

## BEYİN NORMAL VE TÜMÖR HÜCRELERİNE DEKSAMETAZONUN İN - VİTRO ETKİLERİ

Dr. Fadıl Aktrk\*

Anahtar kelimeler : Deksametazon, hücre kültürü, SSS tümörleri  
Key words : Dexamethasone, cell cultures, central nervous system tumours

Kortikosteroidlerin insan SSS tümörü hücre kültürleri terinde invitro sitotoksik etkilerini araştırmaya yönelik çalışmalara hidrokortizon asetatın etkisi gözlendikten sonra başlanmıştır. Değişik yaş grubunda muhtelif tümör hücre kültürleri farklı konsantrasyonda hidrokortizonla tedavi edildiğinde yüksek konsantrasyonunun hücrelerde morfolojik anomalilere yol açtığı, çoğalma hızını azalttığı, düşük konsantrasyonda ise stimulan etki yaptığı grlmştir<sup>6,7,8,15</sup>. Tümör hücrelerinin hidrokortizona cevabının hormon konsantrasyonu ile paralel değişiklik göstermesine karşılık tümörün tipi ve malignite derecesine bağlı değişiklikler saptanamamıştır.

Klinik nroşirurjide 1952 den bu yana beyin tmrl hastalarda yaygın olarak kullanılan steroidlerin hastalarda klinik düzeltmeye yol açtığı bilinmektedir<sup>2,3,4,5</sup>. Bu iyileşmenin tümör çevresindeki beyin ödeminin steroide cevaben azalmasına bağlı olduğu gerek computer tomography (CT) ve gerekse ameliyat bulgularından anlaşılmaktadır. Ancak deksametazonların tümör hücreleri üzerine etkisinin ne yönde olduğu hal tartışılmaktadır.

Bu çalışmada her bir hücre tipinin düşük ve yüksek hücre dansitesinde invitro değişik konsantrasyonlarda deksametazona konsantrasyon bağımlı cevabı ile yüksek hücre dansitesinde 10 ugr/ml deksametazona cevabı araştırılmıştır.

### Materyel ve Metot

Hücre kültürleri Southern General Hospital'de tedavi gören histopatolojik tanıları aynı nropatolog tarafından konulan 9 değişik doku örneğinden

\* Karadeniz Üniv. Tıp Fakültesi, Nöroşirurji Anabilim Dalı Doğenti Trabzon

hazırlandı. Yeterli miktardaki doku örneği Ham's F 12 Eagles'in MEM (Flow lab) % 1 non essential amino asit (Flow lab), % 20 fetal sığır serumu (Gibco Biocult) ndan oluşan besi ortamında 4°C ta transfer edildi. Kullanılan doku örneklerinin kod isimleri, histopatolojik tanıları ve hastanın cinsiyeti Tablo I de verilmiştir.

TABLO I

**Doku Örneklerinin Alındığı Hastaların Cinsiyeti,  
Örneklerin Kod ve Histopatolojik Tanıları**

Kod	Tanı	Cinsiyet
WCA	Astrositom	E
MRG	Astrositom	K
SMO	Astrositom	E
YMI	Astrositom	K
ORW	Astrositom	K
SPM	Medullablastom	E
CRA	Schwannom	K
CAM	Metastatik	K
NOR	Normal	K

Doku örnekleri aseptik şartlarda 20 ml BSS (45 ml Ham's F 12, 9 ml Hapes Buffer, 5 ml Glutamin, 4 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7,4) ile yıkandı ve daha sonra 10 ml taze vasat içerisinde özel bistüri ve pastör pipeti yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. 10 dakika dinlendirildikten sonra karışım 1000 Rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve çökelti 200 ü/ml kollagenaz, 1000 ü/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, 10 mg/ml kanamicin içeren 5 ml BSS içerisinde 37°C da 48-72 saat bekletildi. Daha sonra pipet yardımıyla tek tek hücre süspansiyonu elde edildi ve hücreler iki kez BSS le yıkayıp santrifüj edilerek taze üreme vasatında üç hafta bekletildi.

