29 hücreleri. A: Grup 1, B: Grup 2, C: Grup 3, D: Grup 4. Ölçek: 100 µm.



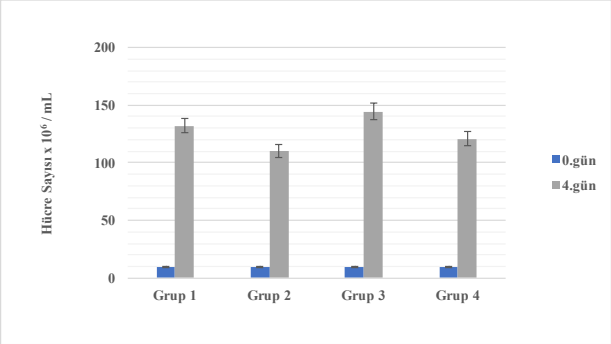
Resim 2. Kültürün 4. gününde farklı kültür ortamlarında kültür edilen HT-29 hücreleri. A: Grup 1, B: Grup 2, C: Grup 3, D: Grup 4. Ölçek: 100 µm.

Her iki günde bir kültür vasatı değiştirilen hücreler ekim işlemini takiben dördüncü günde konfluent hale geldikleri izlendi (Resim 1 ve 2). Konfluent olan hücreler tripsinizasyon sonrası toplandı, Thoma lamı kullanılarak sayıldı ve gruplara göre hücre sayıları sırası ile; 1,4x108, 1,1x108, 1,4x108 ve 1,2x108 olarak belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Günlere göre gruplara ait hücre sayıları (hücre/mL)

HT-29	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
0.gün	$1x10^7$	$1x10^7$	$1x10^7$	$1x10^7$
4.gün	$1,4x10^8$	$1,1x\ 10^8$	$1,4x\ 10^8$	$1,2x10^8$

Hücre sayım sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığı gözlendi ($p>0.05$) (Tablo 1) (Grafik 1).

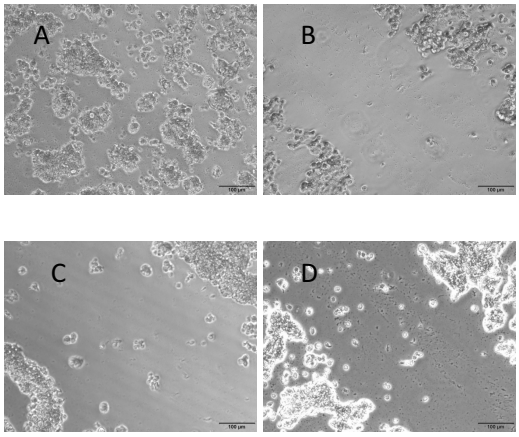


Grafik 1. Günlere göre gruplara ait hücre sayıları (hücre/mL)

Daha sonra hücreler 24 gözlü kültür kaplarına immunohistokimya ve yara modeli çalışmaları için pasajlandı.

Yara Modeli

Farklı kültür vasatlarında kültüre edilen HT-29 insan kolon kanser hücreleri konfluent olduktan sonra yara modeli oluşturuldu. Yara modeli oluşturulmadan önce ve yara modeli oluşturulduktan sonraki 0., 24. ve 36. saatlerde inverted mikroskop ile hücreler görüntülendi. Tüm gruplarda in vitro yara modeli oluşumundan 24 saat sonra hücrelerin yara kenarlarından prolifere oldukları (Resim 3-6 C), kültürün 36. saatinde proliferasyonun devam ettiği, gruplar arasında farklılık olmadığı görüldü (Resim 3-6 D).

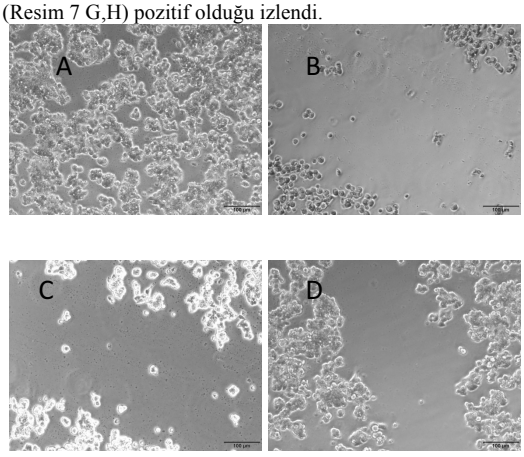


Resim 3. HT-29 insan kolon kanser hücrelerinin Grup 1 vasatı ile kültürü. A: Yara modeli oluşturulmadan önce, B: 0.saat, C: 24.saat, D: 36.saat. Ölçek: 100 µm.

