

Nokodazol Hücre Döngüsü Eş Zamanlaması İçin Kullanılabilir mi?

Can Nocodazole Be Used To Synchronize Cell Cycle?

Dr. Özgür ÇINAR,^a
Dr. Alp CAN,^b
Dr. Olcay OKTAY SEMİZ^c

^aYardımla Üreme Teknikleri ve Tüp Bebek Kliniği, Ankara Etik Doğumevi Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
^bHistoloji-Embriyoloji AD, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara
^cSakarya Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu, Sakarya

Geliş Tarihi/Received: 27.01.2008
Kabul Tarihi/Accepted: 03.05.2008

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Özgür ÇINAR
Ankara Etik Doğumevi Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Yardımla Üreme Teknikleri ve Tüp Bebek Kliniği, Ankara
TÜRKİYE/TURKEY
ozgur.cinar@yahoo.com

ÖZET Amaç: Soma hücreleri için hücre döngüsü; G1, S ve G2 aşamalarından oluşan interfaz ve bunu izleyen mitoz fazından (M-fazı) oluşur. İn vitro kültür ortamındaki hücreler aynı hücreden köken alsalar bile genellikle hücre döngüsünün farklı aşamalarında bulunurlar. Bazı proteinlerin, genlerin veya çeşitli hücre bileşenlerinin özgün değişikliklerini araştırmak için, olabildiğince çok sayıda hücrenin hücre döngüsünün aynı aşamasında tutulması yani hücre eş zamanlaması gerekir. Bu amaçla, mikrotübül depolimerizasyonu yaptığı bilinen bir benzimidazol türevi olan nokodazolun hücre eş zamanlaması için kullanımını araştırdık. **Gereç ve Yöntemler:** 0,3 µM nokodazol in vitro kültürü yapılan Vero hücrelerinin eş zamanlaması için kullanıldı. Nokodazol verilmeyen grup kontrol grubu olarak kabul edilirken; 6, 12 veya 18 saatlik nokodazol verilen grup deney grubunu oluşturdu. Etkinin geri dönüşümünün kontrol edildiği gruptaki hücreler ise nokodazol ile kültürden sonra yıkayıp nokodazol içermeyen medyumla 6, 12, 24 veya 48 saat inkübe edildiler. Çeşitli kültür dönemlerinden sonra hücreler tespit edilip mikrotübülüsleri (anti α+β tubulin antikoru sonrası FITC) ve çekirdekleri (7-AAD) fluoressan madde ile işaretlendi. Preparatlar konfokal mikroskopta incelendi. Nokodazol uygulanan ve kontrol grupları istatistiksel olarak değerlendirildi. **Bulgular:** Nokodazolun zamanla bağlı olarak hücreleri mitozda tuttuğunu saptadık. Özellikle mitozdaki hücrelerde yıkılmış mikrotübülüsler izlendi. Nokodazol kültür ortamından uzaklaştırıldığında, hücreler mitozlarını tamamladılar ve interfaz aşamasına geçtiler. Nokodazol etkisinin geri dönüşüm döneminin 12. saatinde hücrelerin neredeyse tamamının (%99) interfazda olduğu izlendi. Bu bulgu nokodazolun Vero hücrelerini eş zamanladığını göstermektedir. Bunun yanında nokodazolun Vero hücrelerinin apoptozisini de uyardığını gördük. **Sonuç:** Uygun doz ve süredeki nokodazolun kültürdeki Vero hücrelerinin eş zamanlaması için uygun bir madde olduğunu saptadık.

Anahtar Kelimeler: Hücre döngüsü; mikrotübülüs; nokodazol

ABSTRACT Objective: Cell cycle for somatic cells is composed of interphase including G1, S and G2, and the M phase. In vitro cultured cells usually exist at various cell cycle phases even though they originated from one mother cell. To analyze specific variations of some proteins, genes or other cellular components it is essential to keep the cells at or bring them to the same cell cycle phase at the maximum level; this is called cell synchronization. Thus, we analyzed the use of benzimidazole derivative nocodazole, a microtubular depolymerizing agent, for cell synchronization. **Material and Methods:** To synchronize in vitro cultured Vero cells 0.3 µM nocodazole was used. When untreated cells were considered the control group, the experiment group consisted of cells that were treated with nocodazole for 6, 12 or 18 hours. In the recovery group, following nocodazole treatment, cells were washed and cultured in nocodazole-free medium for 6, 12, 24 or 48 hours. After culture periods, cells were fixed and microtubules (after anti α+β tubulin antibody, FITC) and nuclei (7-AAD) were labeled with fluoressant material. Slides were observed with a confocal microscope and the results were statistically analyzed. **Results:** Nocodazole kept the cells at mitosis, time dependently. Disrupted microtubules were seen in the cells particularly during mitosis. When nocodazole was removed from the culture medium, cells completed their mitosis and resumed to the interphase stage. At 12 hours of recovery, almost all cells (99%) were in the interphase. This result indicates that nocodazole synchronizes Vero cells. Besides, we also observed that nocodazole induced apoptosis in Vero cells. **Conclusion:** We noted that nocodazole administration at the appropriate time and dose might be used successfully to synchronize the cells in culture.

