

Deneysel C6 Glioma Modelinde Teknik ve Migrasyon Yönünden Bir İnceleme

Çağatay KEMERLİ *, M. Murat TAŞKIN *, Yalçın GÜZELHAN **, Necati KAPLAN *

ÖZET

Santral sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubunu glial hücrelerden gelişen ve genel olarak glioma olarak adlandırılan tümörler oluşturur. Glial tümörlerin en sık görüleni glioblastoma multiformedir. İleri cerrahi ve radyoterapi tekniklerine rağmen 5 yıllık yaşam oranı % 5'ten azdır. 1970 yılında Ausman primer malign beyin tümörlerinin tedavisinde genetik, immünolojik ve potansiyel kemoterapötik yaklaşımların önemini vurgulamıştır. 20 yıldır deneysel glioma modeli kullanılarak bu yaklaşımlar denenmektedir. Bu çalışmada deneysel C6 glioma modeli oluşturulma tekniği ve bu tümörün migrasyon özelliği incelendi. Model için 16 sıçan kullanıldı. C6 sıçan glial tümör hücreleri sıçanların beyinlerinin sol frontal bölgesine implante edildi. Sıçanlar implante edilen hücre miktarına göre 4 gruba ayrıldı. Her grup 2'şer adet Wistar ve Sprague-Dawley sıçandan oluştu. Her gruba farklı sayıda C6 sıçan glial hücresi implante edildi. Tüm sıçanlarda histopatolojik tetkikle tümör oluşumu saptandı. Gelişen tümörün çapı implante edilen hücre sayısı ile doğru orantılı bulundu. Primer implantasyon bölgesinin haricinde beyin sapı ve temporobazal bölgede tabaka halinde tümör hücreleri görüldü. Bu bulgu migrasyonu göstermektedir.

Sonuç olarak, Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin Cerrahisi Kliniği Departmanı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirdiğimiz bu standartlara uygun C6 sıçan glioma modeli ile glioblastoma multiforme gibi prognozu halen yüz güldürmeyen süreçlerin tedavisi için yeni projelerin ülkemizde de denenmesine olanak tanıyacağına inanıyoruz.

Anahtar kelimeler: C6 glioma, sıçan, migrasyon, deneysel model

Düşünen Adam; 2003, 16(1): 57-64

SUMMARY

Gliomas are the largest group of CNS tumours derivina from the neuroglia. Glioblastoma multiforme is the commonest primary malignant brain tumour and has the poorest prognosis. Despite the advanced surgical and radiotherapy techniques, five year survival rate is less than % 5. Ausman, in 1970, emphasized the importance of genetic, immunologic and potential chemotherapeutic approaches in the treatment of primary malignant brain tumours, and exactly for 20 years these approaches have been tested on experimental glioma models. In this study, experimental C6 glioma model was examined for technique and migration criterions. 16 rats were used. C6 glioma cells were implanted into the left frontal region of the rat brains. The rats were seperated into 4 groups according to the amount of cells implanted. In each group there were 2 Wistar and 2 Sprague-Dawley rats. Tumour formation was directly proportional to the amount of cell implanted. Tumour cells were seen in forms of a layer around the brain stem and temporo-basal region far from the implantation area. These findings indicated the invasion and migration.

As a result, we believe that with the C6 rat glioma model that was invastigated in the research laboratory of our institution, proved to be a satisfactory animal model to study certain therapeutic aspects of malignant glial tumours.

Key words: C6 glioma, rat, migration, experimental model

* Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 1. Nöroşirürji Kliniği, ** İ. Ü. DETAE Sinir Bilim Dah

GİRİŞ ve AMAÇ

Santral sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubunu glial hücrelerden gelişen ve genel olarak glioma olarak adlandırılan tümörler oluşturur (hastane serilerinde % 45-55). Ortalama insidansı 4/100.000'dir (5). Son yıllarda gelişen modern tanı metodlarının katkısıyla santral sinir sistemi tümörlerinin tüm sistem tümörleri içindeki yeri daha belirginleşmiştir. Bu tümörlerin görülme sıklığında belirgin artış saptanmıştır. Santral sinir sistemi tümörlerinin, dolayısıyla gliomaların insidansındaki bu anlamlı artış, araştırmacıları bu tümörleri daha iyi kavrama ve tedavi edebilme yolunda yoğun çaba harcamaya teşvik etmiştir.

Glioblastomagliomaların en anaplastik şeklidir. Önceleri primitif embriyonel hücrelerden oluştuğu zannedilmişse de, bugün artık çok yüksek derecede anaplazi gösteren olgun glial hücrelerden, genellikle astrositlerden oluştuğu kabul edilmektedir (16,23). Bu çalışmada tartışılan deneysel sıçan glial tümör modelindeki hücrelerin histopatolojik karakteri insan glioblastoma hücreleriyle belirgin benzerlik göstermektedir. Gliomaların % 50'den fazlasını oluşturan glioblastoma her yaşta fakat en sık olarak 45-55 yaşları arasında görülür (12,17,18). Erkeklerde daha fazladır (3:1 oranında). Santral sinir sisteminin herhangi bir yerinde oluşabilir. En sık frontal lobta görülür. Bunu temporal bölge takip eder. Glioblastomada tümörün sınırları keskin değildir. Kesit yüzeyi grimsi-kahverengimsi tümör dokusunun yanısıra düzensiz sarı nekrotik alanlar ve kırmızı-kahverengi kanama odakları görülür. Glioblastoma, hücreden zengin ve yüksek derecede anaplastik bir tümördür. İnfiltratif büyüme, nekroz, kanama odakları ve damar cidarında görülen endotel proliferasyonu, invazyon ve primer odaktan uzak subaraknoid alanları migrasyon mikroskopik özelliklerindedir. Beyin cerrahlarının, onkologların, radyasyon terapistlerin, biyolog ve diğer araştırmacıların tüm çabalarına rağmen son 20 yılda glioblastoma multiforme gibi primer malign beyin tümörlerinin prognozunda önemli bir değişiklik olmamıştır. 5 yıllık yaşam oranı glioblastoma multiformede cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi tedavi kombinasyonuna rağmen % 5'ten azdır.

