



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SIÇAN YÜKSEK DERECELİ BEYİN TÜMÖRÜ
MODELİNDE İNSAN KAYNAKLI MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE
GÖÇÜNÜN İZLENMESİ**

Dr. Hüsnü Koşucu

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA
2013

**DENEYSEL SIÇAN YÜKSEK DERECELİ BEYİN TÜMÖRÜ
MODELİNDE İNSAN KAYNAKLI MEZENŞİMAL KÖK
HÜCRE GÖÇÜNÜN İZLENMESİ**

DR. HÜSNÜ KOŞUCU

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı

UZMANLIK TEZİ

Olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. MELİKE MUT AŞKUN

ANKARA

2013

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında gerekli ortamı sağlayan başta tez danışmanlığımı üstlenen Sayın Doç. Dr. Melike Mut Aşkun'a, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Servet İnci'ye, kök hücre ve nanoparça geliştirilmesini ve teminini sağlayan Sayın Prof. Dr. Kamil Can Akçalı ve Sayın Ece Akhan'a, magnetik rezonans görüntüleme emeğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Kader Karlı Oğuz, Sayın Prof. Dr. Ergin Atalar, Sayın Prof. Dr. Aydan Erçingöz, Sayın Yıldırım Gökhalık'a, preparatların hazırlanması ve bakımında canla başla çalışan Sayın Prof. Dr. Figen Söylemezoğlu ve Dr. Zerife Yusifli'ye, deneyin her aşamasında yardımcı olan Sayın Dr. Sevda Lüle'ye, tümör hücrelerini hazırlayan Sayın Doç. Dr. Sibel Pehlivan ve Sayın Dr. Abbas Kaffashi'ye, eğitimini almaktan ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk ve onur duyduğum öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Osman Ekin Özcan, Sayın Prof. Dr. Selçuk Palaoğlu, Sayın Prof. Dr. Nejat Akalan, Sayın Prof. Dr. Hakan Oruçkaptan, Sayın Prof. Dr. Mustafa Berker, Sayın Doç. Dr. Atilla Akbay, Sayın Doç. Dr. Burçak Bilginer, Sayın Doç. Dr. Gökhan Bozkurt, Sayın Uzm. Dr. İlkay Işıkay'a; eğitimim ve tez süresince desteklerini esirgemeyen tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tüm Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Ailesi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Amaç

Glioblastoma multiforme (GBM) en malign tümörlerden biridir. Sağkalım oranları çok düşük olup tanıdan ve standart tedavilerden sonra hayat kalitesi düşmektedir. Radikal cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi ile ortalama sağkalım 14 aydır. Kan beyin bariyeri (KBB) kemoterapötik ajanların cerrahiden sonra geriye kalan tümör hücrelerine ulaşmasına engel olmaktadır. Ayrıca, GBM infiltratif ve invaziv özelliğinden dolayı tüm beyine yayılabilmektedir.

Mezenşim kaynaklı kök hücrelerin (MSC) hasarlı dokuya ve tümöre yönelebilmeleri GBM'de terapötik ajanları taşıyabilecek bir aracı (vektör) olarak kullanılabilirlerini düşündürmektedir.

Bu çalışmanın amacı sıçanda beyin tümörü modeli oluşturmak ve MSC'lerin tümöre göçünü izlemektir.

Yöntem Gereçler

Bu çalışmada toplam 24 adet, 200-250 gr ağırlığında Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol tümör grubu (n=6), tümör ekilmeden *sham* operasyon ve karşı hemisfere kök hücre verilen grup (n=3), tümör ekilmeden *sham* operasyon ve beyin omurilik sıvısına (BOS) kök hücre verilen grup (n=3), tümör oluşturulan ve karşı hemisfere kök hücre verilen grup (n=6), tümör oluşturulan ve BOS'a kök hücre verilen grup (n=6) olarak ayrıldı. Kontrol ve tümör gruplarına sağ hemisfere RG2 (rat gliomu 2) enjeksiyonu yapıldı, *sham* gruplarında boş tümör besi medyası verildi. Cerrahiden 9 gün sonra manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yapıldı. Tümör gruplarında tümör teyit edildikten sonra nanoparça işaretli kök hücre enjeksiyonu gruplara göre karşı hemisfere veya BOS'a verildi. *Sham* gruplarda da karşı hemisfere ve BOS'a cerrahiden 9 gün sonra kök hücreler verildi. Kök hücreler uygulandıktan 5 gün sonra tüm gruplarda MRG yapıldı ve boyutları ölçüldü, takibinde sıçanlar dekapitize edildi. Tümör ve kök hücre ekim bölgesinden koronal olarak aynı planda

geçen kesitlerden yapılan preparatlar hemotoksilen eosin ile boyandı ve histopatolojik olarak değerlendirildi. Aynı kesitler nanoparça yönünden flöresan mikroskobunda değerlendirildi.

Bulgular

Kontrol gruplarında tümör oluşumu izlendi. *Sham* gruplarında boş tümör medyası enjeksiyonu yapılan bölgeye BOS'a verilen kök hücrelerin göçü gözlenmedi, ancak hemisfere kök hücre verilen *sham* cerrahi + karşı hemisfere kök hücre grubunda 1 sıçanda kök hücre enjeksiyonu bölgesinde inflamasyon oluştu ve o bölgede kök hücre gözlemlendi, boş tümör medyası enjeksiyon bölgesinde kök hücre hiçbir denekte görülmedi. Tümör grubunda kök hücrelerin hemisfere enjeksiyonu sonrasında karşı hemisferdeki tümöre göç ettikleri ve inflamasyon yanıtına neden oldukları tüm sıçanlarda gözlemlendi. Tümör oluşturulan ve BOS'a kök hücre verilen grupta tümörde kök hücre görülmedi ancak tüm sıçanlardaki tümör alanında belirgin inflammatuar yanıt gözlemlendi.

Sonuç

Mezenşimal kök hücrelerin tümörün karşı hemisferine enjeksiyonda tümöre ulaştığı ve inflammatuar yanıt başlattığı gözlemlendi fakat BOS'a enjeksiyonda tümöre ulaşamadığı görüldü; bununla beraber tümör lojunda aynı şekilde inflammatuar yanıtın neden olduğu görüldü.

Bu çalışma; insan kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin aksinler boyunca tümöre göç ettiklerini, ancak BOS'tan transependimal olarak geçemediklerini göstermiştir. Kök hücrenin varlığında muhtemel hücrelerden salınan mediatörlerin etkisi ile tümörde inflamasyon oluşturduğu ve tümörün küçüldüğü de gözlemlenmiştir. Kök hücre tümör tedavisinde bir taşıyıcı olarak ancak intraparenkimal uygulama ile kullanılabilir. Kök hücrelerin uzak etkisi ile oluşan inflamasyon ve tümörün küçülmesi ise ileri çalışmalarla teyit edilmesi gereken yeni ve önemli bir gözlemdir.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma multiforme, RG2 sıçan gliomu, nanoparça ile işaretleme, mezenşimal kök hücre

Destekleyen Kurumlar: Hacettepe Üniversitesi Proje Destek Bölümü
(013D02101001)

ABSTRACT

Objective

Glioblastoma Multiforme (GBM) is one of the most malignant tumors. Survival rates are too short and quality of life is poor after the diagnosis and the treatment. With radical surgery, chemotherapy and radiotherapy mean survival is 14 months. Due to the invasive and infiltrating pattern, GBM can spread to the whole brain. And Blood Brain Barrier prevents chemotherapeutic agents reaching to the remaining tumor cells after the surgery.

Mesenchymal stem cells (MSC) can migrate to injured tissues or tumor sites. This gave birth to an idea that they can be used as a vehicle in GBM treatment.

The objective of this study is to create rat brain tumor model and to track MSCs migrating to the tumor.

Method

A number of 24 female, 200-240 gr., Wistar albino rats were used in this study. Rats were divided into five groups; control tumor (n=6), sham operation + MSC to the opposite hemisphere (n=3), sham operation + MSC to Cerebro Spine Fluid (CSF) (n=3), tumor + MSC to the opposite hemisphere (n=6) and tumor + MSC to CSF (n=6). RG2 rat glioma was injected into the right hemispheres to rats in control tumor and tumor groups, whereas tumor medium was injected into the right hemispheres to rats in sham groups. On day 9, after proving the tumor on the MRI, MSC with fluorescence nanoparticles were injected into the left hemispheres or into the cisterna magna in either groups. MSCs were also injected the hemisphere or into the cisterna magna in Sham groups as well. No MSCs were injected to the control group. On day 14, another MRG scan was taken, tumor dimensions were calculated and rats were decapitated. Brains were examined under light microscopy and fluorescence microscopy.

Results

Tumor masses were seen in control group. No MSC migration to the tumor medium injection site was seen in either sham groups; but one rat in sham hemisphere group showed local inflammation at MSC injection zone. We saw MSC migration and inflammatory response in all rats when MSCs were injected to the hemisphere. Inflammatory response was also seen when MSCs were injected into cisterna magna but no MSC migration was seen in those rats.

Conclusion

With local injection, MSCs migrate to the tumor and start inflammatory response. But no MSC migration was seen when injected into Cerebro Spinal Fluid (CSF), although inflammatory response was present in those rats.

This study showed that MSC can migrate to the tumor through axonal pathways but MSCs can not pass the ependymal cells. Decreasing in the tumor mass due to the inflammation was seen, and the inflammation probably was caused by the mediators secreted by MSCs. Stem cells can be used as vectors when applied paracrymally. The inflammatory response and tumor mass reduction is a new observation and its planned to make additional studies to test it.

