

C6 SIÇAN GLİOMA HÜCRELERİ ÜZERİNE ALOE EMODİN VE CİSPLATİNİN ETKİLERİNİN İKİ VE ÜÇ BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜR MODELLERİNDE İNCELENMESİ

THE EFFECTS OF ALOE EMODIN AND CISPLATIN ON RAT GLIOMA CELL LINE IN TWO AND THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE MODELS

Cem GAZİ, Leyla TAPUL*

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, doğal bir antrakinon türevi olan aloe emodin ve organoplatinler grubundan kemoteropatik bir ilaç olan cisplatinin ayrı ayrı ve birarada kullanıldıklarında C6 glioma hücre soyu üzerine etkilerini iki ve üç boyutlu tümör hücre kültür modelleri kullanılarak incelemektir.

Gereç ve yöntem: İki boyutlu kültürlerde iki ilacın ayrı ayrı ve birlikte kullanımları 12, 24, 48, 72. saatlerde hem hücre çoğalması, hem de hücre siklusu sentez fazı açısından incelendi. Üç boyutlu hücre kültürü modelinde ise her iki ilacın ayrı ayrı ve kombine kullanımları 72. saatte hücre siklusu sentez fazı ve hücre ince yapısı açısından değerlendirildi.

Bulgular: Aloe emodin, iki boyutlu kültürde hücre çoğalmasını azaltıcı etki gösterdi ve hücre siklusu sentez fazı işaretlenmesinde azalma meydana getirdi ($p<0,0125$). Üç boyutlu kültürde de sentez fazında azalmaya yol açtığı görüldü ($p<0,0125$). Sferoid morfolojisinde belirgin bir bozukluk tespit edilmedi. Cisplatin de iki boyutlu kültürde hücre çoğalmasını azalttı ve hücre siklusu sentez fazı işaretlenmesinde daha belirgin azalma meydana getirdi ($p<0,0125$). Üç boyutlu kültürde de sentez fazında daha etkin azalmaya yol açtığı görüldü ($p<0,0125$). Sferoidlerin genel morfolojileri kontrol ve aloe emodin grubuna göre bozuktur. Kombinasyon grubunda iki ve üç boyutlu kültürlerde elde edilen bulgular cisplatin grubunda elde edilen bulgularla benzerdir.

Sonuç: Aloe emodin ve cisplatin kombine uygulandıklarında C6 glioma hücreleri üzerine etkileri iki ve üç boyutlu kültür modellerinde incelendiğinde hücre siklusunda sentez fazındaki hücrelerin sayısında azalmaya yol açarak hücre proliferasyonunu azalttığı ve hücre yapısında bozulmaya yol açtığı gözlemlendi. Ancak aloe emodinün cisplatinin etkisini artırıcı ya da azaltıcı yönde bir etkisinin bulunmadığı da tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Aloe emodin, cisplatin, C6 glioma, sferoid, hücre kültürü

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to examine the effects of aloe emodin, a natural anthraquinone derivate, and cisplatin, a chemotherapeutic drug from organoplatins group, on C6 glioma cell line with the use of two and three-dimensional tumour cell culture models.

Materials and methods: For this purpose, the drugs were administered both alone and in combination for 12, 24, 48, 72 hours and the effects on cell proliferation and the S-phase fraction were determined in two-dimensional cell culture. In three-dimensional cell culture, the effects of two drugs used alone and in combination were studied at 72 h by determining the S-phase fraction and evaluating the ultrastructure of the cells.

Results: Aloe emodin has reduced cell proliferation and S-phase fraction in two-dimensional cell culture ($p<0,0125$). Aloe emodin has also reduced S-phase labeling in three-dimensional cell culture ($p<0,0125$). No significant disruption has been detected in spheroid morphology. Cisplatin has reduced cell proliferation and S-phase fraction in two-dimensional cell culture to a greater extent when compared to aloe emodin. Cisplatin also decreased S-phase labeling index in three-dimensional cell culture significantly when compared to other groups. The overall morphology of the spheroids was observed to be more strongly destroyed compared to aloe emodin and control groups. The findings obtained by administrating the combination of both drugs in two and three-dimensional cultures were similar to those of the cisplatin group.

Dergiye geldiği tarih/ Date received: 17.01.2007

* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Çapa
(İletişim kurulacak yazar: tapul@istanbul.edu.tr)

- Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: T-529/21102004

Conclusion: In conclusion, the combination of aloe emodin and cisplatin decreases cell proliferation and S-phase fraction and causes disruption of the morphology of C6 glioma cells in two- and three-dimensional cell culture models, but no aggravation or alleviation of the effects of cisplatin can be observed by aloe emodin treatment.

Key words: Aloe emodin, cisplatin, C6 glioma, spheroid, cell culture

GİRİŞ

Kanser, kalp hastalıklarından sonra tüm ölümlerin ikinci en sık sebebidir (19). Kanser tipine ve gelişim evresine bağlı olarak cerrahi çıkarım, radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin ya tek başlarına ya da kombine kullanımıyla tedavi edilmektedir (17). Ancak hastaların bir kısmı hastalıklarının tedavisi süresince çeşitli destekleyici ve alternatif tedavi yöntemlerini kullanmaktadırlar. Bunlar arasında enerji tedavileri, bitkisel tedaviler, akupunktur, meditasyon gibi değişik yöntemler vardır. Bu yaklaşımlardan bitkisel tedavilere gerek ülkemizde gerekse dünyada oldukça sık başvurulmaktadır (1,13). Diğer yandan doğal yollarla elde edilen ilaçların yan etkilerinin az olduğu düşünülmeyle birlikte bu ilaçların klinik kullanıma geçirilmeden önce yararları olduğu kadar zararlı etkileri bulunabileceği gerçeğinden hareketle, etkilerinin çok dikkatle araştırılmasının gerekliliği ortadadır. Tedavi seçiminde yararı bilinen ve yan etkisi olmayan uygulamaların tercih edilmesi gerektiği de açıktır (14).

