

ÇOĞALAN EHRlich ASCITES TÜMÖR HÜCRELERİNDE TIMİDİN DAMGALANMA İNDEKSİ VE AgNOR DEĞERLERİ

Doç. Dr. S. İNCE (*), Doç. Dr. Ö. DOĞAN (**), Doç. Dr. M. RIDVANOĞULLARI (***), Doç. dr. R. DİŞÇİ (****), Prof. Dr. R. NURTEN (*****), Fizikçi M. ÖZALP (*****), Uz. Dr. S.SOLAKOĞLU (*****), Prof. Dr. Y. D. ANIL (*****)

ÖZET: Bu çalışmada fare peritonunda çoğalan E. Ascites tümör hücrelerinde AgNOR sayımları ile 3H-timidin ile damgalanma indeksi karşılaştırılmıştır. Deneyin sonunda fare peritonunda üreyen hücrelerin 10. günde AgNOR sayımları ile 3H-timidin ile damgalanma indeksi arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: AgNOR, Timidin damgalanma indeksi, Ehrlich Ascites hücreleri

SUMMARY: We have compared the AgNOR counts of Ehrlich ascites tumour cells, which were grown in mice peritoneum and their labelling index with 3H-thymidine. A correlation between AgNOR counts and 3H-thymidine cells has been found 10th day of their proliferation.

KEY WORDS: AgNOR, Thymidine labelling index, Ehrlich ascites cells

GİRİŞ

AgNOR, hücrede Nucleolar Organiser Regions'ın (nukleolus yapıcı bölgeler) gümüşleme yöntemi ile gösterilmesi-

dir (1). Bu bölgeler, kromozomlarda r-DNA segmentlerini içeren bölgeler olup, r-RNA sentezini gerçekleştirirler (2,3,4). Bu nedenle bu bölgelerle ilişkili AgNOR proteinlerinin sayı ve dağılımının hücrenin metabolik ve proliferatif aktivitesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (5,6,7,8,9).

Ehrlich ascites tümörü; farelerde ascites ya da solid şekillerde, yüksek proliferasyon gösteren ve orijinini meme dokusundan alan bir tümördür (10).

Bu çalışmada, böyle yüksek bir proliferatif aktiviteye sahip olan tümör türünde AgNOR değerlerinin hücrede prolife-

* İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji bilim Dalı

** İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

*** İ.Ü. Fen Fakültesi Radyobiyoloji ve Sağlık Fiziği Araştırma ve Uygulama Merkezi (vefat etmiştir)

**** İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Bioistatistik ve Demografi Bilim Dalı

***** İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı

***** İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

TABLO 1 : EAT HÜCRELERİNDE 3H-TİMİDİN İLE DAMGALANMA İNDEKSİ

Gün	DNA DAMGALANMA (%) X ± SD	(n)
2	49.30 ± 6.55	(1000)
6	42.45 ± 7.38	(1000)
10	23.67 ± 4.97	(1000)