Keywords: Glioblastoma multiforme, RG2 rat glioma, tracking with nanoparticle, mesenchymal stem cell

This study is supported by grant from Hacettepe University (013D02101001)

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Beyin Tümörleri	3
2.2. Glioblastoma Multiforme	4
2.2.1. Yayılım ve Metastaz	5
2.2.2. Histopatoloji	7
2.3. Glioblastoma Tipleri	7
2.3.1. Küçük hücreli Glioblastoma	7
2.3.2. Oligodendroglioma Komponentli Glioblastoma	8
2.3.3. Dev Hücreli Glioblastoma	8
2.3.4. Gliosarkom	8
2.4. Glioblastoma Özellikleri	8
2.4.1. Mikrovasküler Proliferasyon	8
2.4.2. Proliferasyon	9
2.4.3. Anjiogenez	9
2.4.4. Nekroz	10
2.5. Histiogenez	11

2.6. Tümör Genetiği	11
2.7. Prognostik Faktörler	13
2.8. Radyoloji	14
2.9. Tedaviye Yanıt Mekanizmaları	14
2.10. GBM’de Tedavi	15
2.10.1. GBM’de Kemoterapi ve Hedefe Yönelik Tedaviler	16
2.10.1.1. Temozolomid	16
2.10.1.2. DNA Tamir Enzim İnhibisyonu	16
2.10.1.3. Anjiogenez İnhibitörleri	16
2.10.1.4. Matriks Metalloproteinaz (MMP) ve İntegrin İnhibitörü:	17
2.10.1.5. Sinyal İleti Sistemi İnhibitörleri	17
2.10.1.6. Diferensiasyon Yapıcı Ajanlar	18
2.10.1.7. Gen Tedavisi	18
2.10.1.8. İntihar Gen tedavisi (Enzim/önilaç sistemi)	18
2.10.1.9. Antisens Tedavi	19
2.11.2. GBM Tedavi Zorlukları	20
2.11.2.1. Kan Beyin Bariyeri	20
2.11.2.2. Beyin Tümörlerine İlaç Ulaşımını Arttırma Yöntemleri	21
2.11.2.3. Vektörler (taşıyıcı araçlar)	22
2.12. Kök Hücreler ve Genel Özellikleri	22
2.12.1. Mezenşimal Kök Hücre Özellikleri	23
2.12.2. Yara iyileşmesinde MSC’nin Rölü	23
2.12.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tümör Üzerine Etkisi	23
2.12.4. Kök Hücre Göçü Mekanizmaları	24
2.12.5. Mezenşimal Kök Hücrelerin Vektör Olarak Kullanılması	25
2.12.6. GBM Tedavisinde Kök Hücrelerin Kullanılması	27

2.13. Deney Hayvanı Olarak Rat Seçilmesi	28
2.13.1. RG2 Rat Gliomu	28
2.13.2. Deney Hayvanlarına Magnetik Rezonans Görüntüleme Yapılması	28
3. YÖNTEM ve GEREÇLER	30
3.1. Araç ve Gereçler	30
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3.1.2. Kullanılan Aletler	30
3.1.3. Kullanılan Yazılımlar	31
3.2. In Vivo Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar ve Anestezi	31
3.3. Sıçanlarda Beyin Tümörü Oluşturulması	31
3.4. Dental Pulp Kök Hücre (DPKH) İzolasyonu ve Hücrelerin Nanoparça ile İşaretlenmesi	32
3.5. VP-6 Nanoparçacığı	33
3.6. Hücre Canlılığının MTT Testi ile Değerlendirilmesi	34
3.7. Manyetik Rezonans Görüntüleme	35
3.8. MR Görüntüleme ile Tümör Büyüklüğünün Tespiti	37
3.9. Histolojik Değerlendirme	38
3.10. Floresan Mikroskobu ile İnceleme	39
3.11. Sıçanlarda Deney Gruplarının Oluşturulması	39
4. BULGULAR	41
4.1. Histolojik Değerlendirme	41
4.1.1. Kontrol Tümör Grubu	42
4.1.2. <i>Sham</i> Cerrahi ve Karşı Hemisfere Kök Hücre Verilen Grup	45
4.1.3. <i>Sham</i> Cerrahi + BOS'a Kök Hücre Verilen Grup	47
4.1.4. Tümör + Karşı Hemisfere Kök Hücre Verilen Grup	49
4.1.5. Tümör + BOS'a Kök Hücre Verilen Grup	51

4.2. Magnetik Rezonans Görüntülemelerinin Histoloji ile Karşılaştırılması	53
4.2.1. Kontrol Tümör Grubu	53
4.2.2. <i>Sham</i> Cerrahi Grupları	54
4.2.3. Tümör+ Karşı Hemisfere Kök Hücre Verilen Grup	55
4.2.4. Tümör + BOS'a Kök Hücre Verilen Grup	57
4.3. Floresan Mikroskopi Değerlendirilmesi	58
4.3.1. Kontrol Tümör Grubu	59
4.3.2. <i>Sham</i> Cerrahi + Karşı Hemisfere Kök Hücre Verilen Grup	62
4.3.3. <i>Sham</i> Cerrahi + BOS'a Kök Hücre Verilen Grup	64
4.3.4. Tümör + Karşı Hemisfer'e Kök Hücre Verilen Grup	66
4.3.5. Tümör + BOS'a Kök Hücre Verilen Grup	68
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ	77
7. KAYNAKÇA	78
8. EKLER	86

SİMGELER ve KISALTMALAR

BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CSF	Cerebro Spinal Fluid
CXCR1	<i>Chemokine receptor 1</i>
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGF	Endotel kaynaklı büyüme faktörü
FGF	Fibroblast kaynaklı büyüme faktörü
GBM	Glioblastoma multiforme
HE	Hematoksilen Eosin
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IL-1	İnterlökin 1
IL-8	İnterlökin 8
IFN β	İnterferon beta
KİBAS	Kafa içi Basınç Artış Semptomları
MCP-1	<i>Macrophage chemoattractant protein-1</i>
MGMT	O ⁶ -metilguanin-transferaz
NSC	Nöronal kök hücre
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
SSS	Santral Sinir Sistemi
SDF-1	Stromal hücre kaynaklı faktör 1
TGFB	Tümör büyüme faktörü
TNF α	Tümör nekroz faktör α
TRIAL	Tümör nekroz faktör ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand
UMRAM	Uluslararası Magnetik Rezonans Araştırma Merkezi

VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. DSÖ SSS tümörleri ana grupları.....	3
Tablo 2.2. DSÖ Nöroepitelyal tümörlerin alt grupları.....	3
Tablo 2.3. DSÖ Astrositik tümörler.....	4
Tablo 3. 1. Kullanılan kimyasal maddeler	30
Tablo 3. 2. Kullanılan aletler	30
Tablo 3. 3. Kullanılan Yazılımlar	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Otopsi vakasında sol frontal lobda geniş yerleşmiş ve korpus kallosum yolu ile karşı hemisfere geçen glioblastoma	6
Şekil 2. 2. Otopsi vakasında sağ frontal ve temporal yerleşimli, orta hat şiftine neden olan glioblastoma	6
Şekil 2.3. Otopsi vakasında sol bazal ganglionda yerleşmiş ve karşı hemisfere yayılım göstermiş glioblastoma	7
Şekil 2.4. Glioblastomada çoklu tabaka oluşturan mikrovasküler proliferasyon.....	9
Şekil 2. 5. Glioblastomada nekroz (sağda) ve tromboze damarlar	10
Şekil 2. 6. Çoklu yalancı çok katlı nekroz odakları.....	11
Şekil 2. 7. Glioblastoma gelişiminde genetik değişiklikler ve zamansal değişim.....	13
Şekil 3. 1. Stereotaksi cihazında sıçan beynine tümör hücreci enjekte edilmesi.....	32
Şekil 3.2. Kök hücreler ve nanoparça işaretli kök hücrelerin 24 saatlik MTT testi. ...	34
Şekil 3. 3. Siemens 3 Tesla MRG.....	36
Şekil 3. 4. Anestezi altındaki sıçan ve sıçan için geliştirilen sarmal.	36
Şekil 3. 5. Tümör hizasından geçen aksiyel sıçan beyin MRG kesiti.....	37
Şekil 3. 6. Şekil 3.5'in büyütülmüş hali. Tümör boyutları ölçülürken.	38
Şekil 4. 1. Tümör oluşmamış (A) ve tümör oluşmuş (B) sıçan beynine ait kesitlerin Hematoksilen Eosin boyası ile boyanması sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntülerine ait bir örnek (10 X büyütme ile).	42
Şekil 4. 2. Kontrol tümör grubundaki sıçandan elde edilen beyin kesitleri.	44
Şekil 4. 3. <i>Sham</i> cerrahi + karşı hemisfere kök hücre verilen sıçan beyninden alınan kesit	46
Şekil 4.4. <i>Sham</i> cerrahi+ karşı hemisfere kök hücre verilen grubundan alınan kesitte;	48
Şekil 4. 5. Tümör + hemisfere kök hücre verilen gruptaki bir sıçandan alınan beyin kesitlerinde;	50
Şekil 4. 6. Tümör + BOS'a kök hücre verilen gruptaki sıçandan alınan beyin kesitinde;	52
Şekil 4. 7. Tümör kontrol grubu, MRG ve histiyoloji karşılaştırılması.....	54
Şekil 4. 8. <i>Sham</i> cerrahi gruplarında MRG ve histiyoloji karşılaştırılması	55
Şekil 4. 9. Tümör + karşı hemisfere kök hücre verilen grupta MRG ve histiyoloji karşılaştırılması.....	56

