

SENTRAL SINIR SİSTEMİ HÜCRELERİNİN STEROİD RESEPTÖR SİSTEMİNİN İNCELENMESİ

Dr. Fadıl Aktürk*

Anahtar kelimeler : Deksametazon, SSS tümörleri, Spesifik steroid reseptörü, Scatchard analizi

Key words : Dexamethasone, central nervous tumours, spesific steroid receptors, Scathard analyse

Steroid hormonlar kan akımı ile tüm vücuda yayılmalarına rağmen sadece belirli organ ve dokuları stimule ederler. İlk araştırmacılar bu basit gerçekten hareketle belirli hormona cevap veren organların bu hormonları tanıyıcı özel üniteleri veya reseptörleri olması gerektiğini öne sürdüler. Çok düşük konsantrasyonda dahi in-vivo olarak aktif olan bu hormonların aktivitelerini steroidlere yüksek bağlanma yeteneği gösteren reseptörler sayesinde olduğu düşünülmüştür^{2,12}.

Steroidlerin hücre içine girişi difüzyon yoluyla gerçekleşir. Steroid stio-plazma içerisinde ya reseptörle birleşerek reseptör-steroid (RcS) kompleksini veya nonspesifik elemanlara bağlanarak nonspesifik-steroid (NS) kompleksini meydana getirir. Daha sonra spesifik olarak bağlanmış RcS kompleksi nukleus içine girer⁶.

Kanda basit yöntemlerle tayin edilen hormon miktarı ile hedef organda hormon stimülasyonu hakkında karar vermek yanıltıcı olabilir. Ayrıca kanda bol miktarda bulunan, fakat steroide özel ilgi göstermeyen bağlayıcı elementler (albumin gibi) steroid dağılımını etkilerler¹⁰.

Steroid reseptörlerin hormonun kandaki 10^{-10} — 10^{-8} M konsantrasyonunda bağlanabilmeleri için için yüksek affiniteye sahip olmaları gerekir. Aksi halde organ hormona cevap veremeyecektir. Eğer hücre hiç reseptör ihtiva etmiyorsa, yani hormona hiç cevap vermiyorsa değerlendirmek ko-

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

laydır. Fakat cevap alınıyorsa alınan cevap ile hücrede mevcut reseptör miktarının tayin edilebilmesi olasılığı vardır. Araştırma bu varsayıma dayandırılmıştır.

Materyel ve Metot

Hücreler Southern General Hospital'de tedavi gören ve histopatolojik tanıları aynı nöro - patolog tarafından konulan hastalardan alınan doku örneklerinden hazırlandı¹. Flasklara ekilen hücreler terminal hücre dansitesine ulaştıktan sonra en az 5 gün geçmiş olduklarında steroid bağlama deneyleri için kullanılabilir olarak kabul edildi. Deney öncesi tüm hücre kültürleri 2 saat süreyle serumsuz kültür vasatında (Ham's F 10) bırakıldı. PE ile yıkanan hücreler 5 saniye süreyle 10 ml % 0,25 tripsinle muamele edildi ve 37°C da 20 dakika bekletildi. Daha sonra pipet yardımıyla 20 ml PBS (oxid ltd) içerisine alınan hücreler 2000 Rpm de 5 dakika santrifüj sonrası 10 ml Ham's F 10 ile suspanse edildi ve 0,4 ml alınarak 19,6 ml sayma mayisi içerisinde ml deki hücre sayısı tayin edildi. (Coulter Elect. Ltd.)

