Araştırma

Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi ile CD133+/CD44+ prostat kanser kök hücrelerinin iki boyutlu ve üç boyutlu ortamdaki hücresel farklılıklarının belirlemesi

DETERMINATION OF CELLULAR DIFFERENCES OF CD133+/CD44+ PROSTATE CANCER STEM CELLS IN TWO-DIMENSIONAL AND THREE-DIMENSIONAL MEDIA BY FOURIER TRANSFORMATION INFRARED SPECTROSCOPY

Günnur GÜLER[1], Eda AÇIKGÖZ[2], Gülperi ÖKTEM[3]

[1]Ege Üniversitesi, İlaç Araştırma-geliştirme ve Farmakokinetik Uygulama Merkezi, İzmir

[2]Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Van

[3]Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZ

Amaç: Sferoid kültürleri, hücrelerin kendi iç dinamikleri ve diğer hücrelerle olan etkileşimleri açısından tek tabakalı kültürlere kıyasla tümör dokusunun özelliklerini daha iyi yansıtmaktadır. Bu çalışmanın amacı, üç boyutlu (3D) ve iki boyutlu (2D) kültür ortamlarında üretilen CD133+/CD44+ prostat kanser kök hücrelerinin (KKH) makromoleküllerindeki benzerlik ve farklılıklarının araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: DU-145 prostat kanser hücre hattı içerisindeki CD133+/CD44+ yüzey belirteç özelliklerine sahip KKH'leri akış sitometrisi (FACS) kullanılarak izole edilmiştir. Agarla kaplı kültür kapları ile sferoid yapıları oluşturulmuştur. 2D ve 3D kültür ortamlarındaki KHK hücreleri Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular: CD133+/CD44+ hücrelerin birinci haftada agarlı kültür ortamlarında mikro-agregatlar oluşturduğu gözlenmiştir. İkinci haftada ise, olgun sferoid yapıların oluştuğu saptanmıştır. 2D ve 3D (multisellüler tümör sferoidleri) kültür ortamlarında üretilen hücreler ile yapılan FTIR analizleri KHK hücre yapısındaki proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerde (DNA, RNA) önemli derecede farklanmalar olduğunu göstermiştir. Membran lipit açil zincir uzunluğu ve hücre zarı kalınlığı, proteinlerin sekonder yapıları ve DNA oligonükleotitlerin baz sekanslarında veya fonksiyonel gruplarında önemli farklanmaların olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 3D kültür ortamında üretilen sfreoid yapılarının in vivo tümör dokusu ile benzer özellikler sergilediğini göstermiştir.

Sonuç: Hücre ortam koşulları ile yaratılmış olan fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler hücrelerin kendi iç dinamiğini ve mikroçevresi içerisindeki etkileşimlerini önemli derecede etkilemektedir. 2D kültür ortamları ile hücreleri tek boyutta indirgemek hücrelerin gerçek özelliklerini yansıtmamaktadır. Bu nedenle, 3D kültür ortamları ile hücre dinamiklerinin incelenmesi gerekmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, kanserde önemli bir hücre popülasyonunu oluşturan KKH'lerin membran yapısı, lipitler, proteinlerin

Günnur GÜLER
Ege Üniversitesi, İlaç Araştırma-geliştirme ve Farmakokinetik Uygulama Merkezi, İzmir
https://orcid.org/0000-0002-8485-7372

DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2018;33(1): 45 -56
doi: 10.5505/deutfd.2019.44227

Gönderim tarihi: 05.09.2018
Kabul tarihi: 09.12.2018

sekonder yapıları ve DNA oligonükleotit yapılarının terapötik hedef olabileceğini göstermektedir.
Anahtar Sözcükler: kanser kök hücresi, prostat kanseri, FTIR spektroskopisi, multiselüler tümör sferoidleri, 3D hücreler, 2D hücreler
ABSTRACT
Objective: Spheroid cultures reflect properties of tumor tissue better than monolayer cultures in terms of internal dynamics and interaction with other cells. The aim of this study is to investigate the similarities and differences in CD133+/CD44+ prostate cancer stem cells (CSCs) produced in three-dimensional (3D) and two-dimensional (2D) culture media.
Material and Method: CSCs with CD133+/CD44+ surface marker properties in the DU-145 prostate cancer cell lines were isolated using flow cytometry (FACS). Spheroid structures were formed with agar-coated culture vessels. CSCs in 2D and 3D cultures were compared with Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy.
Results: CD133+/CD44+ cells were observed to form micro-aggregates in cultured media in the first week. In the second week, mature spheroid structures were formed. FTIR analysis revealed that the 2D and 3D (multicellular tumor spheroids) models of CSCs exhibit significant differences in proteins, lipids and nucleic acids. Significant differences were detected in membrane lipid acyl chain length, membrane thickness, protein secondary structures and DNA oligonucleotides. The results showed that spheroids in 3D culture medium exhibit similar properties to in vivo tumor tissue.
Conclusion: Physical, chemical and biological properties generated by environmental conditions significantly affect internal dynamics of cells and their interactions within the microenvironment. Reducing the cells in one dimension through the 2D culture medium does not reflect actual properties of cells. Therefore, cell dynamics in 3D culture media should be investigated. This study demonstrates that cellular lipids, membrane structure, protein secondary structures and nucleic acids of CSCs constituting an important cell population in cancer may be therapeutic targets.
Keywords: cancer stem cell, prostate cancer, FTIR spectroscopy, multicellular tumor spheroids, 3D cells, 2D cells

Prostat kanseri (PCa), dünya genelinde erkeklerde en sık teşhis edilen ikinci kanser olup, kanser ölümlerinin erkelerdeki en sık sebeplerinden birisidir. Dünya sağlık örgütü (WHO) ve ulusal kanser veri tabanının istatistiklerine göre 2012 yılında gerçekleşmiş olduğu tahmin edilen 1,1 milyon yeni vakayla yıldan 300.000 kişi bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmektedir [1, 2].

Prostat dokusu, bağ ve kas dokusundan oluşan fibromüsküler stroma ve bu yapı ile iç içe geçmiş olan epitelyal glandüler bileşenlerden oluşmaktadır [3]. PCa epitelyal hücrelerin proliferasyonu ve malign transformasyonu sonucunda oluşmaktadır. Geleneksel anti-PCa terapileri ameliyat, radyasyon, hormonal ablasyon ve kemoterapiyi içermektedir [4]. Artan çabalara rağmen, bu tedaviler ileri ve/veya metastatik hastalığı olan hastalar için etkili değildir. Çoğu durumda, kanser terapileri bazı hücrelerin ortadan kaldırılmamasına bağlı olarak tedavi sonrasında kanser kısa bir süre sonra yeniden ortaya çıkmaktadır. Kanser kök hücre (KKH) hipotezi, onkolojik hastalıkların moleküler özelliklerinin çoğunu ve kanserlerin relaps, metastaz yapma ve konvansiyonel tedavilere direnç geliştirmeye eğilimlerini açıklayan oldukça önemli bir modeldir [5].