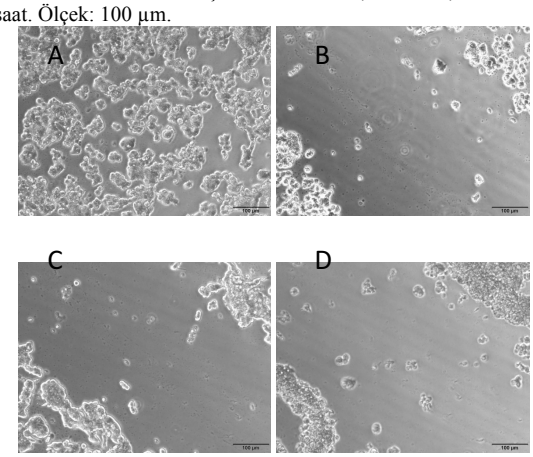
İmmunositokimyasal Analiz Sonuçları

Ki-67 boyama sonuçları

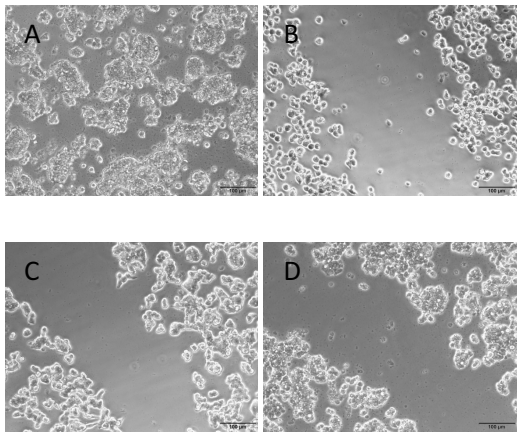
HT-29 insan kolon kanser hücre hattında anti-Ki-67 primer antikoru kullanılarak yapılan immunohistokimyasal analizde Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 kültür vasatlarının kullanıldığı örneklerde Ki-67 immunoreaktivite şiddeti kuvvetli (+++) (Resim 7 A-F) pozitif olarak tespit edildi. Grup 4'te ise Ki-67 immunoreaktivitesinin orta şiddette (++) (Resim 7 G,H) pozitif olduğu izlendi.



Resim 4. HT-29 insan kolon kanser hücrelerinin Grup 2 vasatı ile kültürü. A: Yara modeli oluşturulmadan önce, B: 0.saat, C: 24.saat, D: 36.saat. Ölçek: 100 µm.



Resim 5. HT-29 insan kolon kanser hücrelerinin Grup 3 vasatı ile kültürü. A: Yara modeli oluşturulmadan önce, B: 0.saat, C: 24.saat, D: 36.saat. Ölçek: 100 µm.



Resim 6. HT-29 insan kolon kanser hücrelerinin Grup 4 vasatı ile kültürü. A: Yara modeli oluşturulmadan önce, B: 0.saat, C: 24.saat, D: 36.saat. Ölçek: 100 µm.

Kaspaz-3 Boyama Sonuçları

HT-29 insan kolon kanser hücre hattında anti-Kaspaz-3 primer antikoru kullanılarak yapılan immunohistokimyasal analizde bütün gruplarda Kaspaz-3 immunoreaktivitesi pozitif hücre sayısının çok az olduğu ve immunoreaktivite şiddetininde zayıf (+) olduğu izlendi (Resim 8) .

TARTIŞMA

In vitro çalışmalarda hücrelerin hayatta kalmasını sağlayacak optimum ihtiyaçları karşılayabilecek doğru kültür vasatının seçimi ve kullanımı çok önemlidir. Laboratuvarlarda kullanılacak kültür vasatları firmalar arasında farklılık gösterebilmekte ve çalışmaların gidişatını etkileyebilmektedir. Bu nedenle laboratuvarımıza yeni gelen Serox firmasına ait kültür vasatını, rutin olarak kullanılan vasatlar ile karşılaştırmak amacı ile bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Quan ve arkadaşlarının HT-29 insan kolon kanser hücrelerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada yüksek seviyelerde Ki-67 boyamasının, daha büyük tümör boyutu ve kanser ilerlemesi ile korele olduğu gösterilmiştir (9). Yapılan bir başka çalışmada ise, tek tabaka halinde büyüyen HT-29 insan kolon kanser hücrelerinin %84'ünün çekirdeklerinde Ki-67 ekspresyonunun varlığı ve bunun hücrelerin proliferasyon aşamasında olduğunu gösterdiği bildirilmiştir (10). Ayrıca aynı çalışmada sitoplazmik Ki-67 ekspresyonunun HT-29 insan kolon kanser hücrelerinde gözlendiği de belirtilmiştir. Teknik artefaktlar dışında sitoplazmada Ki-67 varlığı; çapraz reaktivite, sitoplazmik Ki-67'nin immünreaktivitesi ile hücre içindeki diğer proteinlerin ekspresyonu

arasındaki ilişki ve Ki-67 protein sentez mekanizmasındaki anormallikler ile açıklanmaktadır (10).