İdeal inkubasyon sıcaklığını ve süresini tayin için yapılan ön deneylerde 2 normal (NAB, NMB), bir astrositom (ATE) ve bir metastatik tümör (CAM) hücre kültürü kullanıldı. İçlerine 1'er ml Ham's F 10 içerisinde hücre konulan 12 tüpün hücrelerin yüzeye yapışmaması için sallanan tabla üzerinde hareketli kalmaları sağlandı. Bütün tüplere $0,4 \times 10^{-8}$ M radyoaktif işaretli deksametazon ve $0,4 \times 10^{-6}$ işaretlenmemiş deksametazon ilave edildi. Aynı deney 4°C da ve 37°C da aynı şekilde uygulandı. Daha sonra 1, 2, 4, 28, 16 ve 24. saatlerde her iki sıcaklıktaki örneklerden ikişer tanesi alınarak hücrelere bağlanmış deksametazon miktarı radyoaktivite sayacında (Packard 2405) sayılarak belirlendi.

Steroid reseptörlerin saturasyonu deneylerinde 3 normal (NOR, MPB, NMB), 4 astrositom (MOS, KML, KEG, UVW) ve bir meningiom (KNN) hücre kültürü kullanıldı. İçlerinde bilinen sayıda hücreyi ihtiva eden 1 ml Ham's F 10 bulunan 16 tüp ikişerli gruplara ayrıldı ve gruplara giderek artan konsantrasyonlarda (0,02, 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,2 ve 0,24 ugr/ml) radyoaktif işaretli deksametazon ve 0,12 ugr konulan tüplere ayrıca 12 ugr/ml işaretlenmemiş deksametazon konuldu. İnkubasyon 4°C ta soğutulmuş 19'ar ml PBS ilave edildi. Santrifüjden sonra 1 ml süpernatant serbest aktivite sayımı için tutuldu ve geri kalan süpernatant imha edildi. Sediment içerisindeki hücreler 4°C da soğutulmuş PBS ile iki kez yıkandı

ve her defasında 3000 APM de 15 dakika santrifüj edildi. Son sediment üzerine 5 ml 50 mM NaCl içerisinde % 0,1 Triton X ilave edildi ve kuru buzla soğutulmuş saf metanol ile akut olarak donduruldu. Oda sıcaklığında erimeye bırakılan örnekler aynı yöntemle iki kez daha dondurulup erimeye bırakıldı. Tüm örnekler 8500 Rpm de 15 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant 3 ml "Ph" sı 7,4 olan Dextran Coated Charcoal (Farmatia ve Sigma) ile karıştırıldı ve 8500 Rpm de yeniden 15 dakika santrifüj edilerek supernatant sayım için saklandı. Dondurma - eritme den sonraki santrifüjden elde edilen sediment ise 5 ml % 0,9 NaCl ile yıkandı ve santrifüj edildi. Elde edilen sediment üzerine 5 ml 1,3 m NaOH + Sodium Louryl sulphate (Hopkins ve Williams) ilave edilerek sayım için saklandı. Böylece 1) Bağlanmamış radyoaktif işaretli deksametazon miktarını saptamak için, 2) Dextran coated charcoal ile muameleden sonra elde edilen, 3) 1,3 m NaOH + Sodium Lauryl Sulphatla karıştırılarak saklanan üç grup örneğin hepsi, üzerlerine eş miktarda instagel ilave edilerek sayaçta sayıldı.

CPM X 100

Tüm sayımı yapılan örnekler için $\frac{\text{CPM X 100}}{\text{Değişim oranı}}$ formülü ile total DPM

hesaplandı. Süre tayin deneylerinde DPM, zamana karşı grafiklenerek bağlanmanın en yüksek olduğu zaman belirlendi. Saturasyon deneylerinde ise DPM artan konsantrasyona karşı grafiklenerek saturasyon eğrileri çizildi. Ayrıca hücreler içerisinde bağlı radyoaktif işaretli deksametazonun f.mol