Malign beyin tümörlerinin oluşumunun ve gelişmesinin anlaşılmasında ve buna dayalı tedavilerin saptanmasında, in vivo çalışmalarda hayvan tümör modelleri vazgeçilmez kaynaklardır. Hayvan beyin tümörlerinin, insan beyin tümör modelleri ile olan benzerlikleri, klinikte parametrelerin tanımlanması ve doğru tedavinin uygulanması açısından oldukça yol göstericidir (5). Primer beyin tümörlerinin %60 kadarını gliomalar oluştururlar (4). Glioblastoma multiforme (GBM) neoplastik hücrelerin merkezi sinir sistemine infiltrasyonu sonucu nörolojik fonksiyon kaybına ve sonunda da ölüme yol açan bir kanserdir. C6 glioma hücreleri yüksek mitotik aktivite, nükleer pleomorfizm, tümör nekroz odakları, tümör içi kanama gibi çeşitli malign glioblastoma karakteristiklerine sahip hücreler olarak GBM araştırmalarında kullanılmaktadır. Wistar-Furth sıçanların N-N' nitrozometilüre uygulanmasıyla oluşturulan C6 glioma tümör hattı ilaç etkileşimi çalışmaları için tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır (5).

Bitkisel kaynaklı antrakınon türevidir olan aloe emodinün antikanser etkinliği çeşitli deneysel çalışmalarda araştırılmıştır (9,10,11,16,18,21). Aloe emodinün bu etkisi çeşitli tümör hücreleri kullanılarak tek tabakalı kültür modellerinde araştırıldığına antikanser özelliğini değişik mekanizmalarla gerçekleştirdiği bildirilmiştir. C6 glioma hücreleri ile yapılan bir in vitro çalışmada aloe emodinün apoptozis, otofaji ve astrositik farklılaşmaya yol açarak antitümör etki gösterdiği belirtilmektedir (11).

Kanser tedavisinde kombine ilaç kullanımında amaç, tedavinin başarısını artırmak ve olası ilaç yan etkilerini azaltmaktır. Bu çerçevede; aloe emodinün çeşitli antikanser ilaçlarla kombinasyon durumunda etkinliğinin değişip değişmeyeceği araştırılmaktadır. Bu araştırmalardan birinde aloe emodinün cisplatin ile birlikte kullanıldığında C6 glioma hücrelerinde cisplatinin toksik etkisini azalttığı ifade edilmiştir (12). Diğer bir

araştırmada ise Merkel hücreli kanser hücre soylarında aloe emodin, doxorubicin ve 5-fluorouracil gibi antikanser ilaçlarla birlikte kullanıldığında, aloe emodinün bu ilaçların özellikleriyle düşük dozlarındaki antikanser etkinliklerini arttırdığı gözlenmiştir (3).

Cisplatin klinikte genellikle ovaryum, testis ve idrar kesesi kaynaklı kanserlerin tedavisinde kullanılmakta olan platin grubu bir ilaçtır. Cisplatin hücre içersine girerek DNA ile zincir içi ve zincirler arası köprüler kurarak kovalent bağlar yapar. Çeşitli deneysel çalışmalarda da cisplatinin C6 glioma hücrelerinde hücre siklus duraklamasına ve apoptozise yol açtığı gösterilmiştir (7,15).

Antikanser etki mekanizması araştırılan aloe emodinün C6 glioma hücreleri veya diğer hücre soyları ile yapılan çalışmalarda genellikle iki boyutlu kültür modelleri kullanılmıştır. Aloe emodinün üç boyutlu tümör sferoidlerinde etkisinin araştırıldığı çalışmalara rastlamadık. Oysa ki; gerek aloe emodinün tek başına kullanımında gerekse cisplatin ile kombine edildiğinde oluşturacağı antitümör etkiyi, in vivo modellere yakın olan tümör sferoidlerinde değerlendirmek klinik kullanıma geçişi kolaylaştıracaktır.

Çalışmada, doğal bir antrakınon türevidir olan aloe emodin ile cisplatinin ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında C6 tümör hücreleri üzerine etkilerinin, hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültürlerde incelenmesi amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre kültürü koşulları ve kullanılan ilaçlar

Bu araştırmada Amerikan Hayvan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından sağlanan sıçan C6 glioma (ECACC no:558807) hücre soyu kullanıldı. C6 hücreleri için besi ortamı, inaktive edilmiş %10 FCS, 0,2mM glutamin, 100 IU/ml penisilin ve 100 _g/ml streptomisin içeren DMEM-F12 medyumunu (Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumunu, besleyici karışım F12 Ham Medyumunu) dur. Hücreler bu besi ortamını içeren 25cm_ ve 75cm_'lik flakslarda, iç ortamı %5 CO₂, %95 nem içeren ve 37°C olan inkübatör (Sanyo) içinde tutularak ve haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi. Aloe emodin (A 7687 25 mg, Sigma) saf Dimethylsulfoxide (DMSO, D2650, Sigma,) içerisinde hazırlandı. Cisplatin (Ebewe 10mg) ise steril serum fizyolojik ile dilüe edildi.