Yapılan bu çalışmada HT-29 insan kolon kanser hücrelerinin sayımı 0.gün ve 4.gün de yapıldı ve hücre sayısına göre, çalışmada kullanılan farklı vasatların HT-29 hücrelerinin morfolojik verileri değerlendirmesi ile proliferasyonunu etkilemediği sonucuna varıldı. Ayrıca proliferasyon belirteci olarak Ki-67 immunoreaktivitesine bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı ve hepsinin pozitif immunoreaktivite gösterdiği sonucuna varıldı. Bu sonuçlar göz önüne alındığında çalışmada kullanılan dört farklı kültür vasatının proliferasyonu inhibe edici bir etkisi görülmediği bulgusuna ulaşıldı.

Apoptoz, normal fizyolojik ve homeostaz süreçlerinde ve/veya sistemik olarak yaşlanmış ya da hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılmasında temel role sahip bir hücresel mekanizmadır. Kolon kanser hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada HT-29 kolon kanser hücrelerinin canlılık oranı akım sitometrik Annexin V-FITC/PI analizi ile %97,3-%97,5 olarak bildirilmiştir. Ayrıca akım sitometrik ve Western Blotting analizleri ile aktif Kaspaz-3 protein seviyeleri incelenmiş ve HT-29 hücre hatlarında tespit edilmemiştir (11). Apoptozun incelenmesi için ise çalışmada hem intirinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolakların son ürünü olan aktif Kaspaz-3 immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. Sonuçta tüm gruplara ait HT-29 insan kolon kanser hücrelerinde Kaspaz-3 immunoreaktivitesi pozitif hücre sayısının az olduğu ve immunoreaktivite şiddetinin zayıf olduğu tespit edildi ve kullanılan farklı vasatların hücreleri apoptotik süreçlere yönlendirmediği sonucuna varıldı.

İn vitro yara modelinin dört farklı kültür ortamı ile kültüre edilen HT-29 hücrelerinde ara yerinden hücrelerin proliferasyonun 24. ve 36 saatlerde devam etmesi ile, kullanılan ortamların in vitro yara modelinde farklılıklara neden olmadığı sonucuna varıldı.

SONUÇ

Hücre kültür laboratuvarlarında kullanılan hücre kültür vasatları ve ilaveleri araştırmaların devamlılığı açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmamızda laboratuvara yeni gelen Serox firmasına ait kültür vasatı DMEM F-12 ve Fötal Sığır Serumun, rutin kullanılanlar ile karşılaştırılması amacı ile immunohistokimyasal analizler ve yara modeli çalışması gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar ile Serox firmasına ait hücre kültür ürünlerinin rutinde kullanılan firmaların ürünleri ile farklılık göstermediği, hücrelerin proliferasyonunu engellemediği ve apoptotik yolakları aktive etmediği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Yang F, Gao J ve Chen H ve ark. Targeted inhibition of the phosphoinositide 3-kinase impairs cell proliferation, survival, and invasion in colon cancer, Onco Targets and Therapy, 2017:10 4413–4422.
2. Xu H, Zhang Y, Peña M.M, Pirisi L, Creek E. K. Six1 promotes colorectal cancer growth and metastasis by stimulating angiogenesis and recruiting tumor-associated macrophages, *Carcinogenesis*, 2017, Volume 38, Issue 3, Pages 281–292.
3. Kabadayı H, Kıvanç M, Vatansever H. S, SALL4-STAT3 Relations In Primary And Metastatic Colon, Breast And Endometrial Cancer Cell Lines, MCBU-SBED, 2016, 3 (4):460-465.
4. Olejniczak A, Szaryńska M, Kmieć Z, In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines, Int. Journal of Oncology, 2017, 599-612.
5. Szarynska M, Olejniczak A, Wierzbicki ve Kobiela J ve ark. FasR and FasL in colorectal cancer, Int. Journal of Oncology, 2017, 975-986.
6. Vasudev S. N, Banks E. R, Biomarkers of Kidney Disease, Chapter 8-Biomarkers of Renal Cancer, Academic Press, 2011, Pages 313–350.
7. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell Death Differ. 1999, 6(2):99-104.
8. Menéndez M.Y, Otero-Hernández J ve Vega A.J, et all. The role of bone marrow mononuclear cell-conditioned medium in the proliferation and migration of human dermal fibroblasts, Molecular Biology Letters 2017, 22:29.
9. Quan Y, Jin R, Huang A, Zhao H, Feng B, Zang L, Zheng M. Downregulation of GRHL2 inhibits the proliferation of colorectal cancer cells by targeting ZEB1. Cancer Biol Ther. 2014 Jul;15(7):878-87
10. Kim YJ, Lee SH, Lee J, Kuh HJ. Non-nuclear localization of Ki-67 in human colorectal cancer cells grown as multicellular layers. Arch Pharm Res. 2013 May;36(5):634-40
11. Sheikh BY, Sarker MMR, Kamarudin MNA, Mohan G. Antiproliferative and apoptosis inducing effects of citral via p53 and ROS-induced mitochondrial-mediated apoptosis in human colorectal HCT116 and HT-29 cell lines. Biomed Pharmacother. 2017 Dec;96:834-846.

http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Alıntı-Gayriticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

