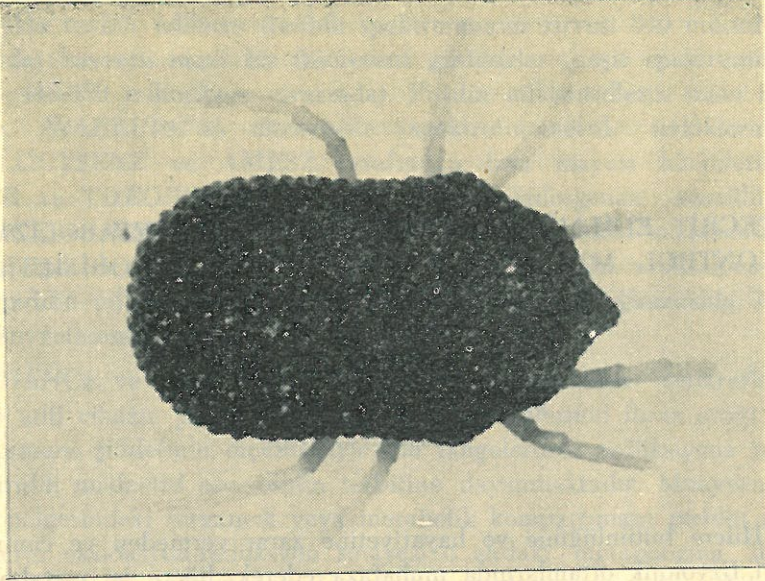
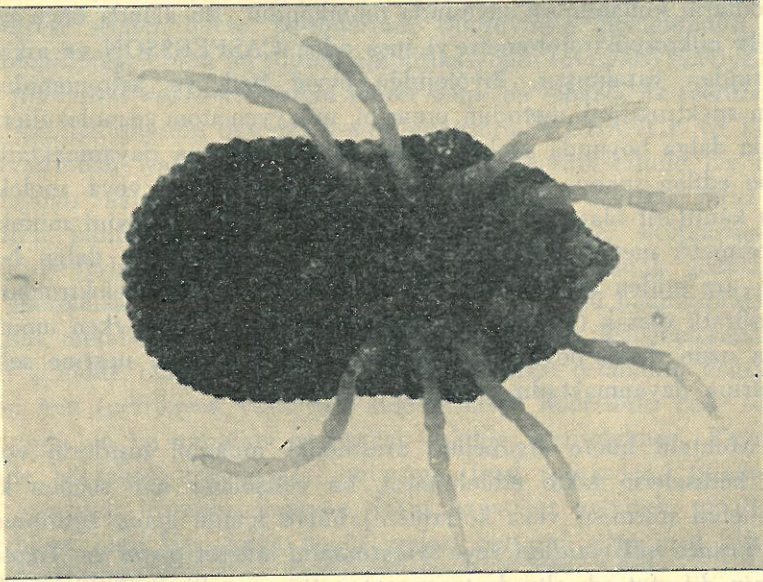


A



B



Şekil I. *Ornithodoros coniceps* Canestrini, 1890. A) Sırttan görünüşü; B) Karından görünüşü. Orig. mikrofotograf.

TECRİT EDİLMİŞ CANLI HÜCRELERDE METABOLİZMA KONTROL MEKANİZMALARININ MİKROFLÜORİMETRİK METODLA TETKİKİ

Eli KOHEN

Karolinska Patologiska Institution
Stockholm — İsveç

Hücre bütünlüğüne ve hayatiyetine zarar vermeden ve canlı hücreleri fizyolojik ortamlarında muhafaza ederek, hücre içi metabolik ve bioşimik hâdiselerin tetkiki ancak spektroskopi ve flüorimetri gibi optik metodların kullanılması sayesinde mümkündür. Bu alanda öncü çalışmalar ilk mikrospektrofotometre'yi inşa eden CASPERSSON ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Biyolojiden evvel fizik ve astronomide kullanılan spektroskopik metodun prensibi, muayyen atom ve moleküllerin muayyen dalga boyunda şuaları imtisas etme hassasına dayanmaktadır. Absorbe edilen şuanın dalga boyuna göre, özel atom veya moleküllerin hem kantitatif olarak teşhisi, hem de kalitatif olarak tâyini mümkündür. Flüorimetri metodunun esas prensibi ise, muayyen bir dalga boyunda ışığa arz edilen moleküllerde, yörüngesi dışına itilen elektronların gayet süratli olarak (10-8 saniye) yörüngelerine avdet ederken umumiyetle daha uzun dalga boyunda (daha az enerjili) bir ışık neşrine sebep olmalarına dayanmaktadır.