Key Words: Cell cycle; microtubules; nocodazole

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2008, 28:437-444

Hücre hattı (cell line) bir hücreden mitozlarla çoğalmış hücre serilerini tanımlar. Oluşan yavru hücreler genotip ve fenotip olarak birbirleriyle aynı özellikleri göstermekle birlikte bu hücreler hücre döngüsü içinde aynı evrede bulunmazlar. Bu nedenle bir hücre hattının karakteri (lag, log, plato fazları, 2'ye katlanma zamanları gibi) o kültürdeki hücrelerin tamamı dikkate alınarak belirlenir.^{1,2} Yine aynı nedenle, özellikle çeşitli ilaçların veya değişik amaçlarla kullanılan kimyasalların hücre döngüsüne ve/veya mitoz mekiğine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, kimyasalın kullanılacağı süreyi optimize etmek için kültür ortamındaki hücrelerden olabildiğince çok sayıda hücrenin aynı hücre döngüsü aşamasında olması istenir ve bu işlem hücre eş zamanlaması (cell synchronization) olarak adlandırılır.^{1,3,4} Hücre eş zamanlaması hücre döngüsündeki özgün bir aşamayı ve bu aşamadaki olaylar ile etkenleri çalışmak için gereklidir. Örneğin, mitoz için gerekli bir proteini ya da bu proteini kodlayacak genin etkinleşmesini hücre döngüsünün farklı aşamalarında izlemek için hücrelerin çoğunluğunu aynı aşamada tutmak hedeflenir.⁵

Soma hücreleri için hücre döngüsü interfaz ve mitoz olmak üzere 2 ana aşamadan oluşur. Bunlardan interfaz, hücre döngüsü içinde genellikle daha uzun süreye yayılmış olup G₁, S ve G₂ alt aşamalarından oluşurken; mitoz ise sırasıyla profaz, metafaz, anafaz ve telofaz alt aşamalarından oluşur.⁶ Özetle interfazın G₂ aşamasında hücre kendini mitozla hazırlamaktadır. Mitozun ilk aşaması olan profazda; kromozom yoğunlaşır, çekirdek zarı parçalanır, çekirdekçikler kaybolur, sentrozom 2'ye bölünerek her bir sentriyol/mikrotübülüs organize edici merkez ayrılıp kutuplara yönelir. Metafazda kromozomlar orta hatta dizilir, bunu izleyen anafazda ise artık mikrotübülüsler aracılığıyla kutuplara çekilen kromozomlar izlenir. Profazdan metafaza geçiş aşaması olan prometafazda, profaz aşamasında hücre içinde dağınık olarak bulunan kromozomların metafaz plağını oluşturmak için düzenlenmesi gerçekleşir. Mitoz mekiğindeki kinetokor mikrotübülüsleri kromozomların kinetokor bölgelerine tutunarak yavaş yavaş metafaz plağını oluşturmak için kromozomları düzenlerler.⁶

İşte bu yüzden hücreleri eş zamanlamak için belki de en uygun zaman mitoz aşamasıdır. Çünkü mitoz mekiği ve ilgili düzenleyici proteinler temel olarak mikrotübülüsler üzerinden çalışır ve mikrotübülüsler üzerine yapılacak etki, uygun şekilde yapıldığında geri dönüşüm sağlanabilmektedir. Mikrotübülüsler, mikrofilamanlar ve ara filamanlarla birlikte hücre iskeletini oluşturan dinamik proteinler olup mitozdan başka, protein ve organel hareketi, taşınması ve organizasyonunda görev almaktadırlar.⁷⁻¹⁰ Bu görevler mikrotübülüslerin oluşumu ve/veya yıkımında etkili olan kimyasal ve fiziksel ajanlarla düzenlenebilmekte; bunun yanında bu ajanlar tıpta kanser tedavisinde hücre bölünmesini engelleme etkisinden dolayı kullanılmaktadır.¹¹⁻¹³

Biz bu çalışmada; mikrotübülüs depolimerizasyonu yaptığı bilinen nokodazolun başarılı bir hücre eş zamanlaması yapmak için kullanılabilir olup olmadığını, iyi bilinen ve çok kullanılan bir hücre hattı olan Vero hücrelerinde araştırdık.^{14,15} Çalışmalarımız gösterdi ki; 0.3 µM doz ve 12 saatlik nokodazol inkübasyonunu izleyen 12 saatlik nokodazolsuz dönemden sonra hücrelerin çok büyük bir çoğunluğu interfaz aşamasında bulunmaktadır. Bu sonuç hücre eş zamanlaması için nokodazol kullanılabilirliğini göstermektedir.

■ GEREÇ VE YÖNTEMLER

KİMYASALLAR

Dimetil sülfoksit içinde 10 mg/mL'lik çözeltisi alınan nokodazol (Nocodazole, Methyl [5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate, M.A.= 301,32, saflık > %99, Sigma Chemical Co., MO, ABD) hücre kültür ortamı içinde çözülerek 0,3 µM (100 ng/mL)'lik çalışma çözeltisi hazırlandı ve bu doz sonraki deneylerde kullanıldı.