Şekil 4. 10. Tümör + BOS'a kök hücre verilen grupta MRG ve histiyoloji karşılaştırılması.....	58
Şekil 4. 11. Tümör kontrol grubunda tümör alanından alınan kesitte floresan mikroskopi incelemesi	61
Şekil 4. 12. <i>Sham</i> cerrahi + karşı hemisfere kök hücre verilen gruptaki sıçandan alınan kesitte kök hücre enjeksiyonu yapılan bölgenin floresan mikroskop incelemesi.....	63
Şekil 4. 13. <i>Sham</i> cerrahi + BOS'a kök hücre verilen gruptaki sıçanda floresan mikroskop incelemesi.	65
Şekil 4. 14. Tümör + karşı hemisfere kök hücre verilen gruptaki sıçanda tümör alanının floresan mikroskop incelemesi.....	68
Şekil 4. 15. Tümör + BOS'a kök hücre verilen gruptaki sıçanda tümör alanının floresan mikroskop incelemesi.....	70

1.GİRİŞ

Santral sinir sistemi hastalıkları, örneğin demiyelizan ve malign hastalıklar, insan hayatını sosyal ve ekonomik olarak etkilemektedir. Kan beyin bariyeri birçok tedavinin hedef noktaya ulaşmasını engellemekte; hastaya verilen tedavinin etkinliğini azaltmakta veya tamamen önlemektedir.

Kök hücrelerin hasarlı beyin bölgesine (tümör veya demiyelizasyon) doğru göç ettikleri gösterilmiştir. Kök hücrelerin kan beyin bariyerini geçebiliyor olması, onların hastalıkların tedavisi için bir araç olarak kullanabileceklerini akla getirmektedir.

Özellikle yüksek dereceli malign beyin tümörlerinde, cerrahiden sonra, kalıntı tümör hücrelerine ve çevredeki invazyon ve/veya infiltrasyon gösteren hücrelere, kemoterapötik ajanların kan beyin bariyerini aşarak ulaşması zordur. İnvazyon ve infiltrasyon gösteren tümör hücrelerine kök hücre ile ulaşmak teorik olarak mümkündür.

Gliomlar erişkin kaynaklı primer beyin tümörlerinin yaklaşık %29'unu oluşturmaktadır. Glioblastome multiforme (GBM) gliomların %58'ini teşkil etmektedir. GBM yüksek derecede malign, diffüz infiltratif bir tümördür; düşük sağkalım ile seyretmektedir. Radikal cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi tedavileri ile ortalama sağkalım 14 ay civarındadır. Yüksek tedavi maliyetleri, hastaya, aileye ve devlete yük olmaktadır.

Radyoterapi tüm beyine etkili olmakta fakat birçok kemotöropatik ajan yüksek dereceli glial tümör tedavisinde kullanılamamaktadır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar insan kaynaklı kök hücrelerin (mezenşimal, nöronal veya embriyonel) tümör alanına göç edebildiğini göstermektedir. Aynı zamanda kök hücrelerin bir vektör olarak kullanılabileceğini ve

yüklenen citokin, enzim, metalloproteinaz, viral genom veya ilaçları tümöre taşıyabildikleri gösterilmiştir.

Biz bu çalışmada deneysel sıçan modelinde beyin tümörü oluşturduk. Tümör ekiminden 9 gün sonra sıçanlara kranyal magnetik rezonans görüntüleme yaptık. Takiben ayrı gruplarda sıçanlara tümörün karşı tarafındaki hemisferine ve diğer bir gruba sisterna magnaya kök hücre enjekte edildi. Tümör hücrelerini ve kök hücrelerini takip edebilmek için kök hücelere floresan nanoparça ile işaretlendi. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra tümör lokalizasyonundan ve uzak bölgelerden kesitler alındı. Alınan kesitlerde kök hücrelerin hemisfere enjeksiyonunda tümöre göç ettiği, sisterna magnaya enjeksiyonunda göç edemediği fakat her iki grupta tümör alanında inflammatuar yanıtı neden olduğu görüldü.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Beyin Tümörleri

Santral sinir sistemi (SSS) tümörlerinin görülme sıklığı yaklaşık 20.59/100.000'dir. Tüm kanserler içerisinde tümöre bağlı ölümlerin %9'unu bu sistemin tümörleri oluşturur. Geniş otopsi serilerinin sonuçlarına göre intrakranyal ve intravertebral tümörlerin görülme sıklığı %0.8-2 arasında değişmektedir. Hastane kayıtlarının ise %1'ini oluştururlar[1].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2007 sınıflamasında tüm SSS tümörleri 7 ana gruba bölünmüştür[2] (Tablo2.1).

Tablo 2.1. DSÖ SSS tümörleri ana grupları

Nöroepitelyal Doku tümörleri
Kranyal ve Paraspinal Sinirlerin Tümörleri
Meninkslerin Tümörleri
Lenfomalar ve Hematopoietik Tümörler
Germ Hücre Tümörleri
Sellar Bölgenin Tümörleri
Metastazlar

DSÖ nöroepitelyal doku tümörlerini 9 alt gruba ayırmıştır. (Tablo2.2)

Tablo 2.2. DSÖ Nöroepitelyal tümörlerin alt grupları.

Astrositik Tümörler
Oligodendrogial tümörler
Oligoastrositik tümörler
Ependimal tümörler
Koroid pleksus tümörleri
Diğer nöroepitelyal tümörler
Nöronal ve mikst nörogial tümörler
Pineal parankimal tümörler
Embriyonel tümörler

Nöroepitelyal tümörlerden astrositomlar, oligodendrogliomlar, oligoastrositomlar ve ependimomlar glial tümörler (gliomlar) olarak adlandırılır.

Gliomların en sık görülen tipi astrositik tümörlerdir. Her tümör için DSÖ derecelendirilmesivardır. Astrositomlar 4 dereceye ayrılır[3] (Tablo 3).

Santral sinir sistemi tümörleri en sık meninkslerde görülür (%35) ve bunu %15.8 ile glioblastoma takip eder. Meningiomların insidansı 100.000’de 7.49 iken nöroepitelyal tümörlerin insidansı 100.000’ de 6.6’dır, ki bunun % 54’ünü glioblastomalar oluşturmaktadır [1].

Tablo 2. 3. DSÖ Astrositik tümörler.

DSÖ Derece I	Subependimal dev hücreli astrositom Pilositik astrositom
DSÖ Derece II	Diffüz astrositom Pilomiksoid astrositom Pleomorfik ksantoastrositom Oligoastrositom
DSÖ Derece III	Anaplastik astrositom
DSÖ Derece IV	Glioblastoma Gliosarkom

Düşük dereceli astrositomlarda morbiditenin en büyük nedeni, yüksek dereceli astrositoma farklılaşabilmesidir. Özellikle 45 yaş üzerinde bu oran artmaktadır[4].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Derece I gliomlarda; örneğin pilositik astrositoma, cerrahi rezeksiyon kür sağlamaktadır. Oysa diffüz gliomlarda (DSÖ Derece II ve üstü) mümkün olduğunca güvenli sınırlarda en geniş rezeksiyon tedavinin birinci basamağıdırve cerrahi sonrası ek tedavi gerekir [5, 6].

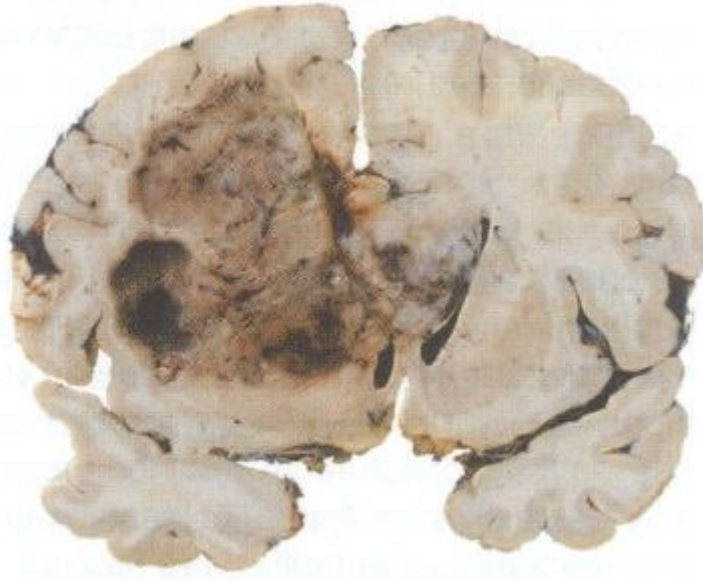
2.2.Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma multiforme (GBM) en sık görülen ve en malign beyin tümörüdür. Ortalama görülme yaşı 56 yaşdır (50-60 yaş). Erkeklerde görülme oranı bir miktar fazladır (K/E=2:3). Tüm gliomların yaklaşık %45-50’sini oluştururlar. Tanı konulmadan belirti verme süresi ortalama 5.4 aydır. GBM hemisferlerde baskın olmak üzere her bölgede görülebilir. GBM sırayla frontal (%40), temporal (%25), parietal (%25) yerleşimlerde görülür. Korpus kallosum aracılığı ile kısa sürede karşı

