



TÜRK ÜROLOJİ DERGİSİ
Cilt: 13, Sayı: 1, 7-13, 1987

TESTOSTERON'UN L-STRAIN HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE S FAZINA ETKİSİ

THE EFFECT OF TESTOSTERON ON S-PHASE OF L-STRAIN CELL CULTURE

ANIL, Y.D.^(*), AYTEKİN, Y.^(*), ERBENĞİ, T.^(*), ÖZKAN, T.^(**)
BİLİR, A.^(*), AYKAÇ, İ.^(***), ÖNER, A.^(****)

GİRİŞ

Kuvvetli bir metabolik aktiviteye sahip olan testosteron'un genetik düzenleme-deki rolü özellikle hedef organlarında iyi araştırılmıştır^(1,2,20,30,35,36). Testosteron etkisi DNA polimeraz aktivitesindeki artış ile yakından ilgilidir^(34,35). Bir görüşe göre tes-tosteron karbosteroid polimeri halinde DNA de özel bir lokusa bağlanır^(11,30). He-def organlarında süratle toplanan testosteron^(13,14), özellikle nukleus civarında lokalize olur^(17,32). Hedef organlarının dışındaki organlarda testosteron tutulması kuvvetli değildir^(22,27,35); ayrıca bu hormonun metabolitlerinin hücre tarafından tu-tuluşu dokunun neoplastik veya normal oluşuna göre değişmektedir^(27,34).

Testosteron'un etkisi hücrelerin In Vivo veya In Vitro şartlarda bu hormona ma-ruz bırakıldıklarında da farklıdır^(24,29). Testosteron solid Ehrlich tümörlerinde DNA, RNA ve protein sentezinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğu halde⁽¹⁸⁾ bu tümörün In Vitro çoğalmasını önler⁽¹⁹⁾.

Hücre kültürlerinin kısa süre testosteronla inkubasyonu, hücrelerde morfolojik transformasyona neden olmaz⁽¹²⁾.

Testosteron, devamlı hücre kültürlerinden Hela hücrelerinde çok düşük konsant-rasyonlarda hücre çoğalmasını engeller⁽²⁵⁾, hedef organların doku veya hücre kültür-lerinde^(1,2), deri⁽¹⁰⁾, kas⁽²⁶⁾ ve testis somatik hücre kültürlerinde⁽²¹⁾ proliferasyon için gereklidir.

(*) İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ve Psikiyatri Anabilim Dalı

(**) Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı

(***) Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı

Bu çalışmada, steroidlere karşı duyarlı⁽²⁹⁾ ve devamlı hücre kültürleri L-Strain hücrelerinde, testosteronun hücre devrinin S fazına etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Kontrol ve deneylerde petri kutularında lameller üzerinde %5 CO₂ ve %95 hava karışımında, %10 dana serumu (Flow, İngiltere) 100 µg/ml streptomisin, 100 Iµ/ml penisilin ihtiva eden Medium 199 (Gibco, İngiltere) içinde 37° de üreyen L-Strain hücreleri kullanılmıştır. Hücreler lameller üzerine 3 × 10⁵ hücre/cm² olacak şekilde ekilmiş, ve ekimden 24 saat sonra kullanılmıştır. Deneyler aşağıda belirttiği şekilde yapılmıştır.

a) Yukarıda açıklanan ve başka bir madde ilave edilmemiş ortamda üreyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır.

b) Deneylerde petri kutuları dört gruba bölünmüş ve bunlara sırası ile 2 µl etanolde çözülmüş 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg Testosteron ve sadece etanol 2 µl/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Hücreler bu ortamda 1/2, 12 ve 24 saat inkube edilmişlerdir. Her inkubasyon süresinin sonunda ortamlar değiştirilerek hücreler, 20 dakika 0,5 µCi/ml ³H-Thymidine (TRA-120 Radiochemical Center, İngiltere) ihtiva eden yukarıda açıklanan ortamda inkube edildiler. 20 dakika sonra hücreler Hank's BSS ile yıkanarak Carnoy sıvısı ile tespit edildiler.

c) Hücreler (b) de verilen konsantrasyonlardaki testosteron, etanol ve kontrol ortamlarında aynı şartlarda, 0.5 µCi/ml ³H-Thymidine ile birlikte ve 24 ve 48 saat bırakıldıktan sonra tespit edildiler.

Tespit işleminden sonra lameller jelatinli lamlara yapıştırıldı ve Kodak AR.10 filmi ile otoradyogramlar hazırlandı. Otoradyogramlar 4°C de 3 gün bekletildikten sonra developpe ve tespit edilerek, Giemsa yöntemi ile boyandılar.