Düşük hücre dansitesinde deksametazonun etkilerini saptamak amacıyla depo hücreler 10 ml fosfat buffer, EDTA (PE) (Oxoid Ltd. ve BDH Chemicals Ltd.) ile yıkandıktan sonra % 0,25 tripsinle 5 saniye çalkalandı ve 30 dakika 37°C da inkubatörde bırakıldı. Bilahare 10 ml kültür vasatında pipet yardımıyla hücre solüsyonu elde edilerek ml deki hücre

sayısı sayaçla (Coulter Elect. Ltd Dunstable Bedding) tesbit edildi. Hazırlanan 12 adet 75 cm<sup>2</sup> lik Flask'a 1000'er hücre 200 ml büyüme vasatı içinde konuldu ve 2 kontrol grubu dışındaki flasklara 2'şerlik gruplar halinde 1, 2, 5, 10, 25 ugr/ml deksametazon (Organon lab.) ilave edildi. Birinci hafta sonunda deksametazonlu vasat alınarak tüm flasklara taze steroidsiz vasat konuldu ve deney üçüncü hafta sonunda bitirildi. Flask içerisindeki koloniler giderek artan konsantrasyondaki metanol ile tesbit edildi ve % 10 luk Gimsa ile boyandı. 16 hücre ve daha fazlasına sahip olan koloniler

koloni sayısı

disseksiyon mikroskopunda sayıldı ve rakam  $\frac{\text{koloni sayısı}}{\text{ekilen hücre sayısı}} \times 100$

denkleminde konularak koloni yapabilme kabiliyeti hesaplandı.

Yüksek hücre dansitesinde deksametazonun etkilerini belirtmek için yapılan deneylerde 8 astrositom, bir medullablastom, bir hemangioblastom, bir schwannom bir metastatik ve bir normal beyin dokusundan hazırlanan depo hücreler kullanıldı.

Deneyde çapları 15 mm olan plastik plakların (Eurolab) 24 adedinin ayrı ayrı konulabildiği havuzcukları olan özel kaplar kullanıldı. İçlerine tek tek plak yerleştirilmiş havuzcuklara 1'er ml büyüme vasatı içerisinde depo hücrelerden hazırlanan  $5 \times 10^4$  hücre konuldu. 16 örnek kontrol grubu olarak saklanırken kalan 16 sına 10 ugr/ml deksametazon ilave edildi. 37°C da 24 saat inkube edilen hücrelerin yüzeye yapıştıkları mikroskopla görüldükten sonra plaklar tek tek, içerisinde 20 ml büyüme vasatı bulunan petri kutularına transfer edildi ve 10 ugr/ml deksametazon tedavisine lüks beslenme ortamında devam edildi. Üçer gün aralıklarda kontrol ve steroid tedavisi alan hücrelerden birer tanesi Gimsa (BDH chemicals ltd) ile boyandı. Hücre sayısını tesbit için plak önce PE ile yıkandı ve sonra % 0,25 tripsinle es miktarda kollagenaz ilavesini takiben 37°C da 15-20 dakika inkube edildi. Pipetle irrigasyon yapılarak hareketlendirilen hücre solüsyonundan 0,4 ml alınıp 19,6 ml sayma solüsyonuyla karıştırılarak sayaçta sayıldı. Sayımda elde edilen rakam hücre sayısı/cm<sup>2</sup> ye çevrilererek 3 hafta içerisindeki hücre sayısı artış grafisi elde edildi.

## Bulgular

Düşük hücre dansitesinde bir hafta deksametazon tedavisi ve üç hafta takip sonunda Gimsa ile boyanan flasklardaki koloni sayısı, ekilen hücre sayısı ile oranlandı. Tablo II de kontrol ve steroid tedavisinin koloni yapma yeteneğindeki farklılıkları görülmektedir.