MİTOTİK HÜCRE KARAKTERİNİN SAPTANMASI

Vero hücreleri (ATCC, Manassas, VA, ABD) %10 oranında fetal dana serumu (fetal calf serum, Gibco BRL, MD, ABD) içeren Dulbecco'nun Minimum Essential Medium-Ham's F-12 (DMEM Ham's F-12, Sigma Chemical Co., MO, ABD) ortamı içinde 75 cm²'lik hücre kültür kaplarına (Greiner Bio-

One, Frickenhausen, Almanya) ekilerek 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂-%95 hava karışımı içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin ekilmesini izleyerek, 3 defa alt kültürleri yapılarak lag, log ve plato fazları ve hücrenin sayısını 2'ye çıkarma zamanları (HİÇZ, doubling time) hücre sayımı yapılarak saptandı.¹⁶ Daha sonra %100 kültür doygunluğuna (confluency) erişen hücreler %0.04 tripsin-%0.02 EDTA (Biochrom AG, Berlin, Almanya-Applichem GmbH, Darmstadt, Almanya) ile kültür kabından kaldırılarak içinde 1.2 cm çaplı lameller bulunan 24 kuyucuklu kültür kabına (Falcon, Franklin Lakes, NJ, ABD) 1500 hücre/cm² olacak şekilde ekildi.

NOKODAZOL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI, HÜCRE İŞARETLENMELERİ VE MİTOZ İNDEKSİ (Mİ)

Nokodazolun etkisi ve bu etkinin geri dönüşümlü olup olmadığı hücrelerin 6, 12 ve 18 saatlik nokodazol ile inkübe edilmesi ve inkübasyon sonrası nokodazolun uzaklaştırılıp nokodazolsuz kültür ortamı içinde 6, 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyonları sonrası araştırıldı. Bunun için nokodazol inkübasyonları sonrası ve nokodazolun uzaklaştırıldığı gruplar ve kontrol grubu olarak hiç ilaç eklenmeyen grup MTSB-XF ile (%2.4 formaldehide, %0.5 Triton X-100, 1 mM paclitaxel, 10 U/mL aprotinin ve %50 deuterium oxide) 20 dk. süresince 37°C sıcaklıkta tespit ve ekstrakte edildi.¹⁷

Hücreler daha sonra fare monoklonal anti α + β tubulin antikoruyla (mouse monoclonal anti α + β tubulin antibody, Sigma Chemical Co., MO, ABD) 90 dk., 37 °C'de ve sonra FITC konjuge edilmiş fareye karşı keçi antikoruyla (FITC conjugated goat anti mouse antibody, Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, ABD) inkübe edildi. Preparatlar her aşamadan sonra fosfat tamponlu tuz (phosphate buffered saline, PBS, Sigma Chemical Co., MO, ABD) solüsyonuyla yıkandılar. Kromozomlar 90 dk. boyunca 10 μ M 7-AAD (Aminoactinomycin-D, Sigma Chemical Co., MO, ABD) ile işaretlendi ve en sonunda 1 μ g/mL Hoechst 33258 (Polyscience, Niles, Illinois, ABD) içeren PBS/glisserol medyumuyla kapatıldı.¹⁸ Mikroskop gözlemleri iki lazer (488 nm Argon iyon ve 543 nm He-Ne) bulunduran Zeiss LSM 510 Meta konfokal mikros-

kobunda (Zeiss, Jena, Almanya) yapıldı. Mİ, en az 1000 hücre sayıp şu denklemlerle hesaplandı: Mİ = (mitozdaki hücre sayısı/toplam hücre sayısı) \times 100.¹⁶ Konfokal mikroskopunda 0.68 μ m kalınlıkta ardışık optik kesitler alınarak görüntü analiz programında mikrograflar değerlendirildi. Apoptozis; hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin varlığı gibi hücre ve çekirdek morfolojilerinin incelenmesiyle değerlendirildi.¹⁹

İstatistiksel analiz

Bulgular bilgisayar tabanlı SPSS programı (sürüm 10.0; SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) ile analiz edilerek değerlendirildi. Her bir deney 3 kez tekrarlandı ve böylece birbirleriyle tutarlı olup olmadığı araştırıldı. Daha sonra her bir grup için bu 3 deney sonucunun değerlerinin aritmetik ortalaması ve bunlar arasındaki standart sapma bulundu. Veriler, her bir grup için alınan ortalama \pm standart sapma olarak belirtildi (Tablo 1). Kontrol ve ilaç uygulanan gruplar arasındaki 6, 12 ve 18 saatlik inkübasyonlar sonrası farklılıklar örneklemin bulunduğu o saat temel alınarak ikili deney grupları şeklinde (kontrol grubu ile ilaç uygulanan her bir grup için pozitif-negatif hücrelerin karşılaştırılmasına göre) ki-kare testi yapılarak karşılaştırıldı ve p< 0.05 anlamlı olarak değerlendirildi. Bunun yanında ilacın uzaklaştırılması sonrası etkinin geri dönüşümlü olup olmadığı ve hücre eş zamanlaması, 6, 12, 24 ve 48. saatler için kontrol ve ilaç grubundaki Mİ'ler ikili olarak ki-kare testiyle karşılaştırılarak gruplar arası anlamlılık olup olmadığı analiz edildi.

BULGULAR

İN VİTRO VERO HÜCRESİ KARAKTERLERİNİN SAPTANMASI

Vero hücrelerinin kültür yoğunluğu %100'e ulaştığında kültür ortamındaki hücre yoğunluğunun $1 \times 10^5 \pm 5 \times 10^3$ hücre/cm² olduğu izlendi. Hücrelerin, 1:4 oranında alt-kültürünün yapılmasını izleyen ilk 12-18 saatte lag fazını geçip log fazına girdiği saptandı. Log fazında HİÇZ'nin 22 ± 4 saat olduğu 86 ± 6 saatte plato fazına ulaştığı görüldü.

