

Sıçan C6 Gliom Modeli: Manyetik Resonans İle Görüntüleme

C6 Rat Glioma Model: Magnetic Resonance Imaging

NECMETTİN TANRIÖVER, ZİYA AKAR, MUSTAFA UZAN, AYHAN BİLİR,
HAYDAR DURAK, REŞİT CANBEYLİ, CENGİZ KUDAY,

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı (NT, ZA, MU,CK), İstanbul Üniversitesi,
İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD(AB), İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Patoloji
Anabilim Dalı (HD), Boğaziçi Ünivesitesi, Psikobiyoloji Laboratuvarı (RC)

Geliş Tarihi: 30.3.2001 ⇔ Kabul Tarihi: 26.4.2001

Özet: Çalışmamızda Wistar sıçanlarında oluşturulan sıçan C6 gliom modeli histopatolojik ve nöroradyolojik olarak incelendi. Aynı zamanda bu tümör modelinde sıçanların klinik bulguları ve yaşam sürelerinin ortaya konması amaçlandı. Çalışmada sıçan C6 gliom modelinde klinikte uyguladığımız 1.5 Tesla (T) Manyetik Resonans Görüntüleme (MRG) için tümör inokülasyonu sonrası en uygun zaman ve verilerin ortaya konması amaçlandı. C6 gliom hücreleri laboratuvarlarda hazırlandıktan sonra, 16 Wistar sıçanının sağ hemisferlerine stereotaksi yardımı ile inoküle edildi. Tümör oluşumunu doğrulamak amacı ile tümör inokülasyonunu takiben 7 ile 9. günler arasında toplam 9 sıçana 1.5 T MRG sistemi kullanılarak, diz koilleri ile görüntüleme yapıldı. 1×10^6 C6 gliom hücresi inoküle edilen tüm sıçan beyinlerinde histopatolojik değerlendirmelerde malign gliom oluşumuna rastlandı. MRG ile değerlendirilen tüm sıçan beyinlerinde sağ hemisferde anaormal sinyal değişikliklerine rastlandı. Lezyonların uygulanan hemotoksilen-eosin boyasında MRG görüntüleri ile korelasyon gösterdiği gözlemlendi ve histopatolojik tanı olarak malign gliom oldukları doğrulandı. İntraserebral C6 malign gliom modeli oluşturulan 16 sıçan için ortalama yaşam süresi 29 gün olarak tespit edildi. Sıçan C6 gliom modelinde literatürden farklı olarak 1.5 T MRG sistemi ile en iyi görüntüyü diz koili kullanarak, kesit kalınlıklarını 3mm olarak aldığımızda elde ettik. Sonuç olarak sıçanların kullanıldığı in vivo gliom modellerinde MRG, tümör oluşumunun doğrulanmasına olanak sağlamakta ve tümör büyüme hızı ve tedaviye cevabın ortaya konmasında önemli roller oynayabilmektedir.

Abstract: Experimental animal models are needed to highlight molecular and cellular characteristics of glial tumors, since the etiology and molecular genetics have not been delineated in these neoplasms. Our aim was to demonstrate the formation of C6 rat glioma model in Wistar rats through histopathological and neuroradiological examinations, and also to evaluate clinical findings and surveys of these rats. We wished to delineate the optimal time period and data for magnetic resonance imaging (MRI) in this particular tumor model. C6 glioma cells were implanted with the aid of stereotactic guidance into the brain of 16 Wistar rats. Magnetic resonance images, through 1.5 tesla (T) MR system with knee coils, were collected from 9 rats, between days 7 to 9 to confirm tumor formation. All rat brains, inoculated with 1×10^6 C6 glioma cells, demonstrated malignant glioma formation in histopathological examinations. MR images revealed abnormal signal changes in right hemispheres of all the rats examined, and these findings were confirmed as malignant gliomas with hematoxyline-eosine staining. Median survival of 16 rats in C6 glioma model in our study was similar to the literature (29 days). Distinct from the literature, optimal results for C6 rat glioma model in 1.5 T MRI were observed in knee coil and with a slice thickness of 3mm. In conclusion, MRI plays a major role in the confirmation of tumor formation and evaluation of tumor growth rate with its response to therapy in in vivo glioma models.

Anahtar kelimeler: Deneysel MRG, sıçan C6 gliom modeli,

Keywords: C6 rat glioma model, experimental MRI

GİRİŞ

Merkezi sinir sistemi (MSS) maligniteleri, sık rastlanılan maligniteler arasında bulunmalarına rağmen, ölümcül hastalıklar sıralamasında erişkinlerde üçüncü, pediyatrik yaş grubunda ise lösemiden sonra ikinci sırada yer almaktadır (7, 9). Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi tüm agresif tedavi seçeneklerine rağmen maalesef malign gliomlarda 2-yıllık yaşam süresi ancak %20'lerde kalmaktadır (26).

Malign gliomlarda etyoloji ve genetik alt yapı henüz tam olarak açıklanamadığından, bu tümörlerin etyo-patogenezinin hücrel ve moleküler düzeyde ortaya konabilmesi, kemoterapötiklerin ve diğer etkili ajanların mekanizmalarının anlaşılabilmesi için deneysel çalışmalarda birtakım hayvan modelleri kullanılmaktadır. Bu şekilde yeni tedavi metodlarının etkinliğinin ortaya konulması kadar, bu tip invazif neoplasmların biyolojisinin açığa kavuşturulmasında hayvanlarda oluşturulan in vivo gliom modelleri önemli bir yer tutmaktadır. Hayvanlarda gliom oluşturmak için kullanılan en etkili kimyasal maddelerin başında alkalizan ajanlar gelmektedir (5, 6).