Deney protokolleri

Çalışmanın ilk aşamasında, 6 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna %100 canlı 500 000 C6 hücresi 5 ml DMEM-F12 medyumunu içinde ekildi. Aloe emodinün 10, 20 ve 40 µM dozlarında, cisplatin ise 0.1, 1 ve 10 µg/ml dozlarında uygulandı. Kontrol gruplarına ise herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı. Aloe emodin ve cisplatinin etkin dozlarının belirlenmesi için 12, 24, 48 ve 72. saatler sonunda zamana ve doza bağlı proliferasyon değerleri belirlendi.

Çalışmanın ikinci aşamasında kontrol, aloe emodin, cisplatin ve kombinasyon grubu (Aloe emodin + cisplatin) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Aloe emodinün etkin dozu olarak 20 µM/ml, cisplatinin etkin dozu olarak ise 1 µg/ml kullanıldı. Tüm gruplarda 12, 24, 48 ve 72. saatler sonunda zamana ve doza bağlı hücre proliferasyon oranları tespit edildi.

İmmünohistokimyasal Yöntemler

Kontrol ve deney gruplarına ait hücrelerin BrdU ile işaretlenme indekslerinin tespiti amacıyla, her bir grup için 24 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 40 000 canlı C6 hücresi lamel üzerine ekildi. Aloe emodin, cisplatinin ve kombinasyon gruplarına ilaçların etkin dozları uygulanırken kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda, tüm gruplardaki hücreler 1 saat süreyle BrdU ile muamele edildi. Daha sonra hücreler %70 etanolde 0 oC'de 30 dk da tespit edilerek immünohistokimyasal prosedür için hazırlandı.

Üç boyutlu kültür modelinde ise, her bir grup için agarla kaplanmış 6 kuyucuklu kültür kaplarınının her bir kuyucuğuna 5 ml medyum içerisinde 1.000.000 canlı C6 hücresi ekildi. Hücreler rutin bakımları yapılmak kaydıyla nemli %5 CO2 hava karışımı ortamda 37oC'de 7 gün süreyle sferoid oluşumu için bekletildi. Deney grubu sferoidlerine etkin dozlarda ilaçlar uygulanırken kontrol grubu sferoidlerine ise herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda tüm gruplardaki sferoidler 1 saat süreyle BrdU ile muamele edildikten sonra %10 formaldehitte tespit edildi. Rutin takip işlemlerinden sonra parafinde bloklandı.

İki boyutlu ve üç boyutlu kültürlerde immünohistokimyasal boyamada primer antikor olarak, NCL-BrdU (mouse, monoclonal), sekonder antikor olarak ise Biotinylated Goat Anti-Mouse kullanıldı. Preperatlar ışık mikroskopunda (Olympus CX21) değerlendirilerek sentez fazındaki hücrelerin BrdU ile işaretlenme oranları belirlendi.

Elektron mikroskopik yöntem

Kontrol ve deney gruplarındaki sferoidler %1.5 gluteraldehitte 30 dk 4oC de bekletilerek tespit edildi. Daha sonra OsO4 te 60 dk 4oC postfiksasyon yapıldı. %1 uranil asetatla 15 dk tutulduktan sonra rutin takip yapılarak Epon 812 ile bloklandı. İnce kesitler kurşun sitrat ve uranil asetatla kontrastlaması yapılarak transmisyon elektron mikroskopunda (JEOL 1011, Japan) incelendi.

İstatistiksel Analiz

Yapılan deneylerden elde edilen verileri değerlendirmede SPSS 11.0 istatistik programı kullanıldı. Ölçüm değerleri homojen dağılım göstermediği için non-parametrik testlerde çalışıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığını değerlendirmede Kruskal-Wallis Varyans analizi testi kullanıldı. Anlamlılık sınırı p< 0,05 olarak kabul edildi. Anlamlı bulunan varyans analizi sonuçları Post-hoc testlerden Bonferroni ile sorgulandı. Bonferroni çalışırken anlamlılık sınırı (4 grup bulunduğu için) p< 0,0125 olarak hesaplandı.

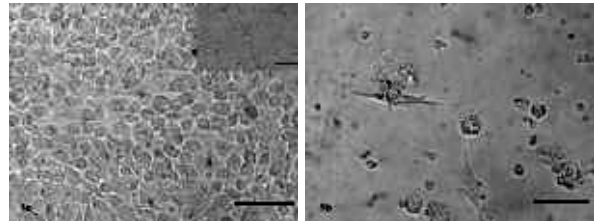
BULGULAR

Aloe emodinün 10µM dozu tüm saatlerde kontrol grubundaki hücre sayısına göre çok az miktarda azalmaya yol açmasına karşın, 20µM ve 40 µM dozları tüm saatlerde kontrole göre hücre sayısında anlamlı bir azalma meydana getirdi (p<0,0125). Ancak aloe emodinün 20 µM ile 40 µM dozları arasında 48 ve 72. saatlerde anlamlı bir fark gözlenmemesi dolayısıyla etkin doz olarak 20µM dozu seçildi.

Cisplatinin 0,1 µg/ml dozu kontrol grubu ile kıyaslandığında 12. saatte bir değişme yaratmazken 24, 48 ve 72. saatlerde hücre sayısının kontrole göre anlamlı bir azalma gösterdiği, 1 µg/ml ve 10 µg/ml dozlarının ise tüm saatlerde kontrol ve 0,1 µg/mL doz uygulanan gruba göre hücre sayısında anlamlı bir azalma yarattığı belirlendi (p<0,0125).

