

DENEYSEL TÜMÖR HÜCRE KÜLTÜRÜNDE SAKİN HÜCRELER

Doç. Dr. Ertan Üçer(*) • Doç. Dr. Y. Doğan Anıl(**)
Prof. Dr. Uğur Çevikbaş(***)

ÖZET: Bu çalışmada deneysel tümör hücre kültüründe sakin hücrelerin yüzdesi saptanmıştır.

SUMMARY: The quiescent cells in experimental tumor cell culture: In this investigation the percentage of the quiescent cell in experimental tumor cell culture have been determined.

GİRİŞ

Bu çalışmada albino sıçan derisinde deneysel olarak oluşturulan tümörün, 1969 yılında in vitro koşullarda yetiştirilmeye başlanan (11) ve bazı karakterleri yönünden Uluslararası normlara uygun olarak tanımlanması yapılan hücre kültürleri (RTE hücreleri) kullanılmıştır (12). Sürekli olarak in vitro koşullarda yetiştirilen RTE hücrelerinin tanımlanmasında morfolojik gözlemler, çoğalma hızı, koloni oluşturma yeteneği, hücre siklusu analizi, damgalı hücre indeksi, mitotik indeks, kromozom sayısı dağılımı, dondurulduktan sonra tekrar normal koşullara getirilen hücrelerin canlılık testi ve çoğalma karakteristiği gibi parametreler incelenmiştir (12).

Bu çalışmanın amacı ise canlı oldukları halde bölünmeyen ve DNA sentezi yapmayan (2) hücrelerin kültürdeki oranını saptamak ve bu oranı kültürde normal olarak bulunan ölü hücre sayılarıyla karşılaştırmaktır.

MATERYEL VE METOD

Albino *Rattus norvegicus*'un derisine kroton yağı ve 7,12-dimetilbenzantrazen uygulanarak oluşturulan tümörün hücreleri (RTE hücreleri) 1969 yılından beri in vitro teknikler izlenerek tek tabaka hücre kültürü yöntemi ile devamlı olarak yetiştirilmişlerdir (11,12). RTE hücreleri standart hücre kültürü tekniği (5,9) kullanılarak devamlı pasajları yapılmış ve deneylerde kullanılmayan hücreler stok olarak dondurulup sıvı azot içinde saklanmışlardır (12,13). Oluşturulan tümörün bir kısmı histopatolojik tanı için tesbit edilerek ayrılmıştır (12). RTE hücreleri in vitro koşullarda Eagle MEM (Wellcome Ltd.) kültür ortamına 200 U/ml Penicilline (Pfizer), 100 mgr/ml Streptomycin (Pfizer) ve % 10 embriyonik dana serumu (Flow Lab.) ilave edilerek yetiştirilmişler ve deneylerde de bu kültür ortamı kullanılmıştır. Devamlı pasajlarda ve deneylerde hemositometre ile sayılan hücrelerin canlılık testi tripan mavisi boya yöntemi ile yapılmıştır (8,10). Deneylerde içinde hücrelerin yetiştirildiği Petri kutuları deney sürecinde 37°C'lik inkubatörde % 5 CO₂ ve % 95 hava karışımından oluşan bir atmosferde tutulmuşlardır (4).

Ölü hücre oranının saptanması: RTE hücreleri 40 mm çapında steril her Petri kutusuna canlı 1.5x10⁵ hücre olacak şekilde ekilmişler ve inkubatöre kaldırılmışlardır. Ekimlerden 12, 24, 36 ve 48 saat sonra Petri kutuları içindeki canlı ve ölü hücrelerin sayıları saptanmış ve sayım değerlerinden ölü hücre yüzdesi hesaplanmıştır. Deneyde her zaman aralığı için üçer Petri kutusu kullanılmış ve deney üç kere tekrarlanmıştır.

