

DEKSAMETASON KULLANILDIĞINDA MYOBLASTLAR YÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN SCANNİNG ELEKTRON MİKROSKOBU İLE İNCELENMESİ

Melih Zeytinoğlu*

Ergin Açıklın**

Günümüzde kanserleşmeye giden dokuların önceden tespiti, böylece erken teşhis ve tedavisi konusunda çalışmalar hızla sürmektedir. Bu amaçla bizim kullandığımız ve aynı zamanda yaygın olan yöntemde : İncelenmek istenen dokudan alınan ve doku kültürü yöntemiyle üretilen hücrelerin genetik yapılarına, yapı ve özellikleri bilinen bazı onkogenler ilave edilerek kansere eğilimli hücreler haline getirilirler. Daha sonra kültür ortamına kanserojen maddeler eklenerek hücrelerde meydana gelen yapı değişiklikleri incelenir.

Yaffe ve Saxel adlı iki araştırmacı fare iskelet kasından alınan dokudan ilk kez C2 adı verilen myoblastları izole etmişlerdir (5). Daha sonra Gosset ve arkadaşları plazmid kullanarak bu C2 kültür hücrelerine N-ras memeli onkogenini yerleştirmeyi başardılar ve bu yeni hücreye CO25 kültür hücresi adı verildi (5).

Günümüze kadar ras onkogeni grubundan onkogenlerin N-ras (Neoroblast), H-ras (Harvey) ve K-ras (Kristen) olarak üç çeşit protoonkogenik formu tanımlanmıştır (3). Ras onkogeni taşıyan hücre ortamlarına kanserojen madde ilave edildiğinde hücrelerde P21 proteinini üretimi artmakta ve artan bu protein GTP ase gibi iş görerek GTP yi inaktive ettiğinden hücre devamlı çoğalmaya ve farklılaşmaya itilmektedir (6).

Günümüze kadar CO25 kültür hücreleriyle yapılan bu tür bir çalışmaya rastlamadık. Bu nedenle tercih ettiğimiz CO25 kültür hücrelerinin ortamına deksamethasone ilave ederek hücre yüzeyinde meydana gelebilecek değişiklikleri Scanning elektron mikroskop tekniği ile incelemeyi amaçladık.

* Anadolu Ü. Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı Araştırma Görevlisi

** Anadolu Ü. Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı Doçenti

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışma İngiltere, Norwich John Innes enstitüsü hücre biyolojisi bölümünde yapılmış olup kullanılan CO25 kültür hücreleri (Fare çizgili kasından elde edilmiş ve N-ras onkogeni taşıyan myoblast) East Anglia Üniversitesi moleküler biyoloji bölümünden temin edilmiştir.

Doku kültüründe dört farklı içerikli ortam kullanıldı. Birinci besiyeri için FCS (% 10 Foetal calf serum, Gibco, Cat. no : 011-62290H) içeren DMEM (Dulbecco's Modifed Eagle Medium, Gibco, Cat. no : 042-02501 H). İkinci besiyeri için FCS ve Deksametazon (200 mM, 9 alphafluoro-16 alpha-methyl-prednisolone, Sigma, Cat. no : D-1756). Üçüncü besiyeri için HS (% 10 Horse serum, Gibco, Cat. No : 034-06050) içeren DMEM. Dördüncü besiyesi için HS ve Deksametazon (200 mM) içeren DMEM kullanıldı (1,4). Hücrelerin konuldukları besiyerleri 5 ml olarak hazırlandı ve hücreler % 10 CO₂ ve % 90 O₂ içeren ortamda 37°C de inkübe edildiler.