Üç defa tekrarlanan deneylerin sonunda lameller üzerinde her deney için rastgele seçilmiş 60 alanda ³H-Thymidine ile damgalanmış ve damgalanmamış hücre oranı tespit edilerek Student'in t testi yöntemi ile p < 0.05 e göre değerlendirildi.

BULGULAR

Deneylerimizde kullanılan testosteron, etanolde çözülmüştür. Testosteron'un çözüldüğü 2 microgram/ml konsantrasyonundaki etanol L-Strain hücrelerinde S fazına ³H-Thymidine ile damgalanan hücre sayısı üzerinde kontrole göre anlamlı bir etki göstermemiştir (Tablo 1 ve 2).

Testosteron, 0.1 microgram/ml konsantrasyonda kullanılarak 1/2,12,24 saat sonra hücrelerin ³H-Thymidine ile muamele edildiği deneylerde (Tablo 1) ve hücrelerin 24 ile 48 saat testosteronla birlikte ³H-Thymidine de bırakıldığı deneylerde (Tablo 2) S fazı üzerinde, kontrole göre, anlamlı bir etkiye sahip değildir. Buna karşılık testosteron konsantrasyonunun 1 microgram/ml olarak alındığı ve bu konsantrasyonda 1/2 saat bırakıldıktan sonra ³H-Thymidine ile muamele edilen hücrelerde DNA

Tablo — 1

Testosteron'da bırakıldıktan sonra 20 dakika ³H-TdR ile muamele görmüş hücrelerdeki damgalanma yüzdesi

	Kontrol	Etanol 2 µl/ml	Testosteron 0,1 µg/ml	Testosteron 1 µg/ml	Testosteron 10 µg/ml
	x			xx	xx
1/2 Saat	39.64 ± 16.96	40.06 ± 15.56	41.76 ± 16.34	32.8 ± 17.97	33.27 ± 14.71
					xx
12 Saat	38.66 ± 11.07	36.98 ± 16.8	39.05 ± 21.14	34.87 ± 22.3	27.77 ± 14.02
					xx
24 Saat	36.43 ± 12.23	35.24 ± 12.85	36.34 ± 14.02	32.8 ± 14.94	24.9.13.55

n = 60

x = SD

P < 0.05, xx = anlamlı fark

Tablo — 2

Testosteron ve ³H-TdR de 24 ve 48 saat bırakılmış hücrelerde damgalanma yüzdesi

	Kontrol	Etanol 2 µl/ml	Testosteron 0,1 µg/ml	Testosteron 1 µg/ml	Testosteron 10 µg/ml
	x				xx
24 Saat	93.98 ± 13.34	93.20 ± 12.39	92.89 ± 13.32	89.17 ± 14.4	30.10 ± 17.19
					xx
48 Saat	95.79 ± 10.76	96 ± 15.41	95.57 ± 13.47	96.94 ± 10.53	45.30 ± 18.97

n = 60

x = SD

P < 0.05, xx = anlamlı fark

sentezine giren hücre sayısında anlamlı azalma görülmektedir (Tablo 1). Testosteron'un 1 microgram/ml konsantrasyonda 1/2 saat içinde S fazına giren hücrelerde etkisi 12 ve 24 saat aynı ortamda bırakılan hücrelerde (Tablo 1) ve buna paralel olarak 24 ve 48 saat ³H-Thymidine ile birlikte testosteronda bırakılan hücrelerde görülmemektedir (Tablo 2). Testosteron'un 10 microgram/ml olarak kullanıldığı deneylerde ise, 1/2, 12,24 saat sonra S fazındaki hücre sayısında belirli bir azalma göze çarpmaktadır (Tablo 1).

Aynı şekilde 10 microgram/ml konsantrasyonda testosteron, ³H-Thymidine ile birlikte hücrelerin ortamına konulduğunda, 24 ve 48 saat sonra S fazında anlamlı bir azalma görülmüştür (Tablo 2).

TARTIŞMA

Deneylerimizde kullanılan konsantrasyondaki etanol (Tablo 1,2) daha önce de gösterildiği gibi⁽²⁸⁾ hücreler için toksik değildir.