Laboratuvarlar için uygun olan küçük hayvanlarda uygulanabilen, gliom modelleri, malign gliomların in vivo özelliklerini ortaya koymak ve tedaviye cevaplarını belirlemek için günümüzde sıklıkla oluşturulmaktadır. Bunların içinde en fazla kullanılanları, C6 gliom ve 9L gliosarkom modelleridir (2,6). C6 hücre kültürleri, metil nitrozüreye ardışık şekilde maruz kalmış Wistar sıçanlarında oluşan beyin tümörleri kültürlerinden elde edilmektedir (3).

C6 hücreleri gliomların in vivo özelliklerinin incelenmesinde günümüze kadar başarı ile kullanılmıştır. Bu özellikler arasında tümör hücre invazyonu (1, 5, 13, 14, 19, 23), migrasyon (6, 22), ve kan-beyin bariyeri geçirgenliği sayılabilir (21). Bununla birlikte sıçan C6 gliom modelinde kemoterapi (8, 28), radyoterapi (17), gen tedavisi (4) gibi tedavi alternatifleri literatürde denenmiştir. Sıçanlarda oluşturulan in vivo C6 ve diğer gliom modelleri literatürde çeşitli çalışmalar ile nöroradyolojik açıdan değerlendirilmiştir (10, 16, 20, 25, 27). Literatürde sıçan C6 gliom modelinin manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile incelendiği birçok çalışma olmasına karşın, bu çalışmalarda özel hazırlanmış yüksek tesla (T) MRG cihazları tercih edilmektedir (11, 12, 15, 18, 29).

Ayrıca C6 gliom hücre implantasyonu sonrası MRG'nin uygulanacağı ideal zaman dilimi konusunda da tam bir fikir birliği oluşmamıştır.

Çalışmamızda Wistar sıçanlarında C6 gliom modeli oluşturulmuş ve bu modelin oluşturulması süresince dikkat edilmesi gereken noktalar gözden geçirilmiştir. Hücre implantasyonu sonrası, klinikte uyguladığımız 1.5 T MRG ile tümör oluşumu konfirmasyonu yapılmıştır. 1.5 T MRG için tümör inokülasyonu sonrası en uygun zaman ve veriler araştırılmıştır. Tümör oluşturulan bütün denekler sakrifiye edildikten sonra histopatolojik olarak incelenmiş, ve MRG tetkikleri ile korelasyonları araştırılmıştır.

GEREÇLER ve YÖNTEM

Hücre Kültürü: Sıçan C6 gliom hücre kültürü American Type Culture Collection'dan (ATCC®107-CCL) (Rockville, Maryland, USA) sağlandıktan sonra Hücre Kültürü Laboratuvarlarında çözüldü. %5 dimetyl sulfoxide ile donmuş olarak laboratuvarımıza gelen hücreler iki dakika 37°C'de çözündükten sonra, buz içinde bulunan taze hazırlanmış %10 Fetal Calf Serumlu ortama çok yavaş alındı. Daha sonra C6 hücreleri 1500 rpm'de 3 dk. süre ile santrifüj edilerek donma ortamından kurtarıldı. Bu işlemin sonrasında hücreler tekrar serumlu ortam ile 3 dakika yıkandılar ve 5ml taze hazırlanmış ortamda suspansiyon haline getirilerek 25 cm²'lik steril polypropilen kültür şişelerine alındı.

Hücreler içerisinde %10 fetal calf serum, 100 IU penisilin, 100 gr/ml streptomycin, 50 gr/ml gentamisin içeren Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)- DME-F12 (Gibco Co/BRL, Gaithersburg, MD, USA)'de haftada iki kere pasajları yapılarak üretildi. Hücreler, inkübatörde 37°C'de, %5 CO₂ hava karışımı ve 1 atmosfer basınç altında, doku kültürlerinde tek tabaka olarak büyüme gösterdi.

C6 glioma hücrelerinin eksponensiyel büyüme fazına geldikleri invert mikroskopta gözlemlendikten sonra, hücreler tripsinize edilerek santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler taze hazırlanmış %10 fetal calf serum içeren DME-F12 medyumuna ile tekrar suspansiyon haline getirildi. Hemositometre ile hücre sayımı ve viabilite oranları sayıldıktan sonra 200,000 viable hücre/µl olacak şekilde hücre suspansiyonu hazırlanarak, çabuk inokülasyon için buz içinde hayvan laboratuvarına ulaştırıldı (Tablo 1).

Tablo 1: Sıçan C6 gliom hücre kültürü'nün histoloji laboratuvarında hazırlanışı



Tümör İnokülasyonu: Çalışmamızda hayvan laboratuvarlarında yetiştirilmiş, ağırlıkları 150-230gr arasında değişen, saf, yetişkin dişi 16 adet Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar genel anestezi için intraperitoneal ketamine (50mg/kg) uygulanmasını takiben, prone pozisyonda stereotaksi aletine (Kopf Ins. Tujunga, CA) yerleştirildi.

