

Melanoma hücrelerinde epoksomisinin indüklediği apoptozis sürecinde gerçekleşen erken spektral değişikliklerin belirlenmesi

Determination of early spectral changes in melanoma cells during epoxomicin-induced apoptotic process

Ertan KÜÇÜKSAYAN¹ (ID), Aslınur SIRCAN KÜÇÜKSAYAN² (ID)

ÖZET

Amaç: Hücrelerde apoptozis sürecinde meydana gelen spektral değişikliklerin belirlenmesi yeni tedavi ve ilaç araştırmalarına önemli bilgiler sağlayabilir. Apoptotik hücreler, hücre küçülmesi ve parçalanmasına yol açan bir dizi hücre altı değişikliğe uğrar. Apoptotik süreçte bu değişimlerin erken aşamada zamana bağlı olarak belirlenmesi hücre kültürü çalışmalarına yeni bir yön verebilir. Bu çalışmanın amacı melanoma hücrelerinin apoptozis sürecinde erken aşamada meydana gelen spektral değişikliklerin zamana bağlı olarak belirlenebileceği bir yöntem geliştirmektir.

Yöntem: Bu çalışmada A375 melanoma hücre hattında apoptozisi indüklemek için epoksomisin (Epo) kullanılmıştır ve apoptotik doz MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Erken apoptotik sürecinin zamana bağlı değerlendirilebilmesi için sabit Epo dozuyla beş farklı zaman noktasında (0.5-6 saat) ölçümler yapılmıştır. Apoptozisin en önemli uyararı olan ROS ölçümü DCFH-DA yöntemi ile yapılmıştır. Western Blot tekniği ile Bax miktarı belirlenmiştir. Geri yansıma spektroskopisi sistemi ile ölçülen spektrumlardan spektroskopik apoptozis indeksi belirlenmiştir.

ABSTRACT

Objective: Determining the changes in the apoptosis process in cells can provide important information for new treatment and drug research. Apoptotic cells undergo a series of subcellular changes that lead to cell shrinkage and fragmentation. Determining these early changes in the apoptotic process depending on time may provide a new perspective to cell culture studies. The aim of this study is to develop a method in which early spectral changes occurring in the apoptosis process of melanoma cells can be determined depending on time.

Methods: In this study, epoxomicin (Epo) was used to induce apoptosis in A375 melanoma cell line and apoptotic dose was determined by MTT method. In order to evaluate the early apoptotic process in a time-dependent manner, measurements were made at five different time points (0.5-6 hours) with a fixed Epo dose. DCFH-DA method was used to measure ROS, which is the most important stimulus of apoptosis. Bax amount was determined by Western Blot technique. Spectroscopic measurements were made with a back-reflection spectroscopy experiment setup consisting of spectrometer, tungsten-halogen light source and fiber optic probe. Apoptosis index values were determined from spectra.

¹Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Alanya, Antalya

²Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Alanya, Antalya



İletişim / Corresponding Author : Ertan KÜÇÜKSAYAN

Alanya Alaaddin Keykubat Üni. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AD., Alanya, Antalya - Türkiye

E-posta / E-mail : ertankucuksayan@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 15.12.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 18.04.2021

Bulgular: Melanoma hücrelerinin apoptozis süresinde ölçülen spektrumlar ile erken spektral değişiklikler belirlenmiştir. ROS ölçümlerinde 2., 4. ve 6. saat ölçümlerinde kontrole göre anlamlı fark bulunmuştur. Hücre canlılığının 24 saat sonra 75 ve 100 nM Epo dozlarında kontrole göre %70 azaldığı bulunmuştur. Apoptozisin bir göstergesi olarak tüm Epo gruplarında zamana bağlı olarak Bax seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Spektroskopik apoptozis indeks değeri tüm gruplarda ROS ve Bax sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Sonuç: Hücre kültüründe apoptozis sürecinde erken aşamada meydana gelen spektral değişikliklerin geri yansıma spektroskopisi ile belirlenebileceği yeni bir yaklaşım sunulmuştur. Bu yaklaşımın hücre kültürü çalışmalarında apoptozisi hücre kültürü koşullarına müdahale etmeden, zamana bağlı olarak izleyebilen bir yöntem olarak geliştirilme potansiyeli vardır.

Anahtar Kelimeler: Geri yansıma spektroskopisi, apoptozis, epoksomisin, melanoma

Results: Early spectral changes were determined with the spectra measured in the apoptosis time of melanoma cells. A significant difference was found in ROS measurements at 2, 4 and 6 hours compared to control. Cell viability was found to be 70% lower than control at 75 and 100 nM Epo doses after 24 hours. Time-dependent Bax levels were found to increase in all Epo groups as an indicator of apoptosis. Spectroscopic apoptosis index value was found to be compatible with ROS and Bax results at all groups.

Conclusion: A new approach has been presented in which spectral changes occurring in the early stage of the apoptosis process in cell culture can be determined by back reflection spectroscopy. This approach has the potential to be developed in cell culture studies as a method that can monitor apoptosis over time without interfering with cell culture conditions.

Key Words: Back reflection spectroscopy, apoptosis, epoxomicin, melanoma

GİRİŞ

Homeostazisin korunması, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki denge ile sağlanır. Apoptozis, homeostazide önemli bir rol oynayan programlanmış, inflamatuvar olmayan, fizyolojik bir hücre ölümü şeklidir. Apoptozis sırasında çok sayıda biyokimyasal mekanizmanın gerçekleşmesine paralel olarak hücre morfolojisinde karakteristik değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler hücre tipine, apoptozis indüksiyon mekanizmasına ve apoptozis sürecinin analiz edildiği zaman noktasına bağlı olarak değişir (1). Apoptozis sürecinin iyi anlaşılması, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasında dengesizlik gösteren kanser gibi hastalıkların terapötik tedavisinin potansiyel olarak yeni hedeflerine işaret edecektir (2-8). Kanser araştırmalarında apoptozisin başlatılması

hedeflenir ve meydana gelen değişikliklerin belirlenir (9, 10). Dolayısıyla apoptozis sürecinde erken aşamada gerçekleşen değişikliklerin belirlenebileceği yeni yöntemlerin araştırılması oldukça önemlidir.

Hücre içinde oluşan anormal proteinler veya zamanla oluşan istenmeyen proteinler, ubikitinlerle işaretlenir ve proteazom kompleksi aracılığıyla yıkılır (11). Epoksomisin (Epo) in vivo ve in vitro olarak anti-inflamatuar etkinliği iyi bilinen hücre içine geçebilen selektif irreversible bir proteazom inhibitörüdür ve çeşitli etki mekanizmaları ile ubikitin proteazom yolağını proteazom üzerinden inhibe etmektedirler (12). Proteazom inhibitörleri birçok çalışmada kanser hücrelerine karşı yeni bir tedavi seçeneği olarak denenmektedir (13).