Muhtelif hücre organelleri arasındaki mukabil tesirlerin ve bioşimik hâdiselerin takib edilebilmesi, bu çalışmalar için seçilen kimyevî maddenin (ferment veya koferment) hücre içinde geniş eğilimine tabidir: *Piridin nükleotidleri* veya *Nikotinamid adenin fosfat* ve *Nikotinamid adenin difosfat* adı altında tanınan teneffüs ve glikoliz kofermentleri, sitoplazma, nüve ve mitokondri içindeki sair *dehidrogenaz* fermentleriyle müşterek faaliyette bulduklarından, hücre içi organelleri arasındaki metabolik reaksiyonların takibi için miyar olarak gayet elverişlidirler. Piridin nükleotidler 330 ilâ 400 milimikron arası dalga boylarında ultravi-

yole ışıkla tenbih edilince (tenbih spektrumunun zirvesi 340 milimikron civarında) kuvvetli mavi bir flüoresans gösterirler (neşir spektrumunun zirvesi 440-450 milimikron civarında). Piridin nükleotidlerin mavi flüoresansı, WARBURG'un ultraviyole spektrofotometrik tetkiklerinden sonra, DUYSENZ ve AMESZ tarafından bira mayası hücrelerinde, BOYER ve THEORELL tarafından alkol dehidrogenaz teamülünde, CHANCE ve BALTSCHOFFSKY tarafından mitokondri süspansyonlarında müşahede edilmiştir. Bu flüoresans hassası yalnız redüksiyon halinde piridin nükleotidlere mahsus olup, proteinlere bağlanmakla 10-15 misli kuvvetlenmektedir.

CHANCE ve LEGALLAIS tarafından inşa edilen «mikroflüorimetre» adlı cihazın prensibi, mahdut hücre bölgelerinin ibraz ettiği mavi flüoresans şiddetinin ölçülmesiyle, bu bölgelerdeki redüksiyona uğramış piridin nükleotid seviyesinin tesbitine dayanmaktadır. Muayyen bir hücre bölgesindeki (organcık veya metabolik kompartıman) piridin nükleotidlerin oksidasyon-redüksiyon seviyesi o andaki metabolizma durumuna göre değişeceğinden, o bölgenin mavi flüoresansı da redüksiyon durumuna orantılı olarak değişecektir. CHANCE-LEGALLAIS mikroflüorimetresi seçilen hücre kesimlerinde flüoresansın ölçülebilmesi için bir *Fotomultiplayer tüpü* ile (dinod amplifikasyonlu fotoselül) takviye edilen bir *fluoresans mikroskopundan* ibaret olup, bu cihazla ilk tecrübeler, çekirge spermatidlerinin dev mitokondrileri üzerinde CHANCE ve THORELL tarafından yapılmıştır. Mikroflüorimetri tecrübelerinde bir hücrenin faydalı olarak kullanılabilmesi için bazı özel hassalar ibraz etmesi tercih edilir: hücre içi kompartımanlarının (nüve, sitoplazma ve mitokondri) birbirlerini örtmeyecek surette müstakil olarak gözükmesi (böcek spermatidlerinde ve mekik şeklinde doku kültürü hücrelerinde olduğu gibi), metabolik hâdiselerle ilgili mavi flüoresans değişmelerinin ölçülebilir şiddette olması ve mümkünse hücre etrafı ortamının değiştirilebilmesi için (perfüzyon veya sair ameliyelerle), hücrelerin cam satırlar üzerinde ve bu satırlara yapışacak şekilde üretilebilmesi. Tecrübe esnasında hücreler ultraviyole şualarının letal tesirinden, flüoresans tenbihi için pek lüzumlu olmayan, fakat hayatiyet üzerinde muzir tesirleri yüksek olan kısa dalga boylu şuaları bertaraf eden özel filtreler vasıtasıyla korunur.