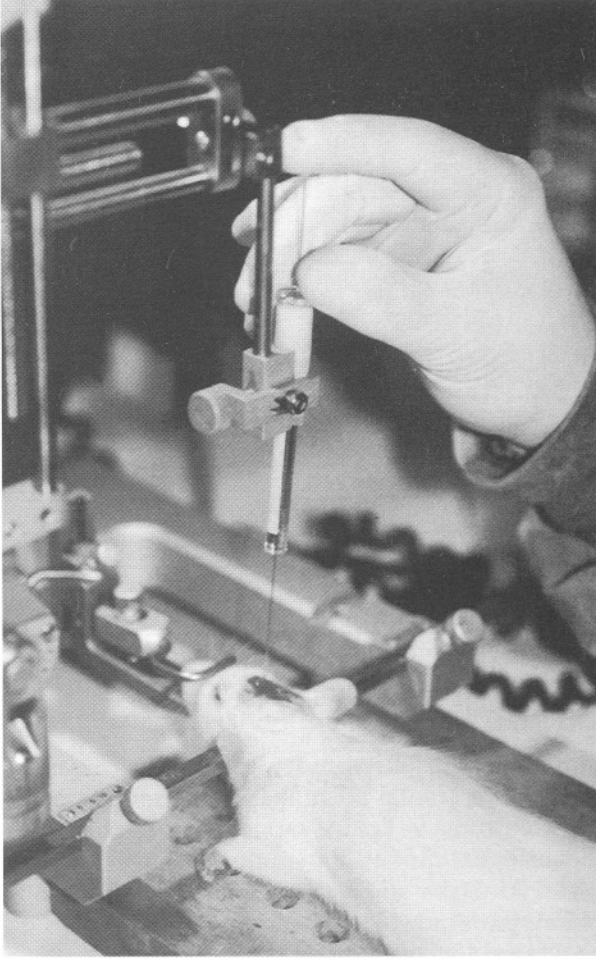
Sıçanların başları %10'luk povidine iodine ile hazırlanıp, traş edildikten sonra, midsagital, ortahat scalp insizyonu ile operasyona başlandı ve periosteum disseke edildi. Temporal kas serbestleştirilerek, 3/0 ipek askı dikisi ile retrake edildi. Koronal ve lambdoid sütürler ortaya konduktan sonra, bregma merkez nokta olarak kabul edildi ve her sıçan için bu bölgenin koordinatları kaydedildi. Stereotaktik koordinatlar eşliğinde, bregma'nın 2.2 mm anterior - 2.5 mm lateral kısmına dişi drill'i ile burr-hole açıldı. Dura'ya ulaşıldığında, her sıçan için stereotaksik koordinatlar yeniden alındı.

Bu aşamada buz içinde ependorf tüpleri ile steril şartlarda getirilen 5 µl/sıçan (1x10⁶ C6 gliom hücresi) olarak hazırlanmış hücreler 10 ml'lik Hamilton mikroşırıngasına (Hamilton Co,Reno,NV) 5'er µl olarak çekildi. Dura No 11 bistüri ile açıldıktan sonra Hamilton mikroşırıngası ile 2.5mm derinliğe girildi ve tümör inokülasyonuna 1 µl/dk'lık

enjeksiyon hızı ile başlandı (Şekil 1). 5dk'lık süre içinde tamamlanan tümör inokülasyonunun ardından, retrograd tümör taşınmasını engellemek ve difüzyona zaman tanımak amacı ile iğne 5dk süre ile aynı yerde bırakıldı. Daha sonra 1-2 dk içinde Hamilton mikroşırıngası geri çekildi, yara yeri saline ile irrigate edilip temizlendikten sonra, kemik defekt steril bone-wax ile kapatıldı. Saline ile tekrar irrigasyonu takiben, cilt-altı ve cilt tek tabaka halinde 3/0 serbest ipek ile kapatılıp operasyona son verildi.

MRG uygulaması: Toplam 9 sıçana tümör inokülasyonunu takiben 7 ile 9. günler arasında MR görüntüleme yapıldı (3 sıçan/gün). MRG tetkikleri General Electric 1.5 tesla MRG sistemi (GE,Waukesha, Wisconsin, USA) ile kneepa - (diz) coil'i kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm sıçanlarda öncelikle T2-ağırlıklı koronal sekanslar alındı. En iyi görüntüleme'nin efektif echo time (TE) 85 msec ve repetiton time (TR) 5 sec olduğunda alındığı gözlemlendi.

Sekanslarda field of view (FOV) 12x12 veya 8x8, matrix 256x256/4 NEX, kesit kalınlıkları ise 3mm olarak alındı. Sıçanlar düşük dozda anestetik ajanın (ketamine- 30mg/kg) intraperitoneal uygulanımını takiben, tahta bir platformda prone pozisyonda micropore flaster yardımı ile hareketsiz halde MRG cihazına alındı ve her sıçan için T2 ağırlıklı



Şekil 1: Sıçanlar genel anestezi altında, prone pozisyonda stereotaksi aletine yerleştirilip, 10ml'lik Hamilton mikrosiringası ile tümör inokülasyonu 1 µl/dk olarak gerçekleştirildi

sekanslarda (5000/85) koronal kesit görüntülemeleri yapıldı.

İlk bir haftadan itibaren nörolojik bulgu vermeye başlayan sıçanlardan, koronal T2-ağırlıklı MR kesitleri alınan tüm deneklerde görüntülemelerde anormal sinyal değişiklikleri tespit edildi.