Apoptozis sırasında meydana gelen morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler, hücre kültürlerinde apoptozisi tespit etmeye yönelik mevcut yöntemlerin temelini oluşturur. Apoptotik süreçler birkaç saat gibi kısa bir sürede gelişebilir ve kullanılan yöntem ve örnekleme süresine bağlı olarak tespit etmek zor olabilir. Hücre ölümü miktarını ve türünü ölçerken, yöntem seçimi kritik önem sahiptir ve elde edilen sonuçları etkileyebilir. Farklı saptama yöntemleri kullanan çok sayıda apoptozis belirleme kiti bulunmaktadır. Hücre canlılığını değerlendirmenin en basit ama yolu, dikkatli mikroskopik incelemesidir. İverted mikroskop ile hücre kültürü ortamındaki hücreler incelenecek ölü hücreler kantitatif olarak belirlenebilir. Hücreleri hemasitometre ile saymak, hücre ölümünü ölçmenin en temel yöntemidir. Bu yöntemde, hücre süspansiyonu PBS içinde eşit hacimde %0.01 tripan mavisi ile karıştırılır. Ancak apoptotik nekrotik hücre ayrımı yapılamaz. Floresan mikroskop kullanılarak apoptotik ve nekrotik hücreler arasında daha iyi ayrım sağlayan bir protokol kullanılabilir. Bu teknikle bir hücre süspansiyonu, floresan DNA bağlayıcı boyalarla karıştırılır ve saymak için floresan mikroskopu ile incelenir. Akış sitometrisi ile hücreler fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre analiz edilir ve apoptozisi belirlemenin ideal yöntemidir (14). Annexin V veya propidyum iyodür gibi işaretçilerin kullanıldığı ve hücrelere gönderilen ışığın ileri yönlü saçılma (forward scatter) miktarının ölçülmesi prensibiyle çalışan bir yöntemdir (15). Apoptozisi belirlemeye yönelik mevcut tüm yöntemler, hücreleri sabitlemek ve boyamak için bir eksojen ajanın eklenmesini ve / veya hücre kültürü ortamına fiziksel veya kimyasal etki edilmesini gerektirir. Bu yöntemler maliyet ve hücre kayıpları gibi dezavantajlara sahip olmalarının yanı sıra belirli bir zaman noktasındaki değerlendirme ile sınırlıdır. Apoptozisi belirlemenin en ideal yolu hücrelerin kültürü ortamına müdahale etmeden ve hızlı bir şekilde apoptotik sürecin değerlendirilmesidir.

Son yıllarda hücre kültürü çalışmalarında apoptozis sürecini daha uzun süreli in vivo ve noninvasif ölçümler ile değerlendirme hedefiyle optik yöntemler

geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır (16, 17). Geri yansıma spektroskopisi yöntemi ile ölçüm yapılan numunenin optik özellikleri belirlenebilir (18). Bu yöntem ile ölçülen spektrumlar, ölçüm alınan numune hakkında bilgi veren, ışığın saçılımı ve absorpsiyonuna bağlı bir sinyaldir (19, 20). Numuneye gönderilen ışık, numunedeki parçacıkların boyutuna, şekline, ışığı kırma indisine bağlı olarak belirli açılar ile saçılır (21). Geri Yansıma Spektroskopisi, hücrelerdeki kırılma indisi değişiminden dolayı elastik olarak saçılan fotonların oluşturduğu geri yansıma sinyaline dayanır (22).

Apoptozisle ilgili hem biyokimyasal hem de morfolojik değişimler diğer hücre ölüm mekanizmalarından farklıdır. Apoptotik hücreler, hücre küçülmesi ve hücrenin parçalanmasına yol açan bir dizi hücre altı değişikliğe uğrar. Geri yansıma spektroskopisi bu hücre altı düzeydeki mikro değişimlere duyarlıdır. Apoptotik süreçte bu değişimlerin erken aşamada zamana bağlı olarak belirlenmesi hücre kültürü çalışmalarına yeni bir yön verecektir. Bu çalışmanın amacı melanoma hücrelerinin apoptozis sürecinde erken aşamada meydana gelen spektral değişikliklerin zamana bağlı olarak geri yansıma spektroskopisi ile belirlenebileceği bir yöntem geliştirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre Kültürü ve Deney Grupları

A375 malin melanoma hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 units/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin ve 1 mM glutamin içeren DMEM'de (Dulbecco's modified Eagle's medium), 37°C, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe standart hücre kültürü tekniği ile çoğaltılmıştır.

MTT ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Melanoma hücrelerinde uygun apoptozis dozunu belirlemek için Epoksomisin (5-100 nM) doz aralığında uygulandı. Hücrelerin petrilere ekilmesinden sonra

medyum atılarak, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 nM dozlarda Epo içeren medyum kuyulara uygulandı. Kontrol sadece melanoma hücrelerini içeren ve Epo uygulaması yapılmayan gruptur. Hücreler, belirlenen dozlardaki Epo ile petrilere metotlara uygun inkübasyon sürelerinde 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi ve 24 saat sonunda ve MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür] testi yapıldı.

Bu yöntemde MTT formazana indirgenir, bu reaksiyon ile oluşan renk kolorimetrik olarak ölçüldü. Canlı hücrelerin tetrazolyum ile formazan oluşturması temeline dayanır ve oluşan renk değişimi absorban ölçümü ile belirlendi. Bunun için A375 hücreleri petrilere 1x10⁴ hücre olacak şekilde ayarlanarak ekildi ve yapışmaları için bir gece bekledi. Hücreler 5-100 nM dozlardaki Epo ile 96 kuyucuklu plakada 24 saat süresince inkübe edildikten sonra medyumlar atıldı. Taze medyum kuyucuklara eklenerek çalışılan her kuyucuğuna 0.5 mg/ml MTT içeren eklendi ve 4 saat 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon sürecinin sonunda kuyucukların dibinde formazan kristalleri görüldü ve 200 µL dimetil sülfoksit eklendi Pipetaj yapılarak karıştırıldı ve absorban ölçümü için uygun homojen mavi bir solüsyon meydana gelmesini sağladı. Daha sonra bir saat içinde, 570 nm dalga boyunda, ELISA plak okuyucusunda ölçüm yapıldı. Sadece hücre (kontrol) veya Epo uygulanmış hücre içeren kuyuların absorban değerlerinden, hücre içermeyen kuyuların absorban değerleri çıkartıldı. Yaşayan hücre yüzdesi; kontrol grubunun absorban değerlerinin ilaçla inkübe edilen hücrelerin absorban değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar % canlılık olarak ifade edildi. Deneyler üç kere tekrarlandı ve her gruptan üç örnek çalışıldı.

Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi

Apoptozisin en önemli uyarıcı olan ROS olduğundan dolayı hücre içinde inkübasyon sonunda oluşan ROS

miktarı, DCF (2',7'-dichlorofluorescein)'nin floresans özelliğinden yararlanarak hesaplanmıştır. Bunun için A375 hücreleri 6 kuyulu plak içerisine 25 x 10⁴ hücre olacak şekilde ekildi ve bir gece hücrelerin yapışması için bekletildi. Hücreler 100 nM Epo ile 6 kuyulu plak 0.5, 1, 2, 4, 6 saat süresince inkübe edildikten sonra medyumlar atıldı ve hücreler PBS yıkandı. Son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde DCFH₂-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) boyası eklendi, 30 dakika boyunca karanlıkta 37 °C inkübatörde bekletildi. Daha sonra 10 dakika 500xg'de santrifüj edildi. Hücrelerde ROS ile oluşan DCF, 20X büyütme ile floresans mikroskopta incelendi. Bu ölçüm tüm gruplarda en az üç kere yapıldı. Daha sonra fotoğrafı çekilen hücrelerin hücre canlılığı Image j programı yardımıyla analiz edildi. Sonuçlar ilaç uygulanmayan kontrol grubuna oranlanarak verildi.