1970 yılında Ausman ve çalışma grubunun, malign beyin tümörlerinde cerrahi ve radyoterapi metodlarının daha da geliştirilmesinin, bu tümörlerin prog-

nozu açısından anlamlı faydası olamayacağı şeklindeki tespitinin ardından; uygun deneysel glioma modeli üzerinden potansiyel kemoterapötik, genetik, immünolojik tedavi metodlarının denenmesi gündeme gelmiştir. Dünyada, özellikle Amerika ve Japonya'da yaklaşık 20 yıldır deneysel glioma modeli üzerinden bu araştırmalar yürütülmektedir. Ülkemizde ise bazı araştırmacılar, geliştirdikleri projelerle bu ülkeler giderek değişik çalışmalarda bulunmuştur.

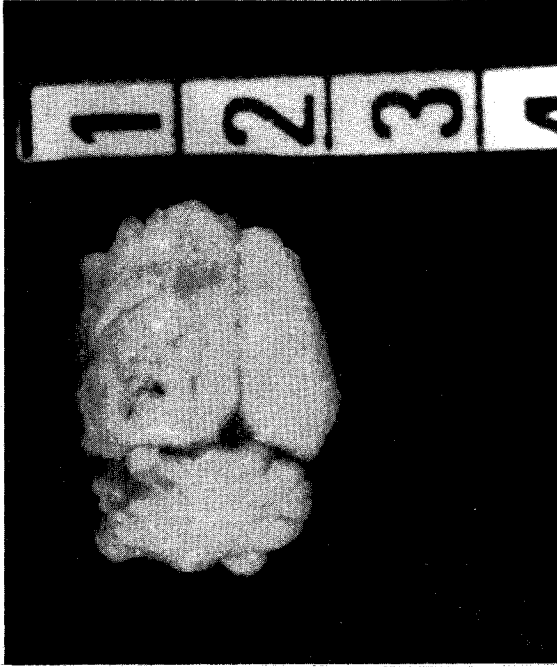
GEREÇ ve YÖNTEM

C6 sıçan glioma hücreleri: Hücreler American Type Culture Collection'dan (ATCC-Maryland USA) sağlandı. % 10 Fetal Calf Serum (FCS) ilaveli F12 medium (Sigma Kimya-İstanbul) içerisinde, 5 cc'lik flasklerde, 37°C'de ve CO₂ etüvünde saklandı (11,20).

Pasajın hazırlanması: İmplantasyon öncesi flaksklerin içindeki medium ve hücre karışımı boşaltma kabına döküldü. 2 mL tripsin ilave edildi. Kısa süre friksiyon yapılarak yüzeye yapışmış olan hücreler serbestleştirildi. Tripsin ve hücre karışımı bir santrifüj tüpüne alınarak, 1,5 mL F12 besiyeri ve FCS eklendi. Dakikada 1000 devirle 3 dakika santrifüje edildi. Dipte kalan sedimentin üzerine 2 mL besiyeri eklenip pipetle friksiyon uygulanarak süspansiyon haline getirildi. Tomo kamarasında hücreler sayıldı (9,11,20).

Sıçanlar: Ağırlığı 250-350 g arasında değişen, 8'i Wistar ve 8'i Sprague Dawley olmak üzere toplam 16 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırmaları Merkezi'nden (DETAM) temin edildi. İmplant edilen C6 sıçan glial hücre sayısına göre A, B, C, D olarak dört gruba ayrıldı. Her grup 2 Sprague-Dawley 2 Wistar türü sıçandan oluşturuldu. Sırasıyla A grubuna 104, B grubuna 105, C grubuna 106, D grubuna 107, 10 mikrolitre süspansiyon içinde implante edildi. Hücre sayısı ile oluşan tümör çapı değerlendirilmesi Tablo 1 ve 2'de; implante edilen hücre sayısının tümör çapı ile oluşturduğu orantı ise Grafik 1 ve 2'de gösterildi.