1 µg/mL ve 10 µg/mL dozları arasında 48. ve 72. saatlerde anlamlı bir fark gözlenmediğinden etkin doz olarak 1 µg/ml doz seçildi.

İki boyutlu hücre kültür modelinde yapılan kontrol, aloe emodin, cisplatin ve kombinasyon gruplarına ait hücre proliferasyon değerlendirmeleri Şekil 1'de gösterilmektedir. Kontrol grubuna göre aloe emodin (20 µM) ve cisplatinin (1 µg/mL) birlikte kullanıldığı kombinasyon grubunda tüm saatlerde hücre sayısı anlamlı bir şekilde azaldı (p<0,0125) (Resim 1a ve b). Ancak bu grup ile tek başlarına uygulanan aloe emodin ve cisplatin grupları kıyaslandığında ve tüm saatlerde hücre proliferasyonu değerlendirildiğinde anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0,0125). Aloe emodin ile kombinasyon grubu arasında fark sadece 24. saatte anlamlıydı (p<0,0125).

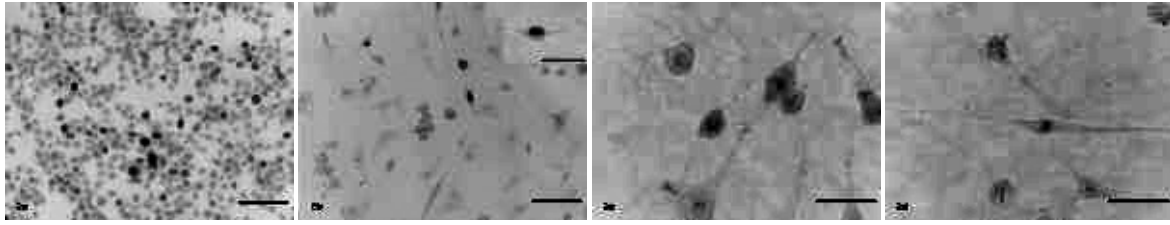


Resim 1. İki boyutlu kültürde; a) Kontrol grubunda çok sayıda ve normal morfolojiye sahip C6 glioma hücreleri. b) Kombinasyon grubunda çok az sayıda ve dejenerasyon gösteren C6 glioma hücreleri.

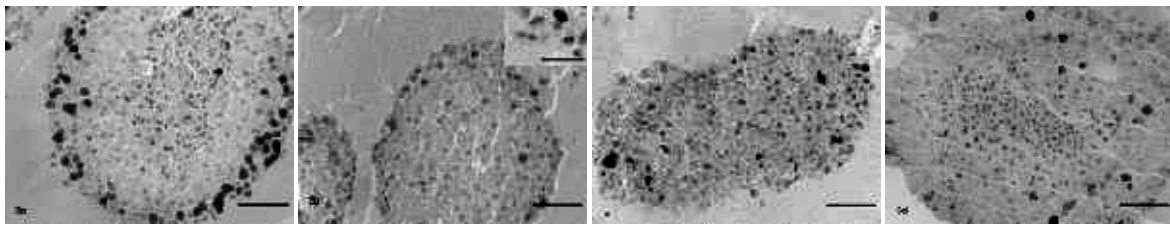
(Not: Bu çalışmadaki tüm resimler 72 saatlik kültürlerden çekilmiştir.)

İmmünohistokimyasal Bulgular

İki boyutlu kültür modelinde BrdU ile işaretlenen hücrelerde yapılan değerlendirmede kontrol grubuna ait çok sayıda sentez fazında hücre izlenirken aloe emodin, cisplatin ve kombinasyon gruplarında immün işaretlenme çok azdı (Resim 2a, b, c ve d). Buna göre, BrdU ile işaretlenme indeksi kontrol grubunda 72. saatte %41 iken aloe emodin grubunda %5,9, cisplatin grubunda %4,9, kombinasyon grubunda ise %1,2 olarak belirlendi (Şekil 2). Kontrol grubunda işaretlenme oranı 48. saatte %57 ile en yüksek değer olarak tespit edildi. Tüm deney gruplarında BrdU ile işaretlenmiş preparatlar kontrol ile kıyaslandığında tüm saatlerde sentez fazı inhibisyonu görül-



Resim 2. İki boyutlu kültürde; a) Kontrol grubu: BrdU ile işaretli çok sayıda C6 glioma hücresi. Bar uzunluğu: 25 µm. b) Aloe emodin grubu: BrdU ile işaretli az sayıdaki C6 glioma hücreleri. Bar uzunluğu: Küçük resim 12,5 µm, büyük resim 25 µm. c ve d) Cisplatin ve Kombinasyon grupları: Her iki grupta da C6 glioma hücrelerinin BrdU ile işaretlenmediği gözlenmektedir. Bar uzunluğu: 12,5 µm.