Cam üzerinde üretilen hücrelerin etrafındaki ortamı değiştirmek için bir perfüzyon kamarası kullanılabileceği gibi, halka kondansatörlü Leitz-Ultropak objektif ve invert mikroskopla çalışıldığı taktirde sair ameliyeler için mikroskop sehпасının üst kısmı serbest kalacağından,

zeminini teşkil eden cam laml üzerinde hücrelerin yetiştirildiği bir küvette (mikroküvet) bu tecrübelerde kullanılabilir. Hücre teneffüsünde ve glikoz metabolizmasında gayet önemli rol oynayan metabolizma ara maddelerinin çoğu, anyon grubuna dahil olup, kuvvetli negatif yükleri dolayısıyla hücre cidarından geçemezler; bu maddelerin tesirlerini tetkik için, doğrudan doğruya mikroenjeksiyonla sitoplazma içine şırınga edilmesi gerekir. Mikroenjeksiyondan daha elverişli olup, mikroflüorimetri tecrübelerinde tercih edilen bir teknik ilk olarak nörofizyologlar tarafından tatbik edilen *Mikroelektroforez*'dir(11). Mikroelektroforez tatbikatı için, verilmesi arzu edilen metabolizma ara maddesinin (meselâ glikoz-6-fosfat) gayet kesif bir solüsyonunu havi mikroelektrodlar hazırlanır ve elektrodun mikromanipülâtör vasıtasıyla hücre içine duhulünden sonra, umumiyetle negatif yüklü olan metabolizma ara maddesi müsait istikamette ve kuvvette bir voltajla hücre içine itilir(12). Umumiyetle kullanılan mikroelektroforetik ceryanların şiddeti hücre cesamet ve toleransına göre 10^{-7} ilâ 10^{-8} amper arasındadır. Mikroelektroforez tekniği evvelâ tahammülü arttırmak için röntgen şualarıyla dev haline getirilmiş doku kültürü hücreleri üzerinde tatbik edildiği halde (12, 13, 14) daha sonra aynı metod, gayet ince mikroelektrodlar kullanılmasıyla mutad cesamette hücrelere tatbik olunabilecek surette genişletilmiştir (15, 16, 17). Mikroelektroforez esnasında görülen flüoresans değişmelerinin cidden metabolik hâdiselere bağlı olduğunu kontrol için tesirsiz anyonlarla (nitrat gibi) muhtelif ceryan dozları kullanarak denemeler yapılmış, hücrenin tahammül edebileceği ceryan şiddetlerinde hiçbir tesir görülmemiştir; ancak ceryan şiddeti hücre cesametiyle muvazenesiz şekilde tolerans seviyesinin üstüne arttırıldığı takdirde flüoresansta hafif veya orta şiddette bir azalma kaydedildi(14). CHANCE - LEGALLAIS mikroflüorimetresinin ilk modelinde hücre üzerindeki ameliyeler tungsten lambasıyla ve flüoresans ölçüleri civa lambasıyla yapıldığından, lamba değiştirme ve sair ameliyeler dolayısıyla, metabolizma ara maddelerinin mikroelektroforezle verilmesinden ilk flüoresans ölçüsüne kadar 15 ilâ 20 saniyelik bir gecikme vardı. Hücre manipülasyonlarının mikroflüorimetrik ölçülerle hem zaman olarak yapılabilmesi için mikroflüorimetre bir *huzme bölücüsü* (*Beam splitter*) ile takviye edildi (18, 19). Kırmızı ve mavi dalga boylarında ışınları ayıran bu bölücü sayesinde, hücre üzerindeki ameliyeler bölücü tarafından yansıtılan kırmızı ışıkla okülerlerden takib edilirken, hücre içi yapılarındaki piridin nükleotidler tarafından neşrolunan mavi flüoresans ise bölücü tarafından yansıtılmadan doğrudan doğruya fotoselüle doğru geçirilmektedir. Hücre sitoplazması

içine elektroforetik olarak metabolizma ara maddesi verildikten sonra bu maddeyle teamüle katılan piridin nükleotidlerin bulunduğu kompartıman veya kompartımanlarda (nüve, sitoplazma, mitokondri gibi) bir flüoresans artışı görülür. Bu artışın husule getirdiği flüoresans eğrisinde dört safha tefrik etmek mümkündür: bekleme safhası (latent safha); süratli yükselme safhası; zirve flüoresans seviyesinde sabit safha (plato); iniş safhası ve umumiyetle mikroelektroforezden önceki sabit safhaya dönüş. Flüoresans yükselme ve inişinin yarılanma müddeti flüoresans temülüne katılan hücre içi enzimlerinin faaliyetiyle yakından ilgilidir.