Gözlem ve Dekapitasyon: Sıçanlar implantasyonun ilk gününden itibaren günlük aktivitelerinin ve genel durumlarının takibi amacı ile gözlem altına alındı, üç günde bir ağırlık takipleri yapıldı. Gözlemler yaşam süreleri açısından mümkün olduğunca objektif yapılmasına çalışıldı. Yapılan değerlendirmeler sonrasında etrafları ile ilgileri kesilen, kendi kendine beslenemeyen ve dışardan verilen uyarıcılara yanıt vermeyen sıçanlar

genel anestezi altında sakrifiye edildi. Her sıçan için ağırlık takipleri, yeni gelişen nörolojik bulgular, ve yaşam süreleri kayıt edildi.

Dekapitasyon sonrası beyin % 4'lük formalin solüsyonuna alındı, ve histolojik olarak parafin blokları hazırlandı. Ardışık 10m'luk koronal kesitler hazırlandı ve her sıçan için en az 1 adet hematoxyline-eosin (H&E) boyası yapıldı. Histopatolojik değerlendirme nöropatologlar tarafından yapıldı. Sıçan beyinlerinden alınan histolojik kesitlerde, tümörün genel özellikleri değerlendirildi, nekroz alanları ortaya kondu.

SONUÇLAR

Tümör oluşumu: Çalışmada kullanılan 16 sıçanın tümünde (%100), intrakranial 1×10^6 C6 gliom hücresi inokülasyonu sonrası, glioblastoma multiforme (GBM) özelliklerine sahip malign gliom oluşumu saptandı. Nörolojik ilk bulgular tümör implantasyonu sonrası 6 ve 7. günlerde sol hemiparezi şeklinde ortaya çıktı. En sıklıkla ortaya çıkan nörolojik bulgular letarji ve hemiparezi idi (Tablo 2). Sol hemiparezi gelişen 8 sıçan da dahil olmak üzere tüm sıçanlarda dekapitasyon sonrası sağ serebral hemisferde, frontal bölgede enjeksiyon sahasında tümör oluşumu tespit edildi. Bir sıçanda muhtemelen tümörün subaraknoid mesafeye yayılımına ya da korteksten doğrudan uzanımına bağlı, ekstrakalvarial büyüme gösteren, ekstraaksiyel intrakranial lezyon görüldü.

Denekler içinde 9 sıçana tümör inokülasyonunu takiben 7 ile 9. günler arasında, tümör oluşumunu doğrulamak amacı ile General Electric 1.5 tesla MRG sistemi kullanılarak, kneepa coil'inde MRG yapıldı. Tüm sıçanlarda T2-ağırlıklı aksiyel ve koronal kesitler alındı. Koronal T2-ağırlıklı MR kesitleri alınan 9 sıçanda da görüntülemelerde anormal sinyal değişikliklerine rastlandı. Tüm sıçanlarda sağ frontal bölgede yer alan hiperintens intraaksiyel lezyonlar, tipik olarak enjeksiyon sahasında gözlemlendi. MRG'si yapılan 9 sıçanın 5'inde orta hatta sapma ve ventriküllere belirgin bası gözlemlendi (Şekil 2a, 2b). MR görüntülemelerin yapıldığı günler arasında belirgin bir farklılık saptanmadı. MRG'si yapılan tüm denekler, çalışma kriterlerinde dekapite edildikten sonra yapılan histopatolojik incelemelerde MRG'deki patolojiler ile yüksek dereceli tümörler arasında anatomik korelasyon gözlemlendi.

Survey: İntraserebral C6 glioma modeli oluşturulan 16 sıçan için median survey 29 gün

Tablo 2: Deneklerin ağırlıkları, nörolojik bulguları, survey zamanları dağılımı.