Resim 3. Üç boyutlu kültürlerde; a) Kontrol grubunda tümör sferoidlerinin periferik kısımlarında yerleşik çok sayıda BrdU ile işaretli sentez fazındaki C6 glioma hücreleri. Bar uzunluğu: 25 µm. b) Aloemodin grubunda sentez fazındaki işaretli C6 glioma hücreleri oldukça az sayıda. Bar uzunluğu: Küçük resim 12,5 µm, büyük resim 25 µm. c) Cisplatin grubunda işaretli hücre sayısı çok daha azalmış olarak izlenmektedir. Bar uzunluğu: 25 µm. d) Kombinasyon grubunda ise aloemodin ve cisplatinin tek başına kullanıldığı gruplara benzer şekilde az sayıda işaretli hücre izlenmektedir. Bar uzunluğu: 25 µm.

dü. Aloemodin ve cisplatin gruplarında işaretlenme yüzdeleri arasındaki fark 24. ve 48. saatlerde anlamlıydı ($p < 0,0125$) fakat 72. saatte anlamlı değildi ($p > 0,0125$). Cisplatin grubunda, tüm saatlerde önemli ölçüde ve anlamlı derecede S fazı inhibisyonu mevcuttu ($p < 0,0125$). Kombinasyon grubunda işaretlenme oranı kontrol ve aloe emodin grubuna göre tüm saatlerde anlamlı bir şekilde azalmıştı ($p < 0,0125$). Kombinasyon

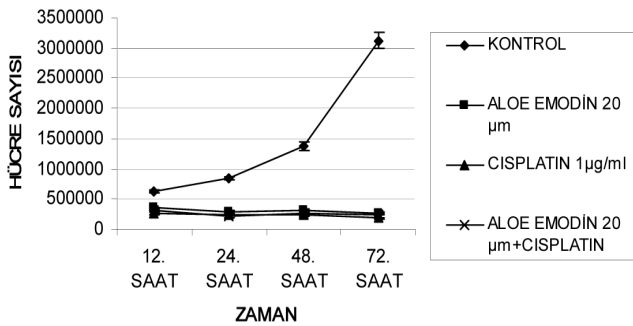
grubu cisplatin grubu ile kıyaslandığında ise anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0,0125$).

Üç boyutlu hücre kültür modelinde BrdU ile işaretlenme sonuçları Şekil 3'de görülmektedir. BrdU ile işaretlenme indeksi %17,5 olarak bulunan kontrol grubuna ait sferoidlerde, sentez fazındaki hücreler çoğunlukla sferoidin periferindeydi (Resim 3a). Aloe emodin grubunda işaretlenme indeksi %9,2 olup kontrol grubuna göre daha azdı ($p < 0,0125$) (Resim 3b). Cisplatin grubunda işaretlenme indeksi %5,8 olup hem kontrol hem de aloe emodin grubuna göre daha azalmıştı (Resim 3c). Kombinasyon grubunda ise işaretlenme indeksi %5,4 idi (Resim 3d). Kombinasyon grubu aloe emodin grubu ile kıyaslandığında fark anlamlı bulundu ($p < 0,0125$). Ancak cisplatin grubu ile kıyaslandığında minimal düzeyde daha az işaretlenmeye yol açtı fakat fark anlamlı değildi ($p > 0,0125$).

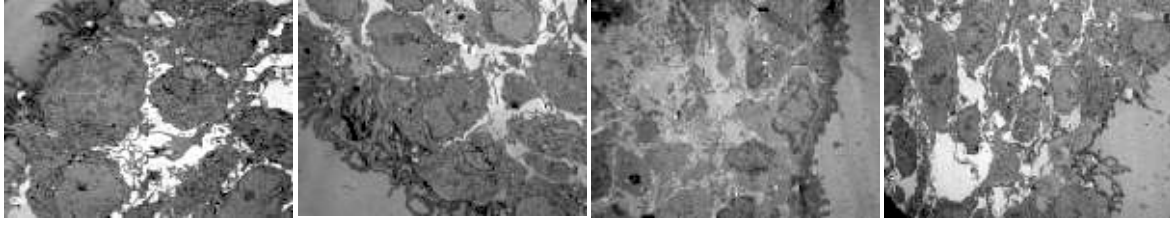
Elektron mikroskopik bulgular

Kontrol grubu sferoidlerde hücreler birbirleriyle bütünlük içerisindeydi (Resim 4a). Hücreler düzgün sınırlı ve ökromatik nükleusa, iyi gelişmiş nükleolusa sahipti. Sitoplazmaları çok sayıda serbest ribozom, granüllü endoplazma retikulumu ve düzgün kristallara sahip mitokondriyonlar içeriyordu. Özellikle sferoidin periferinde bulunan hücreler sitoplazmik organeller açısından zengindiler, sferoidin yüzeyine doğru uzanan düzgün şekilli sitoplazmik uzantılar sergiliyorlardı. Bu hücre-

ALOE EMODİN + CİSPLATİN DOZ DENEYİ



Şekil 1. Proliferasyon deneyi grafiği



Resim 4. Üç boyutlu kültürlerde tümör sferoidlerinin elektron mikroskopik görünüşleri. a) Normal morfolojiye sahip C6 glioma hücreleri. Sferoidin periferisinde yer alan hücrelerde uzun sitoplazmik çıkıntılar izlenmekte. Hücreler arası bağlantılar normal görünümde. X 5000 b) Aloemodin grubu: Hücrelerin morfolojilerinde major bir dejenerasyon izlenmiyor. Genel olarak kontrol grubuna benzer görünüm hakim. X 5000 c) Cisplatin grubunda sferoid morfolojisi oldukça bozulmuş, hücreler arası bağlantılar yalnızca en periferik kısımlarda izlenirken hemen iç kısımlarda dejenere hücreler mevcut. X 4000 d) Kombinasyon grubu: Sferoidi oluşturan C6 glioma hücreleri cisplatin grubundakilere benzer olarak izlenmekte. X 3000

ler içerisinde mitoz göreceli olarak daha sık izlenmekteydi. Hücre ölümü ve apoptozis nadiren ve daha çok sferoidin iç bölgelerine yakın olarak gözlemlendi.