Apoptozisin Western Blot ile Belirlenmesi

Epo hücrede birçok apoptotik yolu aktive edebilir. Bax mitokondriyal membran geçirgenliği, mitokondriyal fonksiyon ve Cyt-c salınımının etkisini düzenlemede anahtar rol oynar (9). Bax seviyelerinin artışı apoptozisin uyarıldığını gösterebilir. Bu yüzden apoptotik marker olarak Bax'ı seçtik. A375 insan melanom hücreleri 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerde (0.5-6 saat) yapılan inkübasyonlardan sonra hücreler kazandıktan sonra iki kez PBS ile yıkandı ve santrifüj edildi. Hücre pelletleri, RİPA tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli içeren tamponda liziz edildi. Buz üzerinde 30 dakika inkübasyondan sonra süpernatantlar, 4°C'de 10 dakika 23.000 x g'de santrifüj edildi. Bradford yöntemi, protein konsantrasyonlarını belirlendi. 30 µg protein içeren numuneler Western Blot yöntemi ile analiz edildi. Proteinler, SDS-PAGE jelleri üzerinde ayrıldı ve PVDF membranlarına aktarıldı. Membranların oda sıcaklığında en az bir saat bloking tamponu (% 5 yağsız kuru süt, 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl ve % 0.1 Tween-20) ile inkübe edilmesiyle spesifik olmayan protein bağlanması önlenildi. Daha sonra membranlar, 1:1.000 oranında seyreltilen Bax spesifik birincil antikolarla

bir gece boyunca 4 °C’de inkübe edildi. Membranlar daha sonra peroksidaz ile konjuge ikincil antikolar (1:10,000) 1 saat inkübe edildi. İmmünoblotların dansitometrik analizinde ECL reaktifi ve Syngene GBox görüntüleme cihazı kullanıldı. Görüntüler Image j programı yardımıyla analiz edildi. Sonuçlar ilaç uygulanmayan kontrol grubuna ve B-Aktin’e oranlanarak verildi.

Spektroskopik Ölçümler

Geri yansıma spektrumu ölçümleri, spektrometre, fiber optik prob, ışık kaynağı ve bir dizüstü bilgisayardan oluşan bir deney düzeneği ile yapıldı. Bu ölçümlerde ışık kaynağı olarak tungsten-halojen lamba (Ocean Optics, Inc. Florida, ABD), spektroskopik veriler için 400 ile 850 nm arasındaki dalga boyuna duyarlı, USB2000 model, spektrometre (Ocean Optics, Inc. Florida, ABD) kullanıldı. Spektrometreden gelen veriler bilgisayardaki yazılım (OoIbase32 Platinum, Ocean Optics, Inc, Florida, USA) ile analiz edilmiştir. Numuneye ışığı göndermek ve toplamak için dairesel geometriye sahip bir fiber optik prob kullanıldı. Optik probta altı tane dedektör fiber, bir tane kaynak fiberinin çevresine simetrik ve dairesel bir yapıda yerleştirilmiştir. Tüm fiberlerin çapları 400 µm dir ve probun ucunda birbirlerine bitişik olarak konumlandırıldı. Spektrumlar, Igor Pro 8.04 teknik grafik ve veri analizi programı ile işlendi.

Spektroskopik ölçümlerden önce, fiber bağlantıları ile ara yüzeylerde meydana gelen yansımaları ve tungsten halojen lambanın spektral dağılımının etkisini kaldırmak için kalibrasyon yapıldı (23). Kalibrasyondan sonra ölçümler siyah zemin üzerinde, probun hazırlanan hücre kültürü numune tüpünde 2-3 mm derinliğe daldırılması ile yapıldı. Her ölçüm sonrasında kalibre edilmiş spektrum daha önceki çalışmalarda açıklandığı gibi hesaplandı (24, 25). Kontrol ve farklı sürelerde (0.5-1 sa) 100 nM Epo ile inkübe edilen hücrelerden oluşan Epo gruplarının her birinden 8 defa geri yansıma spektrumu ölçüldü ve kaydedildi. Ölçülen bu 8 geri yansıma spektrumunun ortalaması alındı. Spektrumlardaki 550 ve 800 nm

deki ışık şiddeti oranı (I_{550}/I_{800}) daha önce yaptığımız çalışmalarda “Spektroskopik Apoptozis İndeksi” diye adlandırılmıştı (26). Bu çalışmada Spektroskopik Apoptozis İndeksi 800 nm deki ışık şiddetinin 550 nm de ki ışık şiddetine oranından hesaplandı (I_{800}/I_{550}). Spektroskopik apoptotik indeks değerlerinin apoptozis sürecinde kontrole göre azalış yerine artış olarak ifade edilmesinin daha uygun olduğu düşünüldü. Ayrıca sonuçların kontrole oranının verilmesinin sonuçların sunumu açısından daha pratik ve standardize olduğu görüldü. Spektroskopik Apoptozis İndeksi spektrumlarında zamana bağlı olarak apoptozisin meydana getirdiği spektral değişimin nicel olarak ifadesidir.

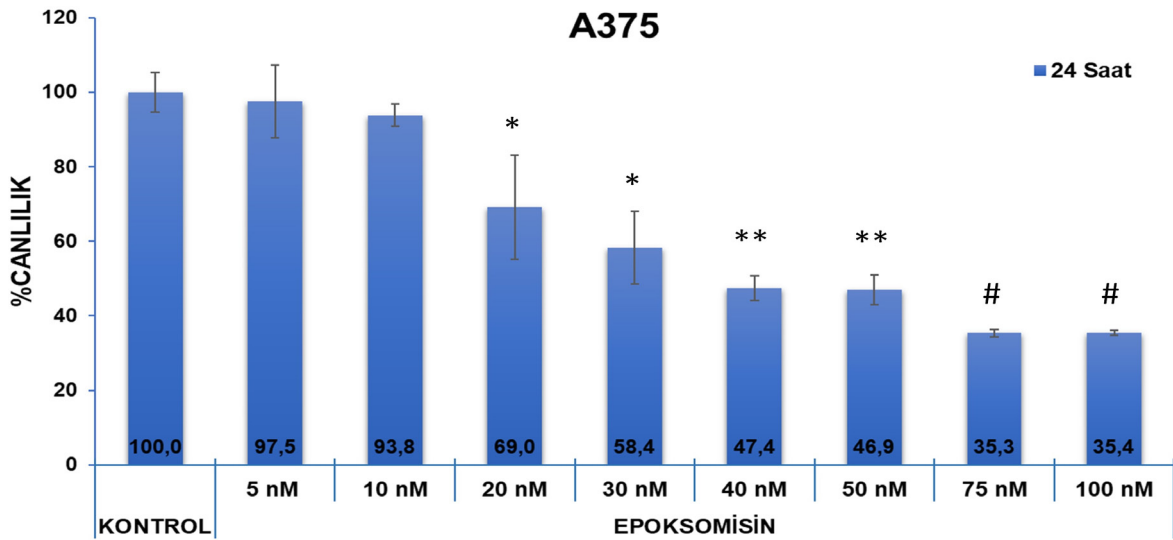
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Graphpad Prism Version 5.03 paket programı kullanılarak yapıldı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Deneyle her grup için üç tekrarlı olarak yapıldı. Nicel veriler ortalama \pm SD olarak verildi. Gruplar arası anlamlı farklılıkları belirlemek için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testinde önemli bir fark bulunursa, iki grup arasındaki karşılaştırmaları değerlendirmek için Dunn’s testi kullanıldı.

