

KOLONİ METODU VE MITOMYCİN-C'NİN KOLONİ YAPMA ETKİNLİĞİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ*

Dr. Fahrettin ÇELİK**

Bu çalışmada astrositom hücreleri kullanılarak in vitro doku kültürü tekniği ile koloni metodu uygulandı. Bu metodla hem 6 ayrı ilacın astrositomlar üzerine olan etkisi incelendi, hem de mitomycin-C isimli ilacın koloni yapma etkinliği üzerine olan etkisi araştırıldı. Koloni ve mikrotitrasyon sonuçları birbiriyle karşılaştırıldı.

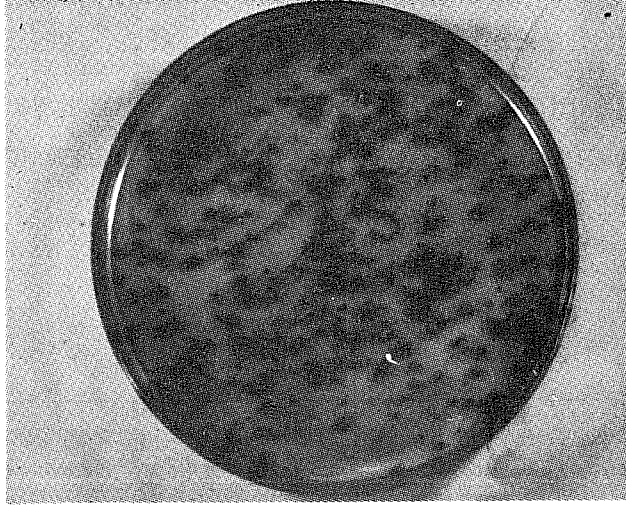
Koloni metodu (cloning) hücrelerin uygun şartlarda koloni yapmaları yeteneklerinden yararlanılarak geliştirilmiştir. Teknik, ilk defa Dr. Sanford (1) tarafından uygulanmıştır. Koloni, ayrı ayrı hücrelerin biraraya gelmesiyle meydana gelen ve bütün hücrelerin birbiriyle bağlantılı olduğu bir hücre topluluğudur. Bir hücre popülasyonunda hücrelerin birbiriyle bağlantılarının görülmesi, kolonideki hücrelerin nükleus ve sitoplazmalarının stromal hücrelerinkinden daha küçük oluşunun mikroskop altında görülmesiyle tanınırlar. Bütün araştırmacıların kabul ettiği bir nokta da, koloni sayımı yapılırken 16 ve daha fazla sayıda hücre ihtiva eden kolonilerin göz önüne alınmasıdır.

Koloni yapma etkinliği : $\frac{\text{elde edilen koloni sayısı}}{\text{inoküle edilen hücre sayısı}} \times 100$

formülüne göre hesaplanır. Bu etkinlik değişik glial kültürlerde düşük bir yüzdeden % 20 ye kadar arttırılabilir. Bu oran glioma kültürlerinde glukokortikoid kullanılarak daha da arttırılabilir. Glukokortikoidler normal glia hücrelerinin koloni tarzında çoğalmasını arttırdığından, malign glial hücrelerin diğerlerinden ayırımında bu metod kullanılabilir. Koloni yapma etkinliği besleyici tabaka (feeder layer)

* Çalışma Beatson Cancer Research Institute Glasgow Scotland'da yapılmıştır.

** Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Bölümü Doçenti.



Şekil 1 : Giemsa ile boyanmış kolonilerin görünümü

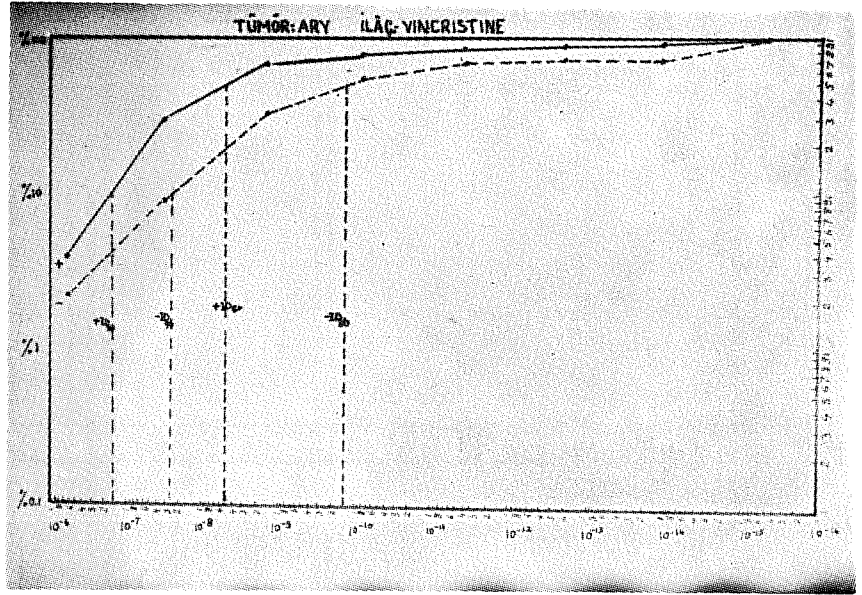
kullanılarak daha da artırılabilir. Bu amaçla hücreler 3000 rad. ir-radiye edilir veya mitomycin-C ilavesiyle (2 mikrogram/ 10^6 hücre) kullanılabilir (2). Mitomycin-C ilavesiyle normal glial hücrelerin artık proliferere olmadığı (3) ve keza glioma hücrelerinin de proliferere olmadığı gösterilmiştir. M. Güner (4), insan astrositom kültürlerini kullanarak erken pasaj kültürlerinde proliferatif devrede deksame-tazon ve betametazon mevcudiyetinde kültür çalışması yaptı. Bu steroidlerin hem koloni yapma etkinliğini, hem de her kolonide bu'u-nan hücrelerin proliferasyon kapasitesini yükselttiğini bildirdi.

Koloni metodu ilk tarif edildiği şekliyle kalmamış ve çeşitli de-ğişiklikler uygulanmıştır. John Paul'e (5) göre Puck ve Marcus va-sat az bir oranda agarla sertleştirildiğinde hücrelerin ko'oni yaptı-ğını bulmuştur. Koloni metodu ilaç hassasiyet testi için de kullanıl-a-bilir.

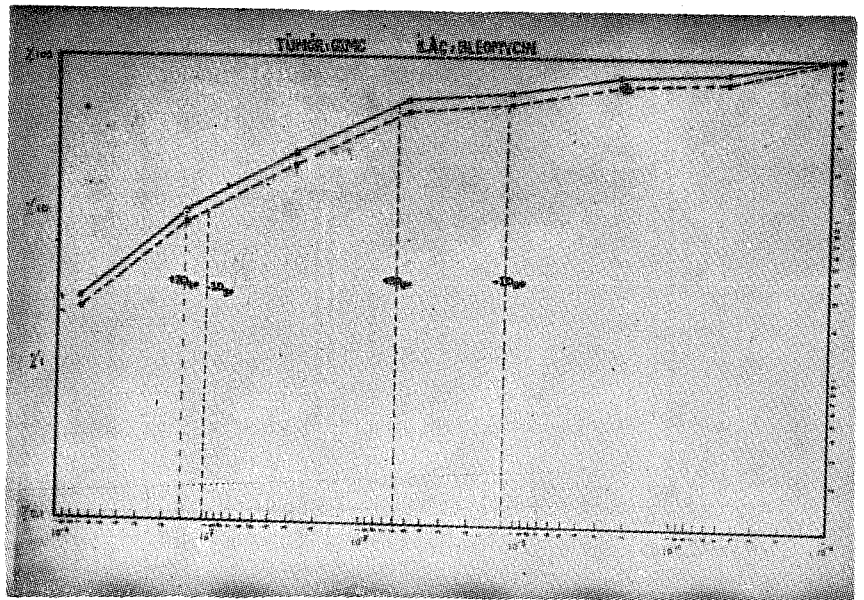
MATERYEL, METOD

1 — Üreme yüzeyi 75 cm^2 olan 2 adet flaskın (hücre kültür kabı) her birine 5×10^5 astrositom hücresi konuldu.

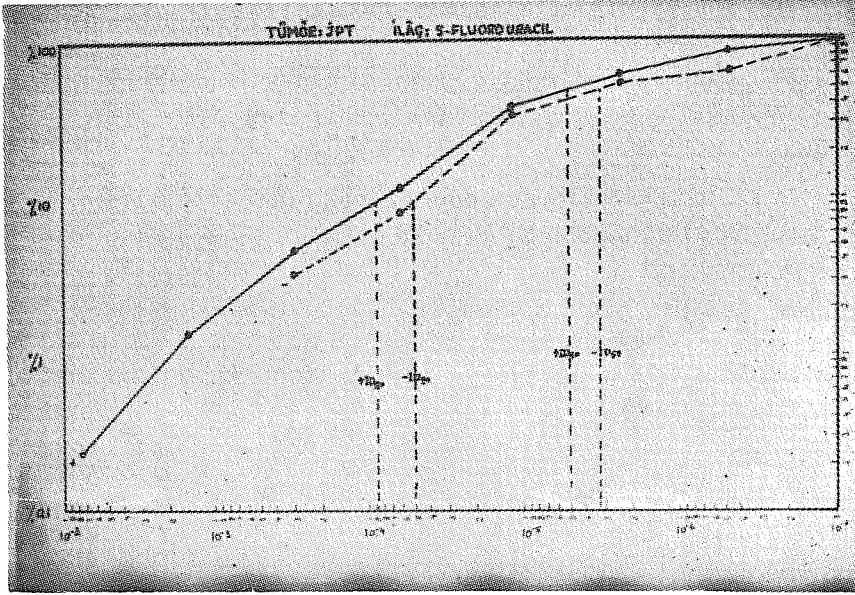
2 — Hücrelerin dibe yapışıp bölünmeye başlamalarından son-