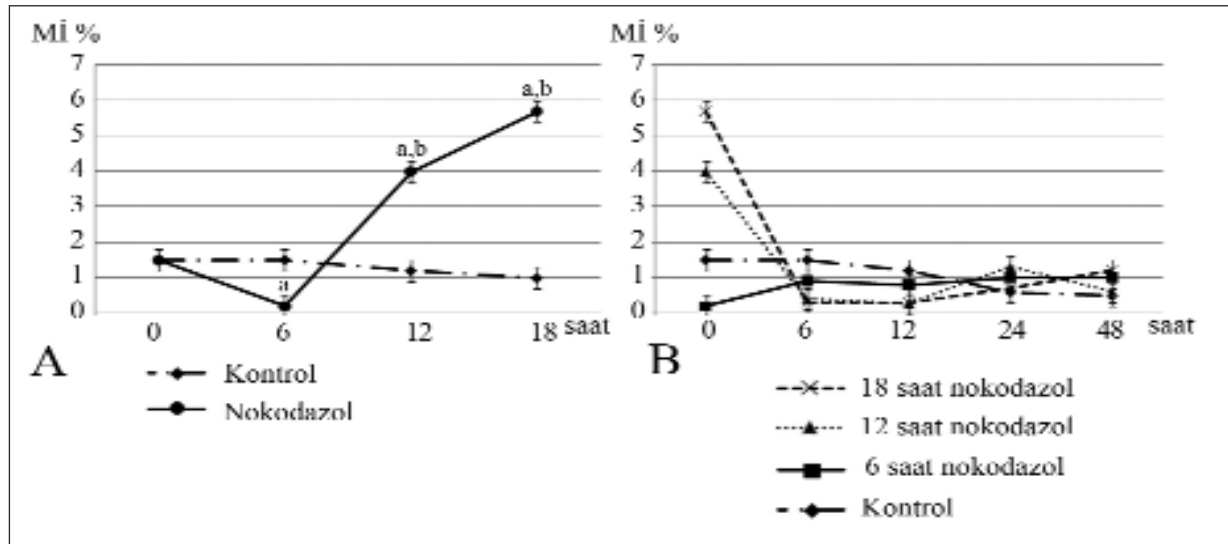
NOKODAZOLUN MİKROTÜBÜLSLER VE HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

Kontrol ve nokodazol gruplarının Mİ'leri, her bir deney saati için ayrı ayrı saptandı. Aynı deneyler toplam 3 kez tekrarlanarak aynı grupların Mİ sonuçlarının aritmetik ortalaması alındı ve standart sapmaları saptandı, Mİ değerleri bu 3 grubun ortalaması \pm standart sapma olarak ifade edildi (Tablo 1). Kontrol grubunda alt kültür işleminden sonraki 12 saati izleyen, ilk 12 saatte Vero hücrelerinin Mİ'si 1.5 ± 0.3 olarak saptanırken (Şekil 1A, 1B) 18-36. saatler arasında 0.8 ± 0.2 olarak; 6, 12 ve 18 saatlik nokodazol inkübasyonu sonrası hücrelerin Mİ'leri sırasıyla 0.2 ± 0.1 , 4.1 ± 0.3 ve 5.7 ± 0.4 olarak saptandı (Şekil 1A, 1B). Mitozdaki hücrelerin mitoz figürleri incelendiğinde kontrol grubundaki hücrelerin 0.3 ± 0.1 'nin profazda, 0.9