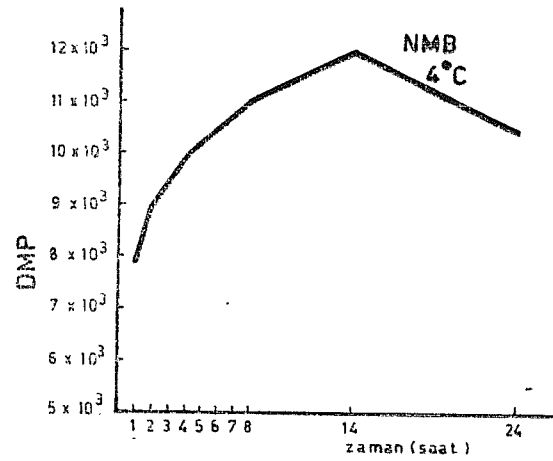
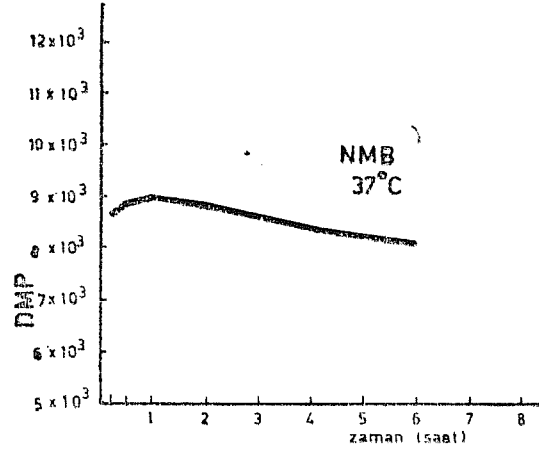
olarak miktarı $\frac{\text{Bağlanmış}}{\text{Serbest}}$ radyoaktif işaretli deksametazona karşı gra-

fiklenerek (Scatchard analizi) doğrular elde edildi. Doğrunun X eksenini kestiiğ noktada okunan rakam o tip hücrede mevcut reseptor miktarının f.mol olarak değeri olarak kabul edildi.

Bulgular

İdeal inkubasyon süre ve sıcaklığını belirlemek maksadıyla yapılan ilk aşama deneyler radyoaktif işaretli deksametazonun 4°C da 37°C da inkubasyona oranla daha geç ve fakat daha sıkı bir bağlanma yaptığını göstermiştir (Şekil 1).

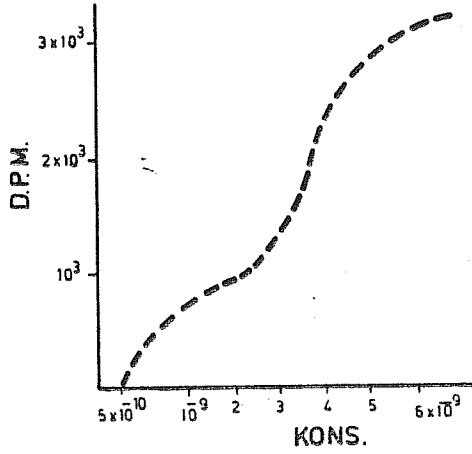
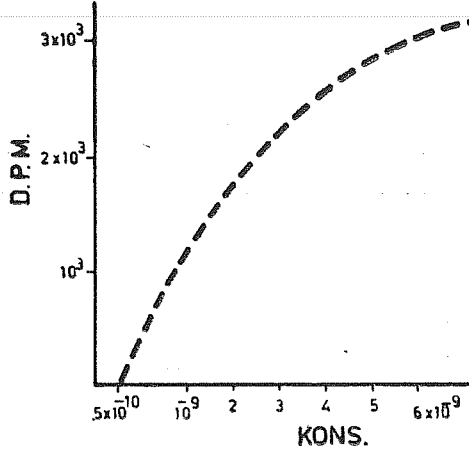
Şekil : 1



Farklı sıcaklıklarda değişik inkubasyon sürelerince radyoaktif işaretli deksametazonla tedavi edilen NMB hücrelerinin bağlanma eğrileri

Tüm hücre tiplerinde bağlanmanın en yüksek bulunduğu zaman tedavinin başlangıcından itibaren 14-16 saat sonrası idi.