İmplantasyon: Sıçanlar intraperitoneal olarak uygulanan ketamin ve fentanil kombinasyonu ile genel anesteziye alındı. Cilt, ciltaltı bregma üzerinden yaklaşık 1 cm'lik vertikal median insizyon ile geçildi. Periost sıyrıldı. Koronal sütürün 1 mm önüne, sagittal



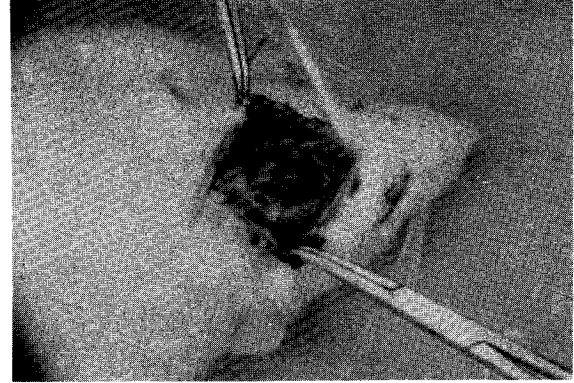
Resim 1. C grubu wistar sıçan beyninin dekapitasyon sonrası makroskopik global görünümü.

sütürün 3 mm sol lateraline dental trepan yardımı ile çapı yaklaşık 4 mm'lik 1 adet burr-hole açıldı. 22G insülin enjektörü iğnesi plastik bir halka ile uçtan 4 mm yukarıda tespit edilip; halka, kranyum dış yüzüne oturtularak, sol frontal bölgeye implantasyon uygulandı (1,8,9,14,19,20,22). İmplantasyon tüm sıçanlara aynı anda yaklaşık üç saat içerisinde tamamlandı.

Kranyal MR incelemesi: Dekapitasyon öncesi tüm sıçanlara kranyal T2 sekans MR incelemesi yapıldı (20).

Dekapitasyon ve fiksasyon: İmplantasyondan 2 hafta sonra her gruptan ikişer sıçan seçilerek, 8 sıçan dekapite edildi. 3 hafta sonra her gruptan eşit sayıda sıçan içeren diğer 8 sıçan dekapite edildi. Tüm beyinler hasar verilmeden bir bütün olarak çıkarıldı (Resim 1, Resim 2). % 10'luk formalin içinde tespitlenerek, histopatolojik tetkik ve immünohistokimya için İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Nöropatoloji Laboratuvarı'na gönderildi. Burada patolojik piyesler % 10 formalin içerisinde 10 gün global bekletildi. Koronal 0.4 cm aralıklarla seri kesitler alındı. Suda yıkanarak uzun takibe başlandı.

Oda sıcaklığında sırasıyla % 90 alkolde 1 gün, % 96 alkolde 1 gün, % 96 alkolde 1 gün, % 100 alkolde 1



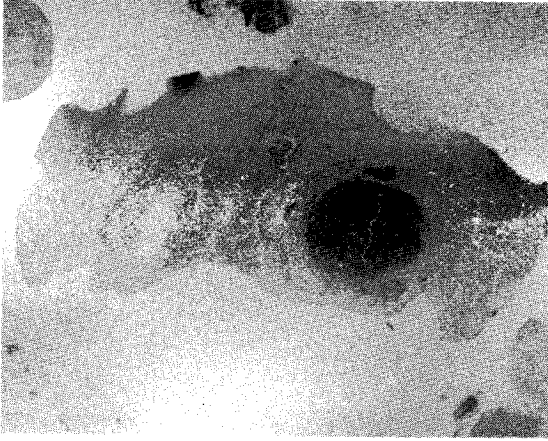
Resim 2. Resim 1'deki sıçanın dekapitasyon işlemi.

gün, % 100 alkolde 1 gün, ksilolde 1 gün, ksilolde 1 gün, parafin (histoplast) 1 gün, parafinde (histoplast) 1 gün olmak üzere toplam 10 gün bekletilerek gömme işlemi yapıldı. Parafin bloklarından 6 mikronluk seri kesitler alınıp ortalama her denekten 50 kesit yapıldı. Bunların yarısı atlanarak hematoksilin ve eozin (H.E.) ile boyandı. Makroskopik ve mikroskopik incelemesi yapıldı. Glial fibriler asidik protein (GFAP), normal ve tümöral dokuda bakıldı (9,19,20).

İstatistik: İmplantasyonun 2., 3. haftasında verilen hücre miktarı ile oluşan tümör çapı karşılaştırıldı. Çalışmanın sonuçlarının istatistiksel verileri Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi.

BULGULAR

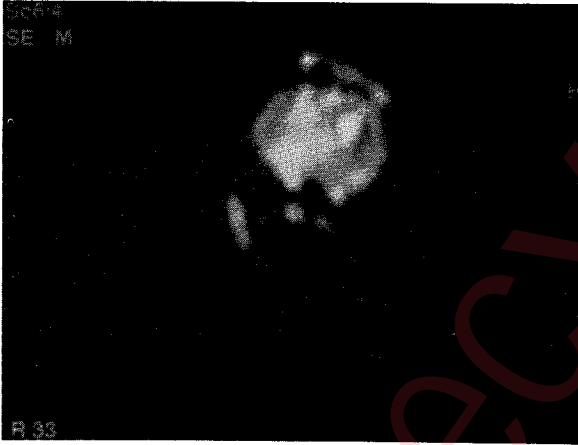
Tümör oluşumu: C6 hücre implantasyonundan 2 hafta sonra her gruptan eşit sayıda ikişer adet sıçan, toplam 8 sıçan seçilerek dekapite edildi. İmplantasyondan 3 hafta sonra ise diğer 8 sıçan dekapite edildi. Dekapitasyon işleminde patolojik beyinler bir bütün olarak çıkarıldı (Resim 1, Resim 2). Makroskopik ve mikroskopik histopatolojik inceleme ile tümör oluşumu değerlendirildi. Tüm sıçanlarda tümör formasyonu saptandı. İmplantasyonun 2. ve 3. haftasında oluşan tümör çapının verilen C6 glial hücre miktarına göre oluşturulan sıçan grupları ile kıyaslanması sırasıyla Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterilmiştir. Tümör çapının büyüklüğü, implante edilen hücre sayısı ile doğru orantılıydı. İmplantasyonun 2. haftası ve 3. haftasındaki bu değerlendirme sırasıyla Grafik 1 ve Grafik 2'de belirtilmiştir. Tümör oluşumu implantasyon bölgesi olan sol frontal bölgede; belirgin