(*) İ.Ü. Fen Fak., Radyobiyojoloji ve Sağlık Fiziği Araş. ve Uyg. Merkezi

(**) İ.Ü. İstanbul Tıp Fak., Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı.

(***) İ.Ü. İstanbul Tıp Fak., Patoloji Anabilim Dalı.

Bölünmeyen ve DNA sentezi yapmayan hücrelerin saptanması: RTE hücreleri 50 mm çapındaki steril her Petri kutusuna canlı 6×10^5 hücre olacak şekilde ekilmişler ve inkubatore kaldırılmışlardır. Ekimden 24 saat sonra hücrelere 25 saat süre ile $1 \mu\text{Ci/ml}$ olacak şekilde ^3H -timidin (^3H -TdR, Ammersham, Sp. Ak. 5 Ci/mM) uygulaması yapılmıştır. ^3H -TdR uygulaması yapılan hücreler tripsin ile Petri kutularından alınmışlardır. Bu hücreler steril Petri kutuları içindeki her lamel üzerine canlı 3×10^4 hücre olacak şekilde ekilmişler ve inkubatore kaldırılmışlardır. Lamellere ekimden önce canlı ve ölü hücrelerin sayıları saptanarak ölü hücre yüzdesi hesaplanmıştır. Deneyde beş Petri kutusu kullanılıp, yirmi lamel hücre ekilmiş ve deney iki kere tekrarlanmıştır. Hücreler lamellere ekimlerinden 6 saat sonra Carnoy tesbiti ile tesbit edilmişler ve Kodak AR-10 stripping filimleri kullanılarak otoradyografi yöntemine (1) göre otoradyogramlar hazırlanmıştır. Hazırlanan otoradyogramlar 3 günlük bir ekspozisyon süresi sonunda banyo edilip kurutulduktan sonra Giemsa boyası ile boyanmışlardır. Bu otoradyogramlardan DNA sentezi yaparak ^3H -TdR almış damgalı (labelling) ve almamış damgasız hücreler sayılarak DNA sentezi yapmayan hücrelerin yüzdesi saptanmıştır.

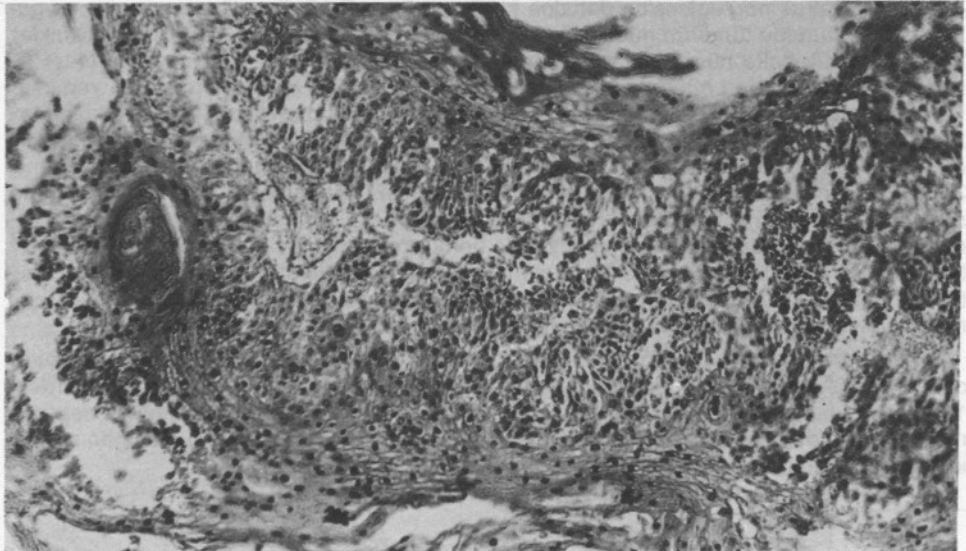
Sayılan ve hesaplanan değerlerin aritmetik ortalama ve standart hataları hesaplanmıştır (14).