TABLO 2 : ÇOĞALAN EAT HÜCRELERİNDE AgNOR SAYIMLARI

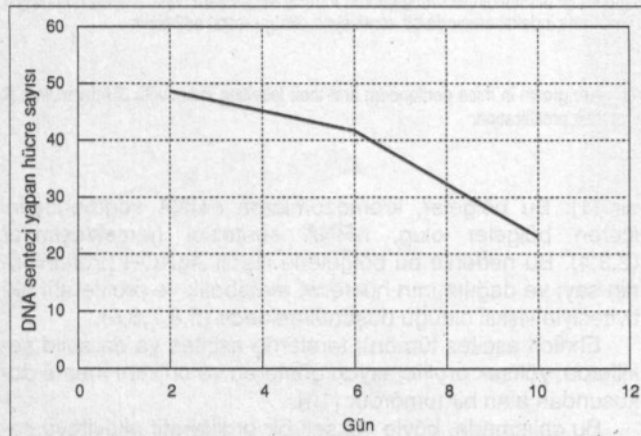
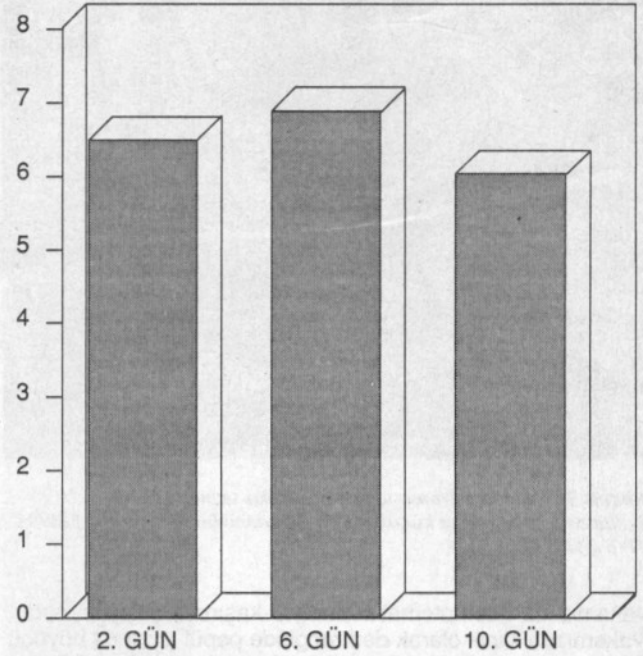
Gün	AgNOR sayımı (%) X ± SD	(n)
2	6.5298 ± 2.4055	(1025)
6	6.8616 ± 3.0097	(1098)
10	6.0258 ± 2.4823	(1009)

F : 26.2625
SD : 2; 3.129
p < 0.001

ratif aktiviteyi güvenilir bir şekilde gösteren timidin damgalanma indeksi (11,12,13) ile karşılaştırılması yapıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Köln Üniversitesi Patoloji Enstitüsü'nden sağlanarak, İstanbul Fen Fakültesi Radyobioloji ve Sağlık Fiziyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde sürekli olarak Balb/c farelerin peritonunda üretilen Ehrlich Ascites Tumor (EAT) hücreleri kullanıldı. Deney sırasında dokuz adet erkek Balb/c faresine Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco)'u içinde 107 hücre/ml olacak şekilde EAT hücresi intraperitoneal olarak verildi. Intraperitoneal enjeksiyonundan önce bir kısım hücre östrojen reseptörü tayini için ayrıldı. Östrojen reseptörleri radyoligant bağlama tekniğine göre yapıldı (14,15). EAT hücreleri enjekte edildikten sonra fareler pellet fare yemi (Yem Sanayii, İstanbul) ve musluk suyuyla beslendiler. EAT hücrelerinin enjeksiyonundan 2,6 ve 10 gün sonra farelere 2 µ Ci/g vücut ağırlığı olacak şekilde 3H-timidin (Amersham Enland, 5 Ci/mmol) enjekte edildi. Timidin enjeksiyonundan 1 saat sonra farelerin peritonundan EAT hücreleri alınarak yayma preparatları hazırlandı ve bu preparatlar %10 formalin ile 1 saat tespit edildikten sonra suyla çalkalandı. Hazırlanan preparatların yarısı Ploton ve ark (16) tarafından tanımlanan ve Crocker ve Nar (17) tarafından yay-

**Şekil 1 : EAT hücrelerinde 3H-timidin ile damgalanma indeksi****Şekil 2 : AgNOR benekçikleri (ortalama değerler)**

gınılaştırılan yöntemle göre boyandı. Bu yöntem suya getirilen preparatlar oda sıcaklığında ve karanlıkta AgNOR çalışma çözeltisi içinde 40 dak bekletilerek gerçekleştirildi. AgNOR çözeltisi bir birim jelatin çözeltisi (%1 formik asit, %2 jelatin) ile iki birim AgNO₃ çözeltisinin (% 50'lik AgNO₃) boya işleminden hemen önce karıştırılması ile hazırlandı. Preparatlar boyama işlemi sonrasında distile suda yıkanıp % 5'lik tiyosülfat çözeltisinde 10-15 sn bekletildi. Dehidratasyon ve temizleme işlem sonrası sentetik kapatma maddesi ile kapatıldı. Diğer yarısı da %2'lik perklorik asit ile 4°C'de 30 dak'lık sürelerle iki defa hidrolize edildi. Ilford K-2 gel emülsiyon ile kaplanarak hazırlanan otoradyogramlar üç gün ekspozite edildikten sonra D-19b ile developpe edilip tespit edildi ve standart Giemsa ile boyandı.