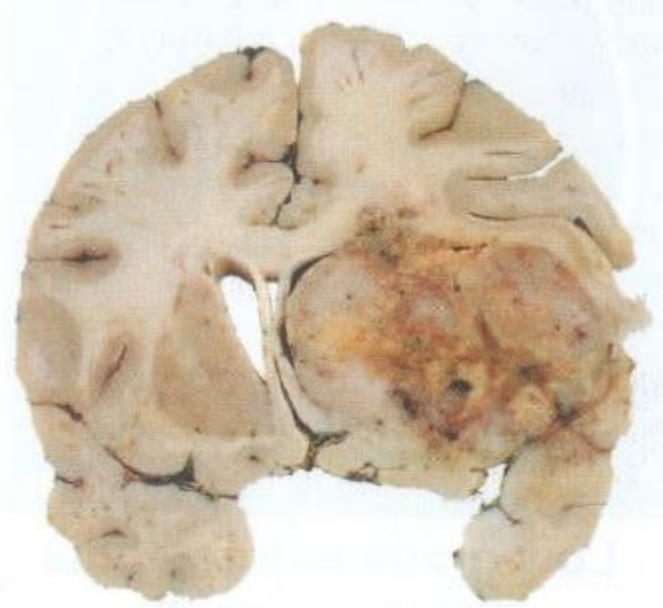
hemisfere geçer (şekil 2.1 ve şekil 2.3). Primer olarak kelebek tipi gliom tarzında korpus kallosumda yerleşebilir. Derin gri cevher çekirdeklerinden veya beyin sapından başlaması oldukça enderdir. Glioblastomada kafa içi basınç artışsemptomları(KİBAS) olarak baş ağrısı (%68), bulantı-kusma (%45) düşük dereceli gliomlardan daha sık olarak gözlenir. Mental durum değişiklikleri (%47),motor defisitler (%44) oldukça yaygın olarak saptanır. Epileptik nöbet ile başvuru yaklaşık %32'dir. Semptom süresi kısa olmasına rağmen başvuru anında kitle boyutu büyük olup, bir lobu tamamen kaplamış olabilir (şekil 2.2). Tümör içerisine geniş kanama olabilir ve hastalar buna bağlı olarak iskemik inmeye benzer bulgular ile başvurabilirler[7, 8].

2.2.1.Yayılım ve Metastaz

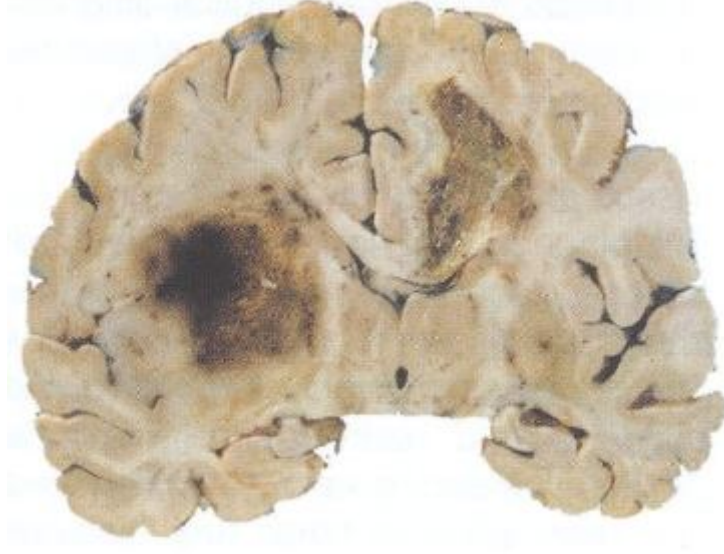
İnfiltratif yayılım diffüz astrositik tümörlerin bir özelliği olmasına rağmen, glioblastoma çevre beyin dokusuna hızlı invazyonu ile nam salmıştır. Korpus kallosumdan karşı hemisfere geçmesi (şekil 2.1), bilateral simetrik kelebek tümör görünümü oluşturması sık görülen bir özelliğidir. İnternal kapsülde, fornikte, optik radyasyoda ve anterior komissürde de yayılımı görülebilmektedir. Hızlı ve infiltratif büyüme göstermesine rağmen subaraknoid boşluğa invaze olmaya eğilim göstermez ve nadiren beyin omurilik sıvısı (BOS) yolu ile metastaz yapar. Hematojen yayılım ise oldukça nadirdir, ventrikülo-peritoneal şant yolu ile abdominal metastazı görülmüştür[2].



Şekil 2.1. Otopsi vakasında sol frontal lobda geniş yerleşmiş ve korpus kallosum yolu ile karşı hemisfere geçen glioblastoma [2].



Şekil 2. 2. Otopsi vakasında sağ frontal ve temporal yerleşimli, orta hat şiftine neden olan glioblastoma [2].



Şekil 2.3. Otopsi vakasında sol bazal ganglionda yerleşmiş ve karşı hemisfere yayılım göstermiş glioblastoma [2].

2.2.2.Histopatoloji

Histopatolojisinde nükleer atipi, sellüler pleomorfizm, mitoz, endotel proliferasyonu ile birlikte yeni damar oluşumu, nekroz alanları, bu nekroz alanlarına uzanan infiltrasyon odakları gözlenir. Nekroz ve endotel proliferasyonu olmazsa olmaz tanısal özelliğdir. Fakat tümör içerisindeki heterojenite stereotaktik biopsilerde tanıyı zorlaştırmaktadır[2,7].

Diğer bir histopatolojik özelliği migrasyon gösterdiği bölgede tümör hücrelerinin subpial bölgede nöronların çevresinde (satellitiosis) ve damarların çevresinde kümeleşmesidir[2].

2.3.Glioblastoma Tipleri

2.3.1.Küçük hücreli Glioblastoma

Küçük, yuvarlak şekilli, hiperkromatik nükleuslu, atipik, monoformik özellikler gösteren hücre topluluğundan oluşmaktadır. Yüksek proliferasyon gösterirler[2].

2.3.2.Oligodendroglioma Komponentli Glioblastoma

Oligodendrogliomayı anımsatan foliküller içerirler. Diğer glioblastomalı hastalara nazaran daha iyi sağkalımları vardır. Nekroz içerenlerde sağkalım daha kötüdür[2].

2.3.3.Dev Hücreli Glioblastoma

Büyük, çoklu çekirdekli olmaları özelliğidir, hücreler boyut ve pleomorfizm derecesinde olabilir. Görünüşlerine rağmen yüksek malignite ile ilgili değildir, hatta daha iyi prognostik özellikleri mevcuttur[2].

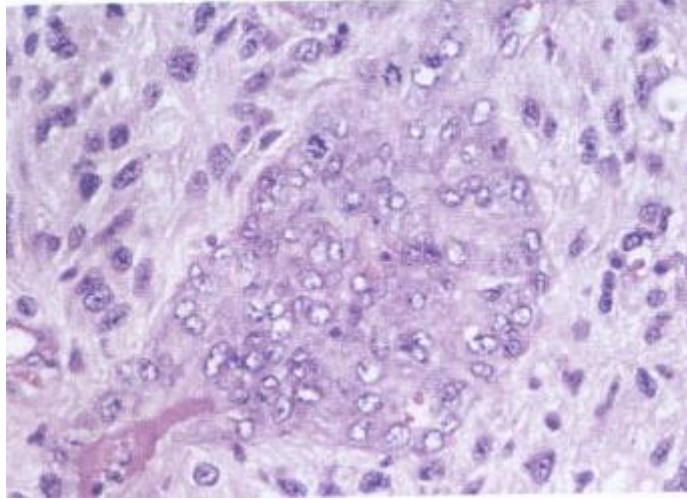
2.3.4.Gliosarkom

Hem glial, hem mezenşimal hücre diferensiyasyonu gösteren glioblastoma varyantıdır. Tüm glioblastomaların yaklaşık %2'sini oluşturur. Sarkomatöz komponenti yüksek tümörlerde (özellikle dural bağlantısı olanlarda) mikroskopik ve radyolojik görüntüsü meningiom ile karışabilir. Epitelyal metaplazi sıktır, kıkırdak, kemik, kas veya yağ dokusu oluşumları görülebilmektedir. Glioblastoma ile benzer sağkalım değerleri mevcuttur[2].

2.4. Glioblastoma Özellikleri

2.4.1. Mikrovasküler Proliferasyon

Nekroza ek olarak mikrovasküler proliferasyonun oluşu glioblastomanın histopatolojik olarak ayırıcı özelliğidir. Işık mikroskopunda, nekroz etrafında yumaklar şeklinde gözükür. Çok katmanlı mitotik epitel ve düz kas hücrelerinden oluşur (Şekil2.4). Vasküler tromboz sık olarak görülür, iskemik tümör nekrozu oluşmasında etken olduğu düşünülmektedir[2].



Şekil 2.4. Glioblastomada çoklu tabaka oluşturan mikrovasküler proliferasyon[2]

2.4.2.Proliferasyon

Proliferasyon glioblastomada mitozun değişik fazları ile birlikte nerdeyse her vakada gözükten bir özelliktir. Mitotik aktivite tümörler arasında çok değişken olabilmekte, hatta bir tümörde bölgesel heterojenite gösterebilmektedir. Ki-67/MIB-1 antikorları ile belirlenen bölünme oranı bölgesel değişiklikler göstermektedir. Ortalama değerler %15-20 civarındadır. Küçük, undifferensiyel, fuziform şekilli hücrelerde genelde yüksek proliferasyon saptanmaktadır, oysa gemistotik hücreler bulunan tümörlerde daha düşük saptanmakta. Proliferasyon indeksindeki geniş değerlere rağmen, proliferasyon ve sağkalım arasında belirgin bir ilişki bulunamamıştır[2].