Özel lamalar üzerine yerleştirilen hücreler PBS (Phosphate Buffer Saline : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7.3) ile 30 saniye ve üç kez oda sıcaklığında yıkandıktan sonra % 2.5 lik glutaraldehit (% 97.5 PBS) ile 15 dakika tespit edildiler. PBS ile 15 dakika yıkanan hücreler % 1 Osmiumtetroksit (OsO₄, % 99 PBS) ile 10 dak. post-fiksasyon işlemine tabi tutuldular ve daha sonra distile su ile 1 dakika yıkandılar. % 30, % 50, % 70, % 90 ve % 100 lük alkol (Ethanol) serilerinden 7.5 dakika geçirilerek dahidrate edilen hücreler CPD (Critical Point Dryer) işlemine tabi tutularak 200 angstrom kalınlığında altın ile kaplandılar. (Sputter Coating) (7).

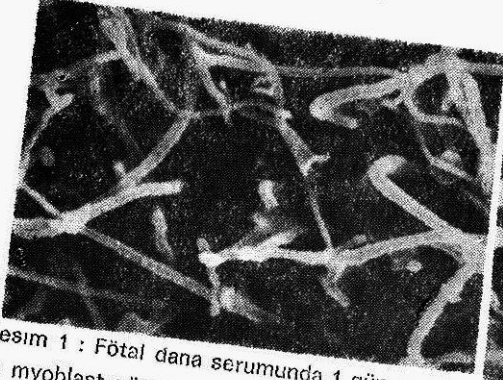
Preparatlar daha sonra scanning elektron mikroskop (CAM SCAN MK4) ile incelendiler (20 kV).

BULGULAR

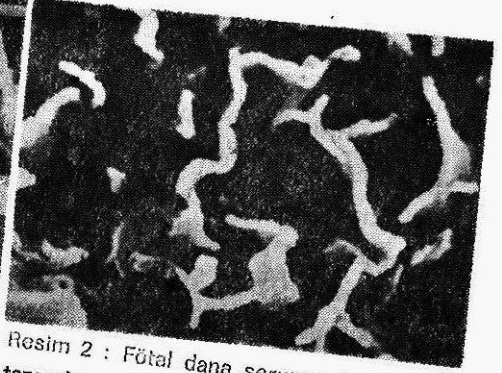
Fötal dana serumu içeren ortamdaki myoblastların ortama konulduktan sonra bir gün içindeki incelemelerinde hücre yüzeyinin genelde oldukça düzgün olduğu gözlemlendi. Yüzeyde ince uzun mikrovilli yapısının arasında daha az miktarda kısa ve künt mikrovilli yapısının da bulunduğu saptandı (Resim I).

Fötal dana serumu içeren ortama deksametazon ilavesinden bir gün sonraki incelemelerde yüzey yapısını oluşturan mikrovillusların yaparaksı yapılara dönüştüğü gözlemlendi. Bunların arasında kısa künt

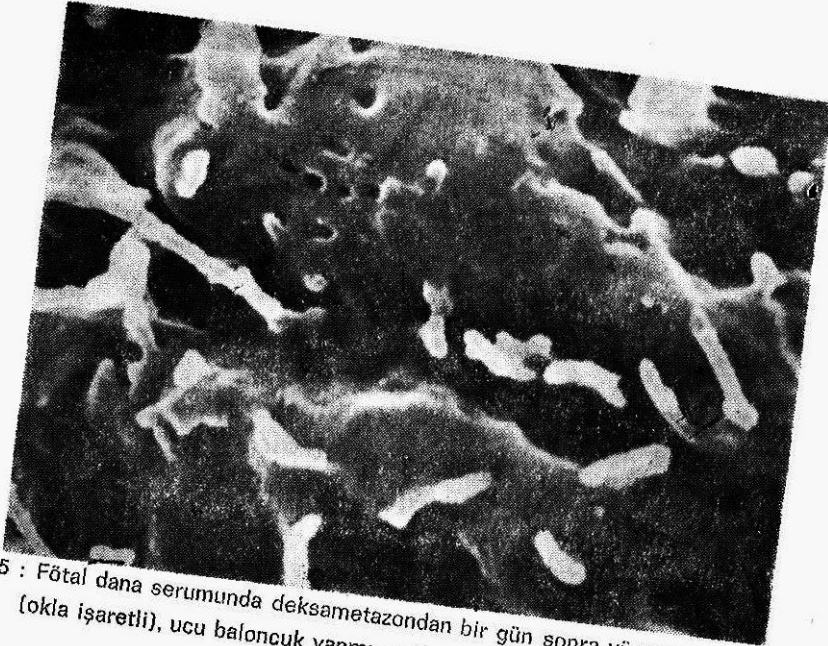
mikrovilli yapısında artış tespit edildi (Resim 2). Yine bazı myoblastların yüzeylerinde gruplaşmış çapları eşit olmayan küçük deliksi yapılarına rastlandı (Resim 5).