Timidin damgalanma indeksi için her preparatta yaklaşık 1000 sentez fazındaki hücre sayılarak yüzdeleri saptandı. AgNOR sayımları Crocker ve ark (18) nın önerdiği yöntemle x1000 büyütme ile gerçekleştirildi.

İstatistiksel değerlendirme için Turkey Multipl Range test uygulandı.

BULGULAR

Deneylerimizde kullanılan hiperdiploid E.Ascites hücreleri östrojen reseptörleri açısından negatif bulunmuştur (3-26 f mol/m).

3H-Timidin ile ölçülen damgalanma indeksi hücrelerin peritona verilmesinden sonra ikinci günde en yüksek düzeyde olmaktadır (Tablo 1, Şekil 1). Hücrelerin peritona verilmesinden sonra 6. günde 3H-timidin ile damgalanma indeksi giderek düşmekte, 10. günde peritonda çoğalan hücreler bir plato fazına vardıklarını gösterecek bir değere inmekte ve en az düzeyde damgalanmaktadırlar. Günler arasındaki 3H-timidin ile damgalanma indeksi istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.001) (Tablo 1, Şekil 1).

Çoğalan E.Ascites hücrelerinde yapılan AgNOR benekçikleri sayımlarında 2. gündeki sayımların 6. günde de yükselmeye devam ettiği, 10. günde ise genel bir düşüş göster-

diği saptanmıştır (Tablo 2, Şekil 2). Çoklu karşılaştırma sonucunda 2. ve 6. gün, 2. ve 10. gün ile 6. ve 10. gün ortalama AgNOR benekcikleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Meme tümörü kökenli olan E. Ascites tümör hücrelerinde hücre proliferasyonu ile östrojen reseptörleri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak amacıyla deneyin başlangıcında bu hücrelerde östrojen reseptörlerini araştırdık. Bulgularda bildirdiğimiz gibi östrojen reseptörlerini negatif bulduk. Bizden önce başka araştırmacılar da EAT hücrelerinin östrojen reseptörleri açısından negatif olduğuna işaret etmişlerdir (19).

Çoğalan E. Ascites hücrelerinde AgNOR sayısının değişimi ile 3H-timidin damgalanma indeksi arasındaki ilişkiden daha önce söz edilmemiştir. Bununla birlikte non-Hodgkin's lenfomalarında Flow-Sitometrik olarak yapılan çalışmada nükleoluslardaki ortalama AgNOR sayısı ile S fazı yüzdesi arasında doğrusal bir ilişki olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada, ileri bir aşama olarak lenfomaların grade'i ile bir ilişki görülmüş, AgNOR sayımlarının bölünen hücre ve fonksiyonu ile ilgili olabileceği düşünülmüştür (5). Bir başka çalışmada AgNOR sayımlarının malign meme kansinomlarında flow sitometrik olarak elde edilen DNA değerleriyle uyumlu olduğu görülmüştür (7).

Benzer şekilde bromodeoksiüridin ve Ki-67 immün boyama sistemi ile boyanan tiroid tümör hücrelerinde AgNOR proteinleri arasında bir korelasyon bulunduğu görülmüştür (58). Yine bromodeoksiüridin ile yapılan bir çalışmada fare timik hücrelerinde AgNOR sayımlarının DNA sentezi ile bağlantılı olduğu, bu nedenle AgNOR değerlerinin hücre proliferasyonu marker'ı olabileceği ileri sürülmüştür (20). Diğer taraftan yine bromodeoksiüridinle lösemi hücrelerinde yapılan bir araştırmada, AgNOR sayısı ile bromodeoksiüridin damgalanma indeksi arasında bir ilişki tespit edilememiştir (21). Bizim çalışmamızda çoğalan E. Ascites tümör hücrelerinde 2. günden sonra 3H-timidin ile damgalanma indeksinde belirgin bir azalma görüldüğü halde AgNOR sayımlarında böyle bir azalma görülmemekte, AgNOR sayımlarında azalma ancak 6. günden sonra ortaya çıkmakta ve 10. günde 3H-timidinle damgalanma ile bir korelasyon göstermektedir. Deneyin süresini daha fazla uzatmak E. Ascites hücrelerinde farelerin 14. günden sonra ölümü nedeniyle mümkün olmaktadır. Bununla birlikte in vitro koşullarda deneyi tekrarlayarak çoğalan E. Ascites hücrelerinde 3H-timidin ile damgalanma indeksiyle AgNOR sayımlarının karşılaştırılması ve AgNOR sayımlarının proliferatif bir marker olup olmadıkları ileri çalışmalarımızda araştırılacaktır.