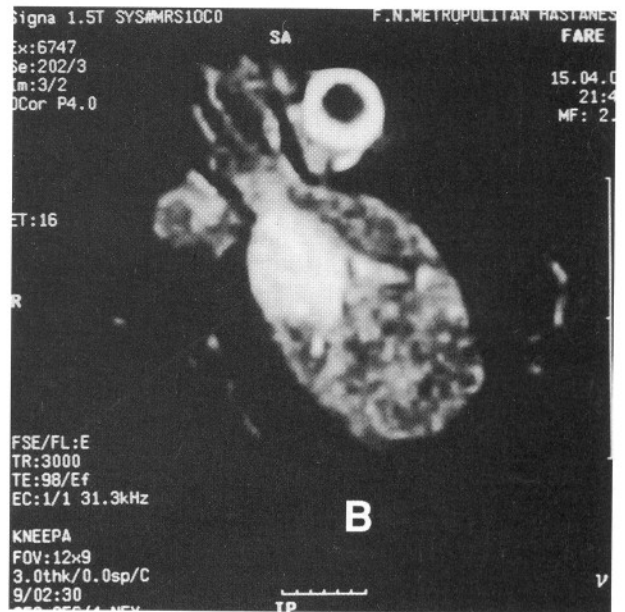
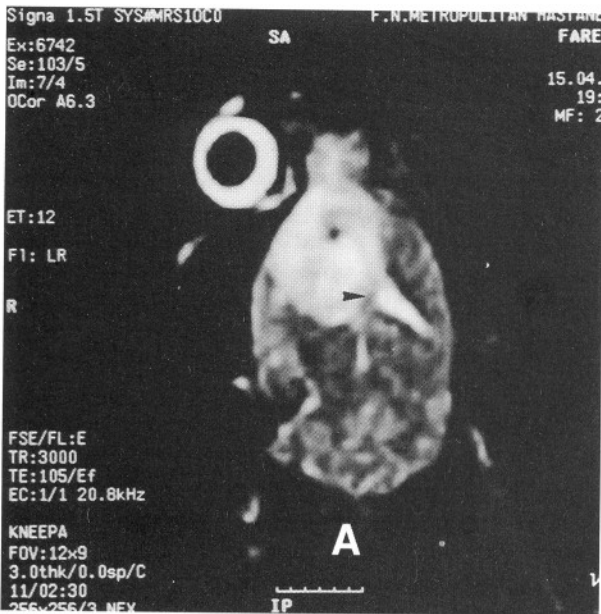
Sıçanlar	İlk Ağırlık	Son Ağırlık	Nörol. Bul	SurveyZam
Rat 1	200gr	190gr	hemipar+let	39gün
Rat 2	205gr	200gr	let	31gün
Rat 3	200gr	190gr	hemipar+let	35gün
Rat 4	200gr	190gr	hemipar+let	28gün
Rat 5	210gr	185gr	let+ani öl	16gün
Rat 6	205gr	190gr	ani öl	16gün
Rat 7	200gr	190gr	let	22gün
Rat 8	190gr	185gr	ani öl	13gün
Rat 9	205gr	200gr	let	36gün
Rat 10	200gr	200gr	hemipar+let	40gün
Rat 11	190gr	180gr	hemipar+let	35gün
Rat 12	230gr	210gr	let+ex.axYKL	23gün
Rat 13	180gr	175gr	hemipar+let	34gün
Rat 14	200gr	195gr	hemipar+let	34gün
Rat 15	210gr	200gr	let	30gün
Rat 16	220gr	210gr	hemipar+let	32gün

Açıklamalar: Nörol. Bul. Nörolojik bulgular, Survey zam. Survey zamanı, hemipar. hemiparezi, Let. letarji, ani öl. ani ölüm, ex.ax. YKL. Ekstraaksiyel yer kaplayan lezyon.

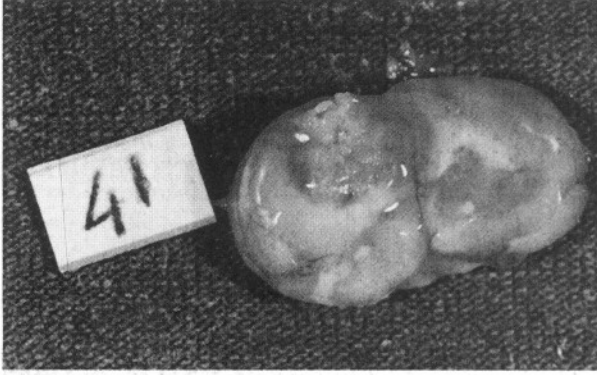
(range 13-40) olarak tespit edildi. Ekstraaksiyel intrakranial lezyon gözlenen sıçan, son iki günde gelişen letarji sonrası 23. günde kaybedildi.

Histopatolojik Bulgular: Tüm sıçanlarda dekapitasyon sonrası, beyinler 2 gün %4 formalin solüsyonunda bekletildi. Öncelikli olarak makroskopik incelemeleri yapıldı. Deneklerin

tamamında enjeksiyonun yapıldığı sağ serebral hemisferde, frontal bölge merkezli etrafında ödem alanı oluşturan ve komşu yapılara bası yapan yüksek dereceli glial tümör ile uyumlu lezyonlar saptandı (Şekil 3). Daha sonra tüm beyinlerden histolojik olarak parafin blokları hazırlandı. Ardışık olarak hazırlanan 10µ' luk koronal kesitlerden, her sıçan için en az 1 adet H&E boyası uygulandı. Çalışmadaki



Şekil 2a, 2b: Koronal T2-ağırlıklı MR kesitlerinde sağ frontal bölgede yer alan hiperintens intraaksiyel lezyonlar, orta hatta sapma (ok başı) ve ventriküllere belirgin bası gözlemlendi.

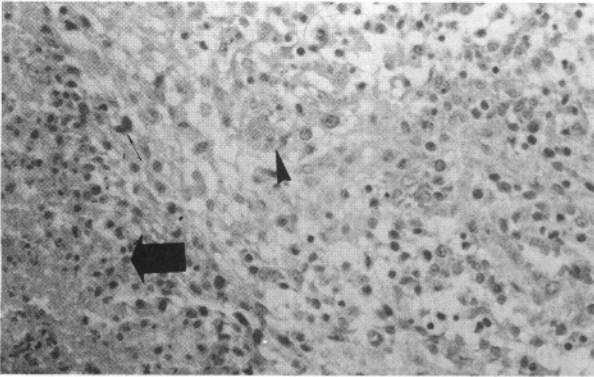


Şekil 3: Sıçan beyinlerinden alınan makropatolojik preparatlarda; 10m 'luk koronal kesitlerde frontal bölge merkezli etrafında ödem alanı oluşturan ve komşu yapılara bası yapan yüksek dereceli glial tümör ile uyumlu lezyonlar.

sıçan beyinlerinden alınan tüm kesitlerde histopatolojik olarak yüksek dereceli glial tümör tanısını doğrulayan artmış mitotik aktivite, pleomorfizm ve nekroz alanları gözlemlendi (Şekil 4).