BULGULAR

Albino sıçan derisine kroton yağı ve 7,12-dimetilbenzantrazen uygulanarak oluşturulan tümörün histopatolojik tanısı yassı epitel hücreli karsinom olarak saptanmıştır (Resim 1).

Tümör dokusunun kültür şartlarında üretilmesinden sonra, hücreler sıvı azotta dondurulmuş ve tekrar kültür şartlarına getirilmişlerdir. Hücrelerin kültür şartlarında üremesi sağlıklı olmuş, kültürlerde ve otoradyogramlarda enfeksiyona rastlanılmamıştır.

Başlangıçta her petri kutusuna 150000 hücre ekilmiş ve ekimden 12 saat sonra bu miktarın 210000 ± 6009 , 24 saat sonra 296667 ± 6667 , 36 saat sonra 420000 ± 13229 ve 48 saat sonra 665556 ± 7658 'e eriştiği saptanmıştır (Tablo 1). Ayrıca kültürde rastlanan normal ölü hücre sayısı 12, 24 ve 36 saat için ortalama % 1.4 olarak 48.ci saatte ise % 1.5



Resim 1: Kroton yağı ve 7,12-dimetilbenzantrazen uygulanarak oluşturulan tümörün histolojik kesiti (H.E. x 132).

TABLO 1: RTE hücre kültürlerinde zamana bağlı hücre artışı ve ölü hücre yüzdesi.

Süre (saat)	Ortalama canlı hücre sayısı \pm S.H.	Ortalama ölü hücre % \pm S.H.
0	150000	-----
12	210000 \pm 6009	1.4 \pm 0.17
24	296667 \pm 6667	1.4 \pm 0.18
36	420000 \pm 13229	1.4 \pm 0.18
48	665556 \pm 7658	1.5 \pm 0.24

S.H. Ortalamanın standart hatası.

olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Sakin hücrelerin araştırıldığı ve hücrelerin devamlı damgalanmaya maruz bırakıldığı deneylerde toplam 28885 hücre sayılmıştır. Bu hücrelerin 27651'i $^3\text{H-TdR}$ ile damgalanmış, 1204 adedi ise damgalanmamıştır. Değişik lameller üzerinde ve mikroskopik alanlarda yapılan sayımlarda damgasız hücre oranının % 4.17 \pm 0.05 olduğu görülmüştür (Tablo 2, Resim 2). Devamlı damgalanmaya maruz bırakılan hücreler ikinci defa tripsinizasyonla kaldırılıp yeniden lameller üzerine ekilirken tripan mavisi ile yapılan canlılık testinde ise ölü hücre oranı % 2.5 \pm 0.5 olarak bulunmuştur (Tablo 2).

TABLO 2: RTE hücrelerinde 25 saat $^3\text{H-TdR}$ uygulamasından sonra sakın hücre ve ölü hücre yüzdesi.

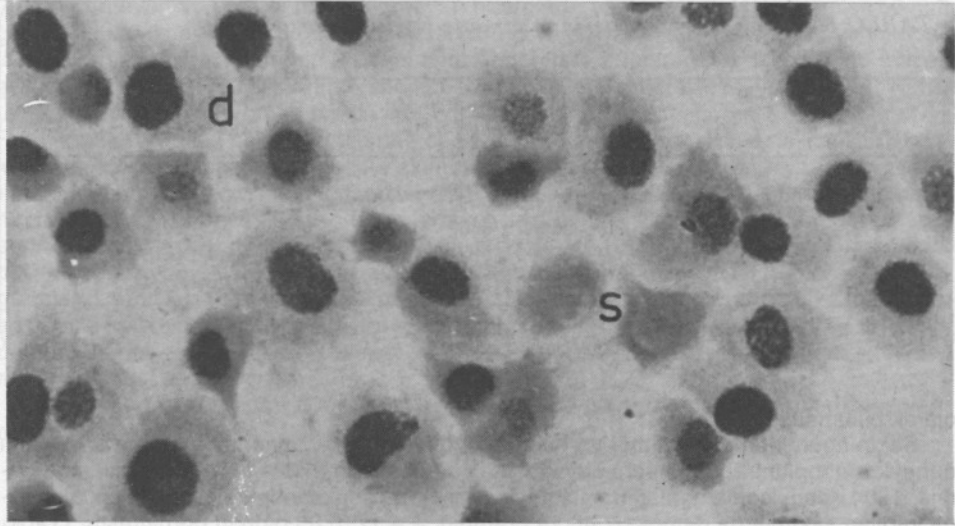
Toplam damgalı hücre sayısı	Toplam damgasız hücre sayısı	Toplam hücre sayısı	Damgasız (sakin) hücre % \pm S.H.	Ortalama ölü hücre % \pm S.H.
27651	1204	28855	4.17 \pm 0.05	2.5 \pm 0.5