Aloe emodin uygulanan gruptaki sferoidlerde sferoid bütünlüğünün genel olarak korunduğu görüldü (Resim 4b). Sferoidlerde hücreler arası açıklık göreceli olarak normaldi. Sferoidlerin dış kısmındaki hücrelerde sitoplazmik uzantıların yer yer azaldığı izlenirken merkezine yakın bölgelerde nekrotik ve apoptotik hücrelere daha sık rastlandı.

Cisplatin uygulanan grupta sferoid morfolojisi oldukça bozdu (Resim 4c). Sferoidi oluşturan hücreler arasındaki mesafeler artmıştı. Kontrol ve aloemodin gruplarına kıyasla nekroz ve apoptozisin daha sık olduğu ve sferoid periferindeki hücrelerin sitoplazmik uzantılarının daha azaldığı dikkati çekti. Hücrelerin sitoplazmik içerikleri daha fakirdi.

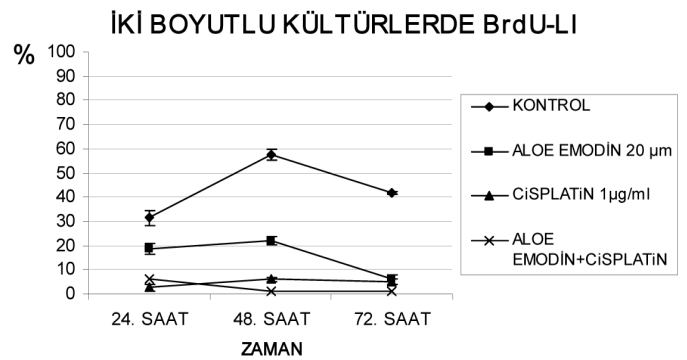
Kombinasyon grubunda genel sferoid morfolojisi cisplatin grubuna benzer olarak bozdu (Resim 4d). Sferoidi oluşturan hücrelerde hücreler arası mesafenin açılmış olduğu ve aynı zamanda apoptotik hücrelerin arttığı gözlemlendi. Sferoid periferindeki hücrelerde sitoplazmik uzantıların azaldığı görülürken sferoidin iç kısımlarında normalden daha uzun sitoplazmik uzantılara sahip hücreler mevcuttu. Bu uzantılar hücreden hücreye uzanmakta ve içerisinde hücre organelleri içermekteydi. Mitoz yapan hücre sayısı kontrol grubuna göre daha azdı.

TARTIŞMA

Aloe emodin 10, 20 ve 40µM dozlarda uygulanarak C6 glioma hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, aloemodin apoptozis ve otofajiye yol açarak gliomalara karşı etkili olduğu ifade edilmiştir (11). Çalışmamızda Mijatovic ve arkadaşlarının bu bulgularına paralel olarak aloemodin hücre ölümüne sebep olduğunu iki boyutlu kültürlerde sayısal olarak belirledik. C6 hücrelerine 20 ve 40 µM dozlarda aloemodin uygulandığında 24, 48 ve 72. saatlerde kontrole göre hücre sayısında anlamlı bir azalma meydana geldi ($p < 0,0125$). Aloe emodin 20 ve 40 µM dozları arasında 48 ve 72. saatlerde anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,0125$). Bu nedenle 20 µM do-

zu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hücre çoğalmasını % 50 oranında inhibe eden etkin doz olarak belirledik. İki boyutlu kültürlerde 72. saatte kontrol grubunda BrdU ile işaretlenme oranı % 41 iken, aloemodin grubunda % 5,9 olarak bulundu.

Cisplatin kuvvetli antitümoral etkiye sahip bir ilaç olarak beyin tümörlerinde sıklıkla kullanılır (15). Cisplatinin iki boyutlu C6 hücreleri üzerine etkilerinin bildirildiği farklı bir çalışmada ise ilaç 0,2-10 µg/ml dozda kullanılmış 24-72. saatlerdeki etkileri incelenmiş, 10 µg/ml lik dozunun % 90 oranında apoptozise yol açtığı belirtilmiştir. 1,5 µg/ml dozda ise 72 saat sonra apoptozise yol açtığı bildirilmiştir. Bizim yaptığımız deneyde de cisplatin 72 saat sonunda tüm dozlarda hücre sayısını azalttı ($p < 0,05$). Ancak 1 µg/ml ve 10 µg/ml lik dozların 48. ve 72. saatlerde hücrelerde meydana getirdiği hücre ölümü arasında anlamlı fark bulunmadı. Bu nedenle cisplatinin etkin dozu olarak 1 µg/ml belirlendi. 1 µg/ml dozda uyguladığımız ilaç hücre morfolojisini de belirgin bir şekilde değiştirerek hücrelerde dejenerasyona yol açtı, bu durum özellikle elektron mikroskopik olarak belirgin olarak gözlemlendi (Resim 4c).

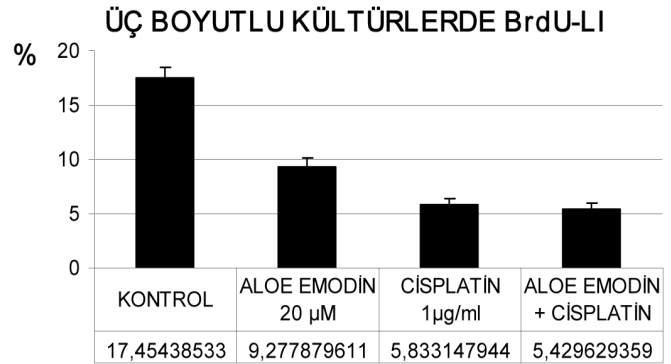


Şekil 2. İki boyutlu hücre kültür modelinde C6 glioma hücrelerinin BrdU ile işaretlenme grafiği