BULGULAR

MTT ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

A375 hücrelerine 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 nM Epo dozları 24 saatlik inkübasyon ile uygulandı. Şekil 1’de hücrelerin belirlenen dozlar ile 24 saatlik inkübasyonu sonrası kontrole göre % canlılık sonuçları görülmektedir. 20, 30, 40, 50, 75 ve 100 nM Epo uygulamasının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında canlılığın istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu ($p<0,001$). MTT sonucunda 75 ve 100 nM Epo dozlarında canlılığın kontrole göre %65 azaldığı bulundu. Canlılık testi sonucunda hücreleri apoptozise en iyi uğratan dozun 100 nM olduğu bulunmuştur. Bundan dolayı zamana bağlı ölçümlerin yapılacağı deney gruplarında 100 nM Epo uygulaması yapıldı.



Şekil 1. Farklı dozlardaki Epo'nin A375 hücrelerinde 24. saatin sonunda kontrole göre % canlılık üzerine etkisi.

* Değerleri, kontrol gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$).

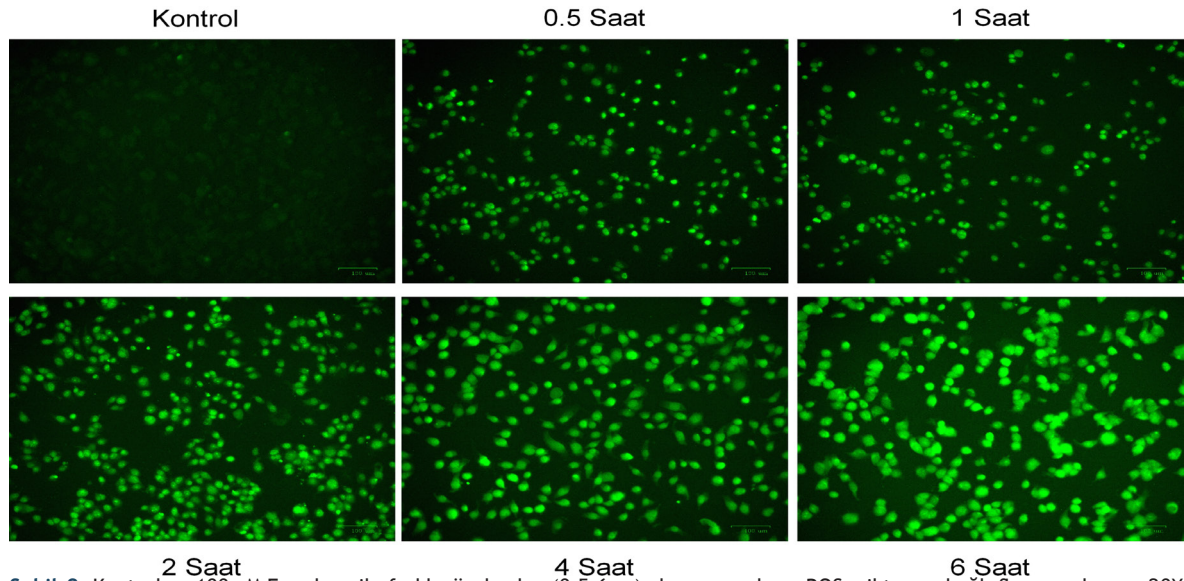
** Değerleri, kontrol 20 ve 30 nM gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$).

Değerleri, tüm gruplardan önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$)

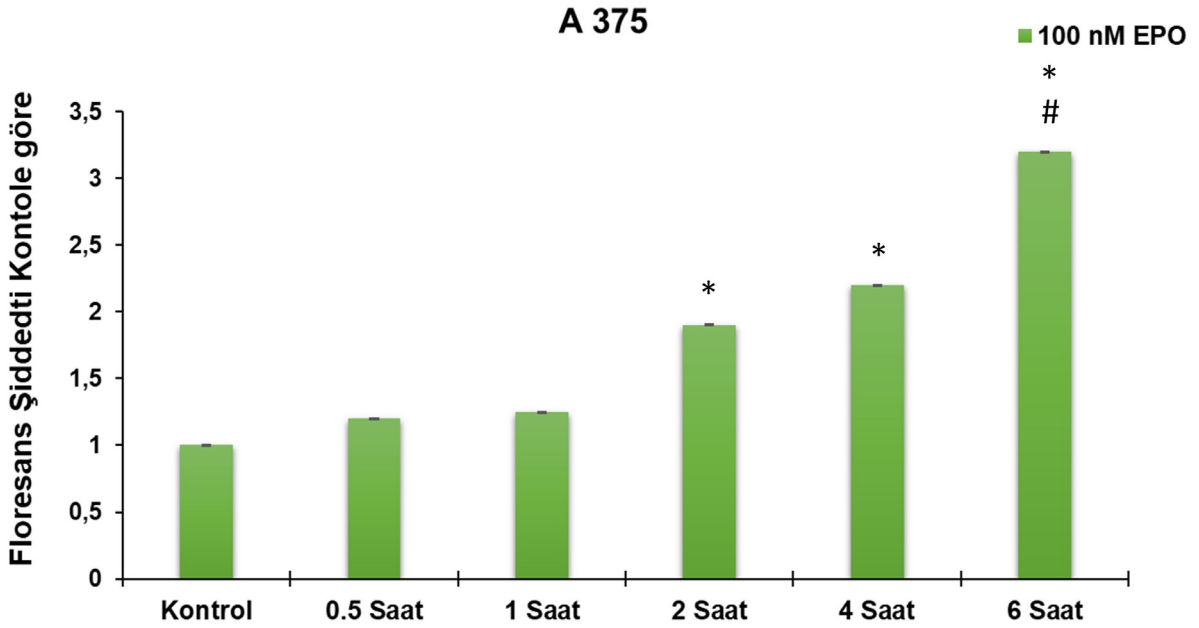
Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi

Hücrelere 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerde (0.5-6 saat) yapılan inkübasyonlardan sonra ROS miktarı ölçüldü. Kontrol ve Epo gruplarının floresans fotoğrafları Şekil 2'de görülmektedir. Tüm Epo gruplarında ROS miktarında kontrole göre artışlar

gözlemlendi. Bu artışın 0.5 ve 1 saatlik inkübasyon sürelerinde anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 3). Ancak ROS miktarının 2, 4 ve 6 saatlik inkübasyon sürelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p < 0,001$).