TARTIŞMA

Beyin tümörleri sıçanlarda spontan olarak oluşabilmektedir (Wistar-albino sıçanları için insidans % 1.06) (23). Nitrozüre grubuna dahil olan metil- ve etil-nitrosüre sistemik olarak sıçanlara uygulandığında hayvanlarda yüksek oranda MSS tümörleri oluşturmaktadır. Sıçan MSS'de bu ajanlara duyarlılık onuncu prenatal günde başlamakta, yavaş yavaş artış gösterip, maksimum düzeye doğumda ulaşmaktadır. Bu nedenle malign gliom oluşturmak için yapılacak alkalizan ajan enjeksiyonu bu evrede,



Şekil 4: Vasküler endotelial proliferasyon ile birlikte, artmış mitotik aktivite, pleomorfizm ve nekroz alanları gösteren GBM oluşumu (H&E, X200). (Büyük ok: nekroz alanları, küçük ok: mitoz, ok başı: vasküler endotelial proliferasyon)

erişkinlere oranla 50 kat güçlü olarak yapılabilmektedir.

Sıçan C6 gliom hücre kültürleri, N-nitroso-methyl-urea'ya maruz kalmış ve intrakranial tümör oluşturmuş sıçanlardan elde edilmekte olup, GBM modeli için oldukça güvenilir bir hücre kültürüdür (5, 6). Her ne kadar ideal sıçan tümör modelinin xenograft olarak insan glioma hücreleri içermesi gerekse de, burada kullanılacak sıçanların mutlak immunosupresif olması gerekmekte ve bu da beraberinde enfeksiyona aşırı duyarlılık gibi problemleri getirmektedir. Aynı şekilde xenograft sıçan tümör modelinde kullanılması gereken immun yetersizlik gösteren atimik (nude) sıçanlarda, normal immun sistemin beyin tümörüne cevabı gözlenmemektedir (2). Bizim çalışmamızda oluşturulan malign glial tümörlerde, bu nedenlerden dolayı, yeterli bir immun sisteme sahip sıçanlar tercih edilmiştir. Sıçanlara ait yüksek dereceli glial tümörlerin oluşturulduğu rutin deneysel çalışmalarda kullanılan C6 hücre kültürü, normal bağışıklığa sahip sıçan beyinlerine implantasyonda daha pratik olarak aynı sonuçları verdiği için, in vivo çalışmalarda en çok tercih edilen sıçan gliom modellerinden biri durumundadır.

Bir in vivo GBM modeli olan C6 gliom hücreleri, öncelikle ayrı hücreler olarak yapay basal membrandan migrasyon göstermekte, ve sekonder olarak tümör oluşturmaktadır. Buradaki multipl hücre grupları tümör kitlesinin öncü hücrelerini oluşturmaktadır. C6 glioma hücreleri kortekse homograft olarak implante edildiğinde sıçan beynine kitle olarak invazyon gösterebileceği gibi, tek tek hücreler şeklinde de migrasyon gösterebilir (5). Literatürde yapılan çalışmalarda C6 hücrelerinin beyin yüzeyinde sadece glia limitans'ta yer almadığı, buna karşın corpus callosum, subependimal boşluk, ve perivasküler bölgenin de tümör hücreleri ile dolu olduğu gözlenmiştir (5). C6 gliom modelinde yapılan immunohistokimyasal çalışmalar, bu hücrelerin karakteristik olarak endotelial basal membrana affinite duyduğunu göstermektedir (13). İnvazyon genellikle mevcut kan damarları yolu ile, beyin parankimine infiltrasyon ile gerçekleşmektedir. C6 gliom hücrelerinde gözlenen bu migrasyon paterni, insanlarda gözlenen malign astrositomların patolojik preparatlarındaki yayılıma benzemektedir (5, 6).

Literatürde C6 gliomun in vivo gelişimi, yüksek-resolüsyonlu MRG'de dahil olmak üzere, çeşitli çalışmalar ile ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda MRG sonrası sıçanlar sakrifiye edilip, radyolojinin histopatolojik bulgular ile

karşılaştırılması yapılmıştır. Genellikle gözlenen C6 gliom hücrelerinin tümör oluşturma yeteneklerinin aşikar olduğudur (2, 4). Pu ve ark. C6 hücre enjeksiyonundan bir hafta sonra, MRG tekniklerinde büyük oranda tümör fokusu tespit etmişler ve yapılan histopatolojik değerlendirmelerde C6 gliom hücrelerinde aktif proliferasyon, mitotik figürler, nekrotik fokuslar, kistik oluşumlar, hemoraji ve neovaskularizasyon görmüşlerdir (24).

Literatürdeki birçok çalışmada, C6 gliom hücreleri ile oluşturulan in vivo modellerde sıçanların yaşam süreleri bir ay civarında bulunmaktadır (25). Çalışmamızda da 1×10^6 C6 gliom hücresi implante edilen 16 sıçanın tümünde GBM ile uyumlu neoplasmlar oluşturuldu. Sıçanlarda gözlenen klinik bulgular şekil ve zaman olarak, deneklerin survey zamanları ile literatürle benzerlik gösterdi (ortalama yaşam süresi 29 gün).