2.4.3. Anjiogenez

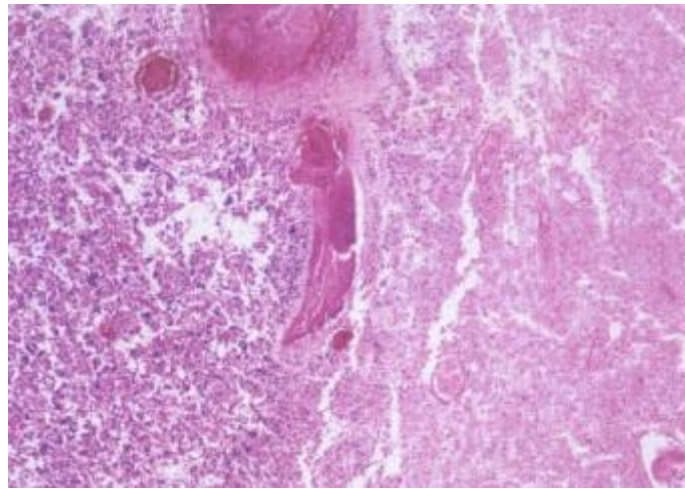
Glioblastoma insanda en iyi vaskülerize olan tümördür. Bunu birkaç yol ile sağlar: daha önce var olan damarların tümöre migrasyonu, klasik anjiogenez (var olan damarlardan tümöre yeni kapiller dallar vermesi) ve vaskülogenez (dolaşımda olan kemik iliği hücrelerinin perivasküler bölgeye yerleşerek damar oluşturması). Glioblastomada anjiogenezin en itici faktörün hipoksi olduğu düşünülmektedir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) glioblastomada damar disfonksiyonunun en önemli medyatörüdür; VEGF tümör anjiogenezini, damar geçirgenliğini (ödem) ve kemik iliği hücrelerinin perivasküler yerleşiminden

sorumludur. Epitel hücrelerine ilaveten düz kas hücreleri ve kemik ilgi hücreleri vasküler remodelling olayında görev alır. Görülen vasküler remodelling glioblastomanın histopatolojik ayırıcı özelliğidir[2].

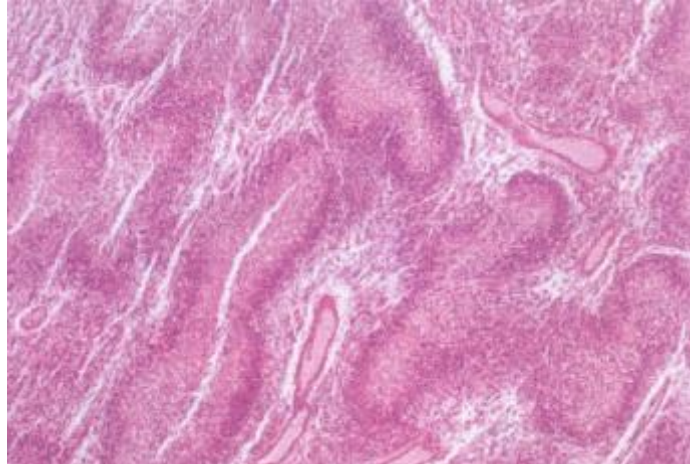
2.4.4. Nekroz

Tümör nekrozu glioblastomanın olmazsa olmaz özelliğidir ve varlığı diffüz astrositomda kötü prognozun en güçlü belirteçidir. Nekroz görüntüleme teknikleri ile kontrast tutmayan merkez olarak görülebilmektedir, ki bu merkez canlı olamayan tümör hücrelerinden oluşmakta olup tüm tümör hacminin %80'nini oluşturabilmektedir (Şekil 2.5). Nekroz içerisinde ender olarak canlı tümör ve damar yapıları görülebilmektedir. Nekrozun yetersiz kanlanmaya bağlı olarak iskemi sonucu geliştiği düşünülmektedir[2].

Mikroskop ile görülebilen bir diğer nekroz formu ise çoklu, küçük, düzensiz band şekilli hücrelerin oluşturduğu merkezin küçük, sıkı yerleşimli glial hücreler tarafından yalancı çok katlı şekilde sarılmasıdır (Şekil2.6). Bu nekroz glioblastomanın ayırıcı bir özelliği olup primer ve sekonder glioblastomada da gözükülebilmektedir[2].



Şekil 2. 5. Glioblastomada nekroz (sağda) ve tromboze damarlar[2].



Şekil 2.6. Çoklu, yalancı çok katlı nekroz odakları[2].

2.5. Histiogenez

Glioblastomanın hücresel kaynağı hep bir araştırma ve tartışma konusu olmuştur. Yıllarca düşünülmüştür ki glioblastomalar, astrosit markerlarını eksprese ettiğinden dolayı, astrosit kökenlidirler. Ancak yapılan kimyasal ve genetik çalışmaların ardından glioblastomanın prekürsör hücrelerden veya nöronal kök hücrelerden geliştiği görülmüştür. Nöronal kök hücrelerin subventriküler zonda yerleşmesi ve glioblastomaların çıkış noktasının bu bölge olması bu görüşü desteklemektedir. Dahada fazlası, glioblastoma içerisinde kök hücre davranışı gösteren hücreler izole edilmiştir. Bu hücrelerin kendilerini yenileme ve tümör oluşturma kabiliyetleri hayvan deneylerinde gösterilmiştir[2].

2.6. Tümör Genetiği

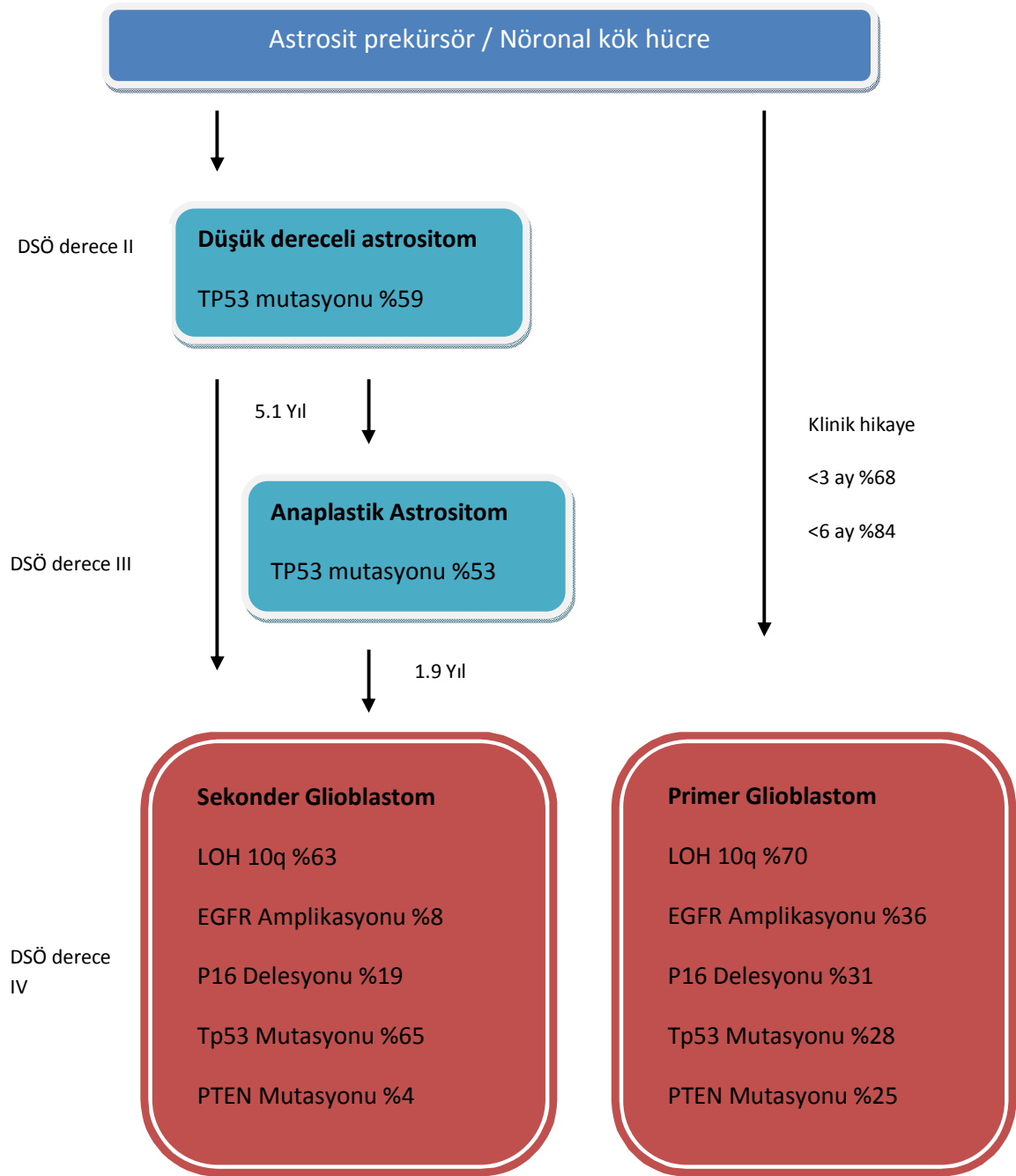
Kromozom çalışmaları sonucunda GBM için Tip I ve Tip II olmak üzere klinik prognozları da farklı olan iki ayrı antiteden bahsedilmektedir. Tip II GBM (Primer GBM veya GBM *de novo*)'de 10. Kromozomun uzun kolunda delesyon (LOH 10q) saptanmış olup, prognoz daha kötüdür. Ayrıca 7.kromozomda epidermal büyüme faktörü (EGFR) artışı [7p13-p12] söz konusudur. Primer GBM olgularında düşük dereceli gliom öyküsü yoktur. Oysa GBM Tip I (Sekonder GBM)'de astrositom, -anaplastik astrositom, -GBM gelişim zinciri izleyen etiyoloji söz

konusudur (Şekil2.7). GBM Tip I'de *P53*, *src* ve *10q* delesyonu tarzında kromozom anomalileri basamaklı seyretmektedir[3, 7].