Kanser kök hücresi, normal kök hücreler gibi kendini yenileme yeteneği bulunan, radyoterapi ve kemoterapiye dirençli, bulunduğu dokunun dışında vücudun diğer dokularında da koloni oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerdir [4, 5]. Güncel radyoterapi ve kemoterapiler kanser hücre bulk popülasyonunu öldürmektedir, ama spesifik direnç mekanizmaları tarafından korunan KKH'lerini ortadan kaldırmamaktadır [5]. Hayatta kalan KKH'leri hastalığın nüksetmesine neden olarak, yeni tümör ve metastazların oluşmasına neden olmaktadır. Tekrarlayan tümörler hızla yayılır ve önceden kullanılan

ilaçlara dirençli hale gelerek prognoza yol açmaktadır. Böylece, KKH'lerinin spesifik sağ kalımı birçok tedavinin başarısız olmasının temel nedenidir. Bu nedenle, PCa içerisinde yer alan KKH'lerin tanımlanması ve karakterize edilmesi yeni stratejik tedavilerin geliştirmesi açısından oldukça önemlidir. KKH'lerin izole edilip tanımlanmasında değişik yöntemler kullanılmaktadır. Prostat kanser kök hücreleri (PKKH) CD44, CD133, integrinler, Sca-1 gibi prostat kök hücrelerine benzer değişik belirteçleri ifade etmektedir [6]. Bu belirteçler prostat kanser kök hücrelerinin izole edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Tümör hücreleri ile yapılan in vitro deneylerde birçok laboratuvarda tek tabakalı (monolayer) tümör hücre kültürleri kullanılmaktadır. Söz konusu in vitro hücre modeliyle kanserin temel oluşum mekanizmaları ve ilaç tedavisi ile ilgili oldukça değerli bilgiler edinilmiştir. Ancak, tek tabakalı kültür ortamları vücutta kitle oluşturan solid tümörlerin üç boyutlu uzaysal özelliklerini tam olarak yansıtamamaktadır. Bu nedenle, solid tümörlerin üç boyutlu düzeni dikkate alınarak daha uygun in vitro sistemler oluşturulması amacıyla multiselüler tümör sferoidleri (MSTS) geliştirilmiştir. MSTS'ler, solid tümörlerin üç boyutlu büyüme ve organizasyonunu oldukça gerçekçi bir biçimde yansıtmakta ve bunun sonucunda tümörler söz konusu hücreler arası ilişkileri ve mikroçevresel koşulları çok daha net olarak ortaya koyabilmektedir [7].

Söz konusu çalışmamızdaki amacımız, Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi kullanılarak DU-145 insan prostat kanser kök hücrelerine ait multiselüler tümör sferoidleri (3D) ile monolayer hücreleri (2D) karşılaştırarak hücre biyokimyasındaki farklanmaları moleküler düzeyde belirlemektir. FTIR spektroskopisi, analiz edilen biyolojik örneklerin (doku kesitleri, hücre, lipozom, vücut sıvıları vb.) moleküler bileşimi hakkında hızlı ve doğrudan bilgi sağlayan biyofiziksel bir tekniktir. Sarf malzeme gerektirmemesi, örneğe zarar vermemesi, az miktarda örnek gerektirmesi (birkaç mikrolitre) ve etiketsiz (label-free) ölçüm sağlaması sebebiyle son zamanlarda, biyomedikal, farmasötik ve biyoteknolojik araştırmalar ile biyokimyasal ve biyofiziksel çalışmalar için giderek daha önemli bir teknik haline gelmektedir [8–12]. FTIR tekniği, IR ışığın soğurulması ile kimyasal bağların titreşiminin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bir hücrenin FTIR spektrumundaki en güçlü IR sinyalleri hücre içeriğindeki proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin fonksiyonel gruplarından kaynaklanmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

DU-145 Prostat Kanser Hücre Hattının Üretilmesi

DU-145 prostat kanser hücre hattının çoğaltılmasında ve sürdürülmesinde içerisinde %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal bovin serum, %1 oranında Amfoterisin B ve %1 oranında L-Glutaminin bulunduğu RPMI-1640 besi ortamı kullanılmıştır. Besi ortamına ekilen hücreler 37°C'de, %5 CO_2'li ve nemli ortamda inkübe edilmiştir. Hücre hattı canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta günlük olarak takip edilmiştir. Flasklarda %80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözlendiğinde hücreler pasajlanarak çoğaltılmıştır.

FACS Yöntemiyle CD133+/CD44+ Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu

DU-145 prostat kanser hücreleri içerisindeki CD133+/CD44+ popülasyonunun izolasyonu için akış sitometrisi kullanılmıştır. Hücreler tripsin ile flask yüzeyinden ayrılıp yıkama işlemi yapıldıktan sonra 10 µl CD133-FTICH ve 10 µl CD44-APC eklenerek +4ºC'de 15 dk. karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Daha sonra CD133+/CD44+ yüzey belirtecini içeren hücre popülasyonu FACS Aria II (Beckton Dickinson) cihazı ile sort edilmiştir.

Sferoid Üretimi

Sferoid üretimi için zemini agarla kaplı 6 kuyucuklu kültür kapları kullanılmıştır. Bunun için steril %3'lük stok agar solüsyonu hazırlanmıştır. Zemin kaplama işlemi için hazırlanan stok agar serumsuz RPMI-1640 medium ile karıştırılarak son konsantrasyon %1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen solüsyon her bir kuyucuğa 1 ml olaracak şekilde paylaştırılmış ve donması için +4ºC'de 10 dk. bekletilmiştir. Daha sonra izole edilen CD133+/CD44+ hücreleri 1x104 hücre/kuyucuk olacak şekilde serumsuz RPMI-1640 medium içerisinde süspanse edilerek

kuyucuklara ekilmiştir. Haftada 2 defa olmak üzere taze medium değişimleri yapılarak takip edilmiştir.

Hücre örneklerinin FTIR için hazırlanması

DU-145 prostat kanser hücre hattından izole edilen CD133+/CD44+ hücreler ve bu hücrelerin agar kaplı kültür ortamlarına ekilerek elde edilen sferoidler toplanarak steril izotonik solüsyonda (%0,9 NaCI) üç defa yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra, hücreler NaCI solüsyonunda re-süspanse edilmiştir.