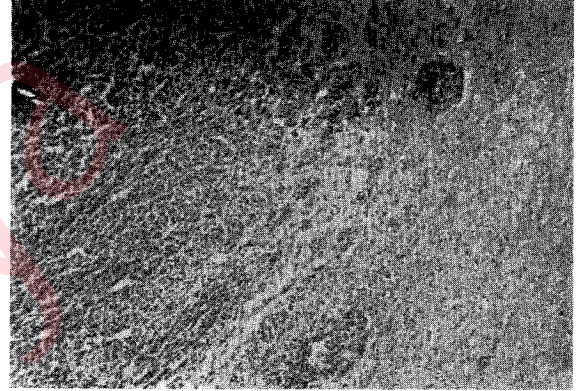
Resim 3. Resim 1'deki sıçan beyninin makroskopik kornal kesiti.



Resim 5. D grubu wistar sıçan beyninin H-E boyanması sonrası mikroskopik görüntüsü (x32).



Resim 4. T2 sekans koronal kranyal MR görüntüsü.



Resim 6. Resim 5'deki mikroskopik görüntünün x125 büyütmesi.

kitle etkisi oluşturup, çevreden nispeten sınırlı iken (Resim 3, Resim 5), implantasyon bölgesinin uzağında periventriküler alanda, subaraknoid bölgede kitle formasyonu oluşturmayan ancak yer yer tabaka tarzında tümör hücre sıraları şeklinde idi (Resim 7, Resim 8).

İnvazyon: Tüm sıçanların beyinlerinin makroskopik ve mikroskopik patolojik incelemeleri yapıldı. 106 ve 107/10 mikrolitre hücre implant edilen sıçanların beyinlerinde çıplak gözle görülebilen belirgin değişiklik saptandı.

106/10 mikrolitre hücre implant edilen ve C grubu olarak sınıflandırılan Wistar tür bir sıçan örnek alındığında makroskopik global incelemesinde (Resim 1). Sol hemisferin sağ hemisferden daha büyük ve

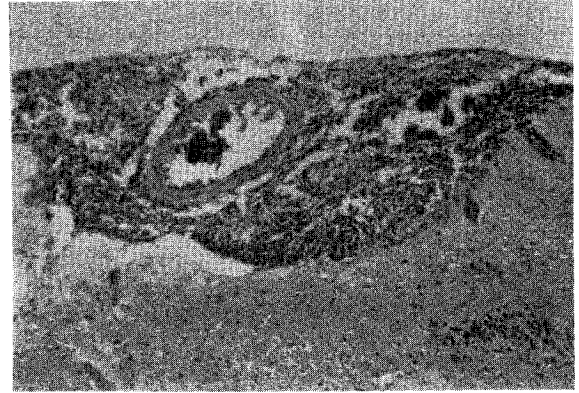
yumuşak kıvamlı (ödem), sağ hemisferin araknoidal örtüsünün düzgün ve kaygan sol hemisferin yüzeyinin ise düzensiz kaba ve sarı grimsi renkte olduğu görüldü. Bu değişiklik parasagittal sol süperomedial hemisfer dışında tüm hemisferi kapsıyordu. Bu bulgu 10⁴ ve 10⁵/10 mikrolitre hücre implant edilen sıçan gruplarında görülmedi.

Tüm sıçan beyinlerinin parafinle muameleyi takiben Hemotoksilen-Eozin (H-E) boyanmasından sonra alınan koronal kesitlerinde (Resim 3), sol frontobazal bölgede Tablo 1 ve Tablo 2'de belirtilen tümör çaplarında tümör oluşumu saptandı.

Mikroskopik incelemede; C6 sıçan glial hücreleri, H-E boyama yöntemi sonucu insan glial tümör hücreleri ile aynı boyanma özellikleri gösterdi. Hücreler



Resim 7. B grubu Sprague-Dawley sıçanın H-E boyanma sonrası mikroskopisi (X 32).



Resim 8. Resim 7'deki mikroskopik görüntünün x 125 büyütmesi.

Tablo 1.