Sıçan gliom modelleri ile geçmişte yapılan birçok çalışmada, kimyasal ve spektrofotometrik analizler için, özel olarak hazırlanmış, küçük MRG cihazları kullanılmıştır (16, 20). Bu küçük aletler, 7 T'ya kadar alan kuvvetleri ile iyi görüntüler sağlamalarına rağmen, yaygın olmadıklarından, işlevselliği tartışmalıdır. Buna karşın, klinikte son derece yaygın olan tüm vücut MRG sistemleri, yüksek T'ye sahip sistemler kadar olmasa da, sıçan beyin tümörleri modellerinde de başarı ile kullanılmaktadır. Johnson ve ark. ilk kez 1987 yılında, 1.5 T MRG sistemi ile sıçan beynini görüntülemişlerdir (15). Bu tip MRG sistemleri içinde, sıçan beyinleri için özel koiller kullanılmaktadır. Literatürde klinikte kullanılan standart koiller olan ekstremite, orbita, küçük eklem ve hatta kafa koilleri bu tip hayvan modelleri için önerilmiştir.

Son dönemlerde difüzyon MRG teknikleri ve fonksiyonel MRG teknikleri çeşitli sıçan beyin tümörü modellerinde tedaviye cevabın ortaya konmasında başarı ile uygulanmaktadır (11, 12). Aynı şekilde, sıçan beyin tümörü modellerinde fonksiyonel neovasküler yapılanmanın incelenmesinde MRG tetkikleri ile gadolinium alımının değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur (29). Çalışmamızda bu yöntemlerden farklı olarak, 1.5 T MRG ile elde edilen verilerin, dekapitasyon sonrası tümörün anatomik lokalizasyonunun korelasyonunu göstermeyi amaçladık. Ayrıca tüm sıçanlarda histopatolojik incelemeler ile, MRG'de gözlenen patolojik sinyal değişikliklerin yüksek dereceli malign glial tümör olduğunu doğruladık.

Çalışmamızda, nöroradyolojik değerlendirmenin başlama zamanını, literatür ışığında tümör oluşumunun gözlemlendiği dönem olan implantasyon

sonrası 7-9. günler arası olarak belirledik. Literatürden farklı olarak, deneklerimize uyguladığımız el bileği (wrist) coil'i yerine, 1.5 T MRG sistemi ile en iyi görüntüyü kneepa - (diz) coil'i kullanılarak elde ettik. En iyi görüntüleme efektif echo time (TE) 85 msec ve repetiton time (TR) 5 sec olduğunda alındı. Yine literatürde önerilen 1mm kesit kalınlıklarının aksine, sekanslarda field of view (FOV) 12x12 veya 8x8, matrix 256x256, kesit kalınlıkları ise 3mm olarak alındı.

MRG'si yapılan tüm denekler, etrafları ile ilgileri kesildikten sonra dekapite edildi. MRG'de patoloji gözlenen tüm sıçanlarda, yapılan histopatolojik incelemelerde GBM ile uyumlu anatomik korelasyon gözlemlendi.

Sıçan C6 glioma modelinde 1.5 T MRG sistemi ile uygun değerlendirmenin, en erken birinci haftadan itibaren yapılabileceği kanısındayız. Bu teknik sırasında kneepa - (diz) coil'i rahatlıkla kullanılabilen, ve kesit kalınlıkları ise 3mm olarak alındığında tümör görüntülemesi için en iyi sonuç elde edilmektedir.

Sonuç olarak sıçanların kullanıldığı in vivo gliom modellerinde, MRG tümör oluşumunun invazif olmayan yöntemlerle doğrulanmasına olanak sağladığından son derece avantajlıdır. Bu tip çalışmalarda, tümör büyüme hızı ve tedaviye cevabın ortaya konmasında MRG'nin gelişen teknoloji ile ileride daha önemli rol oynayacağı kanısındayız.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada sıçanların MRG tetkikleri aşamasındaki yardımları için Metropolitan Florance Nightingale Hastanesi Radyoloji Departmanına ve Radyolog Uzm.Dr. Kutlay Karaman'a, tümör inokülasyonu aşamasında yardımlarından dolayı Ajda Yılmaz'a ve histopatolojik preparatların gözden geçirilmesi ve önerileri nedeni ile nöropatolog Prof.Dr.Büge Öz'e teşekkür ederiz.

Yazışma Adresi: Dr.Necmettin TANRIÖVER
P.K. 5 Cerrahpaşa, 34301 İstanbul
Tel: 0.212.587 6585,
Fax: 0.212.632 0026,
uzan@istanbul.edu.tr
KAYNAKLAR

1. Abramovitch R, Dafni H, Smouha E, Benjamin LE, Neeman M. In vivo prediction of vascular susceptibility to vascular susceptibility endothelial growth factor withdrawal: MRI of C6 rat glioma in nude mice. Cancer Res 1:59(19):5012-5916, 1999
2. Barth RF. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology:the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-