FTIR spektroskopik ölçümleri

Ölçümler, zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) ünitesi ile birleştirilmiş ve DLATGS detektörü ile donatılmış IRTracer-100 FTIR spektrometresi (Shimadzu, Japonya) ile gerçekleştirilmiştir. Hücre süspansiyonunun 2 µl'lik miktarı (yaklaşık 1x106 hücre/ml), ATR kristali üzerinde yerleştirilmiştir ve [8]' de açıklandığı gibi, kuru hava temizleme koşulları altında yaklaşık 10 dakika kadar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Her kültürden alınan üçer numune bağımsız olarak ATR üstüne yetiştirilerek ölçülmüştür, bu şekilde ölçümler üçer kopya halinde gerçekleştirilmiştir (triplicate). Her ölçüm başına en az beş spektrum, 4000-800 cm^{-1} (orta-IR) spektral aralığında kaydedilmiştir. Her interferogram için 4 cm^{-1} spektral çözünürlükte toplam 128 tarama ortalaması alınmıştır. ATR kristali boş olduğunda hava spektrumu arka plan (background) olarak kaydedilmiştir.

FTIR veri işleme

Spektral önişlem, fark spektrumları ve Student t-testleri ile hiyerarşik küme analizi, MATLAB altında çalışan 'Kinetics' (Belçika'daki Université Librede Bruxelles, Prof. Dr. Erik Goormaghtigh tarafından sağlanmıştır) ile gerçekleştirilmiştir.

Spektral önişleme: FTIR spektrumları, spektrometre yazılım programı LabSolutions (Shimadzu, Japonya) ile kaydedildi. Spektral ön işleme ve görselleştirme amacıyla 'Kinetics' yazılımı şu şekilde kullanarak gerçekleştirilmiştir: Spektrumdaki atmosferik su buharı katkısı, 1562–1555 cm^{-1} referans pik olarak alınarak çıkarılmıştır. Daha sonra, spektrumlar tüm spektrum üzerinde baseline düzeltmesi yapılmış ve Amid II bölgesinde 1585 ve 1482 cm^{-1} arasında eşit alan için normalize edilmiştir.

Ortalama absorbans spektrumu: Her örnek tipi için tamamen ön işlem görmüş (baseline düzeltilmiş ve normalize edilmiş) absorbans spektrumlarının (her hücre koşulu için kaydedilen en az 15 spektrum) ortalaması alınmıştır.

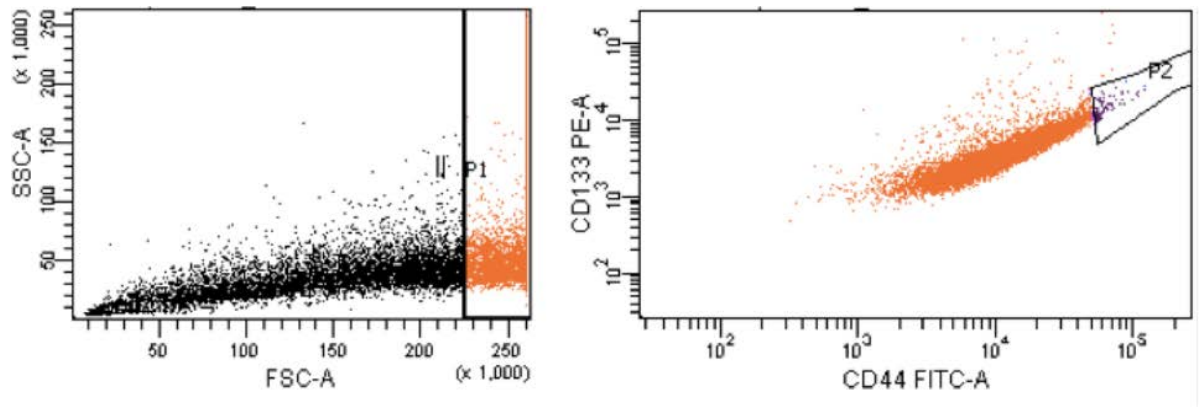
Kızılötesi fark spektrumları ve Student t-testi: Farklı koşullardaki hücrelerin fark spektrumlarını hesaplamak için, 2D-hücrelerinin ortalama absorbans spektrumu, 3D-hücrelerin ortalama absorbans spektrumundan çıkarılmış olup '(3D hücreler) - (2D hücreler)' şeklinde gösterilmiştir. Her bir hücre hattı durumunun spektrumları arasında istatistiksel bir karşılaştırma yapabilmek için, her dalga boyunda Student t-testi gerçekleştirildi. Burada, kırmızı noktalar, önemli farklanmaların meydana geldiği dalga sayılarında standart sapmaları göstermektedir (α = % 0,1 anlamlılık ile).

Hiyerarşik küme analizi (HCA): Tüm absorbans spektrumları için 3015-2800 ve 1800-800 cm^{-1} birleştirilmiş spektral aralığında kümeleme analizi gerçekleştirilmiştir. Böylece iki farklı yöntemle hazırlanan hücre hatları (2D ve 3D) arasındaki diskriminant karakteristikleri belirlenmiştir.