Şekil 2. Kontrol ve 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerden (0.5-6 sa) oluşan grupların ROS miktarına bağlı floresanslarının 20X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü



Şekil 3. Kontrol ve 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerden (0.5-6 saat) oluşan grupların ROS miktarına bağlı floresans şiddetleri. * Değerleri, kontrol gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$). # Değerleri, 2. ve 4. saat gruplardan önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$)

Western Blot ile Bax Proteinin Belirlenmesi

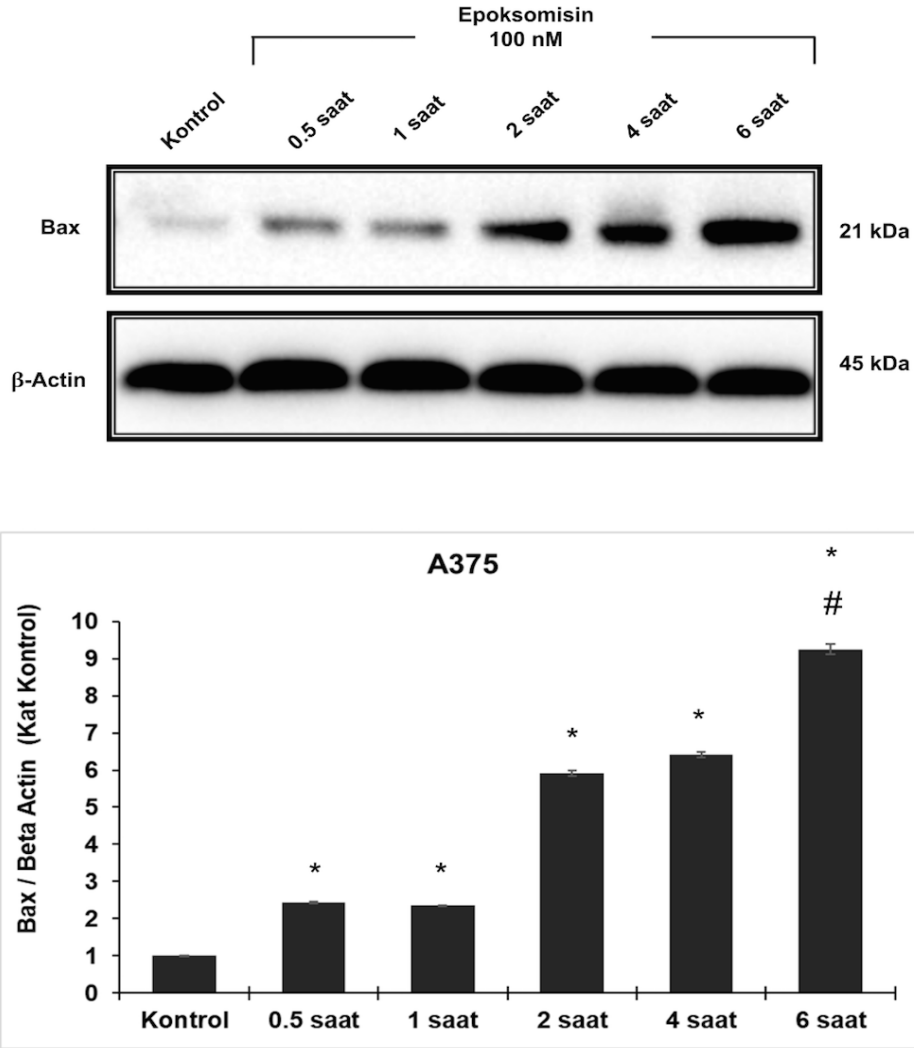
Hücrelere 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerde (0.5-6 saat) yapılan inkübasyonlardan sonra Bax miktarı western blot ile belirlendi. Kontrol ve Epo gruplarının Bax protein batları ve dansitometrik fotoğrafları Şekil 4'de görülmektedir. Tüm Epo gruplarında Bax miktarında kontrole göre artışlar gözlemlendi ve apoptozisin uyarıldığı belirlendi (Şekil 4). Ayrıca Bax miktarının 6. saatte kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 9 kat arttığı bulundu ($p < 0,001$).

Spektroskopik Veriler

Geri yansıma spektrumları kontrol ve 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerde (0.5-6 saat) ile inkübe edilen hücrelerden oluşan deney gruplarından ölçüldü. Şekil 5'de ölçülen spektrumlar kontrol ve zamana bağlı olarak 100 nM Epo uygulamasının dalga boyuna karşılık ışık şiddetinde oluşturduğu etkiyi göstermektedir. Spektrumlar incelendiğinde; zaman ilerledikçe kontrole göre geri yansıma spektrumlarında fark

görülmektedir.

Kontrolün spektrumu 500-800 nm arasında düzgün monotonik bir azalış göstermektedir (Şekil 5). Apoptozisin zamana bağlı etkisi incelendiğinde, 0.5 ve bir saatte ölçülen spektrumların kontrole benzer olduğu görülmektedir. Ancak 2. saatten itibaren kontrole göre spektrumların eğiminin azaldığı ve grafiklerin giderek düzleştiği görülmektedir. Spektrumlarındaki değişimi nicel olarak göstermek için Şekil 5'deki spektrumlardan tüm gruplar için Spektroskopik Apoptozis İndeksi hesaplandı (Şekil 6). Tüm zaman noktalarında spektroskopik apoptozis indeksinin kontrole göre arttığı gözlemlendi. Bu artışın 0.5 ve bir saatlik inkübasyon sürelerinde anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 6). Ancak 2, 4 ve 6 saatlik inkübasyon sürelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p < 0,001$). Spektroskopik apoptozis indeksi 0.5 saatte kontrole göre 1.12 kat artarken, 6. saatte 3.69 kat arttığı bulundu.



Şekil 4. Kontrol ve 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerden (0.5-6 saat) oluşan gruplarının Bax protein seviyelerinin western blot görüntüsü ve dansitometrik analizi.

