

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

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

Günnur GÜLER¹, Eda AÇIKGÖZ², Gülperi ÖKTEM³

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

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

³Ege 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 kültürlerle 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 KKH 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 KKH hücre yapısındaki proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerde (DNA, RNA) önemli derecede farklılıklar olduğunu göstermiştir. Membran lipit açıl zincir uzunluğu ve hücre zarı kalınlığı, proteinlerin sekonder yapıları ve DNA oligonükleotitlerin baz sekanslarında veya fonksiyonel gruplarında önemli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 3D kültür ortamında üretilen sferoid 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>

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 erkeklerdeki 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 yılda 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 laboratuvarında 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 gerektirmemesi (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 CO₂'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 gözlemlendiğinde 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-FTIC ve 10 µl CD44-APC eklenerek +4°C'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 olacak şekilde paylaştırılmış ve donması için +4°C'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 NaCl) üç defa yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra, hücreler NaCl 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 süspanسیونunun 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 ön işleme, fark spektrumları ve Student t-testleri ile hiyerarşik küme analizi, MATLAB altında çalışan 'Kinetics' (Belçika'daki Université Libre de Bruxelles, Prof. Dr. Erik Goormaghtigh tarafından sağlanmıştır) ile gerçekleştirilmiştir.

Spektral ön işleme: 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.

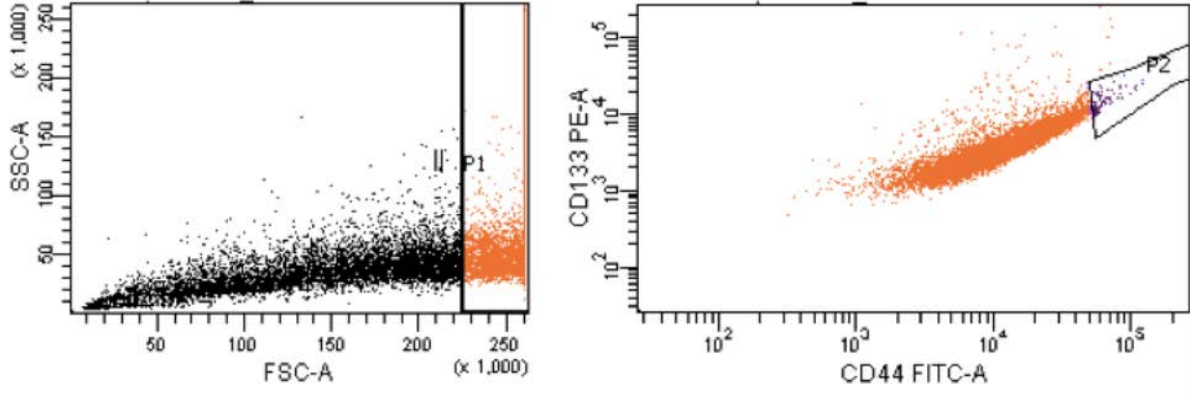
Kızılötesi fark spektrumları ve Student t-testi: Farklı koşullardaki hücrelerin fark spektrumlarını hesaplamak için, 2D-hücrelerinin ortalama absorbans spektrumu, 3D-hücrelerin ortalama absorbans spektrumundan çıkarılmış olup '(3D hücreler) - (2D hücreler)' şeklinde gösterilmiştir. Her bir hücre hattı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