BULGULAR

Kanser kök hücrelerin FACS ile ayırımı

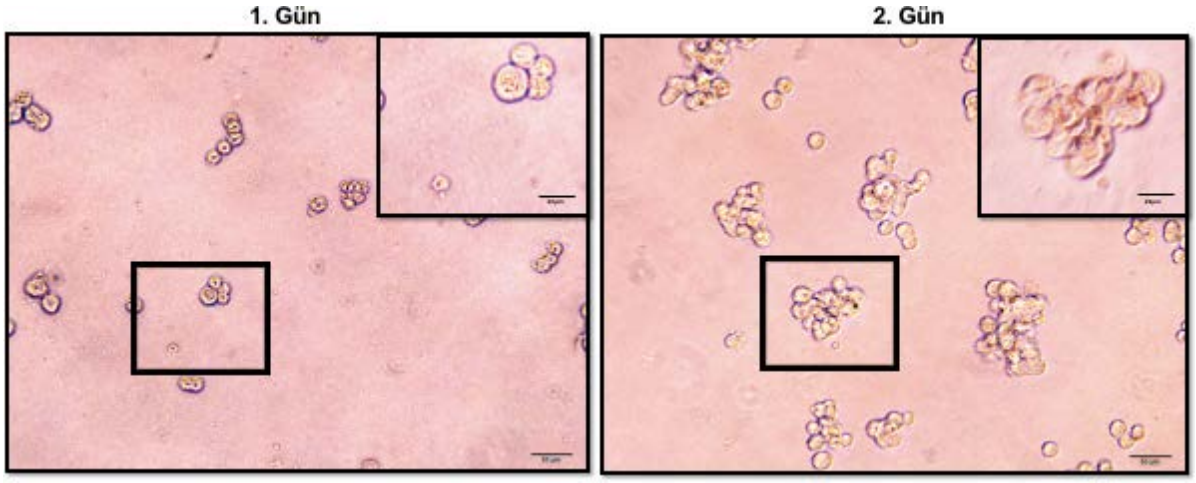
DU-145 insan prostat kanser hücreleri, hücre yüzey belirteci olan CD133 ve CD44 ifadesine dayalı olarak tanımlanıp izole edilmiştir. Hücreler CD133+/CD44+ popülasyon (sorted) olarak FACS ile ayrılmıştır (Şekil-1). Elde edilen kanser kök hücrelerinin saflığı CD133 ve CD44 antikorları ile test edilmiştir. Sort edilen hücrelerin oranı %0.5 olarak tespit edilmiştir. Akış sitometri analizlerini doğrulamak için, hücreler yeniden değerlendirilmiştir. Sonuçlar, sort işlemi sonrasında hücrelerin saflık oranlarının %90,3 arasında olduğunu göstermiştir.



Şekil-1. DU-145 insan prostat kanser hücre hattından izole edilen CD133+/CD44+ hücrelerin dağılımını gösteren akış sitometrisi.

DU-145 CD133+/CD44+ Hücrelerinin Sferoid Oluşumu

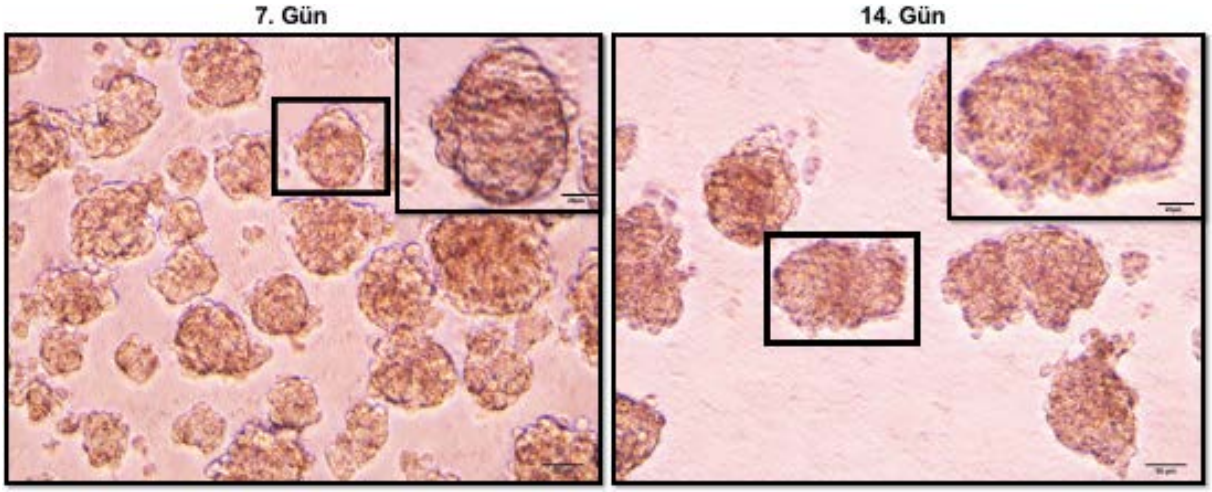
DU-145 CD133+/CD44+ tek hücre düşecek şeklinde resüspanse edildikten sonra kültür kaplarına ekilmiştir. Agar kaplı kuyucuklara 10.000 DU-145 CD133+/CD44+ hücreleri ekildikten sonra, 1 gün içinde bu hücrelerin kümeler şeklinde bir araya gelerek tekdüze mikro-agregatlar oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil-2). Bir araya gelen hücreler 2 günde sınırları belirgin olmayan, amorf kümeler oluşturmuştur (Şekil-2).



Şekil-2. DU-145 CD133+/CD44+ hücrelerinin 1. ve 2. günde oluşturduğu mikro-agregatlar (İnverted mikroskop, Scale bar: İç (20 μm); Dış (50 μm)).

Oluşan küremsi yapılar zaman içerisinde büyümeye devam ederek 7 gün sonra olgun sferoid yapıları oluşturmaya başlamıştır. Sferoid yapıları sınırları belirgin, yuvarlak şekilli morfolojik özellik sergilemiştir. Mikroskobik analizler sonuçları, oluşan sferoid yapılarının 120-150 μm arasında olduğunu göstermiştir. Multiselüler tümör sferoid (MSTS) yapılarında bölgelere göre değişik özellikler ile karakterize hücrelerin varlığı tespit edilmiştir. MSTS yapıların iç bölgelerinde koyu kahverengi alanların varlığı tespit edilmiştir. Dış kısımda yer alan hücrelerin

daha şeffaf olduğu görülmüştür (Şekil-3). 14 günün sonunda, 250-400 μm arasında değişen morfolojik olarak genellikle sınırlı tam olarak belirgin olamayan MSTS yapıları izlenmiştir (Şekil-3).

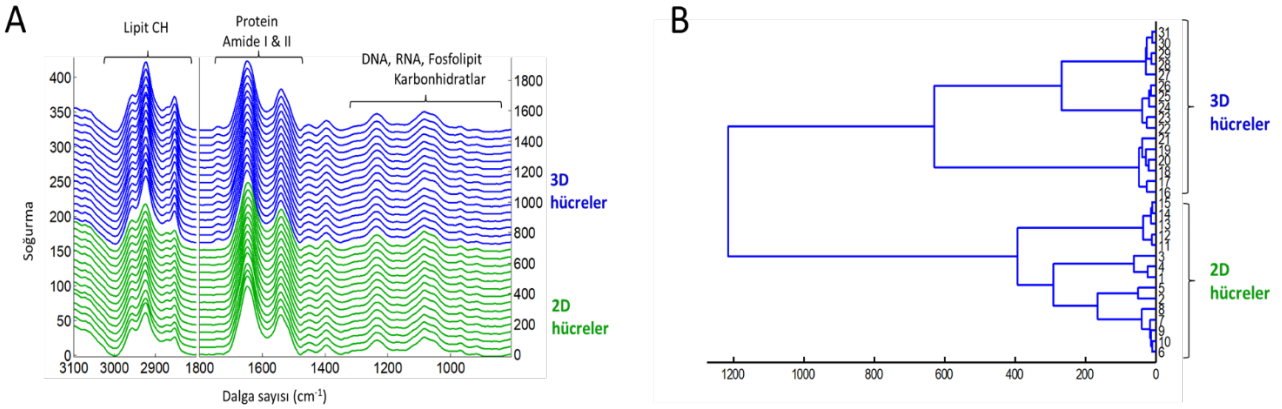


Şekil-3. DU-145 CD133+/CD44+ hücrelerinin 7. ve 14. günde oluşturduğu olgun sferoid yapıları (İnverted mikroskop, Scale bar: İç (20 μm); Dış (50 μm)).