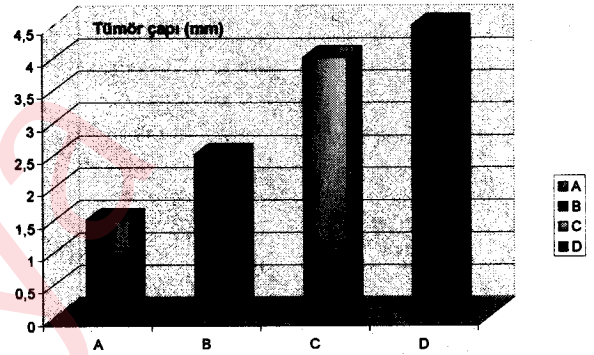
Tümör Çapı	Sıçan Grupları			
	A	B	C	D
4 mm ve üstü	-	-	2	2
2-4 mm	-	1	-	-
2 mm ve altı	2	1	-	-

A: $10^4/10 \mu\text{l}$ hücre implant edilen sıçanlar
B: $10^5/10 \mu\text{l}$ hücre implant edilen sıçanlar
C: $10^6/10 \mu\text{l}$ hücre implant edilen sıçanlar
D: $10^7/10 \mu\text{l}$ hücre implant edilen sıçanlar

yuvarlak oval, nüveleri asidofil kısmen bipolar, kismende dağınık sitoplazmaları vardı. Çevre parenkimden oldukça keskin sınırlanmıştı. Sprague-Dawley türü sıçanda bu sınır daha belirgindi.

Hem Sprague-Dawley, hem de Wistar türü sıçanlarda, mikroskopide, primer implantasyon bölgesinin; oldukça uzağında, beyin sapında, hipokampal bölgede ve ventrikül sisteminde; özellikle perivasküler, perinöral alanlarda tabaka halinde tümör hücreleri görüldü (Resim 7, 8). İmplantasyon bölgesinde ise tüm sıçanlarda nispeten sınırları belirgin, yoğun araknoid yayılım gösteren çapı, implante edilen hücre sayısı ile orantılı tümör oluşum saptandı (Resim 5,6).

Kranyal MR incelemesi: Tüm sıçanlara dekapitasyon öncesi kranyal MR incelemesi uygulandı. Resim 4'de örnek alınan C grubu Wistar sıçanın kranyal MR T2 sekans görüntüsü görülmektedir. Sol frontobazal bölgede, makroskopik ve mikroskopik histopatolojik tetkik ile uyumlu (Resim 3), ortası hiperintens



Grafik 1.

A: $10^4/10 \mu\text{l}$ hücre implant edilen sıçanlar
B: $10^5/10 \mu\text{l}$ hücre implant edilen sıçanlar
C: $10^6/10 \mu\text{l}$ hücre implant edilen sıçanlar
D: $10^7/10 \mu\text{l}$ hücre implant edilen sıçanlar

etrafı hipointens alan tümör oluşumunu; yine sağ temporobazalde bulanık hiperintensite ise migrasyon alanını göstermektedir (Resim 4).

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi: Verilen hücre miktarı ile oluşan tümör çapı arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi.

2. hafta: Tümör çapı

r: 0.8028

N (8)

Sig. 005

Hücre sayısı

3. hafta: Tümör çapı

r: 0.8660

N (8)

Sig, 026

Hücre sayısı

2. hafta sonuçları: Yapılan Spearman korelasyon

Tablo 2.

Tümör Çapı	Sıçan Grupları			
	A	B	C	D
4 mm ve üstü	-	-	2	2
2-4 mm	2	2	-	-
2 mm ve altı	-	-	-	-

A: 10⁴/10 µl hücre implant edilen sıçanlar
B: 10⁵/10 µl hücre implant edilen sıçanlar
C: 10⁶/10 µl hücre implant edilen sıçanlar
D: 10⁷/10 µl hücre implant edilen sıçanlar

analizinde; verilen hücre sayısı ile tümör çapı arasında ileri derecede anlamlı ilişki saptanmıştır (r: 0.80 p: 0.005). Verilen hücre sayısı arttıkça tespit edilen tümör çapı artmıştır.

3. hafta sonuçları: Yapılan Spearman korelasyon analizinde, verilen hücre sayısı ile tümör çapı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (r: 0.86 p: 0.026). Verilen hücre sayısı arttıkça tespit edilen tümör çapı artmıştır.

TARTIŞMA

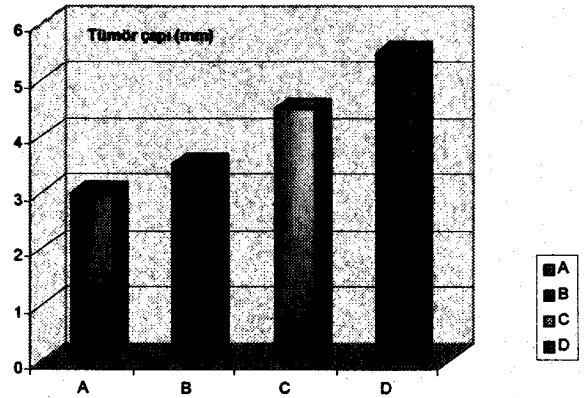
C6 sıçan glioma modelinin hücre ve doku transplantasyon modelleri içindeki yeri:

Çalışmada kullandığımız C6 sıçan glial tümör modelinin, diğer hücre ve doku transplantasyon beyin tümör modelleri ile birlikte tartışılması, bu modelin avantajlarını daha iyi ortaya koymaktadır. C6 sıçan tümör hücre ve dokularının deney hayvanlarına transplantasyonu üzerine kurulu birçok beyin tümör modeli vardır (30). Bulart ve Bignes iki tip ana transplant modeli olduğunu tespit etmişlerdir (13,14):

A. Singeneik tümör modelleri: Kimyasal ajanlar veya virüslerle uzun süreli subkutanöz pasajlama veya hücre kültür serileri sonucu elde edilen tümörlerdir.