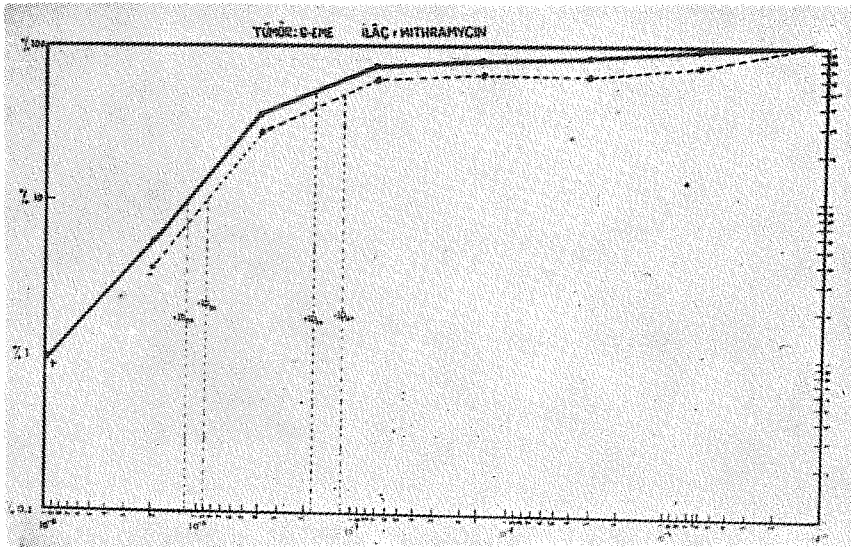
Resim 4 : Vincristine ile yapılan bir koloni çalışması



Resim 5 : Bleomycin ile yapılan bir koloni çalışması



Resim 6 : 5-Fluorouracil ile yapılan bir koloni çalışması



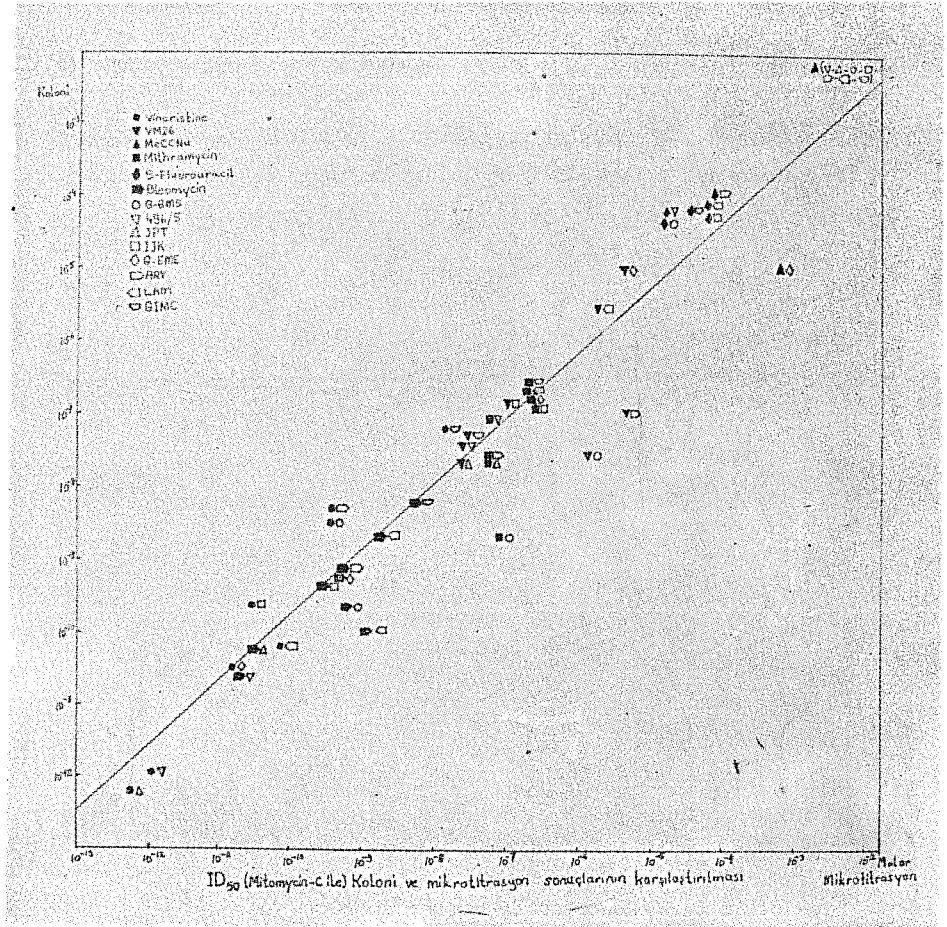
Resim 7 : Mithramycin ile yapılan bir koloni çalışması