2D ve 3D Ortamda Prostat Kanser Kök Hücrelerin FTIR Spektrumları

DU-145 insan prostat kanser kök hücrelerinin iki farklı hücre kültürü ortamında hazırlanan multiselüler tümör sferoidleri (3D) ve monolayer hücreleri (2D)'nin absorbans spektrumları 4000-800 cm^{-1} spektral aralığında kaydedilmiştir (Şekil-4A). Hücre içeriğindeki makromolekülleri oluşturan fonksiyonel grupların moleküler titreşimleri temel olarak üç bölgeye ayrılmaktadır. Atomlar arasındaki bağ titreşimlerinden kaynaklanan dalga sayılarına karşılık gelen fonksiyonel gruplar Tablo I'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Kısaca bahsedecek olursak, (1) 3015-2800 cm^{-1} spektral aralığındaki karakteristik absorbans bantları yoğunlukla lipit CH gruplarından kaynaklanırken, (2) Amid I (1700-1600 cm^{-1}) and Amid II (1600-1500 cm^{-1}) bantları ise protein ikincil yapılarından (örn. α-heliks, β-plakalı tabakalı yapı) meydana gelmektedir. (3) 1250-800 cm^{-1} spektral bölgedeki bantlar ise fosfolipitler ve nükleik asitlerin (DNA, RNA) fosfat grupları ile karbonhidrat ve oligosakkaritlerin COH ve CC gruplarından kaynaklanmaktadır [8, 13–17].

Hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) tüm absorbans spektrumları için 3015-2800 ve 1800-800 cm^{-1} birleştirilmiş spektral aralığında gerçekleştirilmiştir. HCA'da, iki farklı kültür ortamında hazırlanan hücrelerin FTIR spektrumları, spektral benzerliklere göre sınıflandırılmaktadır. Spektrumlar arasındaki değişkenlikler, heterojenlik değerleri ile tanımlanır. 'Kinetics' yazılımı tarafından otomatik olarak hesaplanan kümeler arasındaki yüksek heterojenlik değerleri, kümeler arasındaki yüksek farklılıkları göstermektedir. HCA grafiğinde (Şekil-4B) açıkça görüldüğü gibi, 3D ve 2D hücreler kendi grupları içerisinde heterojen pattern sergilemelerine rağmen, 3D hücrelerinin FTIR spektrumları 2D hücrelerinin spektrumlarından başarılı bir şekilde iki ayrı küme olarak sınıflandırılmıştır. Kümeleme analizi sonucunda elde edilen yüksek heterojenlik değerleri, 3D ve 2D hücreler arasında önemli derecede farklanmalar olduğunu göstermektedir. Hücre yapısındaki proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler (DNA, RNA) kümeleme analizinde rol alan önemli makromoleküllerdir.

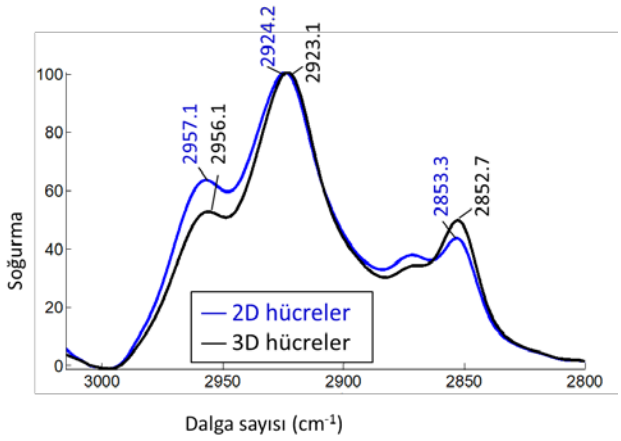


Şekil-4. (A) Üç boyutlu (3D) ve iki boyutlu (2D) prostat kanser kök hücrelerinin FTIR spektrumları. (B) Hiyerarşik kümeleme analizi. 3015-2800 ve 1800-800 cm-1 birleştirilmiş spektral aralığında absorbans spektrumları ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo I. Bağ titreşimlerinden kaynaklanan dalga sayıları ve karşılık gelen fonksiyonel gruplar [8, 13–17].

Dalga sayısı (cm^{-1})	**Moleküler titreşimler ve açıklamaları**	**Hücresel yapılar**
3010	Olefinik ν(=C-H)	Doymamış yağ asitleri
2958	$\nu_{as}(CH_3)$: asimetrik gerilme	Lipit, protein
2921	$\nu_{as}(CH_2)$: asimetrik gerilme	Lipit (çoğunlukla)
2872	$\nu_{s}(CH_3)$: simetrik gerilme	Lipit, protein
2852	$\nu_{s}(CH_2)$: simetrik gerilme	Lipit (çoğunlukla)
1742	Ester ν(C=O): gerilme	Lipit ester grupları (Fosfolipit, trigliserit, kolesterol)
1660, 1652	Protein ν(C=O): gerilme	Protein Amid I: α-heliks yapı
1685, 1635	Protein ν(C=O): gerilme	Protein Amid I: β-plakalı yapı
1540	Protein δ(N–H), ν(C–N): N-H bükülme, C-N gerilme	Protein Amid II: α-heliks yapı
1461	CH_2 makaslama	Lipit
1410-1370	$\nu_{s}(COO^-)$: simetrik gerilme; CH_3 bükülme	Amino asit anyonik karboksil grupları; protein, lipit
1256, 1225	$\nu_{as}(PO_2^-)$: asimetrik gerilme	Fosfolipitler, nükleik asitler (DNA, RNA)
1176	ν_{as}(CO-O-C): asimetrik gerilme	Fosfolipitler, trigliserit ve kolesterol esterleri
1147, 1032	C-O gerilme	Glikojen, karbonhidrat, oligosakkarit
1000-800	C-C, C-O, O-P-O gerilme	Nükleik asitlerin şeker-fosfat omurgası