Bulgulara işaret edildiği gibi testosteron 0.1 microgram/ml konsantrasyonda L-Strain hücrelerinde S fazında etken görülmemiştir. 1 microgram/ml konsantrasyonda ise ancak 30 dakikalık inkubasyon süresi sonunda ³H-Thymidine ile damgalanan hücre sayısında azalmaya sebep olmaktadır (Tablo 1). Bu azalma sonradan kaybolarak 12 ve 24 saatlik inkubasyonlarda görülmemektedir (Tablo 1). Buna karşılık 10 microgram/ml konsantrasyonda testosteron S fazına giren hücre sayısını 30 dakika ile 24 saat testosteronun ³H-Thymidine ile birlikte verildiği deneylerde 24 ve 48 saat sonra da görülmüştür (Tablo 2).

Hela hücrelerinde testosteronun, hücre çoğalmasını önlediği bildirilmiştir⁽⁷⁾. Yine Hela hücrelerinde 5×10^{-5} - 10^{-7} konsantrasyondaki testosteron ile mitoz sıklığı azalmaktadır⁽²⁵⁾. Diğer taraftan prostat hücre kültürlerinde ise 1 microgram/ml konsantrasyonunda testosteron, hücre çoğalması için gereklidir^(1,2). Tavşan kulak derisi kültürlerinde de histolojik yapının korunabilmesi için testosteroon ihtiyacı vardır^(5,10). Levator ani kasının İn Vitro incelenmesinde görülmüştür ki testosteron 1 microgram/ml olarak kullanılırsa 24 saat sonra protein sentezi artmakta, daha yüksek konsantrasyonlarda ise engellenmektedir⁽³⁾. L-Strain hücrelerinde aynı miktarda testosteron, 24 saat sonra S fazına giren hücre sayısını etkilememektedir. testosteronun artan doza bağlı olarak engelleyici etkisi olduğu organ kültürlerinde⁽⁶⁾, cervix⁽³³⁾, adipos doku⁽⁹⁾ ve fare embriyosu doku kültürlerinde⁽²⁸⁾ gösterilmiştir. Benzer şekilde, testosteron'un, adrenal hücre kültürlerinde RNA ve protein sentezini engellediği de bildirilmiştir⁽⁴⁾.

Deneylerimizde kullanılan, asenkron çoğalan L-Strain hücrelerinde yenilenme süresi, bir mitozdan yeni bir mitoz geçiş süresi, 20 saat kadardır; DNA'nın artışı, S fazı, yenileme süresinin 8-16 ncı saatleri arasında olur⁽¹⁶⁾. Hormon etkisini sadece mitoz üzerinde değil de, hücre devrinin bütün fazlarında düşündüğümüzde^(8,31), bulgularımıza göre testosteronun G₁ fazına birinci derecede etken olduğunu dikkate almamız gerekecektir. Buna göre testosteron, hiç olmazsa, 1 microgram/ml

konsantrasyonda G₁ fazından S fazına geçen hücre sayısını etkilemektedir. Testosteronun bu etkisi daha ileri saatlerde görülmüyorsa, engelleyici etkinin genetik materyaldeki tamir (recovery) mekanizmasının çalışmasına zaman bırakmamasından ileri gelmektedir. Zira testosteronun DNA ya bağlanması⁽²⁰⁾ onun tek ipliğine olmaktadır⁽¹⁵⁾.

L-Strain hücrelerinde S fazı mitozu takiben 8-16 ncı saatlerde olduğuna göre, ortama testosteron ilavesinden 12 saat sonra, testosteron etkisi kaybolduğundan, testosteron etkisiyle G₁ fazından S fazına geçişte meydana gelen duraklama, henüz G₁ fazına geçmemiş hücrelerde görülmekte ve 12 nci saate 1 microgram/ml konsantrasyonunda testosteron S fazına geçen hücre sayısını etkilememektedir. Testosteron 10 microgram/ml olarak kullanıldığı zaman bu durum görülmemekte testosteronun engelleyici etkisi diğer fazlara da yansiyarak ³H-Thymidine ile damgalı hücre sayısı azalmaktadır.

Çalışmamızda testosteron ile L-Strain hücrelerinde elde edilen sonuçlar, hücre proliferasyonu açısından, daha önce yapılan çalışmalara kısmen uymakta ve kısmen uymamaktadır. Bu durum kullanılan hücre tiplerinin farklı olmasından ileri gelmektedir⁽¹⁴⁾. Hücre ve dokulardaki bu farklılık, çeşitli örneklerde belirtildiği gibi^(23,30) hücrelerin ihtiva ettiği reseptör proteinlerin dokudan dokuya değişerek ve muhtemelen organizmanın yaşına göre de farklı şekilde hücresel işlevlere katılmasıyla ilgilidir.