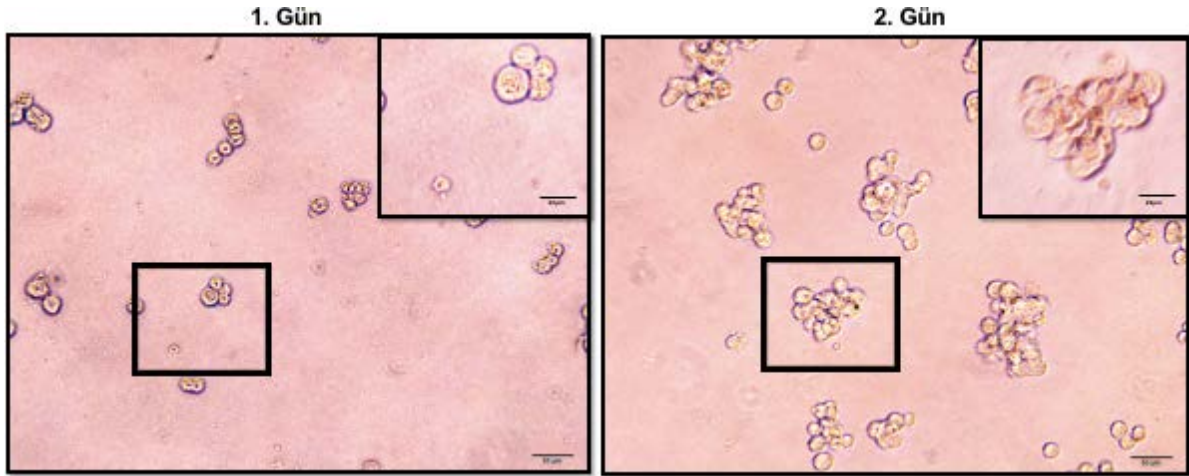


Şekil-1. DU-145 insan prostat kanser hücre hattından izole edilen CD133+/CD44+ hücrelerin dağılımını gösteren akış sitometrisi.

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).



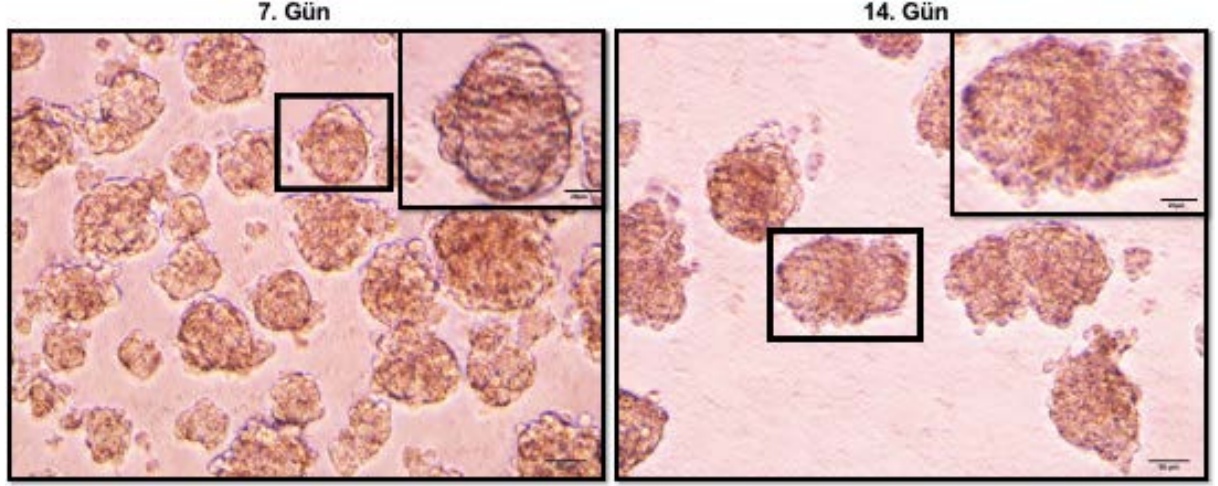
Şekil-2. DU-145 CD133+/CD44+ hücrelerinin 1. ve 2. günde oluşturduğu mikro-agregatlar (İnverted mikroskop, Scale bar: İç (20 µm); Dış (50 µm)).

Oluşan küresel yapılar zaman içerisinde büyümeye devam ederek 7 gün sonra olgun sferoid yapıları oluşturmaya başlamıştır. Sferoid yapıları sınırları belirgin, yuvarlak şekilli morfolojik özellik sergilemiştir. Mikroskopik 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 olmayan MSTs yapıları izlenmiştir (Şekil-3).