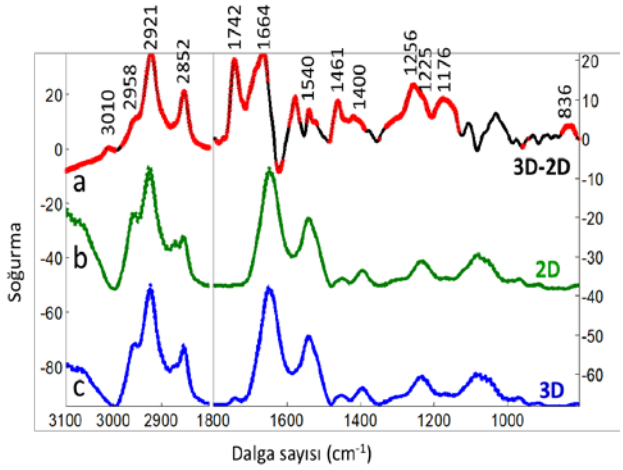
Lipit açil CH gruplarının 3000-2800 cm^{-1} spektral aralığındaki karakteristik absorbans bantları Şekil-5'de detaylı olarak dalga sayısı ile birlikte gösterilmektedir. Bu bölgenin incelenmesi, hücre zarı dinamiği, biyofiziksel özellikleri ile lipit miktarı ve kompozisyonu hakkında bilgi sağlar [18, 19]. Açıkça görüldüğü gibi, 3D-hücre ortamında hem CH_2 ve hem de CH_3 asimetrik ve simetrik gerilme vibrasyonlarından kaynaklanan bant pozisyonları düşük dalga sayısına kaymaktadır ($\nu_{as}(CH_3)$ için: 2957,1→2956,1 cm^{-1}; $\nu_{as}(CH_2)$ için: 2924,2→2923,1 cm^{-1}; $\nu s(CH_2)$ için: 2853,3→2852,7 cm^{-1}). Bu durum, prostat kanser kök hücrelerinin multiselüler tümör sferoidleri (3D) ortamında daha düzenli bir lipit yapısına hakim olduğunu göstermektedir. 2D monolayer hücreleri ile karşılaştırıldığında, 3D multiselüler tümör sferoidlerinde CH_2 asimetrik ve simetrik gerilmelerinden kaynaklanan IR absorbans değerleri CH3 sinyallerine oranla yüksektir. Bu durum, membrane lipit açil zincir uzunluğu ve membran kalınlığı ile ilişkilidir [20, 21]. Bizim çalışmamızda ise, membrane lipit uzunluğunun 3D sferoidlerde daha uzun olduğunu dolayısıyla, hücre zarının daha kalın olduğunu göstermektedir. Bunlara ek olarak, FTIR-fark spektrumuna bakıldığında (Şekil-6, spektrum a), lipit CH bantlarından gelen sinyallerin 3D-hücre ortamında daha yüksek absorbans değerine sahip olması lipit miktarında önemli derecede farklanmalar olduğunu belirtmektedir. Daha ayrıntılı bahsedecek olursak; 3D hücrelerin doymuş (3000-2800 cm^{-1}) ve doymamış (3010 cm^{-1}) yağ asitleri miktarında artış gözlenmektedir. Bunlara ek olarak, lipit ester C=O grupları (1742 cm^{-1}) ile trigliserit ve kolesterol esterlerinin (1176 cm^{-1}) IR absorbans değerlerindeki artış lipit kompozisyonunda da farklanmalar olduğunu ifade etmektedir.



Şekil-5. Üç boyutlu (3D) ve iki boyutlu (2D) prostat kanser kök hücrelerinin CH_2 and CH_3 lipit bantlarını gösteren FTIR spektrumları. Spektrumların karşılaştırması amacıyla, absorbans spektrumları CH_2 asimetrik gerilme bandına (~2923.1 cm^{-1}) göre maksimize edilmiştir.

FTIR-fark spektrumu, absorbans spektrumunda kolayca tespit edilemeyen küçük spektral değişimleri yakalamak için sıklıkla kullanılır. FTIR-fark spektrumu (Şekil-6, spektrum a), 2D-hücrelerin ortalama absorbans spektrumunun (Şekil-6, spektrum b), 3D-hücrenin ortalama absorbans spektrumundan (Şekil-6, spektrum c) digital ortamda çıkarılmasıyla elde edilmiş olup '(3D) - (2D)' şeklinde belirtilmiştir. Kırmızı renk ile belirtilen noktalar, önemli farklanmaların meydana geldiği dalga sayılarında standart sapmaları göstermektedir. 3D hücrelerinde lipit açil CH grupları (3015-2800 cm-1), lipit ester C=O grupları (1742 cm^{-1}), protein α-heliks ve β-plakalı yapılar (1685'de geniş omuz bandı, 1664 ve 1540 cm^{-1}), fosfodiester bağları (1260-1200 cm^{-1} ve 1062'de geniş omuz bandı), trigliserit ve kolesterol esterleri (1176 cm^{-1}), şeker ve/veya karbonhidrat yapıları (1200-950 cm^{-1}) ile nükleik asitlerin şeker-fosfat omurgası yapılarına (836cm^{-1}) karşılık gelen dalga sayılarında pozitif absorbans değerleri gözlenmektedir. Bu durum, 2D hücreleri ile karşılaştırıldığında, 3D hücrelerde proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler (DNA, RNA) gibi makromoleküler yapılarda belirgin derecede artış olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, prostat KKH 3D hücreleri ile 2D hücreleri arasında önemli derecede

biyokimyasal farklanmalar vardır. FTIR-fark spektrumu (Şekil-6, spektrum a) ile elde edilen bu bulgular, Şekil-4 ve Şekil-5'de gözlenen bulgular ile uyumluluk göstermektedir. Çalışmalar, 900-800 cm^{-1} spektral bölgenin incelenmesiyle, DNA oligonükleotitlerin baz sekanslarında veya fonksiyonel gruplarında biyolojik modifikasyonların bir sonucu olarak DNA şeker büzgecinde küçük fakat önemli değişiklikleri ortaya çıkarmayı mümkün kıldığını göstermiştir [22].



Şekil-6. 2D hücrelerin (b) ve 3D hücrelerin (c) ortalama absorbans spektrumları ile '3D-2D' şeklinde belirtilen FTIR-fark spektrumu (a) ve Student t-testi. FTIR-fark spektrumu, 2D-hücrelerin ortalama absorbans spektrumunun, 3D-hücrenin ortalama absorbans spektrumundan digital ortamda çıkarılmasıyla elde edilmiştir. Her bir dalga boyunda α =% 0,1'lik bir anlamlılık seviyesine sahip Student t-testi hesaplanmıştır. Spektrum üzerindeki kalın noktalı işaretler, istatistiksel olarak anlamlı farkları gösterir. Daha iyi okunabilirlik için spektrumlar dengelendi.