KAYNAKLAR

- Hernandez-Verdun D. The nucleolus today. *J Cell Sci* 1991; 99: 465-71.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, et al.: *Molecular Biology of The Cell*. New York, London. Garland Publishing Inc, 1988: 422-8.
- Ranco A, Larran J, Loper A, et al. AgNOR and breast cancer. A study by image analysis. *Histol Histopathol* 1994; 9: 309-13.
- Watcler F, Stahl A. The nucleolus. A structural and functional interpretation. *Micron* 1991; 24: 475-505.
- Crocker J, Maccartney JC, Smith PS. Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organiser region data in non-Hodgkin's lymphomas. *J Path* 1989; 154: 151-6.
- Doğan Ö. Nöroblastom-ganglionöroblastom ganglionörom tumor serisinde AgNOR yöntemi. *Uzmanlık Tezi*, İst Tıp Fak Tez Bürosu, 1991.
- Giri DD, Cawry JN, Dundus SAC, et al. Silver binding Nucleolar organiser region's (AgNORS's) in benign and malignant breast lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA Flow-cytometry. *J Path* 1989; 157: 307-13.
- Treter D, Farabegoli F, Concerrieli A, et al. AgNORs area in interphase nuclei of human tumours correlates with proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labelling and Ki-67 immunostaining. *J Path* 1991; 165: 53-9.
- Yu CWC, Fletcher CD, Newman PL, et al. A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organiser region (AgNOR) staining and histological grading in gastrointestinal stromal tumors. *J Path* 1992; 166: 147-52.
- Stewart HL, Snell KC, Dunham LC, et al. Transplantable and transmissible tumors of animals. *Nat Acad Sci, Washington DC*, 1959.
- Daidone MG, Silvestrini R, Valentini B, et al. Proliferative activity of primary breast cancer and of synchronous lymph node metastases evaluated by 3H-Thymidine labelling index. *Cell Tissue Kinet* 1990; 23: 401-8.
- Meyer JS, Marianne UP, Bubcock DS et al. Breast carcinoma cell kinetics, morphology stage and host characteristics. A Thymidine labelling study. *Lab Invest* 1986; 54: 41-51.
- Meyer SC, Province M. proliferative index of breast carcinoma by thymidine labelling: prognostic power independent of stage, estrogen and progesterone receptors. *Cancer Res Treat* 1988; 12: 191-204.
- Lippman M, Huff KK. A demonstration of androgen and estrogen receptors in human breast cancer using a new protomine sulfide assay. *Cancer* 1976; 38: 868-74.
- Rynaud JP, Martin PM, Baton MM, et al. Morestrol a tag for estrogen receptor in human tissues. *Cancer Res* 1978; 58: 3044-50.
- Ploton D, Menager M, Jeannesson et al. Improvement in staining and in the visualization of agyrophilic proteins of the nucleolar organizer region of optical level. *Histochem J* 1986; 8: 5-14.
- Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphoma. *J Path* 1987; 151: 111-8.
- Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposal for a standardized approach. *J Path* 1989; 158: 185-8.
- Levin E, Chernovsky A. Effect of antineoplastic drugs and estradiol on leucine uptake and proliferation of Ehrlich tumor cells. *Biomed and Pharmacother* 1989; 43: 215-17.
- Carbajo S, Orfao A, Vicente-Villardón JL et al. Expression of silver stained nucleolar organizer regions is compiled to cell cycle in rat thymic cells. *Cytometry* 1993; 14: 46-52.
- Nakamura S, Takeda Y, Okabe Y, et al. Argrophilic proteins of the nucleolar organizer region in acute leukemias and its relation to the S-phase fraction of leukemic cells. *Acta Haematol* 1992; 87: 6-10.