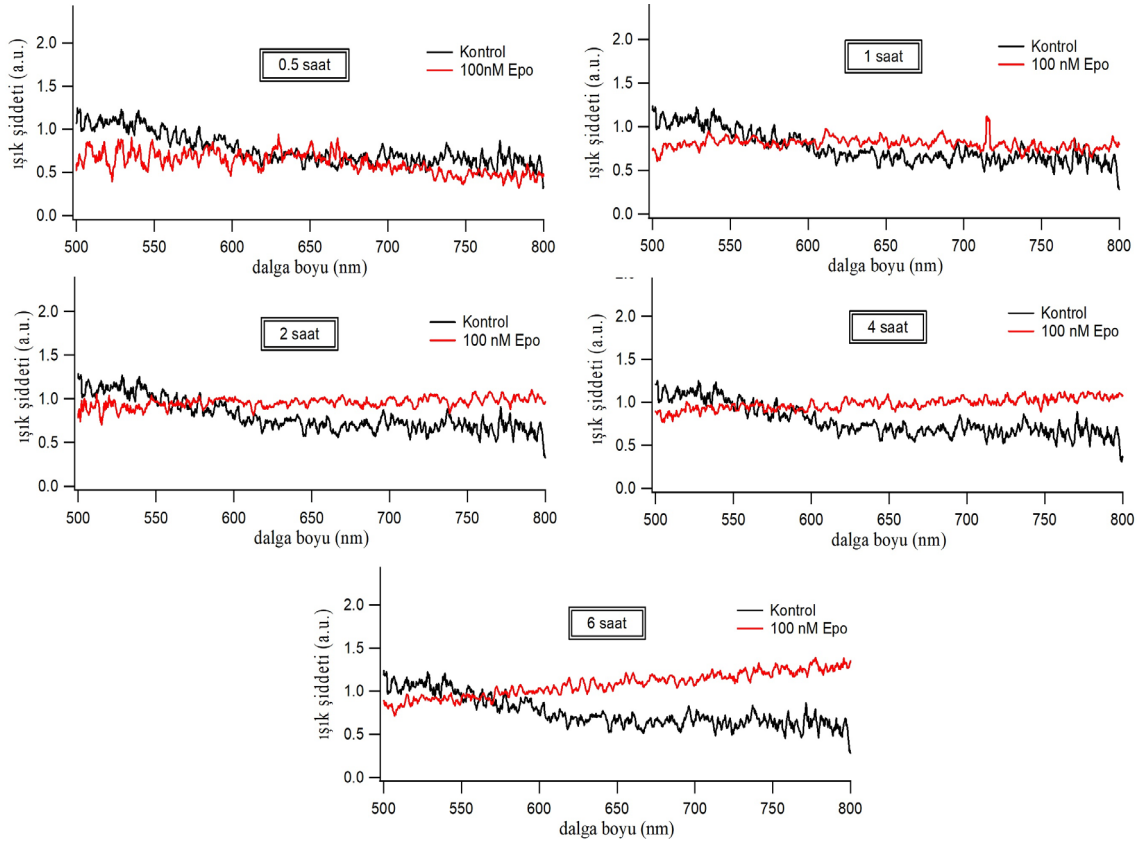
* Değerleri, kontrol gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$).

Değerleri, 2. ve 4. saat gruplardan önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$)

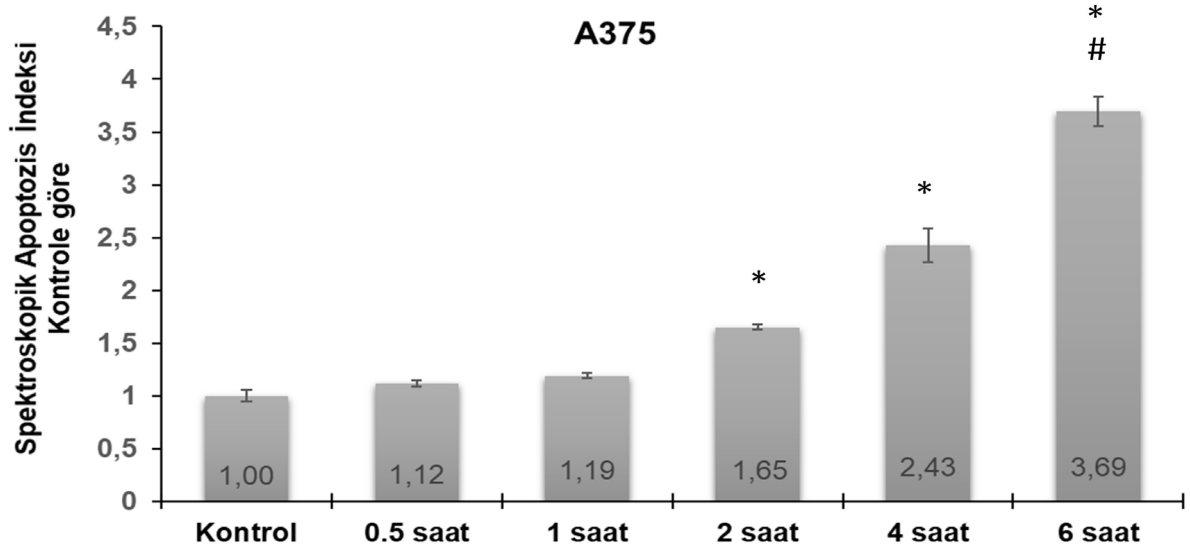
TARTIŞMA ve SONUÇ

Apoptozis, oldukça organize bir hücre ölümü sürecidir ve organizmanın daha büyük yararları için belirli hücreleri ortadan kaldırmaya yönelik rutin olarak gerçekleştirilen normal bir fizyolojik süreçtir. Apoptozisin hastalıklarda özellikle kanser tedavisindeki rolü, apoptozisi doğru, pratik, invazif olmayan bir şekilde saptamak ve izlemek için yeni

yöntemlerin geliştirilmesi için motivasyon sağlar. Apoptotik süreçte meydana gelen değişimlerin erken aşamada zamana bağlı olarak belirlenmesi hücre kültürü çalışmalarına yeni bir yön verecektir (27). Bu çalışmada apoptozis sürecinin erken aşamasında meydana gelen spektral değişikliklerin zamana bağlı olarak geri yansıma spektroskopisi ile belirlenebileceği yeni bir yöntem geliştirildi.



Şekil 5. Kontrol ve 100 nM Epo dozu ile farklı sürelerde (0.5-6 saat) inkübasyon ile oluşan gruplardan yapılan ölçümlerin geri yansıma spektrumları



Şekil 6. Kontrol ve Epo gruplarının spektroskopik apoptozis indekslerinin karşılaştırılması.

* Değerleri, kontrol gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$).

Değerleri, 2. ve 4. saat gruplarından önemli ölçüde farklıdır ($p < 0.001$).

Hücre kültürü araştırmalarında bazı biyokimyasal ve morfolojik özellikleri kullanılarak, apoptozis ölçümlerinden yaygın olarak yararlanılmaktadır (28). Bu yöntemler arasında çeşitli optik mikroskopi türleri, jel elektroforezi, DNA nick-end etiketlemesi, mitokondriyal deneyler ve apoptotik proteinlerin saptanması bulunur (29, 30). Apoptozisi belirlemeye yönelik altın standart yöntemler multiple color floresan mikroskopu ve akış sitometrisidir (15). Floresans mikroskopu, konfokal lazer tarama mikroskopu (31), akış sitometrisi (32), ve mikroarray (33) gibi floresan tabanlı yöntemler de bulunmaktadır. Tüm mevcut yöntemler, bir eksojen boyanın veya etiketleme ajanının eklenmesini veya kültürün kendisinin fiziksel olarak bozulmasını gerektirir. Bu yöntemler apoptozisin doğru bir şekilde tespit edilmesini sağlasa da zaman alıcı, maliyetli ve belirli bir zaman noktasındaki değerlendirme ile sınırlıdır olmalarının yanı sıra uygulama ve sonuçların analizi için uzmanlık gerektirir (27).