Klinik kullanımı yaygın antikanser ilaçlarla aloe emodin etkileşimleri ve bunların kombinasyonlarının antitümör etkinliği değiştirip değiştirmediği çeşitli deneysel çalışmalarla araştırılmaktadır. Bu çalışmalardan birinde aloe emodin cisplatin ile etkileşimi ve birlikte kullanımının etkileri, sıçan C6 glioma hücre soyunda araştırılmıştır (12). Araştırmada C6 hücrelerine aloe emodin 20 ve 40 µM lık dozları uygulanmış ve 20 µM olan doz etkili bulunmuştur. Antikanser etkisi bilinen cisplatinin 1,25, 2,5, 5, 20 ve 40µM dozlarının, hücre sayısında doza bağımlı olarak azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada, iki ilacın kombine uygulamalarında, aloe emodin cisplatinin yol açtığı toksik etkiyi ilk 24 saatte azalttığı belirtilmektedir. Aloe emodin yaptığı bu etki cisplatinin tümör hücrelerinde tetiklediği ERK – (P44/P42 MAP kinaz) aktivasyonu bağımlı etkisini azaltmasından olduğu iddia edilmektedir. Ancak diğer yandan aloe emodin yol açtığı bu etkinin aynı zamanda cisplatinin normal dokular üzerinde oluşturabileceği istenmeyen toksik etkileri azaltabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları ile bizim bulgularımız karşılaştırıldığında paralellik bulunmadı. Şöyle ki, bizim çalışmamızda hücre proliferasyon deneyi sonuçlarına göre aloe emodin ve cisplatinin birlikte uygulanması ile tek uygulamaları arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,0125$). Aloe emodin ile kombinasyon grubu arasında fark sadece 24 saatte anlamlıydı ($p<0,0125$). İki boyutlu hücre kültüründe BrdU-LI sonuçlarımıza göre kontrol grubu 72. saatte % 41 iken aloe emodin % 5,9, cisplatin % 4,9, kombine uygulamada ise % 1,2 olarak belirlendi (Şekil 2). Bu sonuçlara göre her iki ilacın da sentez fazı işaretlenme oranlarında azalma yarattığı ve bu oranların kontrole göre anlamlı olduğu ($p<0,0125$) fakat cisplatinin aloe emodinden daha yüksek oranda sentez fazındaki hücre sayısını azalttığı belirlendi. Kombinasyon grubu ile cisplatin grubu arasındaki BrdU sonuçları bakımından anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,0125$). Üç boyutlu kültür modelinde ise kontrol grubu BrdU ile işaretlenme oranı % 17,5 olarak bulunurken aloe emodin grubunda işaretlenme % 9,2, cisplatin grubunda işaretlenme % 5,8 ve kombinasyon grubunda ise işaretlenme % 5,4 olarak belirlendi (Şekil 3). Kombinasyon grubu değerleri tüm saatlerde kontrole ve aloe emodin grubuna göre işaretlenme oranında anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0,0125$), fakat cisplatin ile arasındaki fark ise burada da anlamlı değildi ($p>0,0125$).

Bir başka çalışmada da aloe emodin 0,5, 5, 7,5, 10 µM lık dozları cis-platinol, doxorubicin, 5-flourourasil ile kombine olarak Merkel hücreleri üzerine in vitro ortamda 5 gün süreyle uygulanmıştır. Uygulama sonucu görülmüştür ki kombine uygulanan ilaçların antiproliferatif etkisi her birinin yalnız uygulanmasının gösterdiği antiproliferatif etkiden daha yüksektir. Bu etki ilaçların özellikle düşük konsantrasyonlarında belirgindir (3).

Tümör büyümesi üzerine çeşitli faktörlerin etkisini değerlendirmede iki boyutlu kültürler yerine üç boyutlu kültürlerin kullanılması son yıllarda tercih edilmelidir. Vücut içi solid tümörleri daha yakından taklit eden multiselüler tümör sferoidleri tümör biyolojisinin birçok yönünü araştırmak için gerçek-



Şekil 3. Üç boyutlu hücre kültür modelinde C6 glioma hücrelerinin BrdU ile işaretlenme grafiği

çi deneysel bir modeldir (2,8). Bu model vücut içi tümör mikroçevre koşullarına daha yakındır. Sferoidlerde hücre-hücre teması sırasında integrin oluşumunun önemli olduğu ve sferoid mikroçevresinin bu integrin salınımını düzenlediği bilinmektedir (20). Sferoidlerin integrin düzeyi in vivo tümörlere daha yakındır. Bu nedenlerle ilaçların etkinliklerinin daha doğru belirlenmesini sağlayabileceğinden, in vivo deneylerde multiselüler tümör sferoidleri kullanılması aynı zamanda klinik kullanıma geçişi de kolaylaştıracaktır.