Epidermal büyüme faktörü glioblastomada ekspresyon artışı en sık görülen gen olup %40 oranında görülmektedir. Sekonder glioblastomalarda enderdir. Bir EGFR varyantı olan EGFRvIII tümör spesifik olup anti tümör tedavide hedef olarak kullanılması umut vericidir[2, 9].

Onuncu kromozom kayıpları (LOH 10) glioblastomada görülen en sık genetik değişikliktir. Tüm kromozom kaybolabildiği gibi kısmi kayıplar da olmaktadır (*10p14*, *10q23* ve *10q25* en sık görülenleridir). Primer ve sekonder glioblastomada eşit oranda görülmektedir. Tam kayıpta ise primer glioblastoma görülmektedir.[2, 9]

Küçük hücreli glioblastomada sıklıkla EGFR amplifikasyonu, p16 delesyonu, PTEN mutasyonu (LOH 10 q23.3) ve LOH 10q beraber görülmektedir[2, 9].



Şekil 2.7. Glioblastoma gelişiminde genetik değişiklikler ve zamansal değişim [2, 9].

2.7. Prognostik Faktörler

Tanı anında yaşın 50'nin altında olması ve Karnofsky performans değerinin 70 ve üzeri olması iyi prognostik faktörlerdir. Deoksiribonükleik asiti (DNA) alkilleyici ajanlara karşı koruyan O⁶-metilguanin-transferaz (MGMT) mutasyonu kemoterapinin etkinliğini arttırarak sağkalımı arttırmaktadır [2].

GBM içerisinde nekrozun varlığı ve genişliği, 10. Kromozomda heterojenite kaybı (LOH 10) ve chitinase 3 like protein 1 (YKL 40) adlı görevi bilinmeyen proteinin artışı kötü prognostik faktörlerdir [2].

2.8. Radyoloji

Radyodiagnostik tetkiklerde genellikle santral nekroz kapsayan ve büyüyen kitle etkisi ile çevresinde yoğun halka tarzında yeni damar oluşumuna bağlı boyanma ile oldukça belirgin peritümöral ödem (vazojenik tipte) gösterir. Korona radiata, komissürler, kortiko-spinal traktüs ve özellikle korpus kallosum (kelebek tipi gliom) gibi beyaz cevher oluşumları yolu ile invazyon gösterir, hatta bu yollarda yeni tümör kitleleri oluşturarak multifokal glioblastoma görünümü oluşturabilir[2, 7].

2.9. Tedaviye Yanıt Mekanizmaları

Glioblastoma tedaviye oldukça dirençlidir. Agresif cerrahi rezeksiyon, radyoterapi (hedefe yönelik ve tüm beyin radyoterapi) ve tolere edilebilecek en yüksek doz kemoterapiye rağmen sağkalımda minimal artış olmaktadır. Tedaviye direnç bazı nedenlere bağlanır:

1- Kan beyin bariyerinin parsiyel de olsa korunmasına ve yüksek tümör intersitisyel basıncı nedeni ile düşük ilaç ulaşımı.

2- Tek nokta gen mutasyonları, heterozigosite kaybı, kromozom delesyonları ve tekrar ayarlanmaları, gen amplifikasyonları ve genetik susturulmalar sonucu oluşan genetik kararsızlığın birçok genotipik ve fenotipik heterojeniteye neden olması, oluşan hücre topluluklarının tek bir terapötik ajana yanıt vermemesi

3- Glioblastomanın invaziv özelliğinden dolayı korpus kallosumdan karşı hemisfere geçmesi, beyin sapına, spinal korda ve hatta beyinin diğer kan beyin bariyeri sağlam bölgelerine yayılması

4- Tümör prekürsör hücrelerin varlığı nedeniyle heterojen hücre topluluğu ve prekürsör hücrelerin terapotik ajanlara direnci

5- Kemoterapi ve radyoterapinin faydalanımını azaltan DNA tamir mekanizmalarının korunması

Bu nedenlerden dolayı tek bir hedefe yönelik terapinin etkili olamayacağı, birçok hedefe etki edebilecek ajanın daha etkin tedavi sağlayabileceği düşünülmektedir[2].

2.10. GBM'de Tedavi

Cerrahi kabul edilebilir morbidite sınırları içerisinde maksimum sınırlarda rezeksiyon uygulanmasıyla histopatolojik tanının elde edilmesinin yanı sıra histopatolojiden bağımsız olarak en iyi tedavi sonuçlarının elde edilmesinde altın standart olarak kabul edilir. Maksimum güvenli cerrahi (gross total rezeksiyon veya subtotal rezeksiyon) sonrası eş zamanlı günlük 75 mg/m² temozolomid (TMZ) ile konvansiyonel 60 Gy radyoterapi ve adjuvan 6 kür TMZ (150-200 mg/m²) uygulanmasıdır[8].

Ortalama sağkalım sadece radyoterapi alan hastalarda 12.1 ay, radyoterapi ile eşzamanlı TMZ ve adjuvan TMZ ile 14.6 ay olarak bulunmuştur[8].

Cerrahi rezeksiyon sınırının dışında invasiv gliom hücrelerinin olması, daha etkin tedaviyi sağlamak için terapotik ajanların oraya ulaşmasını gerektirmektedir[10]. SSS'ni koruyan KBB beyine küçük ve büyük birçok molekülün geçişine engel olarak tedavide büyük zorluklar çıkarmaktadır[11].

2.10.1. GBM'de Kemoterapi ve Hedefe Yönelik Tedaviler

2.10.1.1.Temozolomid

Temozolomid imidazotetrazin türevi, oral biyoyararlanımı yüksek 2. nesil alkilleyici ajandır. Gastrointestinal sistemden absorbe olduktan sonra santral sinir sistemi de dahil olmak üzere bütün vücut dokularına penetre olur ve spontan olarak aktif metaboliti olan 5-(3-metil triazen1-yl) imidazol-4-karboksamid'e (MTIC) dönüşür. En sık görülen yan etkisi trombositopeni olmakla birlikte bulantı, yorgunluk, baş ağrısı ve kabızlık gibi istenmeyen etkiler de gözlenebilir

Bir diğer alkilleyici ajan olan carmustine (BCNU; bis-chloroethylnitrosourea) gliomların tedavisinde kullanılmakla birlikte glioblastomada belirgin bir faydalanım saptanmamıştır[12].

2.10.1.2. DNA Tamir Enzim İnhibisyonu

Metil guanin metil transferaz (MGMT) daha önce bahsedildiği üzere TMZ'nin alkilleyici etkisini azaltmaktadır. O(6)-benzilguanin (O6-BG) sentezini durdurarak MGMT miktarını azaltmaktadır. Bu yolla TMZ etkinliği arttırılabilmektedir. Ancak ciddi toksisitesi mevcut olup, kullanıldığı zaman TMZ dozunu düşürmek gerekmektedir ki bu durumda TMZ etkisi de azalacaktır[12].

2.10.1.3.Anjiogenez İnhibitörleri

Neovaskülarizasyon (yeni damar oluşumu) malign tümörlerin karakteristik özelliklerinden biridir. Özellikle yüksek dereceli gliomlarda tümör kitlesinin önemli bir komponentini endotel hücreleri oluşturur. Malign glial tümörlerde glial ve endotelial hücreler yüzeylerinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi birçok proanjiojenik moleküller sergilerler. Bevacizumab VEGF'e karşı geliştirilmiş monoklonal bir antikordur. Yapılan faz II çalışmasında, bevacizumab ile kombine edilen standart tedavi (cerrahi + radyoterapi + TMZ) grubunda ortalama sağkalım 19.6 ay olarak bulunurken standart tedavi grubunda ortalama sağkalım 13.6 ay olarak

bulunmuştur. Nötropeni, trombositopeni, bitkinlik, venöz tromboz, hipertansiyon, proteinüri, gastrointestinal kanama, serobrovasküler inme gibi yan etkiler görülmüştür[13].

Bevacizumab günler içerisinde damarlar üzerindeki etkisi sayesinde ödemde ve kontrast geçişinde azalmaya neden olmaktadır. Magnetik rezonans görüntüleme yalancı antitümör efekti görülebilmektedir[12].

2.10.1.4. Matriks Metalloproteinaz (MMP) ve İntegrin İnhibitörü:

MMP enzimleri, tümör hücreleri ve peritümöral stromal hücreler tarafından sekrete edilir ve bazal membran invazyonu, anjiogenez, metastaz gibi onkolojik süreçlerde rol alırlar. MMP enzimleri malign glial hücreler tarafından sekrete edilir ve bunun derecesi tümörün proliferatif potansiyeli ile doğru orantılıdır. Temozolomid ile kombine MMP inhibitörü kullanılan bir çalışmada sonuçlar sadece temozolomid kullanımından çok farklı olmamakla birlikte önemli oranda kas ve eklem yakınmaları bildirilmiştir[14].