TARTIŞMA

Son yıllarda, kanser çalışmalarında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Buna rağmen, günümüzde kullanılan cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve güncel olan aşı tedavilerin yetersiz olduğu görülmektedir. Bunun en önemli nedenlerinden biri, kanserin kökü veya tohumu olarak nitelendirebileceğimiz kanser kök hücrelerinin hedeflenmemesinde kaynaklanmaktadır. KKH'leri tümör dokusunun oldukça küçük bir popülasyonunu oluşturmaktadır. KKH'leri sahip olduğu benzer özellikleri sayesinde tümörün gelişmesi, prognozu, relapsı ve metastazından sorumludur. Bu nedenle, etkili tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için KKH'lerinin ortadan kaldırılması gerekmektedir. KKH'lerinin sergilemiş olduğu karakteristik özelliklerin altında yatan biyolojik özelliklerin belirlenmesi önem arz etmektedir. Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda, iki ve üç boyutlu hücre kültür ortamlarında KKH'lerini farklı genetik özellikler sergilediği tespit edilmiştir [23]. Elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak hücre kültür ortam koşullarının KKH'lerdeki biyomoleküllerde de birtakım değişikliklere neden olabileceği hipotezi geliştirilmiştir. Bu çalışmada, iki ve üç boyutlu ortamlarda üretilen KKH'lerinin protein, lipit, karbonhidrat ve nükleik asit gibi temel moleküllerdeki değişimler ATR-FTIR yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmadaki FTIR sonuçlarına göre, üç boyutlu ortamdaki prostat kanser kök hücrelerinin hücre zarı lipit yapılarının daha düzenli olduğu, membrane lipitlerinin daha uzun olduğu ve hücre zarının daha kalın olduğu kanısına varılmaktadır. Ayrıca, bu hücrelerin toplam lipit miktarında (doymuş ve doymamış yağ asitleri) artış ve lipit kompozisyonunda farklanmalar gözlenmektedir. Bunlara ek olarak, 3D ortamda üretilen PKKH'lerinin protein α-heliks yapılarında ve nükleik asitlerde belirgin derecede artış gözlenmektedir. Bu durum, 3D PKKH'lerde hücre zarı dinamiğinin, lipit sentezinin ve protein ve gen ekspresyon seviyelerinin 2D hücrelerden önemli derecede farklı olduğunu göstermektedir.

KKH'lerin karakterizasyonu ve izolasyonunda sıklıkla hücre yüzey belirteçleri kullanılmaktadır. Prostat KKH'leri CD44, CD133, inegrinler, Sca-1 gibi değişik belirteçler kullanılarak izole edilmektedir [6]. Bu çalışmamızda, CD44 ve CD133 yüzey belirteçleri kullanılarak KKH'lerin birçok özelliğini karşılayabilen CD133+/CD44+ özelliğine sahip hücreler izole edilmiştir. CD44 yüzey belirteci kendini yenileme, tümör oluşumu, hücre adezyonu, ilaç direnci ve metastaz gibi önemli onkogenik süreçlerde rol oynamaktadır [24–26].

Çeşitli yöntemler ve materyaller kullanılarak yapılan üç boyutlu hücre kültür modelleri, in vivo fizyolojik

mikroçevreyi taklit ederek tümör hücrelerinin biyolojik özelliklerini daha iyi tanımlamak için yararlı bir platform sağlamaktadır [27]. Bu özellikler sayesinde, geleneksel tek tabakalı hücre kültürü ve in vivo kültür modellemeleri arasında önemli bir köprü görevi görmektedir. Tümör mikroçevresi prostat kanseri invazivliği, metastaz, ve radyoterapi ve kemoterapiye direnç ile ilişkilidir. Multiselüler tümör sferoidleri (MSTS) kültürleri prostat kanserinde kemoterapiye, radyoterapiye ve androjen ablasyonuna direnç mekanizmalarını aydınlatılması ve yeni terapötik hedeflerin keşfi için iyi bir modeldir [28]. KKH'leri tümör kitlesi içerisindeki diğer hücreler ile kıyaslandığında benzersiz özellikler sergilemektedir. MSTS'leri kanser hücrelerin terapiye direnç, invazyon, migrasyon ve metastaz gibi özelliklerin daha iyi değerlendirilmesine olanak verme potansiyeline sahiptir [29–32].

Kültür ortamları temelde, hücrelerin büyümesi için gerekli olan yapay ortamları sağlamaktadır. Başka bir ifadeyle, diğer hücreler dışında kalan bileşenleri içeren hücrelerin mikro-çevresi olarak da tanımlanabilir. Bu açıdan bakıldığında, hücrelerin üretmek için hazırladığımız ortamlar sadece büyümeyi değil, aynı zamanda biyolojik olarak hücrelerin nasıl bir davranış paterni sergileyeceğini de etkilemektedir. 2D kültür ortamları, hücre yapısını tek boyuta indirgediği için temelde hücrelerin polarize hallerini ve diğer hücrelere ile olan etkileşimlerini yansıtmamaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, 2D ortamları hücre içi veya hücre dışı dinamikler hakkında yeterli bilgi verememektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, 2D kültür ortamında üretilen kanser hücrelere kıyasla 3D kültür ortamında üretilen hücrelerin gen ve protein ifadelerinin, kök hücre karakteristiklerinin ve ilaç gibi değişik ajanlara verilen tepkilerin değiştiği rapor edilmiştir [23, 33–35].

Hücre zarı yapısı ve lipit bileşenlerindeki değişiklikler, iyon kanalları, taşıyıcılar, reseptörler, sinyal transdüktörleri ve enzim aktivitesi gibi hücresel fonksiyonları etkilemektedir. Literatür bilgileri hücrelerin malign transformasyonu sırasında lipit profilinde ve membran lipitlerin biyofiziksel özelliklerinde değişikliklerin meydana geldiğini göstermektedir. Membran lipitlerinin biyofiziksel özellikleri membran geçirgenliği, hücre iç/dış trafiği, ilaç direnci ve apoptoz gibi hücresel olaylarla ilişkilidir [36]. Bu çalışmada, farklı kültür ortamlarında üretilen hücrelerin lipit dinamiklerinin değiştiği gösterilmiştir.