S.H. Ortalamanın standart hatası.

Devamlı damgalanmaya bırakılan hücrelerde $^3\text{H-TdR}$ otoradyografisinden sonra ışık mikroskopisi düzeyinde morfolojik bir bozukluğa rastlanılmamıştır.

TARTIŞMA

Hızlı bir şekilde proliferen olan tümör hücre kültürlerinde bir bölüm hücreler hücre devrine katılmaz ve hücre devri dışı kalırlar. Bu hücrelerin mitoz ve DNA sentezi yapma yeteneği olmakla beraber, bunlarda DNA sentezi ve mitoz hemen hemen yok denecek kadar azdır veya hiç görülmez (6). Bu sakın hücreler (quiescent cell) hücre devrinde G_0 hücreleri olarak tanımlanmaktadır (6). Bir çok araştırmacı G_0 hücrelerinin muhtemelen uzun bir G_1 fazından başka bir şey olmadığına inanmaktadır (2). Sakin hücreler uygun bir uyarı ile birlikte hücre devrindeki yerlerini alıp tekrar mitoz ve DNA sentezi gösterirler. Sakin hücreleri göstermenin yollarından biri $^3\text{H-TdR}$ otoradyografisidir (3). Deneylerimizde de $^3\text{H-TdR}$ otoradyografisi kullanılmış ve hücreler bir yenilenme devrinden fazla süre de (25 saat) $^3\text{H-TdR}$ ile muamele edilmişler böylece her hücrenin mutlaka bir kere hücre devrinin S fazında bulunması sağlanmıştır. Buna rağmen % 4.17 oranında hücrenin $^3\text{H-TdR}$ ile damgalanmadığı görülmüştür (Tablo 2, Resim 2). Hücreler 25 saat süre ile $^3\text{H-TdR}$ 'de bira-



Resim 2: $^3\text{H-TdR}$ ile devamlı damgalanmaya bırakılmış RTE hücrelerinin otoradyogramı, (d) damgalı ve (s) damgasız, sakin, hücreler (Giemsa x 132).

kıldıktan sonra tripsinizasyonla kaldırılarak yeniden lameller üzerine ekildiklerinde % 2.5 oranında olan ölü hücreler ortamdaki kaldırılmışlardır.