Saturasyon deneylerinde sayım sonuçlarından hesaplanan total DPM nin konsantrasyona karşı grafiklelenmesinde 3 normal ve 2 astrositonda tatmin edici bir saturasyon elde edilirken 2 astrositom ve 1 meningiomdan iki adımlı saturasyon eğrisi elde edildi (Şekil 2).



Şekil 2

a NMB ve b UVW (astrocytoma) hücrelerinde tek ve iki adımlı saturasyon eğrileri.

Deksametazon tedavisi yapıldıktan sonra radyoaktivite sayacında sayım yapılarak reseptörlere bağlı radyoaktiviteyi belirlemek için radyoaktivite sayacında sayılan tüm örneklerde uygulanan Scatchard analizi¹¹ sonuçlarına göre hücrelerde mevcut reseptör miktarları f.mol olarak tablo I değerlendirilmiştir.

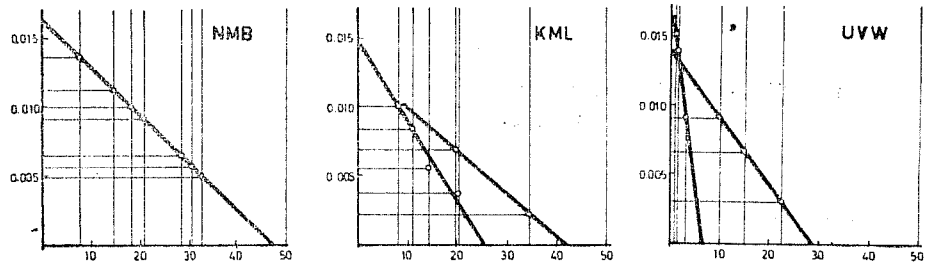
TABLO I

**Değişik Tip Hücrelerde Mevcut Spesifik Steroid
Reseptör ve Non Spesifik Reseptör Miktarları
f mol/10⁶ Olarak Görülmektedir**

Hücre Kodu	Reseptör miktarı (f mol/10 ⁶ hücre)	
	Spesifik	Nonspesifik
NOR	47	
MPB	44	
NMB	48	
UVW	6	29
MOS	11	18
KML	25	42
KEG	21	41
KNN	14	25

Histopatolojik olarak yüksek gradeli astrositom olarak değerlendirilen UVW ve MOS hücrelerinde spesifik steroid reseptör miktarı çok düşük bulunurken grade 1-2 astrositomlarda (KML, KEG) ve reseptör miktarı biraz daha yüksek bulunmuştur. Glial tümörlerde düşük miktardaki spesifik reseptör yanında bir miktarda non spesifik bağlanma tesbit edilmiştir (Şekil 3).

Şekil 3



**Normal, düşük ve yüksek gradeli astrositom hücre kültürlerinde
hücrelerde mevcut reseptör miktarı Scatchard analizi
sonucuna göre grafiklenmiştir**

Tartışma

Santral sinir sistemi (SSS) patolojilerinde sık olarak kullanılan kortikosteroidlerin ödemi azaltıcı etkileri sayesinde klinik iyileşmeyi sağladıkları kabul edilmektedir. Ancak steroidlerin natür olarak normal hücreler üzerindeki bu etkilerinin mekanizması ve tümör hücreleri üzerine etkilerinin ne olduğu konusunda tartışma sona ermemiştir^{3,4,8}. Genel kanıya göre steroid hormonlar hücre membranını penetre ederek sitoplazmik steroid reseptörle birleşmekte ve meydana gelen kompleks nukleus içine girmektedir^{5,7}. Marks Lippmann ve ark. tavuk embrio retinasında radyoaktif işaretli deksametazonla yaptıkları yarışmalı protein bağlama deneylerinde reseptörlerin varlığını ve bu reseptörlerin 4×10^{-8} M deksametazonla sature olduğunu göstermişlerdir⁹. Santral sinir sistemi patolojilerinde etkili olduğu bilinen deksametazonun, etkisini hücrelerde mevcut spesifik reseptörler üzerinden yaptığını gösteren bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır.