İntegrinler angiogenez ve hücre migrasyonunda rol oynayan moleküllerdir. Preklinik çalışmalarda normal beyin dokusunda bulunmayan bazı integrin moleküllerinin malign glial tümörlerde bulunduğu bildirilmiştir[15]. İntegrin inhibitörü Silengitid ile faz I çalışması yapılmış; 51 hastanın 2 tanesinde tam yanıt, 3 hastada kısmi yanıt saptanmış olup yan etki olarak trombositopeni, anoreksi, hiponatremi ve hipoglisemi görülmüştür [16].

2.10.1.5.Sinyal İleti Sistemi İnhibitörleri

Malign tümör hücreleri kontrolsüz proliferasyon, invazyon ve metastaz yapma gibi karakteristik özelliklere sahiptir. Bu süreç hücre yüzeyindeki reseptörlerden çakirdeki sorumlu genlere kadar iletilen bir seri olaylar sonrası ortaya çıkar. Hücre yüzeyinde yer alan epidermal büyüme faktörü (EGF) ve platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktör reseptörleri bu süreçte önemli rol alırlar. EGF reseptör tirozin kinaz inhibitörü ertolinib ile yapılan faz I ve faz II

çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir; EGF ekspresyonu yüksek olan hastalarda anlamlı sonuç alınırken, diğer hastalarda yanıt alınmamıştır [17].

2.10.1.6.Diferensiasyon Yapıcı Ajanlar

Vitamin A türevleri (retinoidler) nükleer reseptörlerle etkileşim yolu ile hücre farklılaşmasını uyarır proliferasyon ve onkogenekspresyonunu inhibe eder, hücreyel immunitiyi arttırmaları. Retinoidlerin glioblastoma hücre dizilerinde apoptozise yol açtığı da gösterilmiştir[18]. Ancak yapılan bir çalışmada yeni tanı konmuş glioblastoma multiforme hastalarında radyoterapi ile eşzamanlı Tmz ve sis-retinoik asit kullanımının sağkalıma faydası olmadığı gösterilmiştir[19].

2.10.1.7.Gen Tedavisi

Malign beyin tümörlerinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapide oldukça yol kat edilmesine rağmen halen istenen sağ kalım oranları elde edilebilmiş değildir. Bu da araştırmacıları farklı arayışlara itmektedir.

Gen tedavisi, tedavi amacıyla hastanın hücrelerine bir genetik materyalin (çoğunlukla bir DNA parçasının) transfer edilerek hastanın tedavi edilmesidir. Amaç mutant fenotipi DNA düzeyinde iyileştirerek, anormal geni düzeltmektir. DNA parçasının hücre içerisine sokulması işlemine “transfeksiyon” denir. Hücre içindeki gene ise transfer edilmiş gen anlamını taşıyan “transgen” adı verilir.

Tümör hücrelerinin herpes simplex virüsünün timidin kinaz (HSV-tk) geni ile transdüksiyonu takiben bir nükleotid analogu olan gansiklovir tedavisi sonucunda tümör hücrelerinin öldüğu ilk kez Molten tarafından gösterilmiştir [20].

2.10.1.8.İntihar Gen tedavisi (Enzim/önilaç sistemi)

Bu yaklaşım memeli organizmalarında bulunmayan bir enzimi kodlayan genin tümör içine sokulması ve ardından non-toksik bir ilacın sistemik olarak verilmesi esasına dayanır. Burada seçilen intihar geni normal memeli hücrelerinde

bulunmayan bir reaksiyonu katalize eder. Bu reaksiyon sonucu non-toksik ön-ilaç selektif olarak toksik formuna dönüşür ve hücrenin ölümü gerçekleşir.

İnhibitör genlerinden en iyi bilinen herpes simplex virüsünün timidin kinaz genidir. Normalde insan vücudunda bulunmayan HSV-tk geni, timidin kinaz enzimini kodlar. Timidin kinaz enzimi nükleotid analoglarından gansikloviri (GSV) fosforile gansiklovire çevirir.

Fosforile GSV çoğalan hücrelerin DNA zincirlerinin oluşumuna katılır. DNA polimeraz enziminin fonksiyonunu bloke ederek DNA zincirinin uzamasını durdurur. Bir başka deyişle, bu toksik GSV formu DNA zincir terminatörü olarak işlev görerek özellikle bölünen hücrelerin ölümüne neden olur.

Bu tedavi yönteminin çözülmesi gereken bazı problemleri vardır. Bunlar: özellikle derin yerleşimli invaziv tümörlerde yeter sayıda tümör hücresinin transfekte (hedef hücre içerisine virüsün girmesi) edilememesi ve kan beyin bariyerinin intakt olduğu hallerde yeterli konsantrasyonlarda GSV'nin bu engeli geçip tümör hücresine ulaşamamasıdır. Yüksek doz GSV-tk enjeksiyonunda hiponatremi, konfüzyon ve nöbet görülmüş olup sağkalımı uzun olan hastada iyi prognostik faktörler mevcut idi (genç yaş, oligoastroitomdan sekonder GBM oluşması)[21-23].

2.10.1.9. Antisens Tedavi

Bu tedavi yaklaşımı antisenslerin aracılık ettiği gen inhibisyonu esasına dayanır. Antisensler kısa DNA parçalarıdır. Bu yapılar, mRNA yapısına paralel (Watson-Crick baz çiftleri boyunca) hidrizedir. Antisensler mRNA'ya bağlanır, ribozomlara ulaşır onları bloke eder ve protein sentezini durdurur. Antisens DNA istenmeyen proteinlerin (örnek c-myc-onkoprotein gibi) mRNA'ları için spesifik olarak dizayn edilmiştir [24].

2.11.2. GBM Tedavi Zorlukları

2.11.2.1. Kan Beyin Bariyeri

Kan beyin bariyeri beyin (KBB) kapillerlerinin luminal yüzeyini oluşturan sıkı kavşaklar (tight junctions) ile birbirlerine bağlanan endotel hücreleri, onları saran perisit ve ekstrasellüler matriks proteinleri (kollajen, laminin ve heparan), en dışta ise astrositler ve perivasküler makrofajlardan meydana gelen bir engeldir.[25] Fenestrasyonların (endotel hücreleri arasında görülen boşluklar) bulunmaması, hücrelerarası sıkı kavşakların bulunması, pinositoz ve transitozun az olması, transsellüler transportun kısıtlı olması ve çok sayıda mitokondri bulunması kan beyin bariyerini periferik endotelden farklı kılan özellikleridir[25, 26].

KBB'nin özellikleri:

- a) Kan ile santral sinir sistemi (SSS) arasında besinlerin ve suda çözünen maddelerin serbest alışverişini kısıtlamak,
- b) Toksin, patojen ve vücudun kendi immün hücrelerinin geçişini engelleyerek SSS'ni hasar ve hastalıktan korumak,
- c) Özel taşıma sistemleri aracılığı ile spesifik moleküllerin taşınmasını sağlamak,
- d) Kan ve/veya beyin kaynaklı maddelerin modifikasyonu/metabolizasyonunu sağlamak olarak sıralanabilir[25].

Beyin kapillerinde değişim genellikle transsellüler yoldan olur. Pinostoz ve hücre içi geçiş yoktur. Bu nedenle sadece kapiller endotel membranından serbestçe diffüze olabilen, yağda çözünebilir ve küçük maddeler KBB'den pasif olarak geçebilir, ki bunlar da taşıyıcılar tarafından SSS dışına taşınmaktadırlar.[25] KBB'nin 12m² yüzey alanı ve toplamda 650 km uzunluğa sahip olmasına rağmen bariyer oldukça etkili olduğu için polar moleküller ve küçük iyonlar gibi yağda

çözünmeyen maddelerin KBB'den geçişi pratik olarak imkansızdır. Bu nedenle terapötik değeri oldukça yüksek olan çoğu ilaç sistemik olarak kullanılamamaktadır [25, 26].

2.11.2.2.Beyin Tümörlerine İlaç Ulaşımını Arttırma Yöntemleri

Yukarıda bahsedilen tedavi amaçlı kullanılan kemoterapi ve hedefe yönelik geliştirilmiş moleküller ve genlerin güncel kullanımda yer alamamasının en önemli nedenleri kan beyin bariyerinin olması ve glioblastomanın beyin içinde çok uzak bölgelere invazyon ve infiltrasyon yapabilme özellikleridir. Hem tümörün en yoğun olduğu bölgeye tedavi ajanlarını taşımak, hem de invazif hücrelere ulaşmak amaçlı çeşitli taşıyıcılar (vektörler) ve KBB geçebilecek yöntemler oluşturulmuştur.

Osmotik şok uygulaması (intrakarotid hiperosmolar mannitol veya bradikinin enjeksiyonu) beyin tümörlerinde KBB'ni bozarak SSS'ne kemoterapotik ajanlarının ulaşmasını sağlamaktadır. Fakat bu işlem nöbete veya inmeye neden olabilmekte ve sadece çok önemli durumlarda kullanılması önerilmektedir[27].

Geliştirilen insülin reseptör antikoları, Ox26 antikoları, lipozomlar, nanoparçlar ve dendrimerler üzerlerine yüklenen terapötik ajanları KBB geçerek SSS'ne taşıyabilmektedir. Fakat bu yöntemlerle terapötik ajanlar endotel hücrelerini geçebilse de, hedef hücreye ulaşabileceği garanti edilememektedir[25, 26].