TABLO II

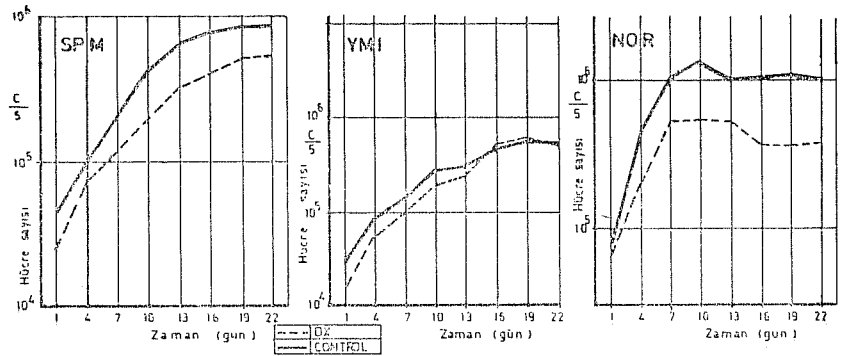
**CAM Dışında Tüm Hücrelerde Koloni Yapma Yeteneğinde  
Deksametazona Bağlı Önemli Artışlar Görülmektedir**

Kod	Kontrol	Deksametazon				
		1 ugr/ml	2 ugr/ml	5 ugr/ml	10 ugr/ml	25 ugr/ml
WCA	8,8	7,6	9,7	10	11,3	10,3
MRG	6,7	6,4	6,8	7,2	8,8	8,2
SMO	11,1	15,4	16,8	17,8	17,7	17,4
YMI	12,8	15,6	16	17,4	17,5	15
ORW	13,9	23	23,3	24,2	25,5	25
SPM	13	18,1	19,3	20,2	20,8	20,5
CRA	21,3	23,8	27	24,4	23,8	26
CAM	19,4	12,9	12,2	13	13,5	11,4
NOR	20,5	33,5	34,5	35,5	35,5	30,5

Deksametazon tedavisinin koloni sayısında yaptığı değişiklik yanında koloniyi oluşturan hücrelerin daha sıkışık dizilmelerine de sebep olduğu görülmüştür.

Yüksek hücre dansitesinde deksametazonun etkilerini belirlemek amacıyla yapılan deneylerde; ilki plakların petri kutularına transferi sırasında olmak üzere üçer gün aralıklarla her hücre tipi için 8 kez hücre sayımı yapılmış ve rakamlar zamana karşı grafiklenmiştir (Şekil 1).

Şekil 1



**Medullablastom, astrositom ve normal doku örneklerinde yüksek hücre  
dansitesinde deksametazon etkisi**

Deksametazon tedavisi alan bütün hücre tiplerinde çoğalma eğrisinin sonuna doğru kontrol kültürlerine oranla bir supresyon görülmüştür. Deksa-

metazona bağılı  $\text{cm}^2$  deki hücre sayısı azalması normal hücrelerde % 52 iken astrositik kökenli olmayan primer beyin tümörlerinde % 38, astrositik tümörlerde ise anaplazi ile paralel bir azalma göstermek üzere ortalama % 16,3 olarak bulunmuştur (Tablo III).

TABLO III.

**Hücrelerde Yüksek Dansite 10 ugr/ml Deksametazona Bağılı Supresyon Oranları**

Kod	Tanı	10 ugr/ml Deksametazon		Supresyon %
		Kontrol hücre sayısı $\text{cm}^2$	sayısı $\text{cm}^2$	
WCA	Astrositom	$6,7 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	16,4
MRG	Astrositom	$8,9 \times 10^5$	$7,3 \times 10^5$	17,9
SMO	Astrositom	$6,7 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$	19,4
YMI	Astrositom	$8,9 \times 10^5$	$7,7 \times 10^5$	13,5
ORW	Astrositom	$4 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	15
SPM	Medullablastom	$5,8 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$	8,6
CRA	Schwannom	$4,8 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	12,5
CAM	Metastatik	$7,9 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$	31,6
KML	Astrositom	$6,4 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	18,7
AMK	Astrositom	$8,2 \times 10^5$	$6,9 \times 10^5$	15,8
MOS	Astrositom	$7,8 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$	14,1
DDL	Hemangioblastom	$6,4 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	7,8
NOR	Normal	$5,8 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	52

Yüksek hücre dansitesine erişmiş plakların Gimsa ile boyandıktan sonra yapılan mikroskopik değerlendirilmesinde deksametazon tedavisi olan plaklarda hücre nükleuslarının birbiri üzerinde görülmeleri hali kontrol plaklara oranla daha seyrek bulunmuştur. Ayrıca nükleuslarının üstüste görülme sıklığı malignite ile de bir paralellik göstermiştir.

