

COLCEMID'IN L-STRAIN HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE S FAZINA ETKİSİ¹

A. BİLİR², Y.D. ANIL³, T. ERBENGIN⁴, ve M. GÜRTEKİN⁵

ÖZET

Devamlı bir hücre soyu olarak kullanılan L-Strain hücre kültürlerinde 6 veya 24 saat colcemid uygulamasından sonra normal medyuma alınarak, değişik zaman aralıklarında ^3H -Thymidine ile elde edilen damgalanma indeksi değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, her iki grupta da damgalanma indeksi azalmış, ilerleyen sürede ise hücrelerde proliferasyon görülmesine rağmen kontrol seviyesine dönüş olmamıştır.

SUMMARY

THE EFFECT OF COLCEMIDS ON S PHASE OF THE L-STRAIN CELL CULTURES

Colcemid was applied for 6 and 24 hours period to L-strain cells, a continuous. There after, the cell were transferred into normal medium and at different time intervals the ^3H -Thymidine Labeling index values were compared with these of control cell cultures. In both groups the Labeling index decreased. Although cell proliferation took place with time, it could not reach control levels.

GİRİŞ

İyi bilinen tipik etkisi, bölünen hücrelerde iğ ipliklerinin düzenin bozulmasına neden olmak ve bunun sonucu olarak da hücre bölünmesinin metafazında durdurulması olan Colchicine'in sakin hücrelerde (Quiescent cells), DNA sentezini uyardığı insan fetal akciğer fibroblast kültürlerinde gösterilmiştir (1).

Diğer taraftan Colchicine ve deriveleriyle yapılan bir çalışmada Spurna ve arkadaşları (2), bu maddelerin zamana ve kullanılan doza bağlı olarak DNA sentezi üzerinde reversibl inhibitör bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Ancak, sözü geçen çalışmada ortamdan Colchicine veya deriverleri kaldırıldıktan sonra, belirli zaman aralıklarında S Fazında tayin edilen hücre yüzdesi verilmediğinden bizim çalışmamızda bir Colchicine derivesi

1 Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu'nda desteklenmiştir. Proje No: 25-25 / 090184.

2, 3, 4 İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoji Bilim Dalı, Çapa-İstanbul.

5 İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Çapa-İstanbul.

olan Colcemid (Gibco) kullanılarak, bu maddenin S Fazına etkisi hakkında bilgi edinilmek istenmiştir.

MATERİYAL VE METOD

Çalışmamızda laboratuvarımızda devamlı üretilen fare fibroblastı L-Strain devamlı hücre kültürleri kullanılmıştır. L-Strain hücreleri 2×10^5 hücre / ml olacak şekilde petri kutularında lameller üzerine ekilmiş ve hücreler Parker Medium 199 (M. 199), % 10 dana serumu, 100 μg / ml streptomisin, 100 IU / ml penisilin ve 20 μg / ml gentamisi içeren medyumda, % 95 hava % 5 CO₂ (pH 7,2) de 48 saat bırakılmışlardır (3). Hücrelere 48 saat sonra 0,06 mg / ml Colcemid (Gibco) verilmiş ve Colcemid içeren yukarıda sözü edilen medyumda 6 veya 24 saat bırakılmışlardır. Bir grup hücre kontrol olarak Colcemid içermeyen medyumda inkübe edilmiştir. 6 veya 24 saat colcemidli medyumda bırakılan deney grupları bu sürelerin sonunda normal inkübasyon medyumlara alınarak hücre ekiminden itibaren 54, 72, 96, 120 ve 144'üncü saatlerde 20 dakika 1 μCi / ml³ H-Thymidine (TRA 120, Amersham, İngiltere) ile aynı medyum içerisinde muameleden sonra Carnoy sıvısı ile tesbit edilmişlerdir. Tesbit edilen hücrelerden standart teknik ile (4) Kodak AR-10 Stripping film kullanılarak otoradyogramlar hazırlanmış ve otoradyogramlar giemsa yöntemi ile boyanarak her deney grubunda ortalama 1000 hücrede damgalanma indeksi tayin edilmiş, sayısal değerler Studentin (t) testi ile (5) karşılaştırılmıştır ($P \leq 0,01$).