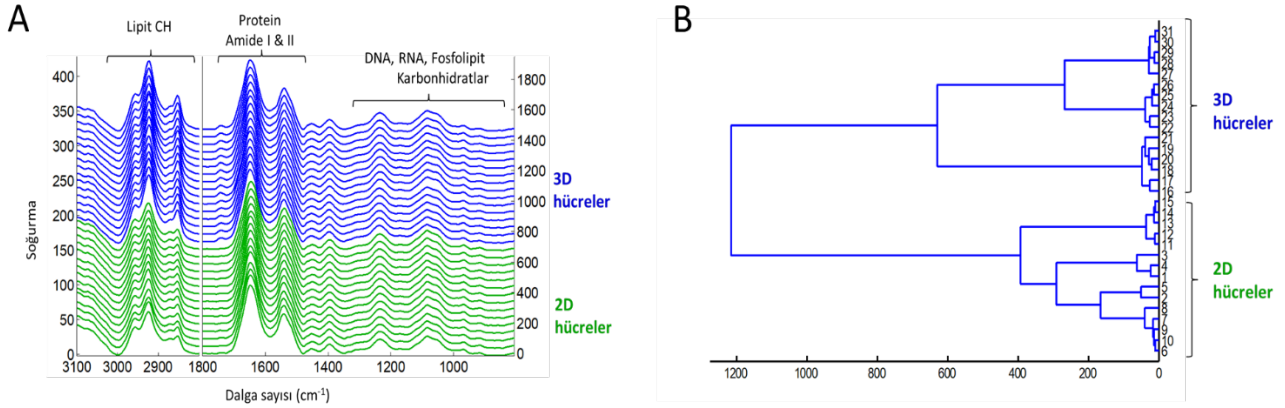


Şekil-3. DU-145 CD133+/CD44+ hücrelerinin 7. ve 14. günde oluşturduğu olgun sferoid yapıları (İnverted mikroskop, Scale bar: İç (20 µm); Dış (50 µm)).

2D ve 3D Ortamda Prostat Kanseri Kök Hücrelerinin FTIR Spektrumları

DU-145 insan prostat kanser kök hücrelerinin iki farklı hücre kültürü ortamında hazırlanan multiselüler tümör sferoidleri (3D) ve monolayer hücreleri (2D)'nin absorptans 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 1'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Kısaca bahsedecek olursak, (1) 3015-2800 cm^{-1} spektral aralığındaki karakteristik absorptans 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 absorptans 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 farklılıklar olduğunu göstermektedir. Hücre yapısındaki proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler (DNA, RNA) kümeleme analizinde rol alan önemli makromoleküllerdir.

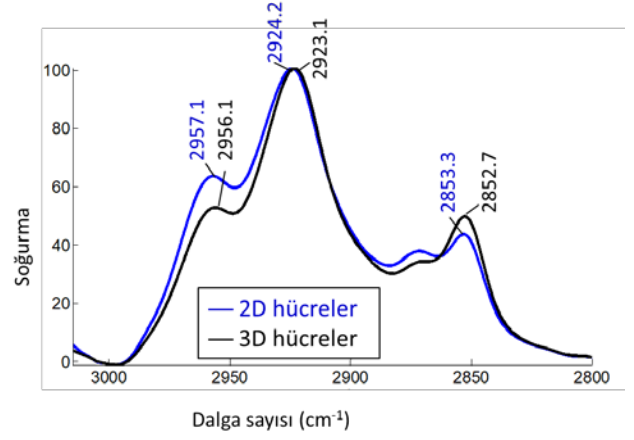


Şekil-4. (A) Üç boyutlu (3D) ve iki boyutlu (2D) prostat kanser kök hücrelerinin FTIR spektrumları. (B) Hiyerarşik kümeleme analizi. 3015-2800 ve 1800-800 cm^{-1} birleştirilmiş spektral aralığında absorpsiyon spektrumları ile gerçekleştirilmiştir.

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

Dalga sayısı (cm^{-1})	Moleküler titreşimler ve açıklamaları	Hüresel yapılar
3010	Olefinik $\nu(\text{C}=\text{H})$	Doymamış yağ asitleri
2958	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$: asimetric gerilme	Lipit, protein
2921	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$: asimetric gerilme	Lipit (çoğunlukla)
2872	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$: simetric gerilme	Lipit, protein
2852	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$: simetric gerilme	Lipit (çoğunlukla)
1742	Ester $\nu(\text{C}=\text{O})$: gerilme	Lipit ester grupları (Fosfolipit, trigliserit, kolesterol)
1660, 1652	Protein $\nu(\text{C}=\text{O})$: gerilme	Protein Amid I: α -heliks yapı
1685, 1635	Protein $\nu(\text{C}=\text{O})$: gerilme	Protein Amid I: β -plakalı yapı
1540	Protein $\delta(\text{N}-\text{H})$, $\nu(\text{C}-\text{N})$: N-H bükülme, C-N gerilme	Protein Amid II: α -heliks yapı
1461	CH_2 makaslama	Lipit
1410-1370	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$: simetric gerilme; CH_3 bükülme	Amino asit anyonik karboksil grupları; protein, lipit
1256, 1225	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$: asimetric gerilme	Fosfolipitler, nükleik asitler (DNA, RNA)
1176	$\nu_{\text{as}}(\text{CO}-\text{O}-\text{C})$: asimetric 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