ÖZET

Testosteronun devamlı ve primer hücre kültürlerindeki etkisi konusunda değişik bulgular vardır. Bu çalışmada, devamlı hücre kültürlerinden L-Strain hücrelerinde testosteronun hücre devrinin S fazına etkisi araştırılmıştır. L-Strain hücreleri 0.1 microgram/ml, 1 microgram/ml ve 10 microgram/ml konsantrasyonda testostere maruz bırakılmış ve testosteronun etkisi ³H-Timidin otoradyografisi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak testosteronun konsantrasyona ve zamana bağlı olarak devamlı L-Strain hücre kültürlerinin S fazında engelleyici bir etkisi olduğu görülmüştür.

SUMMARY

There are different results on the effects of testosterone on established and primary cell cultures. In this study, the effect of testosterone on the S phase of cell cycle of L-Strain cells of established cell cultures has been searched. The L-Strain cells have been exposed to 0.1 microgram/ml, 1 microgram/ml and 10 microgram/ml concentrations of testosterone has been searched through ³H-Thymidine autoradiography. As a result, it has observed that, due to concentrations and time there is a hindering effect of testosterone on S phase of L-Strain cell cultures.

- 1 — **Baulieu, E.E.**, Lasnitzki, I. and Robel, P.: Metabolism of testosterone and action of metabolites on prostate glands grown in organ culture. *Nature* 219:155, 1968.
- 2 — **Baulieu, E.E.**, Lasnitzki, I. and Robel, P.: Testosterone, prostate gland and hormone action. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 32:575, 1968.
- 3 — **Buresova, M.**, Gutmann, E. and Klicpera, M.: Effect of testosterone on the incorporation of amino acids into the proteins of the levator ani muscle *In Vitro*. *Physiol. Bohemos.* 18:137, 1969.
- 4 — **Burrow, G.N.** and Marrow, L.B.: Further Studies on the steroid inhibition of adrenal protein synthesis. *Endocrin.* 83:18, 1968.
- 5 — **Coffey, D.S.**, Shimazaki, J. and Williams-Ashman, H.G.: Polymerization of deoxyribonucleotides in relation to androgen induced prostatic growth *Arch Biochem. Biophys.* 124:184, 1968.
- 6 — **Endo, H.** and Murota, S.I.: Effect of steroid hormones on the chondroitin sulphate metabolism of chick embryo femur growing *In Vitro*. *In: Tissue Culture*. pp:31-33. Ed. Ramakrishnan, C.V. The Maharaja Sayajirao University of Baroda. 1965.
- 7 — **Endo, H.**, Suzuki, H. and Mohri, T.: Effects of steroid hormones on Hela Cells. *In: Tissue Culture*. pp:200-202. Ed: Ramakrishnan, C.V. The Maharaja Sayajirao University of Baroda. 1965.
- 8 — **Epifanova, O.I.**: Effect of hormone on the cell cycle. *In: The cell cycle and Cancer*. pp:145-190 Ed. Baserga, R. Marcel Decker Inc. 1971.
- 9 — **Esanu, C.**: Hormonal effects on deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis in human tissues *In Vitro*. *Rev. Roum. Endocrin* 7:151, 1970.
- 10 — **Gillette, R.W.**, Goulian, R.D. and Conway, H.: Comperative effects of steroids on skin maintained in organ culture. II. Estrodiol, progesterone, and testosterone. *J. Natl. Cancer Inst.* 39:947, 1967.
- 11 — **Gottfried, H.**: The prostatic cell DNA-Steroid association: A Hypothesis of nuclear events and cytoplasmic consequences. *J. Theor. Biol.* 37:447, 1972.
- 12 — **Hsie, A.W.** and Puck T.T.: Morphological transformation of chine hamster cells by dibutryl adenosine cyclic 3:m-monophosphate and testosterone *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 68:358, 1971.
- 13 — **Johnsson, C.E.**: *In Vitro* uptake of tritiated testosterone and estradiol by lateral lobe of the hypertrophied human prostate and the accessory ex glands of the rat-A pilot study. *Acta Endocrin.* 61:25, 1969.
- 14 — **Kaufman, M.**, Pinsky, L., Straisfeld, C., Shanfield, B. and Zilahi, B.: Quantitative differences in testosterone metabolism as indication of cellular heterogeneity in fibroblast monolayers derived from human preputial skin *Exp. cell Res.* 96:31, 1975.
- 15 — **Kidson, C.**, Thomas, A. and Cohen, P.: Interactions of hormonal steroids with nucleuc acids. *Biochemistry* 9:1571, 1970.
- 16 — **Killander, D.** and Zetterberg, A.: Quantitative cytochemical studies on interphase growth. *Exp. Cell Res.* 38:272, 1965.
- 17 — **King, R.J.B.** and Gordon, J.: An attempt to isolate an oestradiol receptor from nuclei by adsorption on oestradiol-17-B *J. Endocrin.* 40:195, 1968.
- 18 — **Kodama, M.** and Kodama, T.: Effect of steroid hormones on the *In Vivo* oncorporation of glycine-2-14C into solid Ehrlich Tumor, Kidney and Liver. *Cancer Rs.*30:228, 1970.
- 19 — **Kummer, D.**: Cytostatica-und Röntgen-Strahleneffekte im Nucleinsaurestoff Wechsel von soliden, malignen Tumoren *In Vitro*. *Z. Krebsforsch.* 74:76, 1970.
- 20 — **Litwack, G.** and Singer, S.: Subcellular actions of glucocorticoids. *In: Biochemical actions of hormones*. pp:113-163 Ed. Litwack, G. Acad. Press. 1972.
- 21 — **Mather, J.P.** and Phillips, D.M.: Primary culture of testicular somotic cells. *In: Methods for Serum-free culture of cells of the endocrine system*. pp:29-45. Alan R. Liss Inc. 1984.
- 22 — **Mosebach, K.O.**: Verteilung, Bindungen und Metabolite von Testosterone im Seugekierorganismus. *In: Das Testosteron Diestruma*. pp:17-31. Ed. Klein, E. Springer-Verlag. 1968.
- 23 — **Mueller, G.C.**: Estrogen action. A Study of the influence of steroid hormones on genetic expression. *In: The Biochemistry of steroid hormone action*. Biochemical society Symposium. No.32. Acad Press. 1971.
- 24 — **Perlman, D.**, Giufre N.A., Brindle, S.A. and Pan, S.C.: Cytotoxicity of steroid to mammalian cells in tissue culture *Exp. Biol. Med.* 111:623, 1962.
- 25 — **Peters, K.** and Bauer, R.: Untersuchungen an Hela-Zellen nech getrennter und kombinierter Anwendung von stroiden und Röntgenstrahlen. *Strahlen Therapie.* 139:43, 1970.
- 26 — **Powers, L.M.** and Florini, J.R.: A direct effect of testosterone on muscle cells in tissue culture. *Endocrin.* 97:1043, 1975.