B. Heterotransplantasyon tümör modelleri: Diğer tümörlerden ya da aynı türün farklı cinsinden immün sistemi baskılanmış ya da beyin, gözün ön bölümü gibi immünolojik olarak korunmuş bölgelerine yapılan hücre ve doku transplantasyonudur.

Transplantasyon teknikleri zaman içerisinde büyük ilerleme kaydetmiştir. İlk çalışmalarda bir iğne ile



Grafik 2.

A: 10⁴/10 µl hücre implant edilen sıçanlar
B: 10⁵/10 µl hücre implant edilen sıçanlar
C: 10⁶/10 µl hücre implant edilen sıçanlar
D: 10⁷/10 µl hücre implant edilen sıçanlar

deney hayvanına direkt tümör fragmanları enjekte edilirken, sonraları Wilson bu kantitatif olmayan tekniği düşük mortalite hızında stereotaktik transplantasyon tekniklerini kullanarak kantitatif ve standarde hale getirmiştir. Bu teknikte hücre kültüründe çoğaltılan hücre süspansiyonları kullanılmıştır. Daha sonraları daha iyi stereotaktik tekniğin ve konsantre hücre süspansiyonlarının kullanılması, özel enjeksiyon iğnelerinin gelişmesi ile % 90 - % 100'e varan oranda intraserebral tümör gelişmesini sağlamıştır.

Çalışmamızda konsantre, 10 mikrolitreye sığdırılmış hücre kullanılmış ve implantasyonlar özel enjeksiyon iğnesi ile gerçekleştirilmiştir. Stereotaktik yöntem yerine manuel yöntem uygulanmasına rağmen % 100 oranında tümör formasyonu görülmüştür (Tablo 1, Tablo 2).

1941 yılında Zumeran ve Arnold metil klorentilenle oluşturulmuş ependimoblastomayı fare beynine transplante etmişler ve % 90-100 oranında tümör gelişimini sağlamışlardır. Bu orijinal tümörden frozen kesitleri alarak Ausman ve çalışma arkadaşları birçok hücre kültür serisi elde etmişler ve buna ependimoblastoma A adını vermişlerdir. Onlar subkutanöz olarak pasajlanmış ependimoblastomayı, intraserebral olarak fareye transplante etmişler ve değişik ilaçlara karşı tümör hassaslığını kantitatif olarak ölçmüşlerdir. C6 tümör hücreleri deneysel glioma çalışmalarında geniş olarak kullanılır (1,8,9,14,19,20,22). Bu hücre serisinin orijini hakkında bazı soru işaretleri vardır. Dr. Bende ve ark.'ları bu hücre serisinin EN/Nitrozürenin transplasental yolla sıçanlara tabi tutulmasıyla oluştuğu iddia etmiştir. C6 hücre serisi

astrositik morfoloji gösterir (2,22,25,26) ve glial hücre markerlerinin (GFAP, S100 prt) içermesi nedeniyle nörobiyolojide geniş olarak kullanılır (1,4,8,9,10,11,24). Önceleri yaygın olarak invitro kullanılmış sonraları invivo transplantasyon modelleri ile daha popüler hale gelmiştir. Çalışmamızda tipik glial-astrositik morfoloji, insan glial tümörüne bütünüyle benzer şekilde gözlemlenmiştir. Kaye ve ark.'ları $10^6/10$ mikrolitre C6 hücre süspansiyonunun erişkin sıçanların birçok türünde intrakranial olarak yeterli tümör gelişimine yol açtığını tespit etmişlerdir (3). C6'ya karşı monoklonal antikor kullanarak tümör dokusunun etrafındaki normal dokuda mikroskopik invazyonu göstermişlerdir. Çalışmamızda 10^6 ve $10^7/10$ mikrolitre tümör hücresi verilen sıçan gruplarında implantasyonun ikinci haftasında minimum 4 mm çapında tümör oluşumu saptanmıştır (Tablo 1, 2). Bu tespit literatürdeki sonuçlarla paralellik göstermektedir. Birçok araştırmacı erişkin sıçanlarda C6 hücre büyümesini intraserebral olarak tespit etmiştir (1,8,9,11,25-27). Yine bu araştırmacılar çalışmalarında erişkin Wistar sıçanlarında C6 hücre büyümesinin, insan gliomasına Sprague-Dawley ve Long Evans tür sıçanlardan daha çok benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu tür sıçanlarda tümör büyümesi sınırlı ve kapsüllüdür (9,20,26). Wistar sıçanlarda parenkimal invazyon neovaskülarite ve nekroz görülür. Literatürdeki bu bulgular çalışmamızdaki bulgularla uyumludur. Dekapite ettiğimiz Sprague-Dawley sıçanlarda oluşan tümör formasyonu keskin sınırlıydı ve neovaskülarite göstermiyordu. Wistar sıçanlarda tespit ettiğimiz nekroz bu sıçanlarda görülmedi (Resim 5). Yukarıda tartışılan transplantasyon modelleri kullandığımız modeli de içeren singeneik yani, aynı türler için kullanılan transplantasyon modülleridir. Ayrıca heterotransplantasyon modelleri de vardır. Singeneik modelde normal laboratuvar şartları sıçanların deney süresince yaşamalarına yeterli olanağı sağlar. Ayrıca kullanılan sıçan türleri Wistar ve Sprague-Dawley sıçanlar, olağan fizyolojik ve biyolojik yapılarını koruyan sıçanlar olduğundan, elde edilen sonuçlar daha değerlidir. Son yıllarda çalışmalarda yeni bir tip tümör modeli denenmektedir. Bu modelde memelilerin gen hücrelerine spesifik genler uygulanmaktadır. Moleküler biyolojide en önemli teknolojik gelişmelerden biridir. Janesh ve Milks, 1974 yılında memelilerde yabancı gen uygulanmasını ilk kez rapor etmişlerdir. SU40 DNA'sını geliştirmekte olan fare embriyosunun blastokist kavitesine vermişlerdir. Diğer

başarılı gen transfer deneyleri embriyo hücrelerine uygulanmaktadır. Önümüzdeki günlerde bu çalışmaların popülaritelerinin artarak devam edeceği açıktır.