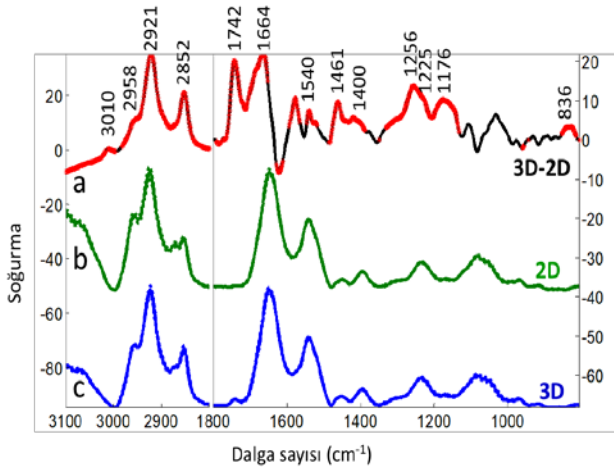
Lipit açıl CH gruplarının 3000-2800 cm^{-1} spektral aralığındaki karakteristik absorptans bantları Şekil-5’de detaylı olarak dalga sayısı ile birlikte gösterilmektedir. Bu bölgenin incelenmesi, hücre zarı dinamiği, biyofiziksel özellikleri ile lipit miktarı ve kompozisyonu hakkında bilgi sağlar [18, 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 ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ için: 2957,1→2956,1 cm^{-1} ; $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ için: 2924,2→2923,1 cm^{-1} ; $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ 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 absorptans değerleri CH_3 sinyallerine oranla yüksektir. Bu durum, membrane lipit açıl 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 absorptans değerine sahip olması lipit miktarında önemli derecede farklılıklar 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 $\text{C}=\text{O}$ grupları (1742 cm^{-1}) ile trigliserit ve kolesterol esterlerinin (1176 cm^{-1}) IR absorptans değerlerindeki artış lipit kompozisyonunda da farklılıklar 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, absorptans spektrumları CH_2 asimetrik gerilme bandına ($\sim 2923.1 \text{ cm}^{-1}$) göre maksimize edilmiştir.

FTIR-fark spektrumu, absorptans spektrumunda kolayca tespit edilemeyen küçük spektral değişimleri yakalamak için sıklıkla kullanılır. FTIR-fark spektrumu (Şekil-6, spektrum a), 2D-hücrelerin ortalama absorptans spektrumunun (Şekil-6, spektrum b), 3D-hücrenin ortalama absorptans spektrumundan (Şekil-6, spektrum c) digital ortamda çıkarılmasıyla elde edilmiş olup '(3D) - (2D)' şeklinde belirtilmiştir. Kırmızı renk ile belirtilen noktalar, önemli farklılıkların meydana geldiği dalga sayılarında standart sapmaları göstermektedir. 3D hücrelerinde lipit açıl CH grupları (3015-2800 cm^{-1}), lipit ester $\text{C}=\text{O}$ 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 (836 cm^{-1}) karşılık gelen dalga sayılarında pozitif absorptans 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 absorpsiyon spektrumları ile '3D-2D' şeklinde belirtilen FTIR-fark spektrumu (a) ve Student t-testi. FTIR-fark spektrumu, 2D-hücrelerin ortalama absorpsiyon spektrumunun, 3D-hücrenin ortalama absorpsiyon spektrumundan dijital ortamda çıkarılmasıyla elde edilmiştir. Her bir dalga boyunda $\alpha = \% 0,1$ '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 nitelendirilebileceğimiz 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, lipid, 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 lipid yapılarının daha düzenli olduğu, membrane lipidlerinin daha uzun olduğu ve hücre zarının daha kalın olduğu kanısına varılmaktadır. Ayrıca, bu hücrelerin toplam lipid miktarında (doymuş ve doymamış yağ asitleri) artış ve lipid 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, lipid 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 indirmediği 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 hücrel 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 hücrel 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 cardiotoxic 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, Shiraiishi 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, Schleder 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.