#### Tartışma

Kortikosteroidlerin invitro tümör hücreleri üzerine etkisini incelemek maksadıyla 1950'lerden bu yana yapılan araştırma sonuçlarına göre steroidlerin büyümeyi inhibe edici etkisi olduğunu tesbit edenler<sup>9,10,11</sup> yanında

etkisiz olduğunu ve hatta üremeyi hızlandırıcı etkisi olduğunu söyleyenler<sup>13</sup> de vardır. Ancak genel olarak kabul edilen steroidlerin tümör çevresi normal beyin dokusundaki ödemi azaltarak klinik iyileşmeye yol açtığı gerçeğidir.

Normal erişkin insanda klinik dozlarda kullanıldığında kortikosteroidlerin ekstraselluler aralıktaki konsantrasyonu 5 mgr/ml ( $10^{-10}$  —  $10^{-9}$  M) dir. Araştırmada deksametanoz konsantrasyonları bu değere yakın tutuldu.

Düşük hücre dansitesinde hücrelerde deksametazonun 1, 2, 10, 25 ugr/ml dozlarının tümünün hücre poliferasyonu ve koloni yapma yeteneğini arttırıcı etki yapması ve bu etkinin en yüksek olarak 10 ugr/ml konsantrasyonda gözlenmesi literatürle uyum göstermektedir<sup>1,13,14</sup>.

Yüksek hücre dansitesi deneylerinde terminal hücre dansitesine ulaşan tüm hücre kültürlerinden 10 µg/ml deksametazonla tedavi edilenlerde deksametazon almayanlara oranla inhibisyon daha erken başlamış ve hücre sayısı daha aşağı seviyede kalmıştır. Farklı hücre kültürlerinde inhibisyonun farklı olması, hücrelerin steroide ilişkisinin değişik olmasından kaynaklanmaktadır. Bu ise hücrelerde bir spesifik reseptör sistemini akla getirmektedir. Supresyonun en fazla olarak normal hücre kültüründe gözlenmesi (% 51) anlamlı bir bulgudur.

Sonuç olarak beyin tümörü olan hastalarda yayın olarak kullanılan deksametazonun tümör hücreleri üzerine direkt etkisi normal hücrelere olan etkisine oranla zayıflamış olarak bulunmuştur. Bu durum normal beyin hücrelerinde mevcut olan deksametazona karşı özel ilginin malignite yönünde gelişmesiyle bozulduğunu akla getirmektedir.

### Özet

Deksametazonun insan santral sinir sistemi (SSS) normal hücreleri ve tümör hücreleri üzerine invitro etkilerini araştırmak amacıyla 9 değişik doku örneğinden hazırlanan hücreler kullanıldı. Uygun şartlarda saklanan doku örneklerinden hazırlanan depo hücrelerden araştırmanın birinci aşamasında düşük hücre dansitesinde 1, 2, 5, 10, 25 ugr/ml konsantrasyonlardaki deksametazonun etkisi araştırıldı. Koloni yapabilme yeteneğinde kontrol gruba oranla en belirgin olarak 10 ugr/ml konsantrasyonda olmak üzere % 83'e varan artışlar tesbit edilmiştir. İkinci aşamada depo hücrelerden yüksek hücre dansitesinde her hücre tipi için 24 ekim yapılmış ve bunların yarısı 10 ugr/ml konsantrasyonda deksametazonla tedavi edilmiştir. Bu tedavi sonunda normal hücrelerde hücre sayısında % 50 supres-

yon görülürken anaplazi ile bağımlı olmak üzere astrositomlarda % 20 civarında supresyon görülmüştür.