Aloe emodin antikanser etkisi tek başına ya da kombine tedavilerde üç boyutlu tümör modelleri kullanarak daha önceden araştırılmamıştır. Bu nedenle üç boyutlu modellerdeki bulgularımızı karşılaştırma olanağı bulamadık. Ancak; Cisplatinle tümör sferoidlerinde yapılan bir çalışmada, ilacın hücre çoğalmasını etkileyerek sferoid büyüklüğünü azalttığı ve sferoidde hücrelerarası bağlantıları bozarak dejenerasyona ve apoptosise yol açtığı bildirilmiştir (6). Aynı çalışmada hücre proliferasyonundaki azalmanın daha çok sferoidin periferinde belirgin olduğu, iç kısımlarında bulunan sessiz hücrelerde ise etkisinin daha az görüldüğü belirtilmiştir. Çalışmamızda cisplatin grubunda sferoidi oluşturan hücreler arasındaki mesafeler artmıştı ve morfolojisi bozulmuştu (Resim 4 c). Kontrol grubuna kıyasla hücrelerin birbiri ile olan temasının azaldığı ve hücre ölümünün daha sık olduğu da bulgularımız arasındaydı. Hücrelerin sitoplazmik içerikleri daha fakirdi ve uzantıları daha azalmıştı. Bulgularımız Hall ve ark.'nın bulguları ile paraleldi. Diğer yandan aynı grubumuzda BrdU ile işaretlenme kontrol ve aloe emodin grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı ($p<0,0125$).

Sonuç olarak, çalışmamızda aloe emodin ve cisplatinin C6 glioma hücrelerinde hücre ölümü ile tümör hücre çoğalmasını azalttığı, ancak cisplatinin etkisinin aloe emodinden daha kuvvetli olduğu görüldü. Kombinasyon grubunda ise cisplatinin tek başına kullanıldığı gruba göre anlamlı bir fark bulunmadı. İleriki çalışmalarda üç boyutlu tümör modelleri de kullanarak aloe emodin tümör invazyonu, damar oluşumu etkisi ve radyoterapi ile kombine kullanımının araştırılmasının kanser tedavisine katkı sağlayabileceği düşünülmekte ve yeni deneysel çalışmalar planlanmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde, deneyimlerinden yararlandığımız Sayın Prof. Dr. Ayhan BİLİR, Doç. Dr. Bülent AHİS-HALI, Doç. Dr. Nurhan İNCE ve Doktora öğrencisi Sevilcan TUNA'ya destekleri için çok teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Algier LA., Hanoğlu Z, Özden G, Kara F. The use of complementary and alternative (non-conventional) medicine in cancer patient in Turkey. *Eur J Oncol Nurs* 2005;9: 138-146.
2. Bell HS, Whittle IR, Walker M, Leaver HA, Wharton SB. The development of necrosis and apoptosis in glioma: experimental findings using spheroid culture systems. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001; 27:291-304.
3. Fenig E, Nordenberg J, Beery E, Sulkes J, Wasserman L. Combined effect of aloe-emodin and chemotherapeutic agents on the proliferation of an adherent variant cell line of Merkel cell carcinoma. *Oncol Rep* 2004;11:213-217.
4. Graham AC, Cloughesy TF. Brain tumor treatment: chemotherapy and other new developments. *Semin Oncol Nurs* 2004; 20:260-272.
5. Grobden B, De Deyn, PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 2002;310:257-270.
6. Hall MD, Martin C, Ferguson DJP, Phillips RM, Hambley TW, Callaghan R. Comparative efficacy of novel platinum (IV) compounds with established chemotherapeutic drugs in solid tumour models. *Biochem Pharmacol* 2004; 67:17-30.
7. Krajcı D, Mares V, Lisa V, Bottone MG, Pellicciari C. Intracellular microtubules are hallmarks of an usual form of cell death in cisplatin-treated C6 glioma cells. *Histochem. Cell Biol* 2005;125:183-191.
8. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 2004; 9: 273-285.
9. Kuo PL, Lin TC, Lin CC. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci* 2002; 71:1879-1892.
10. Maity TK, Mandal SC, Bhakta T, Pal M, Saha BP. Metabolism of 1,8-Dihydroxy 3-Hydroxy Methyl Anthraquinone (Aloe-emodin) isolated from the leaves of *Cassia tora* in albino rats. *Phytother Res* 2001;15:459-460.
11. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Miljkovic Dj, Harhaji L, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Stojkovic MM, Trajkovic V. Antiglioma action of aloe emodin: The role of ERK inhibition. *Cell Mol. Life Sci* 2005; 62: 589-598.
12. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Miljkovic D, Kaludjerovic Sabo, TJ, Trajkovic V. Aloe emodin decreases the ERK- dependent anticancer activity of cisplatin, *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:1275-1282.
13. Molassiotis A, Fernandez-Ortega P, Pud D, Ozden G. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: A European survey. *Annals of Oncology* 2005; 16: 655-663.
14. Niggeman B, Grüber C. Side effects of complementary and alternative medicine. *Allergy* 2003;58:707-716.
15. Noda S, Yoshimura S, Sawada M, Naganawa T, Iwama T, Nakashima, S, Sakai N. Role of ceramide during cisplatin-induced apoptosis in C6 glioma cells. *J Neurooncol* 2001; 52:11-21.
16. Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Vecchia FD, Cavaggioni A, Basso G, Diaspro A, Salvato B, Carli M, Palu G. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 2000;60:2800-2804.
17. Rang HP, Dale MM: *Cancer Chemotherapy*. In: *Pharmacology ELBS, Hon-Kong*, 1993, pp. 781-803.
18. Saleem R, Faizi S, Deeba F, Siddiqui BS, Qazi MH. Anthrones from aloe barbadensis. *Phytochem* 1997;45:1279-1282.
19. Salmon SE, Sartorelli AC. *Cancer Chemotherapy*. In: Katzung BG (ed): *Basic & Clinical Pharmacology*, San Francisco 2001, pp. 923-958.
20. Santini MT, Gabriella R. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 1999;67:148-157.
21. Yeh FT, Wu CH, Lee HZ. Signaling pathway for aloe-emodin-induced apoptosis in human H460 lung nonsmall carcinoma cell. *Int J Cancer* 2003; 106:26-33.