Değişik SSS tümörleri ve normal beyin hücrelerinden elde edilen hücre kültürlerinde aynı konsantrasyonda steroidle farklı oranda hücre sayısında azalma olması hücrelerin deksametazona ilgilerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır¹. Değişik bir anlatımla hücrelerdeki spesifik reseptör sayısının farklılığı söz konusudur.

Hücrelerin deksametazonla tedavilerinde 4°C da inkubasyonun reseptörle interaksyonun daha sağlıklı olduğu Howard A Young ve ark.¹³ yaptığı araştırmada da tesbit edilmiştir. Benzer çalışma Arpat C. Fazekas ve John K Mc Farlane tarafından 100 primer ve 22 metastatik meme tümörü hücre kültüründe yapılmış ve ideal inkubasyon süresi 18 saat olarak bulunmuştur⁶.

Bu araştırmada radyoaktif işaretli deksametazonla inkubasyon süresince hücrelerin sürekli hareketli olmaları sağlandı. Inkubasyon sonunda sitoplazma dış yüzeyine yapışan deksametazon PBS ile 3 kez mekanik yıkamayla alındı ve serbest deksametazon olarak sayıldı. Yıkamalardan sonra hücrelerde radyoaktivite bulunması steroidin bir reseptörle bağlı olarak hücre içerisinde kalabildiğine işarettir. Sitoplazma membranı dış yüzeyindeki ceplere giren ve yıkama ile çıkarılamayan proteinlerin dışarıya alınması için hücreler deney öncesi 2 saat serumsuz vasatlarda preinkubasyona tabi tutuldu.

Hücrelerin Triton X le muamelesi ve saf metanolla 3 kez dondurulup eritilmesiyle hücre membranı parçalandı ve sitoplazma içi serbest deksametazon dextran ocated charcoal ile sayım dışı bırakıldı. Sitoplazma içi bağlı

deksametazon ve nukleuslar ayrı ayrı sayacıta sayıldı. Nukleuslarda radyo-aktivite tesbit edilememesi reseptör steroid kompleksinin nukleus içeri- sine taşınmadığı, sitoplazma içerisinde kaldığını göstermektedir.

Reseptörlerle interaksiyona giren radyoaktif işaretli deksametazon mik- tarı tedavide kullanılan deksametazon konsantrasyonu ile bağımlı olarak artmaktaydı. Bu doyurulabilirlik literatürle uyum göstermektedir.

Normal hücrelerde 44-48 f mol/10⁶ hücre spesifik steroid reseptörü bu- lunurken astrositomalarda malignitenin artışı ile ters orantılı olarak azalan miktarda spesifik reseptör bulunması normal hücrelerin malignite yönün- de gelişirken spesifik reseptörlerini kaybettiklerinin açıkca delilidir. Astrositomalarda azalmış miktardaki spesifik reseptör yanında nonspesi- fik reseptörlerin bulunuşuda reseptör sisteminin bozulmuş olmasının do- laylı delili olarak kabul edilmelidir^{10,12}.

Sonuç olarak beyin tümörlü hastalarda çevre beyaz madde ödemi çöze- rek klinik iyilik sağlayan deksametazonun tümör hücrelerine doğrudan etki ile sitostatik yada sitotoksik etki yapamayacağı anlaşılmaktadır.