Apoptotik hücreler hücre küçülmesi ve hücrenin parçalanmasına yol açan bir dizi hücre altı değişikliğe uğrar. Geri yansıma spektroskopisi bu hücre altı düzeydeki mikro değişimlere duyarlıdır. Bu çalışmada hücre hattı olarak melanoma A375 ve apoptozisi indükleyici ajan olarak anti-inflamatuvar etkinliği iyi bilinen hücre içine geçebilen selektif irreversible bir proteazom inhibitörü olan Epo seçilmiştir. Epo proteazom inhibisyonuyla hücrede katlanmamış miktarını artırarak ROS oluşumunu ve hücresele strese sebep olur (34). Bilindiği üzere ROS apoptozisin en önemli uyarandır (35). A375 hücrelerinde apoptozisi indükleyecek Epo dozunun tespit edilmesi için, 5-100 nM dozlardaki Epo ile 24 saat inkübasyon sonrası hücrelerin canlılığı MTT yöntemi ile belirlenmiştir. A375 hücrelerinde 75 ve 100 nM Epo uygulamasının kontrole göre canlılığı yaklaşık %65 azalttığı belirlenmiştir. MTT deneyinde canlılığın 24 saatte %35'e düşmesi spektroskopik veriler ile canlılık arasındaki sıkı ilişkiyi kanıtlamaktadır. Hücre içinde 6 saatte ROS miktarının artması ve ROS'un detoksifiye edilememesi nedeniyle hücre apoptozise gitme

kararı alır. Kontrol ve farklı sürelerde uygulanan 100 nM Epo uygulamalarının ROS fotoğrafları Şekil 2'de görülmektedir. Hücre içi ROS miktarının tüm sürelerde kontrole göre arttığı ancak bu artışın 0.5 ve 1 saat için anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3). Hücre içinde protein homeostazisi gereği bir süre denge korunduğu için erken aşamada ROS miktarında anlamlı bir artış bulunamadı. ROS miktarının 2, 4 ve 6. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p<0,001$). Bu çalışmada hesapladığımız Spektroskopik Apoptozis İndeksi sonuçları ile ROS sonuçlarının korelasyon gösterdiği görülmektedir. Hücrelere 100 nM Epo dozu ile farklı yapılan inkübasyonlardan sonra Bax miktarı western blot ile belirlendi. Apoptozisin bir göstergesi olarak sabit tüm Epo gruplarında zamana bağlı olarak Bax miktarında kontrole göre artışlar gözlemlendi ve apoptozisin uyarıldığı belirlendi (Şekil 4). Ayrıca Bax miktarının 6. saatinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde bulundu ($p<0,001$).

Spektroskopik veriler incelendiğinde Geri Yansıma Spektroskopisinin apoptotik prosese duyarlı olduğu görülmektedir. Kontrol ve Epo uygulanan hücrelerden ölçülen spektrumların farklı olduğu görülmektedir (Şekil 5). Bu çalışmada apoptozis sırasında erken aşamada meydana gelen erken spektral değişiklikler belirlendi. Spektrumlar incelendiğinde zamana bağlı olarak spektrumların eğiminin azaldığı görülmektedir. Ancak bu azalışın 2 saatten sonra belirgin hale geldiği Spektrumlarda apoptozise bağlı değişimi nicel olarak ifade etmek için Spektroskopik Apoptozis İndeksi hesaplandı. Ölçülen spektrumların analizinden spektrumlar arasındaki farkın en iyi belirlenebileceği dalga boylarının 550 ve 800 nm olduğu bulundu. Daha önce yaptığımız çalışmalarda spektrumlardaki 550 ve 800 nm deki ışık şiddeti oranı (I_{550}/I_{800}) "Spektroskopik Apoptozis İndeksi" diye adlandırılmıştı (26). Bu çalışmada ise Spektroskopik Apoptozis İndeksi 800 nm deki ışık şiddetinin 550 nm deki ışık şiddetine oranından hesaplanmıştır (I_{800}/I_{550}). Spektroskopik apoptotik indeks değerlerinin apoptozis sürecinde kontrole göre azalış yerine artış olarak ifade

edilmesinin daha uygun olduğu düşünülür. Ayrıca sonuçların kontrole oranının verilmesinin sonuçların sunumu açısından daha standardize ve pratik olduğu görüldü. Spektroskopik Apoptozis İndeksinin 2, 4 ve 6. saatte kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir ($p<0,001$). Spektroskopik sinyalde bu erken aşamada gözlenen değişimin nedeni apoptozise giden hücrede meydana gelen hacim azalması olabilir (36). Apoptotik hücrede su kaybıyla meydana gelen hacim azalması sitoplazmanın kırma indisinde artışa neden olur. Böylece organeller ve sitoplazma arasındaki kırılma indisi farkı azalır. Bu hücrede apoptozis oluştuğunda kontrole göre geri yansıma sinyalindeki farkın kaynağıdır (17, 37, 38). Geri Yansıma sinyalinde meydana gelen değişimin sebeplerini açıklayabilmek