Mikroflüorimetrik tecrübeler hücre içi piridin nükleotidlerinin iki büyük kompartımana ayrıldığını göstermiştir(8); a - hücre teneffüsü oksidasyonlarıyla ilgili *Mitokondri kompartmanı* (oksijen, anoksi ve *Amital* ile *Rotenon* gibi hücre teneffüsü inhibitörlerine hassas) ve b - glükoz metabolizmasıyla ilgili *Extramitokondriyal kompartıman* (nüve ve sitoplazma). Doku kültürü halinde üretilen Ehrlich ascites kanser hücrelerine (EL2 hücreleri) perfüzyonla *Amital* (piridin nükleotid-stiokrom b redüktaz inhibitörü) verildiği taktirde yalnız mitokondrilere münhasır bir flüoresans artışı görüldüğü halde, glükoz perfüzyonu yapılmca bütün sitoplazma ve nüveye şamil kuvvetli bir mavi flüoresans artışı görülür. Mikroelektroforez tecrübelerinde(14) EL2 hücrelerinin (ve sair doku kültürü hücrelerinin) mitokondrileri özel olarak teneffüs oksidasyonlarının ara metabolizma maddelerine (glütamat, α -ketoglutarat, malat, süksinat, v.s.) cevap verdikleri halde, sitoplazma ve nüve ancak glükoz metabolizmasının ara maddelerine tercihen flüoresans artışıyla cevap verir (früktoz-1, 6-fosfat, glükoz-6-fosfat, gliseraldeidro-3-fosfat, 6-fosfoglükonat, üridin-difosfoglükoz, v.s.). Mitokondri ve ektramitokondriyal kompartımanlardaki piridin nükleotidlerinin (herbiri için özel metabolizma ara maddelerine) flüoresans cevapları, bu kompartımanlardaki adenin nükleotidlerin seviyeleri tarafından (adenosin mono, di ve trifosfat) kontrol edilir(14, 20). Nüve ve sitoplazma piridin nükleotidleri umumiyetle birbirlerine muvazi olarak faaliyet gösterdikleri halde tefrik edici bazı özellikler de ibraz ederler: EL2 hücrelerinde, nüve piridin nükleotidleri, *Amital* veya süksinat muvacehesinde, sitoplazmaya nazaran daha aşırı bir redüksiyon halindedirler(21) ve bu halleri herhalde nüve nükleotidlerinin daha güç reokside olmalarına bağlıdır. Röntgen ışınlarıyla hasıl edilen dev EL2 hücrelerinde (EL2G hücreleri) nüve ve sitoplazmanın, früktoz-6-difosfata cevapları oksijen, *Rotenon* ve *Dikumarol* (mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon inhibitörü) muvacehesinde birbirine muvazi olmakla beraber, früktoz-I, 6-fosfat başka metabolizma ara madde-

leriyle takviye edildiği taktirde (glükoz-I-fosfat, 6-fosfoglükonat, üridin-difosfoglükoz) veya yerine glükoz-6-fosfat'ı havi mikroelektroforetik karışımlar kullanıldığı taktirde, nüve ile sitoplazma arasında farklar belirmektedir(22): aerobik hücrelerde sitoplazmanın flüoresans teamülü umumiyetle daha alçaktır, fakat Rotenonla bu hücrelerin mitokondrileri bloke edilince, sitoplazmadaki flüoresans teamülü şiddetlenmekte, nüvedeki ise pek az değişmektedir. Aynı hâdiselere, gene röntgen ışınlarıyla hasıl edilmiş «insan karaciğeri doku kültürü dev hücreleri, «Chang devleri»nde de rastlanır(22). Nüve ile sitoplazma arasında müşahede edilen farklar muhtelif yollardan izah edilmiştir: nüvenin oksidatif sisteminde radyasyonların hasıl ettiği tahribat(23); nüvede oksidatif fosforilasyon yapabilecek bir sistemin bulunmaması(24) veya dev hücrelerinde nüvenin aşırı genişlemesiyle oksijenin nüve merkezine kadar erişmekte karşılaşabileceği müşkülâtlar(25). Nitekim sitoplazma ile nüve arasındaki farklı «Rotenon hassasiyetine» ancak dev hücrelerde rastlanmaktadır; Rotenon oksidatif metabolizmayı bloke ettiği için ancak oksidatif metabolizmanın daha müsait olarak ceryan ettiği sitoplazmada tesir gösterebilir.