- 1 gliomas. J Neurooncol 36(1):91-102, 1998
3. Benda P, Someda K, Messer J, Sweet WH. Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. J Neurosurg 34:310-323, 1971
4. Benedetti S, Bruzzone MG, Pollo B, DiMeco F, Magrassi L, Pinolo B, Cirenei N, Colombo MP. Eradication of rat malignant gliomas by retroviral mediated in vivo delivery of the interleukine 4 gene. Cancer Res 59:645-652, 1999
5. Bernstein JJ, Goldberg WJ, Laws ER, Conger D, Morreale V, Weed LR. C6 glioma cell invasion and migration of rat brain after neural homografting: ultrastructure. Neurosurgery 26:622-628, 1990
6. Bernstein JJ, Laws ER, Levine KV, Wood LR, Tadvalker G, Goldberg WJ. 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
7. Black PMC. Brain tumors (I) N Eng J Med 324:1471-1466, 1991
8. Black P, Han CM, Vender JR, Finkelstein SD. Chemotherapy in experimental brain tumor, part 2: pretreatment with leukotriene C4 prolongs survival. J Neurooncol 36:7-19, 1998
9. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. Cancer statistics CA 1992; 41:19, 1992
10. Bruce JN, Falavigna A, Johnson JP, Hell JS, Birch BD, Yoon JT, Wu EX, Fine RL, Parsa AT. Intracerebral clysis in a rat glioma model. Neurosurgery 46(3):683-691, 2000
11. Chenevert TL, McKeever PE, Ross BD. Monitoring early response of experimental brain tumors to therapy using diffusion magnetic resonance imaging. Clin Cancer Res 3(9):1457-66, 1997
12. Chenevert TL, Stegman LD, Taylor JM, Robertson RL, Greenberg HS, Rehemtulla A, Ross BD. Diffusion magnetic resonance imaging: an early surrogate marker of therapeutic efficacy in brain tumors. J Natl Cancer Inst 20;92(24):2029-2036, 2000
13. Chicoine MR, Silbergeld DL. Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. J Neurosurg 83:665-671, 1995
14. Goldbrunner RH, Bendszus M, Sasaki M, Kraemer T, Plate KH, Roosen K, Tonn JC. Vascular endothelial growth factor driven glioma growth and vascularization in an ortopic rat model monitored by magnetic resonance imaging. Neurosurgery 47 (4), 2000
15. Johnson GA, Thompson MB, Traver BP. Three-dimensional MRI microscopy of the normal rat brain. Magn Reson Med. 4(4):351-365, 1987
16. Kim B, Thomas CL, Ross BD. Growth kinetics and treatment response of the intracerebral rat 9L brain tumor model: a quantitative in vivo study using magnetic resonance imaging. Clinical Cancer Research 1:643-650, 1995
17. Kondziolka D, Somaza S, Comey C, Lunsford LD, Claassen D, Pandalai S, Maitz A, Flickinger JC. Radiosurgery and fractionated radiation therapy: comparison of different techniques in an in vivo rat glioma model. J Neurosurg 84:1033-1038, 1996
18. Mazurchuk R, Zhou R, Straubinger RM, Chau RI, Grossmann Z. Functional magnetic resonance imaging of a rat brain tumor model: implications for evaluation of tumor microvasculature and therapeutic response. Magn Reson Imaging 17(4):537-548, 1999
19. Nagano N, Sasaki H, Aoyagi M, Hirakawa K. Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. Acta Neuropathol 86:117-125, 1993
20. Nakajima M, Nakasu S, Morikawa S, Inubushi T. Estimation of volume doubling time and cell loss in an experimental rat glioma model in vivo. Acta Neurochir 140:607-613, 1998
21. Ohnishi T, Sher PB, Posner JB, Shapino WR. Capillary permeability factor secreted by malignant brain tumor: role in peritumoral brain edema and possible mechanism for anti-edema effect of glucocorticoids. J Neurosurg 72:245-251, 1990
22. Ohnishi T, Matsumura H, Izumoto S, Hiraga S, Hayakawa S. A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. Cancer Res 58:2935-2940, 1998
23. Plunkett RJ, Agnieszka L, Tara B. Hormonal effects on GBM in the nude rat model. J Neurosurg, 90:1072-1077, 1999
24. Pu P, Liu X, Liu A, Cui C, Zhang Y. Inhibitory effect of antisense epidermal growth factor receptor RNA on the proliferation of rat C6 glioma cells in vitro and in vivo. J Neurosurg 92:132-139, 2000
25. Raila FA, Bowles AP, Perkins E, Terrell A. Sequential imaging and volumetric analysis of an intracerebral C6 glioma by means of a clinical MRI system. J Neurooncol 43:11-17, 1999
26. Rostomily RC, Berger MC, Keles EG. Radical surgery in the low grade and high grade gliomas. In Yung WKA (ed): Clinical Neurology: International Practice and Research, Cerebral Gliomas Series, pp 345-369, 1996
27. Sherburn EW, Wanebo JE, Kim P, Song SK, Chicoine MR, Woolsey TA. Gliomas in rodent whisker barrel cortex: a new tumor model. J Neurosurg 91:814-821, 1999
28. Takeda N, Diksic M. Relationship between drug delivery and the intra-arterial infusion rate of SarCNU in C6 rat brain tumor model. J Neurooncol 41:235-246, 1999
29. van der Sanden BP, Rozijn TH, Rijken PF, Peters HP, Heerschap A, van der Kogel AJ, Bovee WM. Noninvasive assessment of the functional neovasculature in 9L-glioma growing in rat brain by dynamic 1H magnetic resonance imaging of gadolinium uptake. J Cereb Blood Flow Metab 20(5):861-870, 2000

Ateromatöz olmayan arterial daralmanın sıklıkla görülen sebepleri konjenital hipoplazi, diseksiyon, vasospasm, vaskulopati ve tümörün damarı sarması olarak sıralanabilir.