BULGULAR

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre 5 saat Colcemid muamelesinden sonra L-Strain hücrelerinde ³H-Thymidine ile damgalanma indeksi azalmakta $28,25 \pm 12,41$ olmaktadır. Buna karşılık olan kontrol değerleri ise $44,93 \pm 10,37$ dir. Altı saat Colcemid uygulanmış grupta damgalanma indeksi 72 saatlik inkübasyon sonucu biraz yükselmekte beraber yine de kontrol değerinin altındadır (Tablo 1). Colcemid ile 6 saat inkübasyon sonucu normal medyuma alınarak inkübe edilen L-Strain hücrelerinde 96, 120 ve 144'üncü saatlerde de damgalanma indeksi kontrol değerlerine göre çok azalmıştır (Tablo 1).

24 Saat Colcemid ile inkübe edildikten sonra normal inkübasyon medyuma alınarak 72, 96, 120 ve 144'üncü saatlerde elde edilen damgalanma indeksi değerleri kontrol değerlerine göre çok azalmıştır (Tablo 1). Colcemid ile 24 saat inkübasyondan sonra en çarpıcı azalma 144'üncü saatte göze çarpmakta damgalanma indeksi değeri $10,24 \pm 4,2$ olarak bulunmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. 6 veya 24 saat Colcemid muamelesinde bırakılmış hücrelerin değişik zamanlarda ³H-Thymidine ile tayin edilen damgalanma indeksi değerleri.

Inkubasyon süresi (saat)	54	72	96	120	144
Kontrol	44.93 ± 10.37*	40.50 ± 12.93	43.36 ± 11.95	48.94 ± 11.98	44.29 ± 15.80
6 saat Colcemid muamelesi:	28.25 ± 12.41	44.12 ± 18.12	24.29 ± 9.41	16.40 ± 8.53	16.39 ± 8.50
24 saat Colcemid muamelesi:	—	25.25 ± 12.89	26.47 ± 11.45	11.51 ± 5.73	10.24 ± 4.2

* SD P — 0.01

TARTIŞMA

Elde edilen bu sonuçlar, Colcemid'in hücre proliferasyonunda genel bir duraklamadan sonra hücrelerin yeniden proliferasyona (2) geçtiğine işaret eder gibi görünüyor da hücre ekiminden itibaren geçen süre içinde, hücre yoğunluğunundaki artışın da damgalanma indeksinde bir duraksamaya neden olabileceği izlenimi vermektedir. Damgalanma indeksinde elde edilen rakamların sadece 72'ci saatte ve 6 saatlik Colcemid muamelesinden sonra yüksek bulunmasının yanı sıra rakamların daha sonra düşmüş olması hücre yoğunluğuna bağlı etki konusundaki görüşü doğrular mahiyettedir.

Diğer taraftan Colcemid muamelesinden sonraki ilerleyen sürede 144'üncü saatte dahil olmak üzere elde edilen damgalanma indeksinin sayısal değerleri muhtemelen Jasny ve arkadaşlarının (2) işaret ettiği G_0 / G_1 den S Fazına geçen sakin (quiescent) hücrelere aittir. Buna göre çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç L-Strain hücrelerinin colchicine ve derivelerin DNA sentezine giren sakin (quiescent) hücrelerin veya başka deyişle G_0 / G_1 hücrelerinin araştırılmasında uygun bir obje oldukları şeklindedir.

KANAKLARY

1. Jasny, R.B., J., Fried and I. Tamm: *The effects of treatment with human B-Interferon on the stimulation of thymidine uptake and DNA Synthesis by Colchicine in human fibroblasts*. Journal of Interferon Research 6: 239-246 1985.
2. Spurna, V., F. Santavy and A. Lange: *The influence of certain Colchicine derivatives on the growth characteristics of L-Cells-Gen Physiol. Biophys-4*: 382-392 (1985).
3. Ferencz, N.R. and Nardone, R.M.: *A noncontinuous slow gas chamber for the cultivation of mammalian cells grown in Petri dishes*. Exp. Cell Res. 53: 139-144 1968.
4. Rogers, A.W.: *Techniques of Autoradiography*. Elsevier Pub. Com. 1967.
5. Velicangil, S.: *Biyoistatistik*. Fizik Kitabevi 1984.