Yukarıdaki sitoplazma-nüve misali mikroflüorimetrik metod sayesinde nüve ile sitoplazma arasında ince fark ve münasebetlerin tetkik edilebileceğini belirtiyor(26). Aynı metod mitokondri ile ekstramitokondriyal kompartımanlar arasındaki metabolizma farklarının ve karşılıklı münasebetlerin tesbiti için de kullanılabilir. Bu iki kompartıman müstakilen herbiri için karakteristik metabolizma ara maddelerine cevap verdikleri halde karşılıklı bağlantılar da göstermektedirler. Mikroelektroforez için kullanılacak terkibe, müştereken bir mitokondri sübstratunu (glütamat) ve bir ekstramitokondriyal sübstratı (glükoz-6-fosfat) eklendiği taktirde, EL2G hücrelerinde yalnız ikinci sübstratuma karşı flüoresans cevabı görülür. EL2G hücreleri evvelâ glükoz (ekstramitokondriyal) ile perfüzyona tabi tutulup, sonradan mikroelektroforezle glütamat veya izositrat (mitokondriyal) verilirse, mitokondriler artık kendi sübstratlarına cevap vermez. Ancak bazı durumlarda bir ekstramitokondriyal flüoresans artışı görülür. Açlığa maruz bırakılmış hücrelere mikroelektroforezle mitokondri substratları verildiği taktirde, artık müteakiben bu hücreler glikoza cevap vermezler. Bazı substratlar ise hem mitokondrilere, hem de sitoplazmaya mahsus olmak üzere karma tesir gösterirler: meselâ malat her iki kompartımanda da kullanılabilir. Zira malat dehidrogenazi hem sitoplazma, hem de mitokondrilerde mevcuttur.

EL2G hücrelerinde glikozu kontrol eden mekanizmaların araştırılması için aç bırakılmış ve glikozla beslenmiş hücrelerin metabolik cevap-

larını mukayeseli tetkik etme gayet elverişlidir(20). Zira glikoz temasındaki hücreler glikoz-inhibisyonu ibraz ederler ve müteakiben mikroelektroforezle verilen glikoliz substratum'larına ancak zayıf teamül gösterirler. Glikoz-inhibisyonunu bertaraf edebilecek faktörlerin tesir kabiliyetlerini tahlil için, bu faktörler teker teker veya grup halinde mikroelektroforez terkebine dahil edilmiştir. Dikkate değer bir hususiyet, glikoliz kontrolünde önemli oldukları ileri sürülen adenzin-difosfat, adenzin monofosfat, inorganik fosfat ve glikoz-6-fosfat gibi faktörlerin tek başına pek az veya ancak vasat derecede müessir olmalarıdır. Buna mukabil bu faktörlerin bazıları bir araya getirilip mikroelektroforez terkibi içine dahil edilir ve hep birden sitoplazmaya verilirse daha tesirli oldukları görülür; en müessir tertipler şunlar olmuştur: früktoz-1, 6-fosfat + adenzin difosfat+inorganik fosfat, aynısı+glikoz-fosfat, aynısı+glikoz-6-fosfat+adenzin trifosfat. Bu neticeler, glikoliz kontrolünde tek bir faktör ve tek bir enzimin mesul olmadıklarını, herhalde muhtelif faktörlerin muhtelif enzimler muvacehesinde tesirlerini itibare almanın icab ettiğini belirtiyor.

Mikroflüorimetrik metod canlı hücreler üzerinde farmakolojik ve fiziksel tesirlerin müşahedesi için de kullanılmıştır. Radyasyona maruz tutulan EL2 ve insan karaciğeri hücrelerinden hasıl olan devlerde oldukça(17) kuvvetli glikoliz ceryan etmesine rağmen, bu hücreler mitokondri inhibitörlerinin tesirlerine mukavimdir (Rotenon-rezistansı). Hekzaploid bira mayası hücreleri de devlere benzer bir metabolizma ibraz ederler. Buna mukabil radyasyona tabi tutulmamış insan karaciğeri ve Çin hamsteri kültürlerinde, oksijen muvacehesinde mikroelektroforezle verilen glikoliz substratumlarına karşı flüoresans teamülü yoktur. Bu hücrelerde ancak Rotenonla mitokondriler ve oksidatif teneffüs bloke edildikten sonra glikoliz belirir. EL2 kanser hücrelerinde ise oksijen muvacehesinde gayri muntazam glikoliz görülüp, Rotenonla bu glikoliz takviye edilebilir. Başka metotlar ile, elektron mikroskobu v.s. yapılan araştırmaların gösterdiği gibi (27, 28, 29) radyasyona tabi tutulan hücrelerin lipoprotein membranlarında tahribat vukua gelir: bu hâdise mitokondri ve nüve lipoprotein membranlarına şamil olabilir. Dev hücrelerinde mitokondriler radyasyonla zedelenmiş olacağından bu hücrelerde oksidatif teneffüs herhalde zaten başlangıçtan zayıftır ve artık Rotenonla bloke edilemez, buna mukabil teneffüs metabolizmasının kontrolundan kurtulan sitoplazma ve nüvede glikoliz aktiftir. EL2 kanser hücrelerinde mitokondriler daha hafifçe zedelenmiş olabileceğinden, bu hücrelerde hem aerobik glikoliz hem de Rotenon hassasiyeti görülür. Buna mukabil karaciğer