ra hücre kültür kaplarından birinin içine mitomycin-C (2 mikrogram/ 10^6 hücre) ilave edildi. Bir gece 37 dereceye bırakıldı.

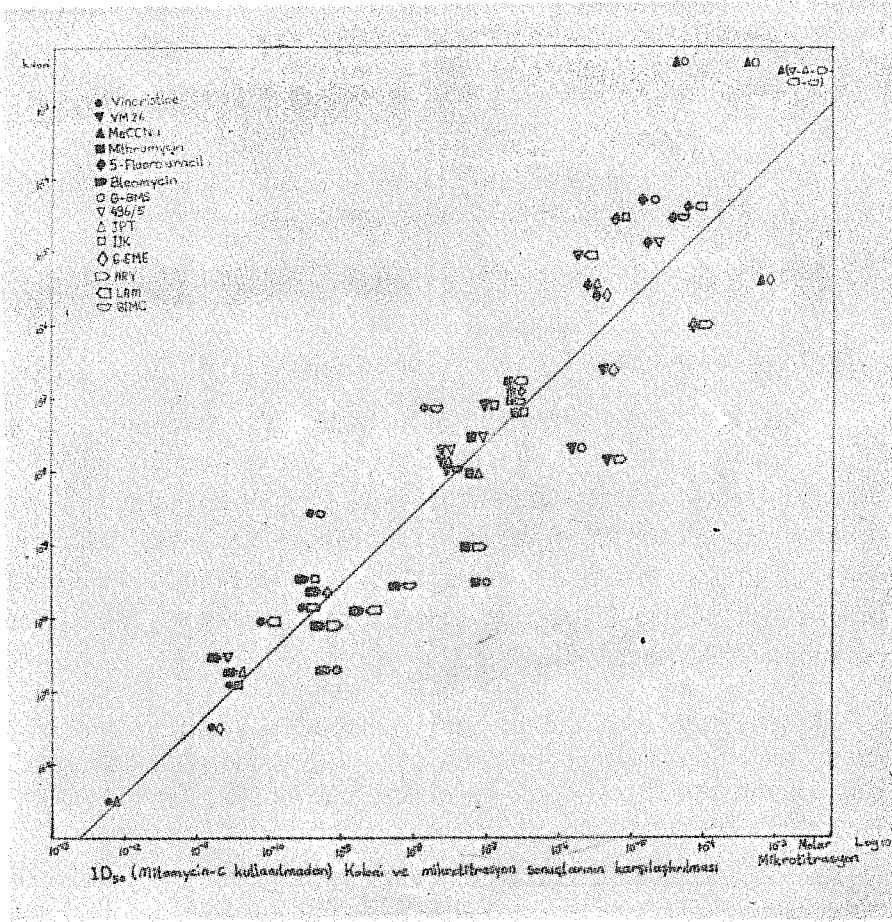
3 — Mitomycin-C dışarı alındı, hücreler BSS (Hank's balanced salt solution without bicarbonate) ile yıkandı, taze vasat sıvısı konulup, 2 günlüğüne inkübatöre terk edildi.

4 — Mitomycin-C ile tedavi edilmiş hücreler tripsinize edilip, 16 adet 9 cm. lik mikrobiyolojik petri kutusunun her birinin içine 2×10^4 hücre konuldu.

5 — Diğer hücre üreme kabı alınıp içindeki hücreler tripsinize edildi ve üreme yüzeyi 25 cm^2 olan 8 adet küçük hücre üreme kabının her birinin içine 5×10^4 hücre/ml. konuldu. Ve bunlar 24 saat 37 dereceye bırakıldı.