TEŞEKKÜR

FTIR spektroskopi ölçümleri, Ege Üniversitesi İlaç Araştırma ve Geliştirme Merkezi ve Farmakokinetik Uygulamalar Merkezi'nde yapıldı. Bu çalışmada, FTIR spektrometresinin kullanımına izin verdiği için Prof. Dr. Ercüment Karasulu'ya ve temin edilen Kinetics' programı için Prof. Dr. Erik Goormaghtigh'e teşekkür ediyoruz.

KAYNAKLAR

1. Wong MCS, Goggins WB, Wang HHX et al. Global Incidence and Mortality for Prostate Cancer: Analysis of Temporal Patterns and Trends in 36 Countries. Eur Urol 2016;70:862–874.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2015;65:87–108.
3. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res 2016;1863:1238–1260.
4. Leão R, Domingos C, Figueiredo A, Hamilton R, Tabori U, Castelo-Branco P. Cancer stem cells in prostate cancer: Implications for targeted therapy. Urol Int 2017;99:125–136.
5. Chang JC. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. Medicine (Baltimore) 2016;95:S20-5.
6. Jaworska D, Król W, Szliszka E. Prostate cancer stem cells: Research advances. Int J Mol Sci 2015;16:27433–27449.
7. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. J Biotechnol 2010;148:3–15.
8. Güler G, Acikgoz E, Karabay Yavasoglu NÜ, Bakan B, Goormaghtigh E, Aktug H. Deciphering

the biochemical similarities and differences among mouse embryonic stem cells, somatic and cancer cells using ATR-FTIR spectroscopy. Analyst 2018;143(7):1624-1634.

9. Smolina M, Goormaghtigh E. Gene expression data and FTIR spectra provide a similar phenotypic description of breast cancer cell lines in 2D and 3D cultures. Analyst 2018;143(11):2520-2530.
10. Derenne A, Gasper R, Goormaghtigh E. The FTIR spectrum of prostate cancer cells allows the classification of anticancer drugs according to their mode of action. Analyst 2011;136:1134–41.
11. Gasper R, Mijatovic T, Bénard A, Derenne A, Kiss R, Goormaghtigh E. FTIR spectral signature of the effect of cardiotonic steroids with antitumoral properties on a prostate cancer cell line. Biochim Biophys Acta 2010;1802:1087–94.
12. Gazi E, Dwyer J, Gardner P et al. Applications of Fourier transform infrared microspectroscopy in studies of benign prostate and prostate cancer. A pilot study. J Pathol 2003;201:99–108.
13. Toyran N. Fourier Transform Infrared Microspectroscopy Technique: Review. Turkiye Klin J Med Sci 2008;28:704–714
14. Aksoy C, Severcan F. Role of Vibrational Spectroscopy in Stem Cell Research. Hindawi Publ Corp Spectrosc An Int J 2012;27:167–184
15. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I ur. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. Appl Spectrosc Rev 2008;43:134–179.
16. Diem M, Boydston-White S, Chiriboga L. Infrared Spectroscopy of Cells and Tissues: Shining Light onto a novel Subject. Appl Spectrosc 1999;53:148A–161A
17. Fabian H, Mäntele W. Infrared spectroscopy of proteins. In: Chalmers JM, Griffiths PR (eds) Handbook of Vibrational Spectroscopy. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2002;1–27.
18. Güler G, Gärtner RM, Ziegler C, Mäntele W. Lipid-Protein Interactions in the Regulated Betaine Symporter BetP Probed by Infrared Spectroscopy. J Biol Chem 2016;291:4295–307.
19. Korkmaz F, Köster S, Yildiz Ö, Mäntele W. The Role of Lipids for the Functional Integrity of Porin: An FTIR Study Using Lipid and Protein Reporter Groups. Biochemistry 2008;47:12126–12134.
20. Derenne A, Claessens T, Conus C, Goormaghtigh E. Infrared Spectroscopy of Membrane Lipids. In: Encyclopedia of Biophysics. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013;1074–1081.
21. Kumar S, Shabi TS, Goormaghtigh E. A FTIR imaging characterization of fibroblasts stimulated by various breast cancer cell lines. PLoS One 2014;9(11):e111137.
22. Banyay M, Sarkar M, Gräslund A. A library of IR bands of nucleic acids in solution. Biophys Chem 2003;104:477–488.
23. Oktem G, Bilir A, Uslu R et al. Expression profiling of stem cell signaling alters with spheroid formation in CD133(high)/CD44(high) prostate cancer stem cells. Oncol Lett 2014;7:2103–2109.
24. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. Stem Cells Transl Med 2015;4:1033–1043.
25. Li Z. CD133: A stem cell biomarker and beyond. Exp Hematol Oncol 2013;2:1.
26. Wang L, Zuo X, Xie K WD. The Role of CD44 and Cancer Stem Cells. Methods Mol Biol 2018;1692:31–42.
27. Lv D, Hu Z, Lu L, Lu H, Xu X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. Oncol Lett 2017;14:6999–7010.
28. Kurioka D, Takagi A, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Watanabe M. Multicellular spheroid culture models: Applications in prostate cancer

research and therapeutics. J Cancer Sci Ther 2011;3:60–65.

29. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. Cancer Sci 2017;108:283–289.

30. Xin L, Lukacs RU, Lawson DA, Cheng D, Witte ON. Self-Renewal and Multilineage Differentiation In Vitro from Murine Prostate Stem Cells. Stem Cells 2007;25:2760–2769.

31. Chambers KF, Mosaad EMO, Russell PJ, Clements JA, Doran MR. 3D cultures of prostate cancer cells cultured in a novel high-throughput culture platform are more resistant to chemotherapeutics compared to cells cultured in monolayer. PLoS One 2014;9(11):e111029.

32. Bielecka ZF, Maliszewska-Olejniczak K, Safir IJ, Szczylik C, Czarnecka AM. Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research. Biol Rev 2017;92:1505–1520.

33. Riedl A, Schlederer M, Pudelko K et al. Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT–mTOR–S6K signaling and drug responses. J Cell Sci 2017;130:203–218.

34. Stankevicius V, Kunigenas L, Stankunas E et al. The expression of cancer stem cell markers in human colorectal carcinoma cells in a microenvironment dependent manner. Biochem Biophys Res Commun 2017;484:726–733.

35. Mosaad EO, Chambers KF, Futrega K, Clements JA, Doran MR. The Microwell-mesh: A high-throughput 3D prostate cancer spheroid and drug-testing platform. Sci Rep 2018;8:1–12.

36. Peetla C, Vijayaraghavalu S L V. Biophysics of Cell Membrane Lipids in Cancer Drug Resistance: Implications for Drug Transport and Drug Delivery with Nanoparticles. Adv Drug Deliv Rev 2013;65:1686–1698.