### Summary

Nine different cell cultures which were prepared from different tissue specimens were used to investigate the effect of dexamethasone on central nervous system cells and tumour cells. Stored cells prepared and kept in suitable condition. In the first step of investigation the effect of 1, 2, 5, 10 and 25 ugr/ml concentrations of dexamethasone low density cell cultures were studied. Cloning efficiency was higher with dexamethasone than control group and this effect was maximum at 10 ugr/ml concentration (83 %). In the second step of investigation 24 high cell density cultures treated with 10 ugr/ml dexamethasone. At the end of the treatment, there was 50 % supression in normal cels while there was 20 % supression in astrocytomas that was related to the malignancy.

### Kaynaklar

1. Agosin M, Christen R, Badine O, Gasie G, Neghme A, Pizarro O, Jarpa A : Cotison Induced Metastasis of Adenocarcinoma in Mice Proc. Soc. Exp. Bid. Med. 80, 128:31, 1952.
2. Blindermann EE, Graff CJ, Fitzpatrick T : Basic Studies in Cerebral Edema. It's Control bay a Corticosteroid. Journal of Neurosurgery 19:319-324, 1962.
3. French AL : The use of Steroid in the Treatment of Cerebrol Edema. Bull. N.Y. Acad. Medical. 42:301-311, 1966.
4. French AL, and Gallich IH : The use of Steroids for Control of Cerebral Unexpected Findings. Neurology 17:223-226, 1967.
5. Gallich JH, and French AL : The use Dexamethasone in Treatment of Cerebral Edema Resulting from Brain Tumors and Brain Surgery. Amer. Parct. 12:169-174, 1962.
6. Gillette DW, and Winderlich DA : Accelerated Growth of Mammary Tumor Cells in normal and Atymic Mice after Treatment in-vitro Dexamethasone. Cencer Reearch 38:3146-3149, 1978.
7. Güner M, Freshney RY, Morgan D, Freshney MG, Thomas D, Graham DI : Effect of Dexamethasone and Betamethason on in-vitro Cultures from Human Astrocytoma. Br. J. Cancer 35:439-447, 1977.
8. Kotsolimbos DG, Meyer L, Berson M, Taylor JM, Sheinberg LC : Corticosteroid Effect on Intracerebral Melanomate and Associated Edema. Somr Edema. Clin. Neurosurgery 10:212-233, 1964.

9. Ley KD, Tobey RA : Regulation of Initiation of DNA Synthesis in Chinese Hamster Cells. *J. Cell Biology* 47:453-459, 1970.
10. Lindgren A, and Westermark B : Serum Requirement and Density Dependent Inhibition of Human Malignant Glioma Cells in Culture. *Exp. Cell Research*. 104:293-299, 1977.
11. Lindgren A, Westermark B, and Ponten J : Serum Stimulation of Stationary Human Glia and Glioma Cells in Culture. *Exp. Cell Research*, 95, 1975.
12. Lippman ME, Wiggert BD, Chader GJ, and Thompson EB : Glucocorticoid Receptors. *Jour. of Biol. Chemistry*. 249:1916, 1974.
13. Mealey J, Chen TT, and Schanz GP : The Effect of Dexamethasone and Prednisolone on Cell Cultures of Human Glioblastoma. *J. Neurosurgery*. 34:324, 1971.
14. Sherbet GV, Laksami M, Salim K, and Haddad B : Does Dexamethasone Inhibit the Growth of Human Gliomas. *Jour. Neurosurgery*. 47:864-870, 1970.
15. Wilson CB, Barker M, Hoshino T, Oliver A, and Downie R : Steroid Induced Inhibition of Growth in Glial Tumors. A Kinetic Analysis. *Steroids and Brain Edema*. Ed's: Reulen H.J. and Schumann K., Springer-Verlag Newyork 95-100, 1972.