hücrelerinde ve Çin hamsteri fibroblastlarında oksijen muvacehesinde glikoliz yapılabilmesi için Rotenonla evvelâ mitokondrilerin bloke olmasına ihtiyaç vardır(17):

Hücre bölünmesine mani olan kanser tedavisinde kullanılan nitrogen mustard ve benzeri maddelerle de (meselâ 2, 3, 5-trietileniminobenzokinon-I, 4), bu maddeler radyasyonu taklit edici (radyomimetik) olduklarından dev hücreleri (EL2T) hasıl etmek mümkündür(30). EL2T hücreleri radyasyon devlerine benzemekle beraber, bu hücrelerde lipoprotein membran hasarı herhalde daha ileri bir safhadadır (aynı hâdisse daha yüksek radyasyon dozlarına maruz kalmış hücrelerde de görülür). EL2T hücrelerinde glikoliz flüoresans teamülü, ilâca tabi tutulmuş EL2 hücrelerinde görülenden 2 ilâ 8 defa daha zayıftır. Radyomimetik maddeler nüve ve endoplasmik retikulumdaki lipoprotein yapıları hasara uğratabildiğinden, hücre içindeki aktivasyon faktörlerinden membran kompartımantalizasyonu ile tecrit edilmiş oldukça inaktif kalan litik enzimlerin aktive olmasına yol açabilirler. Litik enzimler arasında piridin nükleotidleri hidrolize eden enzimler mevcuttur ve bunların aktive olmasıyla piridin nükleotidleri özel olarak glikoliz yapan bölgelerde (sitoplazma ve nüve azalacağından) glikoliz inhibisyona uğrar(31). EL2T hücrelerinde flüoresans teamülünün şiddeti zayıfladığı gibi, yarılanma müddeti de EL2 hücresine nazaran 4 defa artmış, yani glikoliz enzimlerinin kinetiği yavaşlamıştır.

Amital muvacehesinde 4 gün ilâ 2 hafta üretilen EL2 hücrelerinde de benzer bir değişme görülür, fakat glikoliz flüoresans teamülü daha yüksek bir seviyededir, ancak kinetiği yavaşlamıştır(32). Doku kültürü hücrelerini sair ilâç ve hormonlar muvacehesinde yetiştirerek bu maddelerin tesirlerini doğrudan doğruya hücre içi organcıklarının metabolizmalarına bakarak tetkik etme mümkün olmaktadır(32). EL2G hücrelerinde glikoliz flüoresans seviyesini şimdiye kadar yapılan müşahede-lerde en yüksek seviyeye çıkaran kültür metodu iki hafta için triidotiro- nin muvacehesinde üretme olmuştur. Aynı hücreleri bir gün için yüksek dozda insülin temasında bırakmakla da oldukça benzer neticeler elde edilmiştir.

Bu tecrübelerden görüldüğü gibi mikroflüorimetrik teknik sayesinde hücre içi organcık ve kompartımanlarının enerji metabolizmasındaki teamüllerini, karşılıklı münasebetlerini, ayrıca bu organcıkların metaboliz- ması üzerinde tesir icra edebilecek fiziksel ve farmakolojik âmillere muvacehesinde vukubulan değişiklikleri de müşahede etmek mümkün ol-

muştur. Sair bioşimik ve farmakolojik metodlar kullanıldığında, doku dilimleri, parçalanmış veya homogenize hücreler, doku ekstreleri veya enzim süspansiyonları ile çalışma zarureti hasıl olacağından, hücre içi organcıklarının, bütünlük ve hayatiyetini idame ettiren hücrelerde gösterebileceği gayet hassas fakat metabolizma kontrolu için o derecede müessir reaksiyonlara erişmek mümkün olamamıştır; bundan dolayı mikrofliüorimetri ve benzeri metodlara müracaat edilmiştir. Bu sayede hücre içi enzimlerinin mitoz ve diferansiasyon esnasında veya fiziksel-farmakolojik tesirler altında ibraz ettikleri faaliyet ve değişimleri tetkik etmek mümkün olmaktadır.