Migrasyon

C6 glioma-astrositoma hücreleri migrasyon gösterirler. Bu hücrelerin migrasyon paterni ile insan habis glioma migrasyon paterni aynıdır. Migrasyon yolu bazal lamina yüzeyinden ve sinir liflerine paraleldir. İncelenen insan glioması patolojik materyalinde de aynı görüntüye rastlanır (7,8,16,21,28,29). Bu çalışmada migrasyon hem mikroskopik histopatolojik, hem de radyolojik olarak açık bir biçimde ortaya konmuştur. Sprague-Dawley ve Wistar tüm sıçanlarda implantasyonu uyguladığımız sol frontal bölgenin dışında, tabaka tarzında tümör kitlesi oluşturmayan C6 glial hücreleri görüldü. Bu hücreler beyin sapında, hipokampal bölgede ve ventrikül sistemde; özellikle perivasküler, perinöral alanlarda tespit edildi (Resim 7, Resim 8). Bu görüntü, C6 glioma hücrelerinin migrasyon kabiliyetlerinin yüksek derecede olduğunu destekler nitelikteydi (5). Glioblastomada; cerrahi ve radyoterapinin tüm çabalara rağmen başarısızlığının nedenlerinden biri, belki de en önemlisi malign hücrelerin migrasyon kabiliyetlerindeki artış olabilir (9,20). C6 sıçan glial hücrelerinin doku içine migrasyon yapabilmesi için proteaz salgılamaları gerekmektedir (9). Gliomalar doku plazminojen aktivatörleri yaparlar ve bu enzim migrasyonda rol oynar. Sıçan beynindeki C6 hücrelerinin oluşturduğu mikrovaskiteler bu hücrelerin proteaz salgıladıklarını düşündürür (9).

C6 glial hücreleri tarafından migrasyonun gerçekleşmesi için yapılan ve yukarıda açıklanan hücre dışı elemanlardan başka hücre içi düzenleyicilerde vardır. S100 proteini bunlardan biridir. Bu protein hücre içi kalsiyumunun mobilizasyonu için tetikleyici rol oynar. Hücre içi kalsiyumunun mobilizasyonu direkt hücre hareketiyle ilgilidir. 6 hücrelerdiki S100 proteinlerindeki artış hücre içi kalsiyumu mobilize eder ve hücre hareketliliği artırarak migrasyonu kolaylaştırır. Migrasyon ve C6 glioma hücrelerinin invazif karakterleri beraberinde şu iki noktayı gözönüne getirir. Birincisi multiple tümörler acaba multiple orijinli mi? Yoksa tek bir tümör dokusunun migrasyonu mu söz konusu? İkincisi ise glioma ve astrositomada cerrahi manipülasyonu tartışma. Habis beyin tümör do-

kusunun tamamen ortadan kaldırılması için cerrahiye ek olarak neler yapılabilir ve bu hücrelerin karakteristik migrasyon kabiliyetleri azaltılabilir mi? Belki de bu soruların cevapları habis glial tümörlerin sonunu hazırlayacaktır.

SONUÇ

Uygun standartta deneysel C6 sıçan glioma modelini oluşturmanın belirli koşulları vardır (43):

1. Glial neoplastik hücrelerin büyüme hızı ve malign karakteri yeterli olmalı.
2. Kullanılan kültürlerin hacimleri küçük olmalı.
3. Tümör indüksiyon zamanı kısa olmalı.
4. Deney hayvanlarını yaşam süreleri implantasyon sonrası standardize edilebilmeli.
5. Tümör insan gliomasına benzer histopatolojik özellik göstermeli.
6. Tümör hücreleri kolay üreyebilmeli ve laboratuvar personeline zarar vermemeli.
7. Terapötik cevabı insan beyin tümörüyle korelasyon göstermeli.

Çalışmamızda oluşturulan tümör modelinde iki hafta gibi kısa sürede tüm sıçanlarda tümör tespit edilmiştir. Tümör indüksiyon zamanı kısadır. Kullanılan hücre kültürü hacmi literatürde en küçük hacim olan 10 mikrolitredir. Küçük hacimle implante edilen hücrelerin tümörojeniteleri daha yüksektir (6). Wistar sıçanlarda oluşturulan beyin tümörünün nekrozu, neovaskülaritesi ile insan beyin tümörüyle tamamen korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. C6 sıçan glioma hücreleri laboratuvar şartlarında kolay çoğaltılabilmektedir. Laboratuvar personeline zarar vermektedir.