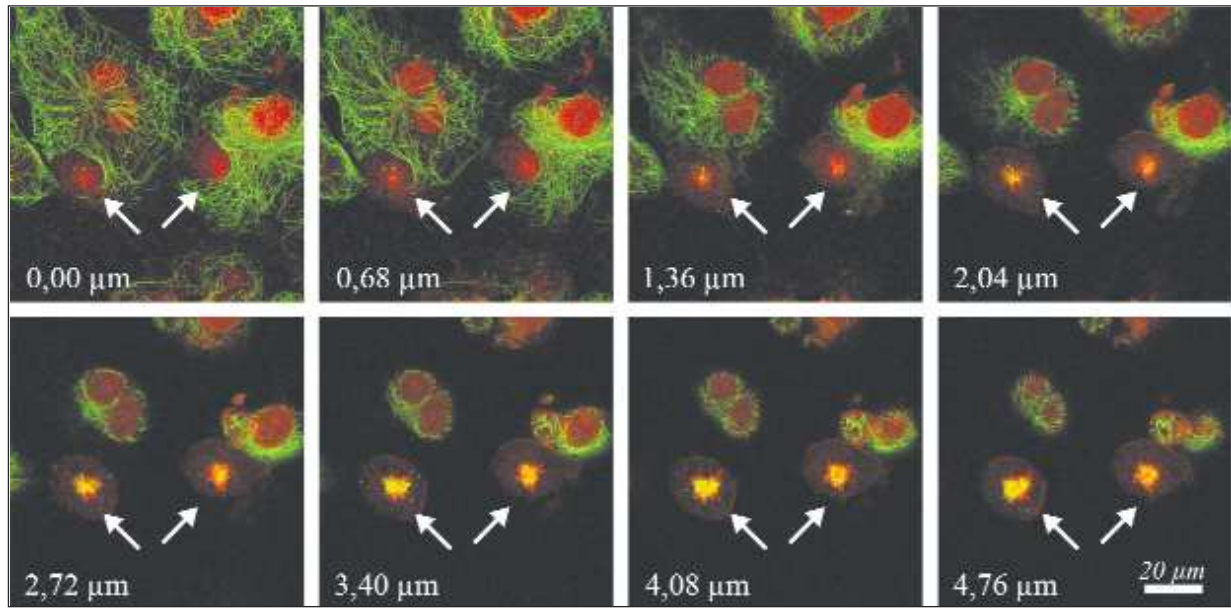
± 0.2 'sinin metafazda, 0.4 ± 0.1 'nin anafaz-telofazda olduğu izlenirken 6 saatlik nokodazol inkübasyonunda mitoz aşamalarından 0.2 ± 0.1 oranında metafaz görülürken yoğun apoptotik aktiviteye rastlandı. 12 ve 18 saatlik nokodazol eklenmesi sonrası mitoz figürü 12 saat için 2.6 ± 0.4 profaz, 1.2 ± 0.1 metafaz ve 0.8 ± 0.1 anafaz-telofaz şeklinde iken 18 saat için 3.7 ± 0.3 profaz, 1.4 ± 0.2 metafaz ve 0.6 ± 0.1 anafaz-telofaz şeklindeydi (Şekil 2). Kullanılan yoğunluktaki nokodazolun interfaz hücrelerinin mikrotübülüslerini etkilemediği, öte yandan mitozu yeni girmiş, profaz aşamasındaki hücrelerin mikrotübülüslerini depolimerize ettiği izlendi. Bu değişiklik mikrotübülüslerin kromozomlar etrafında toplanmış seyrek kısa odaklar şeklinde izlenmesine neden oldu (Şekil 2).

TABLO 1: Kontrol grubu ve 6, 12, 18 saat süreyle nokodazol uygulanan grupların ilaç sonrası (0. saat) ve ilacın uzaklaştırılıp nokodazolsuz medyunda 6, 12, 24 ve 48 saat süreyle izlenmesi sonrası Mİ'leri (her bir deney grup ve zamanının 3 kez tekrarlanması sonrası aritmetik ortalamaları \pm standart sapmaları olarak) gösterilmektedir.

Gruplar	Belirli zamanlardaki Mİ (ortalama \pm standart sapma)				
	0. saat	6. saat	12. saat	24. saat	48. saat
K	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2
6	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3
12	4.1 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.2	1.3 ± 0.4	0.6 ± 0.2
18	5.7 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.3	1.2 ± 0.3



ŞEKİL 1: A) 6, 12 ve 18 saat süreyle nokodazol inkübasyonları sonundaki mitotik indeksler (Mİ). Özellikle 12. ve 18. saatteki Mİ'lerin kontrollere oranla oldukça arttığı görülüyor. B) 6, 12, 18 saat süreyle nokodazol ile inkübe edilen hücrelerin nokodazolun yıkanıp uzaklaştırılması sonrası 6, 12, 24 ve 48. saatlerdeki Mİ'leri. $p < 0.05$, a: Kontrolle; b: 6. saatle karşılaştırıldığında.



ŞEKİL 2: 12 saatlik nokodazol uygulaması sonrası profaz ve interfazdaki hücrelerin ardışık olarak 0.68 μm aralıklarla alınmış konfokal mikrografları. Yeşil sinyal: Mikrotübülüsler (anti α + β tubulin antikor ve sonrası FITC), Kırmızı sinyal: Çekirdek (7-AAD). Mikrotübülüslerin interfaz hücrelerinde sitoplazma içinde yaygın olduğu, mitozdaki hücrelerde ise (oklar) çekirdek etrafında kısa mikrotübülüs uzanımları olarak bulunduğu izlenmekte. Bar: 20 μm .

NOKODAZOL İLE HÜCRE EŞ ZAMANLAMASI

Nokodazol etkisinin geri dönüşümlü olup olmadığını görmek ve hücre eş zamanlaması için uygun zamanı saptamak amacıyla hücrelerin 6, 12 ve 18 saatlik nokodazol inkübasyonları yapıp nokodazol yıkanıp uzaklaştırıldıktan sonra 6, 12, 24 ve 48 saatlik ilaçsız ortam içinde kültürleri yapıldı. Mitoz figürleri izlenerek Mİ'leri saptandı (Şekil 1B, 2). Buna göre, 6 saatlik nokodazol ile inkübasyon sonrası nokodazolun uzaklaştırıldığı 6, 12, 24 ve 48. saatlerdeki Mİ'ler sırasıyla $\%0.9 \pm 0.2$, $\%0.8 \pm 0.3$, $\%1.0 \pm 0.3$, $\%1.0 \pm 0.3$ oldu. Bu durum 12 saatlik nokodazol sonrası ilaçsız ortamla aynı sürelerde kültür edilen hücreler için; $\%0.4 \pm 0.1$, $\%0.2 \pm 0.2$, $\%1.3 \pm 0.4$, $\%0.6 \pm 0.2$ olur iken; 18 saatlik nokodazol sonrasındaki ilaçsız ortamla yukarıda belirtilen sürelerdeki kültür sonunda Mİ'ler $\%0.3 \pm 0.1$, $\%0.3 \pm 0.1$, $\%0.7 \pm 0.3$, $\%1.2 \pm 0.3$ oldu (Tablo 1). 18 saat nokodazol uygulaması sonrası nokodazolun 6 saat süreyle uzaklaştırıldığı grup ve kontrol grubu arasında ($p < 0.007$); 12 ve 18 saat nokodazol uygulanmasını izleyen 12 saat süreyle nokodazolsuz inkübasyon gruplarıyla kontrol grubu arasında ($p < 0.02$; $p < 0.02$, sırasıyla) ve 12 saat nokodazol uygu-

