

FLORESİN İŞARETLEME İLE HÜCRE ÇEŞİTLEME

Dr. Fadıl Aktürk*

Anahtar kelimeler : Deksametazon, SSS, hücre kültürleri, floresin
Key words : Dexamethasone, Central nervous system. Cell cultures Flourescein,

Hücre siklusunda bölünmeden hemen sonra her iki hücrenin nukleusunda diploid kromozomal yapıya sahiptir. Bu safhadaki hücre siklusun G_1 fazında olarak kabul edilir. Daha sonra hücre DNA sentezine başlar (S) ve dönem yeniden bölünmeye kadar devam eder. Mitoz (M) sırasındaki hücrenin DNA sı 4 C dir. Mitozdan hemen önceki dönemdeki hücre G_2 fazındadır. Ancak 4C DNA ihtiva eden hücrelerden bir kısmı bölünmeyebilir. (Karaciğer ve SSS de olduğu gibi.)

Vücuttaki birçok organ fonksiyonel olarak farklı tip hücrelerin bir karışımıdır. Özel bir tip hücrenin diğerlerinden ayrılabilmesi birçok durumda faydalıdır. W.A. Bonner ve ark. (1971) hücreleri floresin özelliklerine göre ayırabilen bir cihaz yaptılar³. Daha sonra tek tip hücreler topluluğunda hücreleri, ihtiva ettikleri DNA miktarına göre ayırabilen bir cihaz geliştirildi⁵. Böylece bir dokuda artmış proliferatif yeteneği işaret eden fazla miktarda mitoz öncesi hücre olup olmadığını, bir anlamda malignitenin derecesini tayin etmek mümkün olmaktadır.

Beyin tümörlerinde sitostatik etkisi olduğu varsayılan steroidlerin kültürdeki hücrelerin DNA sentezini durdurarak onları G_1 fazında (2C) bloke etmesi beklenir. Ancak bu konuda bir araştırma yapılmamıştır.

Materyel ve Metot

Bu deneyde toplam 9 hücre tipi kullanılmıştır. Hücreler Southern General Hospital'de tedavi edilen ve histopatolojik tanıları aynı nöropatolog tarafından konulan hastalardan alınan doku örneklerinden hazırlandı¹.

* Karadeniz Üniv. Tıp Fakültesi, Nöroşirurji Anabilim Dalı Doçenti Trabzon

Flasklara ekilen hücrelerin yüksek dansiteye ulaşabilmeleri için 3 hafta beklendi ve 2. haftanın sonunda her deney için ayrılmış 2 flasktan birisine 10 ugr/ml deksametazon ilave edildi. 3. haftanın sonunda PE ile iki kez yıkandı ve tripsinizasyonla hücre solüsyonu elde edildi. PE ile yeniden yıkanan hücreler özel karıştırıcı üzerinde % 70 metanol ile muamele edildi. Santrifüjden sonra hücreler chromomycin A (Sigma lab) ile 4°C da 30 dakika bekletildi. Boyanmış hücre solüsyonları FaCs II (Becton Dickinson) de incelenerek hücrelerin floresin aktiviteleri ölçüldü.

Bulgular

Terminal hücre dansitesine ulaşan hücre kültürlerinin incelenmesinde tümör hücre kültürlerinde DNA sentez (S) ve mitoz (M) dönemindeki hücre sayısı normal hücre kültürlerine oranla daha fazla bulunmuştur.

10 µgr/ml deksametazonla 1 hafta süre ile tedavi edilen normal ve metastatik tümör hücre kültürlerinde kontrol kültürlerine oranla DNA sentez (S) dönemi hücre sayısında azalma saptanmıştır.

Astrositom, medullo blastom ve schwannomda deksametazona bağlı olarak DNA sentez ve hücre siklusu değişikliği önemli derecede olmamıştır.

Tartışma

Tümörler üzerine kortikosteroidlerin in-vitro etkilerini belirlemeye yönelik 1950 lerden bu yana yayınlanan araştırmalara göre steroidlerin tümör büyümesini durdurduğu^{6,7,8,11,12} veya hızlandırdığı^{1,9} hakkında kesin bir sonuç elde edilememiştir. İn-vitro düşük hücre dansitesinde hücre kültürlerinde deksametazonun 1-25 ugr/ml konsantrasyonlarda hücre poliferasyon ve koloni yapma yeteneğini arttırdığı ve bu etkinin en belirgin olarak 10 ugr/ml konsantrasyonda olduğu bilinmektedir^{1,2,9,10}.

Takao Hoskino ve ark.⁴ primer ve metastatik orijinli 50 farklı beyin tümörü ile floresin işaretli hücre çeşitleme analizi yapmışlardır. Sonuçta benign tümör özelliklerini çok sayıda DNA sentezinde hücre bulunması, tek tip karyotip olması ve tümör içinde çok az değişkenlik mevcudiyeti şeklinde özetlediler.