Sonuçta bu çalışmada oluşturduğumuz deneysel glial tümör modeli, literatür çalışmalarındaki standartlara ve yeni projelerin çalışılmasına uygun olarak değerlendirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Badic B, Hunt K, Economou JS, et al: Stereotactic delivery of a recombinant adenovirus into a C6 glioma cell line in a rat brain tumor model. *Neurosurgery* 35:910-916, 1994.
2. Barba D, Harin J, Ray J, Gage FH: Thymidine kinase-mediated killing of a rat brain tumours. *J Neurosurg* 7:729-735, 1993.
3. Barker M, Hoshino T, Gurcay O, et al: Development of an animal brain tumor animal model and its response to therapy with 1,3 bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* 33:976-989, 1973.
4. Benda P, Someda K, Messer J, et al: Morphological and immunohistochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg* 34:310-323, 1971.

5. Berens ME, Rutka JT, Rosenblum ML: Brain tumor epidemiology, growth and invasion. *Neurosurg Clin North Am* 1:1-18, 1990.
6. Bernstein JJ, Getz R, Jefferson M, Keleman M: Astrocytes secrete basal lamina after hemisection of the rat spinal cord *Brain Res* 327:135-141, 1985.
7. Bernstein JJ, Goldberg W, Laqs ER Jr: Human malignant astrocytoma xenografts migrate in rat brain: A model for central nervous system cancer research. *J Neurosci Res* 22:134-144, 1989.
8. Bernstein JJ, Goldberg W, Laqs ER Jr: Immunohistochemistry of human malignant astrocytoma cells xenografted to rat brain: A polipoprotein E. *Neurosurgery* 24:541-546, 1989.
9. Bernstein JJ, Goldberg WJ, Laqs ER Jr, et al: C6 glioma cell invasion and migration of rat brain after neural homograffing: ultrastructure. *Neurosurgery* 26:622-628, 1990.
10. Bernstein JJ, Goldberg WJ, Laqs ER Jr: Human malignant astrocytoma xenografts migrate in rat brain: a model for central nervous system cancer research. *J Neurosci Res* 22:134-143, 1989.
11. Bernstein JJ, Laws ER Jr, Levine KV, et al: C6 glioma-astrocytoma cell and fetal astrocyte migration into artificial basement membrane: a permissive substrate for neural tumors but not fetal astrocytes. *Neurosurgery* 28:652-658, 1991.
12. Black PM: Brain tumors: *N Engl J Med* 324:1471-1476, 1991.
13. Brooks WH, Roszman TL, Dudka and Shaggs C: Immunobiology of primary intracranial tumors. *J Neurosurg* 54:331-337, 1981.
14. Bullard DE, Bigner DD: Animal models and virus induction of tumors, in Thomas DGT, graham DI (eds) *Brain tumours: Scientific Basis, Clinical Investigation and Current Therapy* Boston: Butterworths, 1980 pp.51-84.
15. Bullard DE, Schold SC Jr, Bigner SH, et al: Growth and chemotherapeutic response in athymic mice of tumors arising from human glioma-derived cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 40:410-427, 1981.
16. Burger P: Gliomas: Pathology, in Wilkins R, Rengachary S (eds): *Neurosurgery*. New York, McGraw-Hill Book Company, 1985, pp.553-563.
17. Burger PC, Dubois PJ, Schold SC, Jr, et al: Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 58:159-169, 1983.
18. Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA: Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 56:1106-1111, 1985.
19. Chicoine MR, Silbergeld DL: Assessment of brain tumor cell motility in vivo and in vitro. *J Neurosurg* 82:615-622, 1995.
20. Chicoine MR, Silbergeld DL: Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. *J Neurosurg* 83:665-671, 1995.
21. Connor JR, Bernstein JJ: Astrocytes in rat fetal cerebral cortical homograffs following implantation into adult rat spinal cord. *Brain Res* 409:62-70, 1987.
22. Coomer B, Stewart P, Hayakawa E, Farrel C, Del Maestro R: A quantitative assesment of microvessel ultrastructure in C6 astrocytoma spheroids transplanted to brain and muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 47:29-40, 1988.
23. De Ridder L, Calliauw L: Invasiveness of primary and secondary brain tumors in vitro correlated with clinical results. *Neurosurgery* 31:1043-1048, 1992.
24. Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, et al: Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 51:2164-2172, 1991.
25. Farrel C, Megyesi J, del Maestro R: Effect of ibuprofen on tumor cell growth in the C6 spheroid implantation glioma model. *J Neurosurg* 68:925-930, 1988.
26. Farrel CL, Stewart PA, Del Maestro RF: A new glioma model in the rat: the C6 spheroid implantation technique permeability and vascular characterization. *J Neurooncol* 4:403-415, 1987.
27. Goldberg W, Connor Jr, Bernstein JJ: Glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry of spinal cord astrocytes after induction of ischemia or anoxia in culture. *J Neurosci Res* 17:168-175, 1987.
28. Goldberg WJ, Bernstein JJ: Fetal cortical astrocytes migrate from cortical homograffs throughout the host brain. *J Neurosci Res* 20:38-45, 1988.
29. Goldberg W, Laws E, Bernstein J: Individual C6 glioma cells migrate in adult rat after neural homograffing. *Int J Dev Neurosci* 9:427-437, 1991.
30. Greene HSN, Arnold H: The homologous and heterologous transplantation of brain and brain tumors. *J Neurosurg* 2:315-331, 1945.