lamasını izleyen 24 saatlik nokodazolsuz inkübasyon grubuyla kontrol grubu arasında ($p < 0.02$) anlamlı farklılık olduğu izlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında; hücrelerin $\%99.8$ 'inin interfazda olduğu, 12 saatlik nokodazol sonrası nokodazolun uzaklaştırıldığı 12 saatlik inkübasyonun en etkili eş zamanlama yöntemi olduğu belirlendi (Şekil 1B).

TARTIŞMA

Hücre döngüsünün farklı fazlarında bulunan memeli hücrelerinin çoğunluğunu aynı fazda tutma yeteneği (hücre eş zamanlaması) hücre döngüsü boyunca gerçekleşen önemli biyokimyasal olayları anlamak için gereklidir.²⁰ Hücreleri sallamak (*shake-off*), serum miktarını azaltmak ve hidroksiüre, afidikolin ve metotreksat gibi çeşitli kimyasalların kullanımı hücre eş zamanlaması için daha önce uygulanan yöntemlerdir.²¹⁻²⁴ Ancak bu yöntemlerin hemen hepsi hücrelerde kalıcı fiziksel veya metabolizma değişiklikleri oluşturdukları için günümüzde pek tercih edilmezler. Sonoda'nın çalışmasında hücreler santrifüj yöntemiyle eş zamanlanarak G1, S veya G2 fazlarına, ardışık nokodazol ve mimosin kullanımıyla da G1-S aşamasına

ulaştırılmış, ancak sonuçta yan etkilerinden dolayı ilaç kullanımının tercih edilmemesi gerektiği belirtilmiştir.⁵ Lazer akım sitofluorometri tekniği kullanılarak HTC hücrelerinin (karaciğer karsinom hücreleri) kolsemid, hidroksiüre ve nokodazol varlığında hücre döngüsü incelenmiş; kolsemidin tek başına ya da hidroksiüre ve nokodazol varlığında metafaz aşamasındaki hücrelerin birikimine neden olduğu ve bir DNA polimeraz inhibitörü olan afidokolinin nokodazol ile birlikte hücreleri G1-S sınırında eş zamanladığı izlenmiştir.²⁵ Bizim çalışmamızda, kültüre edilen Vero hücrelerini eş zamanlamak için kullanılan nokodazolun 6, 12 ve 18 saatlik değişen sürelerdeki etkileri ve bu etkilerin geri dönüşümlü olup olmadığı araştırıldı. Cho ve ark. HeLa hücreleri üzerine 100 ng/mL nokodazolun etkilerini araştırdıklarında; G2-M fazındaki hücre sayısının ve bunun yanında hücre apoptozisinin arttığını saptamışlardır.²⁶ Mİ 6 saatlik inkübasyon sonunda %45, 12 saat sonunda %75, 18 ve 24. saatlerde ise %90 olarak bildirilmiştir. Bu bulgu nokodazolun HeLa hücrelerini eş zamanladığını göstermektedir. Oysa bizim çalışmamızda aynı doz ve süredeki nokodazolun Vero hücrelerinin Mİ'ni, her ne kadar arttırmış olsa da en fazla %6'lara çıkardığı izlenmiştir. Bu farklılık bir kanser hücre hattı olan HeLa hücreleriyle, Vero hücrelerinin yapısal farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Öte yandan Cooper ve ark. tarafından yayınlanan bir çalışmada, nokodazolun hücre eş zamanlaması için kullanılmasının uygun olmadığı belirtilmektedir.²⁷ Araştırmacılar L1210, yüzeye yapışmayan (nonadherent), fare lösemi hattı üzerine 0.01 ve 1 µg/mL yoğunluktaki nokodazolun 19 saat süreyle etkisini değerlendirdiklerinde 1 µg/mL'lik nokodazolun hücre büyüklüğünü arttırdığı ve DNA içeriğinin nokodazol ile inkübe edilmeyenlerden farklı olduğunu belirtmektedirler. Her iki grup arasında bu farklılığın olması nokodazolun iyi bir hücre eş zamanlayıcı olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Bununla beraber, nokodazolun uzaklaştırılarak hücre eş zamanlaması yapılmasını da hücre büyüklüğü, DNA paterni gibi çeşitli hücre karakterlerini değiştirdiği gerekçesiyle kabul etmemektedirler. Ancak, onların çalışmalarında kullanılan nokodazol dozu bizim kullandığımız doz ile karşılaştırıldığında 10