Tümör dokularında histopatolojik olarak normal dokulardan daha fazla mitoz görülmesi artmış proliferatif yeteneğin bir bulgusu olarak bilinir. Floresin işaretli hücre çeşitleme ile yapılan araştırmamda DNA sentez dönemi hücre sayısında malignite ile uyumlu bir artış saptanmıştır. Ancak 1 hafta süreyle yapılan deksametazon tedavisine bağlı olarak astrositom,

schwannom ve medulloblastom hücre kültürlerinde DNA sentezindeki hücre sayısı açısından kontrol hücre kültürlerine göre önemli bir farklılık bulunamamıştır. Normal hücre kültürleri ve metastatik hücre kültürlerinde ise deksametazona bağlı olarak (S) dönem hücre sayısında anlamlı düşüşler gözlenmiştir.

Bu durum normal beyin hücrelerinde deksametazona karşı mevcut olan özel ilginin malignite yönünde gelişme sonucu azaldığı ve hatta kaybolduğunu telkin etmektedir.

Özet

İnsan SSS hücre kültürlerinde deksametazon tedavisinin DNA sentezi (S) üzerine etkisini saptamak amacıyla 9 değişik tip hücre kullanıldı.

Yüksek dansiteye ulaşmış kültürlerden her hücre tipi için bir kontrol ve bir de 1 haftalık 10 ugr/ml deksametazon tedavisi alan olmak üzere ikişer örnek hazırlandı. Bu hücreler chromomycin A (Sigma lab) ile muameleden sonra FacS II ile (Becton Dickinson) incelendi.

Normal hücrelerle metastatik tümör hücrelerinde deksametazonla tedaviye bağlı G_1 de kısmi blok tesbit edilirken astrositik tümör hücrelerinde sentez ve mitoz devresine ulaşmış hücre sayısı normal hücrelere oranla daha fazla bulundu.

Summary

In order to evaluate the effect of dexamethasone treatment upon the synthesis of DNA in human central nervous system cell cultures, nine different type cell cultures were used. Twin high cell density cultures for each cell type were used and one of these was treated with 10 ugr/ml dexamethasone for one week.

These cells were investigated with FacS II (Beeton Dickinson) after treatment with chromomycin A (Sigma lab).

At the end of the research it was seen that, there were more cells in synthesis and myosis period in astrocytomas while there was partly blocage at G_1 phase, which is related to the dexamethasone treatment, in metastatic and normal cells.

Kaynaklar

1. Aktürk F : Beyin Normal ve Tümör Hücrelerine Deksametazonun İn-Vitro Etkileri. (Baskıda)
2. Arpels G, Babcock IV, Southam GM : Effect of steroids on Human Cell Cultures Sustaining Effect of Hydrocortisone. Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 115:102-106, 1964.
3. Fodge DW, Chao EL, Johnson HL : Glucocorticoid Binding and H Thymidin Incorporation into DNA in Embryonic Chick Cell Cultures Can. Research 33:3391-339, 1978.
4. Hoshino T, Nomura K, Wilson CB, Knebel KD, and Gray JW : The Distribution of Nuclear DNA From Human Brain Tumor Cells. Journal of Neurosurgery 49:13 - 21, 1978.
5. Jensen EV, and Jacobson HI : Recent Progress in Human Research. 18:387-411, 1962.
6. Ley KD, and Tobey RA : Regulation of Initiation of DNA Synthesis in Chinese Hamster Cells. J. Cell Biol. 47:453-459, 1970.
7. 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.
8. Lindgren A, Westermark B, and Ponten J. : Serum Stimulation of Stationary Human Glia and Glioma Cells in Culture. Exp. Cell Research: 95, 1975.
9. Mealey J, Chen TT, and Schanz CP : The Effect of Dexamethason and Methylprednisolone on Cell Cultures of Human Glioblastoma J. of Neurosurgery. 34:324, 1971.
10. Sherbet GV, Laksami M, Salim K, and Haddad B : Does Dexamethason Inhibit the Growth of Human Gliomas. Journal of Neurosurgery. 47:864-870, 1970.
11. Westermark B : The Deficient Density. Dependent Growth of Human Malignant Glioma Cells and Virus Transformed Glia. like Cells in Culture. Int. J. Cancer 12:438 - 451, 1973.
12. Wilson CB, Barker M, Hoshino T, Oliver A, and Downie R. 1972 Steroid Induced Inhibition of Growth in Glial Tumors. A Kinetic Analysis. Steroids and Brain Edema. Ed's. Reulen H.J. and Schurmann K. Springer-Verlag. New York 95 - 100.