Bulgular floresin işaretli hücre çeşitleme deneylerinde² deksametazon te- davisine bağlı olarak normal hücrelerde (S) fazında hücre sayısı azalırken tümör hücrelerinde önemli bir fark olmamasıyla paralellik göstermek-

Özet

Santral sinir sistemi patolojilerinde ve özellikle tümörlerinde genişce kullanım alanı olan deksametazonun normal hücre ve tümör hücreleri üze- rine etki mekanizmasını belirlemek amacıyla 8 değişik doku örneğın- den hazırlanan hücre kültürü kullanılmıştır. İki aşamada yapılan deneyle- rin ilk aşamasında hücrelerin deksametazonla interaksiyona girmesi için gerekli inkubasyon süresi ve ortam sıcaklığı belirlenmiştir. 4°C da 14 saat inkube edilen hücrelerin deksametazonla daha sağlıklı bir birleşme gösterdikleri ortaya çıkmıştır. İkinci aşamada hücreler üzerine 0,02 ugr/ml 0,24 ugr/ml radyoaktif işaretli deksametazon ve hücrelerin saturasyon eğrisi elde edilmiştir. Sonuçlara göre normal ve düşük gradeli astrosito- malarda doyurulabilir tek tip spesifik steroid reseptörü bulunmuştur. Yük- sek gradeli astrositomalar ve meningiomda ise spesifik steroid reseptör miktarı azalmış olarak tesbit edilmiştir.

Summary

To investigate the mechanism of the effect of dexamethasone on normal and tumour cells, which is very important to threat the central nervous

system pathologies especially tumours, cell cultures which prepared from eight different tissue specimens, were used. In the first step of the research, the ideal incubation period and temperature for interaction between the cells and dexamethasone have been investigated. And it was seen that the interaction was more healthier at 4°C and for 14 hours incubation. In the second step of the research, 0,02 - 0,24 ugr/ml radio-actuated dexamethasone and 12 ugr/ml dexamethasone simultaneously added to the cell cultures and saturation curves were drawn. The results showed that normal cells and low grade astrocytomas had only one type saturable specific steroid receptors and high grade astrocytomas and meningiomas had fewer specific steroid receptors.

Kaynaklar

1. Aktürk F.: Beyin Normal ve Tümör Hücrelerinde Deksametazon'un İn-Vitro Etkileri (Baskıda).
2. Aktürk F.: Floresin İşaretleme ile Hücre Çeşitleme (Baskıda).
3. Baxter GP, Tomkins GM.: Glucocorticoid Hormone Receptors. Advances in the Biosciences. Ed. Raspe G, New York, Pergamon, 1970.
4. Baxter GP, Tomkins GM.: Glucocorticoid Hormone Receptors in Hepatoma Tissue Culture Cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 68:932-937, 1970
5. Clark JH, Pack EJ, Jr.: Receptors and Hormone Action Vol 1. Steroid Hormone Receptors: Basic Principles and Measurements. Ed. O'Malley, B.W. Eirnbaur Lutz A. Press: London 383 - 410, 1977.
6. Fazekas AG, Mac Farlane JK.: Macro Molecular Binding of Glucocorticoids in Human Mammary Carcinoma, Cancer Research 37:640-645, 1977.
7. Vensen EV, Jacobson HI.: Recent Progress in Human Research 18:387-411, 1962.
8. Levinson BB, Baxter JD, Rousseau GG.: Cellular site of Glucocorticoid Receptor Complex Formation. Science: 175 - 189, 1972.
9. Lipman ME, Wiggert ED, Chader GJ, and Thompson EB.: Glucocorticoid Receptors. Jour. of Biol. Chemistiy: 249, 1916, 1974.
10. Rosenau W, Baxter JD, Rousseau GG, and Tomkins C.: Mechanism of Resistance to steroids glucocorticoid Receptor Defect in lymphoma Cells. Nature New Biol. 237:20 - 24, 1972.
11. Scatchard G.: The Attraction of Protein for small Molecules and Ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51. 660 - 672, 1949.
12. Tucher WS, Kirsch WM, Martinez A, and Fink LM.: İn - Vitro Plasminogen activator Activity in Human Brain Tumors. Cancer Research: 38:297, 1978.
13. Young HA, Scolnick EM, and Parks WP.: Glucocorticoid Receptor Interaction and Induction of Murine Mammary Tumor Virus. The Jour. of Biol. Chemist 250:3337-3343, 1975.