kat daha yüksektir. Nokodazolun düşük dozlarının ise aynı etkiye sahip olup olmadığı belirtilmemiştir. Ayrıca Cooper ve ark.nın çalışmasında hücre olarak bir kanser hücre türünün kullanılması nedeniyle, normal hücre türünden farklılık gösterip göstermeyeceği de açık değildir. Aynı ekibin diğer 2 çalışmasında memeli hücrelerinin serumsuz bırakılmasının da hücreleri eş zamanlamak için uygun olmadığı ifade edilmekle birlikte ideal bir eş zamanlama yöntemi de önerilmemiştir.^{28,29} Samake ve Smith ise nokodazolu yarıklanma (cleavage) aşamasındaki sığır embriyonlarının hücre döngüsünü durdurmak ve blastomerleri eş zamanlamak için kullanmışlardır.³⁰ 0.4 µg/mL ve üzeri yoğunluktaki nokodazolun hücre bölünmesini durdurduğunu, nokodazolun uzaklaştırılmasından sonra ise yarıklanma evresinde durmakta olan embriyonların gelişimlerine devam ettiklerini, 3-5 saat içinde interfaz aşamasına geçtiğini ve 6 saat sonra DNA sentezinin yeniden başlatıldığını saptamışlardır. Öte yandan, her ne kadar hücre sayısı ve zona pelüsidadan çıkma (hatching) oranı azalmış olmakla birlikte blastosist aşamasına ulaşma oranları anlamlı şekilde etkilenmemiştir. Araştırmacılar bu sonuçlar ışığında nokodazolun sığır embriyonlarını eş zamanlamak için kullanımını önermektedirler.³⁰

Beswick ve ark. 0.16-16 µM yoğunluklarındaki nokodazolun kronik lenfositik lösemi hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunu baskılayarak apoptozisi uyardığını ve bunun kaspaz ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.³¹ İkegami ve ark.nın çalışmalarında nokodazolun zebra balığı embriyonlarında metafazda hücreleri durdurduğu ve kaspaz yolağı üzerinden apoptozisi arttırdığı izlenmiştir.³² Benzer şekilde, biz de, 6. saatte çok daha yoğun olmak üzere nokodazol uygulamasını izleyen hücre morfolojilerinin incelenmesi sonucunda apoptotik hücre ölümünün arttığını saptadık. Kook ve ark. da nokodazolun Rat-1 hücrelerinde morfolojik değişiklikler, DNA fragmantasyonu ve sonunda hücre ölümüne yol açarak apoptozisi uyardığını; normalde yassı olan hücrelerin yuvarlaklaştığını ve tüm bu değişikliklerin p130cas, p125 ve paksilin gibi fokal adezyon proteinleriyle ilişkili olduğunu ve bcl-2 ile bu değişikliklerin engellendiğini göstermişlerdir.³³

Nokodazolun hücre eş zamanlamasını sağlaması mikrotübülüsleri depolimerize edici etkisinden kaynaklanmaktadır. Böylece hücreler mitozu tamamlayamamaktadır.^{14,15} De Brabander ve ark. PTK2 hücrelerinin 1 ya da 10 µg/mL dozdaki nokodazol ile inkübasyonun özellikle sentromerle ilişkili mikrotübülüslerin kaybına neden olup sadece sitoplazma içinde bir iki bölgede mikrotübülüs varlığının bulunduğunu, ancak ilacın uzaklaştırılmasından sonra kinetokor ve sentromer bölgelerinde giderek artan oranda küçük mikrotübülüs birikiminin izlendiğini saptamışlardır.³⁴ Ayrıca kinetokor nükleasyonunun sadece metafaz aşamasındaki yoğunlaşmış kromozomlarla ilişkili olduğunu, buna karşın profazdaki kromozomlarla ilişkisinin çok az olduğunu da bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada düşük doz (0.1 µg/mL) nokodazolun varlığında hücrelerin mitozda kaldığı, mikrotübülüslerin kinetokor ve sentrozomla ilişkili kısa yapılar olarak izlendiği, nokodazolun uzaklaştırılmasından sonra ise bu kısa mikrotübülüslerden nükleasyonla uzadığı ve böylece hücrenin döngüsünün kaldığı yerden

sürdüğü belirtilmiştir.³⁴ Biz de çalışmamızda aynı dozdaki nokodazolun interfaz hücrelerinde mikrotübülüsleri anlamlı bir şekilde etkilemezken mitozu giren hücrelerde mikrotübülüslerinin depolimerizasyonuna bağlı çekirdek etrafında toplanan kısa yapılar olarak bulunduğunu saptadık.

Özetle, bu çalışma Vero hücre hattının eş zamanlaması için uygun doz ve süredeki nokodazol uygulamasının kullanılabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte nokodazolun apopitozisi de uyardığı göz ardı edilmemeli, apopitozisin yapılacak çalışmanın sonuçlarını etkilemesi olasılığı varsa hücre eş zamanlaması için nokodazol yöntemi tercih edilmemelidir.