Resim 8 : Mitomycin-C kullanıldığında iki metod arasındaki uygunluk



Resim 9 : Mitomycin-C kullanılmadan iki metod arasındaki uygunluk

6 — Küçük hücre üreme kaplarından 7 tanesinin içinde bulunan hücreler mikrotitrasyon metodu ile yapılan çalışmada kullanılan konsantrasyon metodu ile yapılan çalışmada kullanılan konsantrasyonlarda ilaçla 3 gün süre ile tedavi edildi. Bir kaptaki hücreler ise kontrol olarak kullanılmak üzere tedavi edildi.

7 — Küçük hücre üreme kaplarındaki hücreler tripsinize edildi. Her bir ilaç konsantrasyonunda tedavi edilmiş hücrelerden 4000 tanesi daha önceden hazırlanmış olan ve mitomycin-C ile tedavi edilmiş hücrelerin bulunduğu 2 şer adet petri kutusuna ilave edildi. Yine 4000 er hücre de, içinde mitomycin-C ile tedavi edilmiş hücreler bulunmayan 2 şer adet petri kutusuna konuldu.

8 — Petri kutularına 20 ml. vasat sıvısı içinde 10 mikrogram/ml. betametazon ilave edildi.

9 — Haftada bir vasat sıvısı değiştirilmek üzere hücreler 3 haftalığına % 2 lik CO₂ inkübatörüne konuldu.

10 — 3 haftanın sonunda petri kutularında bulunan hücreler BSS ile yıkanıp, metanol ile fikse edildi.

11 — Koloniler Giemsa ile boyandı. (Resim 1 de koloniler görülüyor).

12 — Koloni sayıcısı ile koloniler sayıldı.

13 — Hiç tedavi edilmemiş grupta bulunan hücrelerin yaptığı koloni sayısı % 100 (kontrol) olarak alınıp, değişik konsantrasyonlarda ilaçla tedavi edilmiş hücrelerin yaptığı koloni sayılarının yüzde oranları hesaplandı. Sonuçlar logaritma kâğıdı üzerinde grafik yapıldı. (ID₅₀, ID₉₀) Resim 2-7 de her bir ilaca ait koloni grafiklerinden birer örnek görülmektedir. Bu sonuçlar mikrotitrasyon metodunun sonuçları ile karşılaştırıldı.

Araştırmada 8 ayrı astrositom kullanıldı. Bunlardan 7 si doğrudan insandan alınan astrositom olup, biri xenograft'lı astrositomdu. Araştırmada 6 ayrı ilaç kullanıldı. Bu ilaçlar, methyl-CCNU, vincristine, 5-fluorouracil, VM26, bleomycin, ve mithramycin'dir.

TARTIŞMA

Her iki metodun sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Resim 8-9 da görüldüğü gibi +ID₅₀ değerleri (mitomycin--C kullanıldığında elde edilen değerler) kullanıldığında iki metodun sonuçları arasındaki uygunluk P<0.001, --ID₅₀ değerleri kullanıldığında P<0.001 dir. Fakat resimlerde görüldüğü gibi +ID₅₀ değerleri kullanıldığında, değerler regresyon hattının hemen yanında, --ID₅₀ değerleri kullanıldığında regresyon hattının iki tarafında daha dağınık bir şekilde bulunmaktadır. Bu durum +ID₅₀ değerlerinin, yani feeder layer kullanıldığında iki metod arasında daha fazla uygunluk sağlandığını göstermektedir. Ayrıca koloni yapma etkinliğinin mitomycin-C kullanıldığında arttığı görülmektedir.

SUMMARY

In this study, the effects of chemotherapeutic agents on astrocytoma was searched by using cloning technique. Six different anticancer medications were used and the effect of mitomycin-C on cloning efficiency was determined. The results of cloning and microtitration were compared.

KAYNAKLAR

1. Sanford, K: The development of variations in transplantability and morphology within a clone of mouse fibroblasts transformed to sarcoma producing cells in vitro, J. Nat. Cancer. Inst., 15; 215, 1954.
2. Macpherson, I and Bryden, A: Mitomycin-C treated cells as feeders, Experimental Cell Research 69. 240-241, 1971.
3. Westermarck, B: Growth regulatory interactions between stationary human glia-like cells and normal neoplastic cells in culture, Experimental Cell Research, 81: 195-206, 1973.
4. Güner, M: Effects of dexamethasone and betamethasone on in vitro cultures from human astrocytomas, British J. Cancer, 35: 439-447, 1976.
5. Paul, John: Cell and tissue culture, 4 th. ed. Livingstone Edinbourg pp. 234-237, 1970.