Herhangi bir dokuda hücre sayısının artması üç mekanizma ile gerçekleşir: a) Hücre devrinin kısalması, b) G_0 hücrelerinin hücre devrine girmesiyle büyüme fonksiyonunun artması, c) Hücre kaybının azalması (2). *In vivo* şartların bir modeli olan *in vitro* deneylerimizde ölen hücre sayısı 48.ci saate kadar ortalama % 1.4-1.5 arasındadır (Tablo 1). Buna göre, hücre kaybında süratli bir artış yoktur, hücre kaybı belli bir oran içinde olmakta ve deney süresince hücreler denge durumunu (steady state) muhafaza etmektedirler. Deney şartları bütün deney süresince sabit tutulduğu serum azalması veya yokluğu söz konusu olmadığına göre sakin hücreler için uyarı sadece medyum değişikliği ve tripsinizasyondan gelebilecektir (2). Tripsinizasyon yapılmasına rağmen deneylerimizde % 4.17 oranında DNA sentezi yapmayan hücrelere rastlanılmaktadır. Bununla beraber bazı hücrelerin tripsinizasyona rağmen DNA sentezini başlatmadıkları da bilinmektedir (7). Ölü hücre sayısı oranının sabit oluşuna rağmen deneylerimizde görülen hücre sayısındaki artış normal şartlarda hücre kültürlerindeki artış olarak kabul edilebilir. Sakin hücrelerden, başka deyişle G_0 hücrelerinden G_1 'e giren hücrelerin olup olmadığı ilerdeki çalışmalarımızda gösterilecektir.

Bu çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç yassı epitel hücreli karsinom hücrelerinin, RTE hücrelerinin, devamlı hücre kültüründeki popülasyonunun % 4.17 oranında sakin hücreler içerdiğini göstermek olmuştur.

KAYNAKLAR

- 1- Appleton, T.C.: Stripping film autoradiography, in *Autoradiography for Biologists* Ed. P.B. Gahan, Academic Press, London: 33 (1972).
- 2- Baserga, R.: *Multiplication and Division in Mammalian Cells*. Marcel Dekker Inc., New York, (1976).
- 3- Dethlefsen, L.A.: In quest of the quaint quiescent cells, in *Radiation Biology in Cancer Research* Ed. R.E. Meyn and H.R. Withers, Raven Press, New York: 415 (1980).

- 4- Ferencz, N. JR. and Nardone, R.M.: A non-continuous flow gas chamber for the cultivation of mammalian cells grown in Petri dishes. *Exp. Cell Res.* 53: 139 (1968).
- 5- Jakoby, W.B. and Pastan, I.: *Methods in Enzymology* Vol. LVIII, Cell Culture. Academic Press, New York (1979).
- 6- Lajtha L.G.: On the concepts of the cell cycle. *Cell Comp. Physiol.* 62: 143 (1963).
- 7- Mauro, F., Falpo, B., Briganti, G., Elli, R. and Zupi, G.: Effects of antineoplastic drugs on plateau-phase cultures of mammalian cells. II. Bleomycin and hydroxyurea. *J. Natl. Cancer Inst.* 52: 715 (1974).
- 8- Paterson Jr. M.K.: Measurement of growth and viability of cells in culture, in *Methods in Enzymology* Vol. LVIII, Cell Culture Ed. W.B. Jakoby and I. Pastan, Academic Press, New York: 141 (1979).
- 9- Paul, J.: *Cell and Tissue Culture*. 5. ed. Churchill Livingstone, London (1975).
- 10- Phillips, H.J.: Dye exclusion tests for viability, in *Tissue Culture Methods and Applications* Ed. P.F. Kruse Jr. and M.K. Paterson Jr., Academic Press, New York: 406 (1973).
- 11- Üçer, E.: The identification of granules observed under the phase-contrast microscope of cells in tissue culture. *İst. Üniv. Fen Fak. mec. Seri B*, 37: 233 (1972).
- 12- Üçer, E.: Albino *Rattus norvegicus*'da oluşturulan bir tümörün in vitro koşullarda yetiştirilen hücrelerinin tanımlanması. *Kükem Dergisi* 6: 29 (1983).
- 13- Üçer, E.: In vitro da yetiştirilen hücrelerin dondurularak sıvı azot içinde saklanması. VII. Ulusal Biyoloji Kong. Bildiri Metinleri Botanik ve Uygulamalı Biyoloji 1: 523 (1987).
- 14- Velicangil, S.: *Biyoloji, Tıp, Diş Hekimliği ve Eczacılık Bilimlerinde Biyoistatistik*. Filiz Kitabevi, İstanbul, (1984).