- 27 — **Quincey, R.V.** and Gray, C.H.: Uptake of (1,2-³H) 17 α methyl testosterone by breast carcinoma and other tissues of human subjects. *Brit J.Can.* 20:271, 1966.
- 28 — **Sidky, Y.A.:** Effect of steroids on thymus lymphoid development in Vitro. *Anat. Record.* 161:187, 1968.
- 29 — **Thompson, E.B.,** Lippman, M.E., and Lyons, L.B.: Control of enzyme induction and Growth in tumor cells and cell hybrids. In: Differentiation and control of malignancy of tumor cells. Princess Takamatsu Symposia. 4. University Park Press. 1973.
- 30 — **Tomkins, G.M.** and Gelehrter.: The Present status of genetic regulation by hormones. In: Biochemical actions of hormones. pp:1-20 Ed:Litwack, G. Acad. Press. 1972.
- 31 — **Turkington, R.W.:** Multiple hormonal Interactions. The mammary gland. In: Biochemical actions of hormones pp:55-80. Ed:Litwack, G. Acad, Press. 1972.
- 32 — **Tveter, K.J.:** An autoradiographic study on the localization of androgen in the prostate gland and the seminal vesicle of the male rat. *Acta. Endocrin.* 63:207, 1970.
- 33 — **Willbanks, G.D.,** Leibus, E. and Tsurumoto, D.: Tissue culture of the human uterine cervix. *Methods in cell Biology* 21:29, 1980.
- 34 — **Williams-Ashman, H.G.** and Shimazaki, J.: Some metabolic and morphogenetic effects of androgens on normal and meoplastic prostate. In:Endogeneous factors influencing host-tumor baiance. pp:31-41. Ed:Wissler, R.W., Dao, T.L., Wood, J.R., S. The University of Chicago Press. 1967.
- 35 — **Williams-Ashman, H.G.** and Reddi, A.H.: Androgenic regulation of tissue growth and function. In:Biochemical actions of hormones. pp:257-294. Ed:Litwack, G. Acad. Press. 1972.
- 36 — **Wilson, J.D.:** Localization of the biochemical side of action of testosterone on protein synthesis in the seminal vesicle of the rat *j.clin. Invest.* 41:153, 1962.