Resim 1 : Fötal dana serumunda 1 gün sonra myoblast yüzeyi. Düzgün yüzey ve mikrovilli yapısı x 25000



Resim 2 : Fötal dana serumunda deksametazondan bir gün sonra myoblast yüzeyinde yapraksı mikrovilli yapısı x 25000



Resim 5 : Fötal dana serumunda deksametazondan bir gün sonra yüzeydeki delikli görünüm (okla işaretli), ucu baloncuk yapmış mikrovillus (çift okla işaretli) x 25000

At serumu içeren kültür ortamında bir gün bekletilen myoblastlar incelendiğinde hücre yüzeylerinin bozulduğu dikkati çekiyordu. Hücre yüzeyi kıvrıntı, çıkıntı, kabartı, katlantı şeklinde görüntülerle kaplı idi. Ayrıca hücre yüzeyinde kısa, küntü mikrovilli yapısı da gözlemlendi (Resim 3).

At serumu içeren ortama deksametazon ilavesinden bir gün sonra myoblastların incelenmesinde hücre yüzeyinin pürüzlenme gösterdiği, kıvrıntı, çıkıntı, kabartı, katlantı şeklindeki yüzey bozukluklarının arttığı tespit edildi. Mikrovilli yapısının arttığı ayrıca bunların yapraksı mikrovilli şekline dönüştüğü ve apikal uçlarında balonsu yapılar oluştuğu gözlemlerimiz arasında idi (Resim 4).



Resim 3 : At serumunda bir gün sonra myoblast yüzeyi. Pürüzlü görünüm ve mikrovilli yapısı x 15000



Resim 4 : At serumunda deksametazondan bir gün sonra katlantı tarzında deformasyon (okla işaretli). Kısa, künt mikrovilli (çift okla işaretli) x 30000

TARTIŞMA

Çalışmada her iki ortamda da deksametazon ilavesinden sonra hücre yüzeylerinde katlantı, kıvrıntı şeklindeki deformasyon belirtilerinin ileri derecede arttığı dikkati çekmektedir. Benzer bir çalışmada Linstead ve arkadaşları dexametazon kullandıktan sonra fibroblast yüzeylerinde benzer bozuklukları tespit etmişlerdir (7). Gene Bar. Sagi ve Feramisco çalışmalarında ras aktivitesinin membran bozukluklarına sebep olduğunu bildirmişlerdir (2). Bu çalışmada at serumu ortamdaki hücre yüzey yapısı gerek dexametazon ilavesinden evvelki

grup gerekse dekzametazonlu grup fetal dana serumu ortamındaki hücrelerle kıyaslandığında daha fazla deformasyon göstermektedir. Bu durumda fetal dana serumu serumun myoblastlar için daha uygun bir ortam oluşturduğu kanaatini doğurmaktadır.

RNA ve protein ihtiyacının hücrelerde arttığı durumda hücrenin ortamdan madde alımını arttırmak için yüzeyde buna uygun yapı geliştirmesi beklenir. Hücre içine madde alımıyla ilgili membran özelliklerinin birisi mikrovilli yapısıdır (8). Özellikle dexametazon ilavesinden sonra mikrovilli sayısındaki artış yaprak şeklinde genişlemeler bu amaca yönelik yapı gelişmesini düşündürmektedir.