Teşekkür

İstatistiksel değerlendirmelerdeki kıymetli katkılarından dolayı Doç.Dr. Atilla Halil Elhan'a ve Yard.Doç.Dr. Serdal Kenan Köse'ye teşekkür ederiz. Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü 2001 K 120240 no'lu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Uzbekov RE. Analysis of the cell cycle and a method employing synchronized cells for study of protein expression at various stages of the cell cycle. *Biochemistry (Mosc)* 2004;69:485-96.
2. Freshney IR. Quantitation. In: Ian FR, ed. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2000. p. 309-328.
3. Cooper S. Rethinking synchronization of mammalian cells for cell cycle analysis. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1099-106.
4. Davis PK, Ho A, Dowdy SF. Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *Biotechniques* 2001;30:1322-6.
5. Sonoda E. Synchronization of cells. *Subcell Biochem* 2006;40:415-8.
6. Gartner LP, Hiatt JL. Cell cycle. In: Gartner LP, Hiatt JL, eds. *Color Textbook of Histology*. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1997. p. 52-55.
7. Can A. Epitel. Demir R, çeviri editörü. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. 1. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006. p. 23-30.
8. Sawin KE. Cell polarity: following formin function. *Curr Biol* 2002;12:R6-8.
9. Sawin KE. Microtubule dynamics: faint speckle, hidden dragon. *Curr Biol* 2004;14:R702-4.
10. Welte MA. Bidirectional transport along microtubules. *Curr Biol* 2004;14:R525-37.
11. Chen JG, Horwitz SB. Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs. *Cancer Res* 2002;62:1935-8.
12. Ikubo S, Takigawa N, Ueoka H, Kiura K, Tabata M, Shibayama T, et al. In vitro evaluation of antimicrotubule agents in human small-cell lung cancer cell lines. *Anticancer Res* 1999;19:3985-8.
13. Jung H, Sok DE, Kim Y, Min B, Lee J, Bae K. Potentiating effect of obacunone from *Dic-tamnus dasycarpus* on cytotoxicity of microtubule inhibitors, vincristine, vinblastine and taxol. *Planta Med* 2000;66:74-6.
14. Friedman PA, Platzer EG. Interaction of anthelmintic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin. *Biochim Biophys Acta* 1978;544:605-14.
15. Hays RM, Franki N, Ross LS. Effect of metabolic inhibitors on vasopressin-stimulated transport systems in the toad bladder. *J Supramol Struct* 1979;10:175-84.
16. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 2007;25:319-31.
17. Vielkind U, Swierenga SH. A simple fixation procedure for immunofluorescent detection of different cytoskeletal components within the same cell. *Histochemistry* 1989;91:81-8.
18. Can A, Semiz O, Cinar O. Two convenient methods for nuclear labeling in confocal microscope with visible lasers. *J Histotechnol* 2003;26:147-56.
19. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 2004;19:124-8.
20. Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* 1992;61:441-70.
21. Chou RC, Langan TJ. In vitro synchronization of mammalian astrocytic cultures by serum deprivation. *Brain Res Brain Res Protoc* 2003;11:162-7.
22. Fox MH, Read RA, Bedford JS. Comparison of synchronized Chinese hamster ovary cells obtained by mitotic shake-off, hydroxyurea, aphidicolin, or methotrexate. *Cytometry* 1987;8:315-20.

23. Menges M, Murray JA. Synchronization, transformation, and cryopreservation of suspension-cultured cells. *Methods Mol Biol* 2006;323:45-61.
24. Zwanenburg TS. Standardized shake-off to synchronize cultured CHO cells. *Mutat Res* 1983;120:151-9.
25. Miller-Faurès A, Michel N, Aguilera A, Blave A, Miller AO. Laser flow cytofluorometric analysis of HTC cells synchronized with hydroxyurea, nocodazole and aphidicolin. *Cell Tissue Kinet* 1981;14:501-14.
26. Cho SG, Sihm CR, Yoo SJ, Cho KK, Lee HG, Choi YJ, Kim SH. Analysis of gene expression induced by microtubule-disrupting agents in HeLa cells using microarray. *Cancer Lett* 2006;241:110-7.
27. Cooper S, Iyer G, Tarquini M, Bissett P. Nocodazole does not synchronize cells: implications for cell-cycle control and whole-culture synchronization. *Cell Tissue Res* 2006;324:237-42.
28. Cooper S. Mammalian cells are not synchronized in G1-phase by starvation or inhibition: considerations of the fundamental concept of G1-phase synchronization. *Cell Prolif* 1998;31:9-16.
29. Cooper S. Reanalysis of the protocol for in vitro synchronization of mammalian astrocytic cultures by serum deprivation. *Brain Res Brain Res Protoc* 2005;15:115-8.
30. Samaké S, Smith LC. Synchronization of cell division in eight-cell bovine embryos produced in vitro: effects of nocodazole. *Mol Reprod Dev* 1996;44:486-92.
31. Beswick RW, Ambrose HE, Wagner SD. Nocodazole, a microtubule de-polymerising agent, induces apoptosis of chronic lymphocytic leukaemia cells associated with changes in Bcl-2 phosphorylation and expression. *Leuk Res* 2006;30:427-36.
32. Ikegami R, Zhang J, Rivera-Bennetts AK, Yager TD. Activation of the metaphase checkpoint and an apoptosis programme in the early zebrafish embryo, by treatment with the spindle-destabilising agent nocodazole. *Zygote* 1997;5:329-50.
33. Kook S, Shim SR, Kim JI, Ahnn JH, Jung YK, Paik SG, et al. Degradation of focal adhesion proteins during nocodazole-induced apoptosis in rat-1 cells. *Cell Biochem Funct* 2000;18:1-7.
34. De Brabander M, De May J, Joniau M, Geuens G. Ultrastructural immunocytochemical distribution of tubulin in cultured cells treated with microtubule inhibitors. *Cell Biol Int Rep* 1977;1:177-83.