için daha çok temel düzeyde moleküler çalışmaya ihtiyaç vardır. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, in vitro olarak apoptozisi izlemek için geri yansıma spektroskopisi ölçümlerini kullanan çok az sayıdaki çalışmalardan biridir. Yöntemi, akış sitometrisi gibi güvenilir bir nicel tekniğe dönüştürmek için daha ileri çalışmalar yapılacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışmada geri yansıma spektroskopisi ile hücre kültürü koşullarına minimum müdahale ederek ve eksojen bir ajan eklemeyen apoptozisi erken aşamada gösteren yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşımın apoptotik değişimleri diğer analiz yöntemlerinden daha erken, zamana bağlı olarak izleyebilen, invazif olmayan, tekrarlanabilir ve pratik bir yöntem olarak geliştirilme potansiyeli bulunmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (ALKÜ-BAP) Koordinatörlüğü tarafından 2019-04-01-MAP01 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. ALKÜ-BAP Koordinatörlüğünün vermiş olduğu destek için teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma Etik Kurul İzni gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Ke B, Tian M, Li J, Liu B, He G. Targeting programmed cell death using small-molecule compounds to improve potential cancer therapy. *Med Res Rev.* 2016;36(6):983-1035
2. Pehlivanoğlu S, Aydın Acar Ç. PAK4 promotes invasive potential of MCF-7 cells in PKC-dependent manner through downregulation of E-Cadherin. *Turk Hij Den Biol Derg.* 2020;77(1):107-16
3. Akgun S, Kucuksayan H, Ozes ON, Can O, Alikanoglu AS, Yildiz M, et al. NF-kappaB-induced upregulation of miR-548as-3p increases invasion of NSCLC by targeting PTEN. *Anti-cancer Agents, Med Chem.* 2019;19(8):1058-68.
4. Kucuksayan H, Akca H. The crosstalk between p38 and Akt signaling pathways orchestrates EMT by regulating SATB2 expression in NSCLC cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 2017;39(9):1010428317706212.
5. Kucuksayan H, Akgun S, Ozes ON, Alikanoglu AS, Yildiz M, Dal E, et al. TGF-beta-SMAD-miR-520e axis regulates NSCLC metastasis through a TGFBR2-mediated negative-feedback loop. *Carcinogenesis.* 2019;40(5):695-705.
6. Hanikoglu A, Kucuksayan E, Hanikoglu F, Ozben T, Menounou G, Sansone A, et al. Effects of somatostatin and vitamin C on the fatty acid profile of breast cancer cell membranes. *Anti-cancer Agents, Med Chem.* 2019;19(15):1899-909.
7. Hanikoglu A, Kucuksayan E, Akduman RC, Ozben T. A review on melatonin's effects in cancer: Potential mechanisms. *Anti-cancer Agents, Med Chem.* 2018;18(7):985-92.
8. Kucuksayan E, Ozben T. Hybrid compounds as multitarget directed anticancer agents. *Curr Top Med Chem.* 2017;17(8):907-18.
9. Kucuksayan E, Cort A, Timur M, Ozdemir E, Yucel SG, Ozben T. N-acetyl-L-cysteine inhibits bleomycin induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors. *J Cell Biochem.* 2013;114(7):1685-94.
10. Cort A, Timur M, Ozdemir E, Kucuksayan E, Ozben T. Synergistic anticancer activity of curcumin and bleomycin: an in vitro study using human malignant testicular germ cells. *Mol Med Rep.* 2012;5(6):1481-6.
11. Yewdell JW. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.* 2001;11(7):294-7.
12. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002;82(2):373-428.
13. Sorolla A, Yeramian A, Dolcet X, Perez de Santos AM, Llobet D, Schoenenberger JA, et al. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Br J Dermatol.* 2008;158(3):496-504.
14. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp Oncol.* 2012;34(3):255-62.
15. Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol.* 2011;103:55-98.
16. Chalut KJ, Ostrander JH, Giacomelli MG, Wax A. Light scattering measurements of subcellular structure provide noninvasive early detection of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2009;69(3):1199-204.
17. Mulvey CS, Sherwood CA, Bigio IJ. Wavelength-dependent backscattering measurements for quantitative real-time monitoring of apoptosis in living cells. *J Biomed Opt.* 2009;14(6).
18. Kucuksayan-Sircan A, Kucuksayan E. Geri Yansıma Spektroskopisi ile Hücre Kültürü Çalışmalarında Hücre Sayısının Belirlenmesi İçin Yeni Bir Metot. *SdÜ Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2020;11(2).

19. Sircan-Kucuksayan A, Canpolat M. Estimating joint cartilage thickness on an animal model ex vivo using diffuse reflectance spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2019;86(4):623-8.
20. Sircan-Kucuksayan A, Yaprak N, Derin AT, Ozbudak IH, Turhan M, Canpolat M. Noninvasive assessment of oral lesions using elastic light single-scattering spectroscopy: a pilot study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(5):1467-72.
21. Mourant JR, Freyer JP, Hielscher AH, Eick AA, Shen D, Johnson TM. Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics. *Appl Optics*. 1998;37(16):3586-93.
22. Bohren CF, Huffman DR. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*: Wiley; 1998.
23. Sircan-Kucuksayan A, Canpolat M. Retrieval of chromophore concentration in a tissue phantom by diffuse reflectance spectroscopy. *Opt Spectroscopy*. 2014;117(4):663-9.
24. Turhan M, Yaprak N, Sircan-Kucuksayan A, Ozbudak I, Bostanci A, Derin A, et al. Intraoperative assessment of laryngeal malignancy using elastic light single-scattering spectroscopy: A pilot study. *Laryngoscope*. 2017;127(3):611-5.
25. Ozekinci M, Kucuksayan E, Erdogan G, Aslan M, Pestereli E, Canpolat M, et al. Histopathological and biochemical assessment of a novel diagnostic method for ovarian torsion. *Biotech Histochem*. 2020;95(3):203-9.
26. Kucuksayan E, Sircan-Kucuksayan A. Real-Time Detection of Doxorubicin-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells Using the Back Reflection Spectroscopy. *EJM*. 2021;26(1):128-34.
27. Monton H, Parolo C, Aranda-Ramos A, Merkoci A, Nogue C. Annexin-V/quantum dot probes for multimodal apoptosis monitoring in living cells: improving bioanalysis using electrochemistry. *Nanoscale*. 2015;7(9):4097-104.
28. Takemura G, Kanoh M, Minatoguchi S, Fujiwara H. Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart - A critical review from definition and classification of cell death. *Int J Cardiol*. 2013;167(6):2373-86.
29. Sgonc R, Gruber J. Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol*. 1998;33(6):525-33.
30. Kucuksayan E, Konuk EK, Demir N, Mutus B, Aslan M. Neutral sphingomyelinase inhibition decreases ER stress-mediated apoptosis and inducible nitric oxide synthase in retinal pigment epithelial cells. *Free radical biology & medicine*. 2014;72:113-23.
31. Dimitrijevic J, Krapf L, Wolter C, Schmidtke C, Merkl JP, Jochum T, et al. CdSe/CdS-quantum rods: fluorescent probes for in vivo two-photon laser scanning microscopy. *Nanoscale*. 2014;6(17):10413-22.
32. Chattopadhyay PK, Peretto SP, Yu J, Roederer M. The use of quantum dot nanocrystals in multicolor flow cytometry. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010;2(4):334-48.
33. Morales-Narvaez E, Monton H, Fomicheva A, Merkoci A. Signal enhancement in antibody microarrays using quantum dots nanocrystals: Application to potential Alzheimer's disease biomarker screening. *Anal Chem*. 2012;84(15):6821-7.
34. Fernandez-Estevéz MA, Casarejos MJ, Lopez Sendon J, Garcia Caldentey J, Ruiz C, Gomez A, et al. Trehalose reverses cell malfunction in fibroblasts from normal and Huntington's disease patients caused by proteasome inhibition. *PLoS One*. 2014;9(2):e90202.
35. Sidor-Kaczmarek J, Cichorek M, Spodnik JH, Wojcik S, Morys J. Proteasome inhibitors against amelanotic melanoma. *Cell Biol Toxicol*. 2017;33(6):557-73.
36. Porcelli AM, Ghelli A, Zanna C, Valente P, Ferroni S, Rugolo M. Apoptosis induced by staurosporine in ECV304 cells requires cell shrinkage and upregulation of Cl⁻ conductance. *Cell Death Differ*. 2004;11(6):655-62.

37. Mulvey CS, Zhang KX, Liu WHB, Waxman DJ, Bigio IJ. Wavelength-dependent backscattering measurements for quantitative monitoring of apoptosis, Part 1: early and late spectral changes are indicative of the presence of apoptosis in cell cultures. *J Biomed Opt.* 2011;16(11)

38. Mulvey CS, Zhang KX, Liu WHB, Waxman DJ, Bigio IJ. Wavelength-dependent backscattering measurements for quantitative monitoring of apoptosis, Part 2: early spectral changes during apoptosis are linked to apoptotic volume decrease. *J Biomed Opt.* 2011;16(11)