Hücre içine madde alımıyla ilgili bir özellikte pinositatik veziküllerdir (8). Bar. Sagi ve arkadaşları fibroblastlarla yaptıkları çalışmada Transmisyon elektron mikroskobu ile N-ras onkogeni taşıyan fibroblastların dexamethasone ilavesinden sonra sitoplazmalarında pinositatik veziküllerin arttığını gördüler (2). Bu çalışmada hücre yüzeyinde delik şeklindeki görüntüler ise micropinositoza ait membran özelliği kanaatini doğuruyorsa da bu konu henüz çalışmalara ve tartışmaya açıktır.

ÖZET

Hücreler fonksiyonlarına bağlı bazı yüzey özelliklerine sahiptir. Metabolizması değişen hücrelerin yüzeyinde de bazı değişiklikler beklenir. Bu çalışmada fareden elde edilen N-ras Onkogeni bağlanmış myoblastlar değişik kültür ortamlarında üretildi. Ortama deksametazon eklenerek değişik kültür ortamının ve dekzametazonun etkileri sonucu hücrelerin yüzeylerindeki değişiklikler scanning Elektron Mikroskop ile incelendi. Değişik kültür ortamında üretilen hücrelerin yüzeylerinde bazı farklılıklar tespit edildi. Ortama deksametazon eklenmesinden sonra hücrelerin yüzeylerinde mikrovilli artışı yanı sıra düzensiz kıvrıntı, kabartı, katlantı gibi deformasyon özellikleri tespit edildi.

SUMMARY

Scanning Electron Microscopical Observations of the Effects of Dexamethasone in Surfaces of Myoblastic Cells

Cells have certain surface characteristics depending on their functions. When the metabolism of the cells changes, some differences on their surfaces are also expected. In this study, the myoblasts, given

N-ras oncogen were produced in different cultur media. Dexamethasone was added to the medium and the effects of media and dexamethasone on the surfaces of these cells were examined by a scanning electron microscopy. Certain differentiations were determined on the surface of cells grown in different cultur media. The increases of microvilli and some deformation characteristics such as ruffling and swelling were determined after adding dexamethasone to the cultur medium.

KAYNAKLAR

1. American type culture collection : Media hand book; cell culture media and reagent cell culture media formulations, American type culture collection catalogues, 1984.
2. Bar-Sagi D and Feramisco JR : Induction of membrana ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescant fibroblast by ras proteins, Science, 233 : 1061-1068, 1986.
3. Chardin P Touchot N Zaahraoni A Pizon V Lerosey I Olofsson B and Tavitian A : Structure and organization of the ras gene family in human, Proceeding of a NATO advanced research workshop on ras oncogenes, Plenum Press, Newyork, November : 1-9, 1989.
4. Freshney RI : Culture of animal cells a manual of basis technique, Second Edition, Alan R. Liss Inc., Newyork, 1987.
5. Gossett LA Zang W and Olson EN : Dexamethosone depend inhibition of diferantiation of C2 myoblasts bearing steroid- inducible N-ras oncogenes, Journal of Cell Biology, 106 : 2127-2137, 1988.
6. Hall A Morris JDH Price B Lloyd A Hancock JF Gardener S Houslay MD Wakelam MJO and Marshall CJ : The function of the mammalian ras proteins. Proceeding of the NATO advanced research workshop on ras oncogenes, Plenum Press, Newyork, November, 1-9, 1989.
7. Linstead P Jennings B Presscott A Hawley P Warn R and Gibson I : Scanning electron microscopy and the transformed phenotype, Micron and Microscopica Acta, 19 (3) : 155-162, 1988.
8. Weiss L : Cell and tissue biology, A texbook of histology, Sixth edition, Urban and Schwarzenberg, Inc., Baltimore, Munich, 1988.
9. Yaffe D and Saxel O. : Serial passaging and differential of myogenic cell isolated from dystrophic mouse muscle, Nature, 270 : 725-727, 1977.