Küçük moleküllerin hücre dışına çıkışını sağlayan taşıyıcıların verimliliğini azaltan ajanların kullanılması; verapamil, siklosporin A, quinidin, valsopodar ve biricodar tedavinin etkinliğini arttırabilmektedir[28].

İntra-arteryal ilaç enjeksiyonu, ilacın enjeksiyon sonrası SSS'ne yüksek konsantrasyonla ulaşmasına ve sistemik dolaşıma ulaşınca konsantrasyonunun düşmesine; yan etkilerinin azalması ilkesine dayanır. Fakat yapılan faz III çalışmasında anlamlı klinik veri elde edilememiştir. Bunun yanında kateter komplikasyonları (kanama, enfeksiyon, tromboz, tedaviye bağlı nörotoksite, lökoensefalopati, ipsilateral körlük ve kortikal nekroz) görülmüştür[12].

İntratekal kemoterapi uygulaması eksternal ventriküler drenaj veya Ommaya rezervuar aracılığı ile ventriküle tedavi verilmesi, veya lomber ponksiyon aracılığı ile beyin omurilik sıvısına (BOS) tedavi verilmesi esasına dayanır. Düşük ilaç miktarına rağmen SSS'de yüksek konsantrasyon ve düşük sistemik yan etki elde edilir. Ancak geçirilen cerrahiye bağlı oluşan skar ve tümörün oluşturduğu etki nedeni ile BOS döngüsü bozulmuş olabilmektedir. Nörotoksisite ve kimyasal menenjit görülen yan etkileridir[12].

Konveksiyona dayalı tedavi direk tümör içerisine veya ameliyat lojuna KBB'ni geçemeyen büyüklükteki moleküllerden oluşan terapötik ajanların enjeksiyonudur. Stereotaksik olarak da yapılabilir. Fakat yapılan faz III çalışmasında bir faydalanım görülmemiştir. Bu yöntemde sorun tedavinin sadece tümörün etrafındaki infiltrasyon alanı ile sınırlı kalınması ve komplikasyon olarak enfeksiyona yol açmasıdır[12].

2.11.2.3. Vektörler (taşıyıcı araçlar)

Vektörlerin büyük çoğunluğunu genetik mühendislerince laboratuvar ortamında hazırlanmış viruslar oluşturur. Bu amaçla en sık kullanılan virus adenovirus, herpes simplex virusu ve retroviruslardır. Bu virüslerin çoğalma yetenekleri alındıktan sonra genetik materyal virus DNA'sına eklenir. Herpes simplex virüsü birçok hücreyi enfekte eder ama nöronlardaki infeksiyonlarının uzun süreli olması nedeni ile glial tümörlerde tercih edilirler[21].

2.12. Kök Hücreler ve Genel Özellikleri

Embriyoda kök hücreler blastosit içerisinde yerleşmektedirler. Bu hücreler embriyonik kök hücreler olarak isimlendirilmektedir ve insan vücudundaki tüm hücre çeşitlerine dönüşme kapasitesine sahiptirler; bu yetenekleri pluripotent olarak isimlendirilmektedir. Gelişimin ileri aşamalarında embriyonik kök hücreler yetişkin kök hücrelere dönüşmektedirler, ki bu hücreler sınırlı sayıda hücre çeşidine dönüşebilme kapasitesine sahip olup bu yetenekleri multipotent olarak isimlendirilmektedir[29, 30].

2.12.1. Mezenşimal Kök Hücre Özellikleri

Vücut içerisinde birçok organ ve dokuda mevcuttur fakat en çok kemik iliğinde mononükleer hücrelerle birlikte bulunurlar. Mezenşimal kök hücreler hemapoetik ve epitelyal yüzey antijenlerine sahip değildirler, buldukları dokuya bağlıdır ve CD29, CD44, CD51, CD73, CD90, CD105, CD166 ve Stro-1 yüzey antijenlerini değişik kombinasyonlarda taşırlar. Bir dokuya özgü belli bir antijen kombinasyonu saptanmamıştır, bu da alınan dokudan izole edilmelerini ve tanımlanmalarını zorlaştırmaktadır. Fakat bir progenitör hücre olarak kemik, kırık ve yağ dokusu gibi birçok hücre hattına farklılaşma özellikleri vardır. En kolay kemik iliği aspirasyonu ile edilebilmektedirler, in vitro ortamda hücre kültürü kolay olup immümodülatör özelliklere sahiptirler; T lenfosit proliferasyonu ve aktivitesini baskılayabilirler, dendritic-cell, B-cell ve natural killer fonksiyonlarına engel olabilirler[31-34], ve hatta travma veya tümör bölgelerinden gelen sinyallere göç etme potansiyelleri mevcuttur[35, 36].

2.12.2. Yara iyileşmesinde MSC'nin Rölü

Mezenşimal kök hücreler ömürlerinin büyük kısmını, bir progenitör hücre olarak, istirahat halinde geçirirler. Fakat bir travma anında, MSC'lerin göç özellikleri ortaya çıkar ve tercihen travma bölgesine doğru göç ederler. Örnek olarak, sıçan MSC'sinin iskemik kardiyak hasar ve iskemik beyin hasarı sonrası iskemik dokuya göç ettiği ve bölgede kaldığı gösterilmiştir[37, 38]. Aynı zamanda allogreft organ reddi sahasına ve akciğer hasarına göç edebilmektedir[39, 40]. Bu bölgelere göç ettikten sonra MSC'ler çoğalmakta, yetişkin hücrelere farklılaşmakta, doku onarımında görev almakta ve doku tamiri için ek uyaranlar oluşturmaktadırlar[35].

2.12.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Tümör Üzerine Etkisi

MSC'lerin tümör oluşumu, yaşaması, büyümesi ve metastaz üzerine etkilerini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Djouad ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fare deneysel melanom modelin fareden elde edilen MSC'lerin lokal ve uzak bölgeye enjeksiyonu sonucunda tümör büyümesinin arttığı görülmüştür[41]. Başka bir grup,

meme kanseri modelinde MSC uygulanması sonrası tümör büyümesini etkilemeden metastaz oranının arttığını göstermiştir[42]. Daha da fazlası; midede helicobakter enfeksiyonu sonrası oluşan kronik enflamasyona uygulanan kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin metaplazi ve displazi gösterdikleri, mide tümörü hücrelerine farklılaşma potensiyeli olduğu saptanmıştır[43].

Yukarıda bahsedilenlerin aksine Maestroni ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Lewis akciğer karsinomu ve B16 melanom fare modellerinde fare kemik iliği kök hücre uygulamasından sonra hem tümör büyüklüğünde hem de metastaz oranında düşme saptamıştır[44]. Buna ek olarak sıçan kolon kanseri modelinde MSC'lerin tümör büyümesini durdurduğu gösterilmiştir[45]. İnflamasyonu ve vasküleritesi yüksek bir tümör olan Kaposi sarkomunda, fare kaposi sarkomu modelinde, insan kaynaklı MSC'lerin anti-tümöral yanıt oluşturduğu bildirilmiştir[46].

Mezenşimal kök hücrelerin tümör ve endotel hücrelerine etki eden anjiogenez arttıran büyüme faktörleri salgılayarak (VEGF, FGF[fibroblast growth factor], PDGF [platelet derived growth factor]) yeni damar oluşumunu desteklediği görülmektedir. Aynı zamanda MSC'ler endotel hücrelerine veya perisitlere farklılaşabilmektedirler, böylece tümörün kanlanması artmaktadır [35, 47, 48].

Tümörler büyüdükçe, fibrovaküler yapıya ve matriks oluşumuna gerek duyarlar, ki bu da tümör ile ilişkili fibroblastlar (TAF) tarafından yapılmaktadır. Tümör ile ilişkili fibroblastlar matriks oluşumu, anjiogenez ve hücre büyümesinin yükseltilmesinden sorumlu tutulmaktadır. Mezenşimal kök hücrelerin TAF'ların öncüsü oldukları düşünülmektedir. Bu bilgiler kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin tümör oluşumunda görev aldıklarını desteklemektedir [35, 48].

2.12.4. Kök Hücre Göçü Mekanizmaları

Mezenşimal kök hücrelerin yara, travma ve tümör bölgelerine göç ettiği bilinmekle beraber bunu hangi mekanizmalar ile yaptığı net olarak bilinmemektedir. Lökosit göçünü sağladığı gibi, kök hücre göçünü de inflamasyon sinyallerinin

sağladığı düşünülmektedir. Bu nedenden dolayı tümörler iyileşmeyen yaralara benzetilmektedir [35, 49]. İnsulin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) mezenşimal kök hücre göçünü, sitokin reseptörlerini arttırmaktadır [50].

Kök hücrelerin glioma hücrelerine çağrılmasının moleküler temellerini araştıran çalışmalar yapılmıştır; interleukin-8 (IL-8) ve reseptörü *chemokine receptor 1 (CXCR1)*[51], *stromal-derived factor-1/CXCR4 (SDF-1/CXCR4)* salgılanmasını[52], *platelet-derived growth factor BB (PDGFBB) intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)* ekspresyonunu[53, 54], *macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) stromalcell-derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha)*[55], *tumor necrosis factor alpha (TNF- α)*[56], *vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)* [57], *vascular endothelial growth factor VEGF VCAM-1 ekspresyonunu* artırarak[58] kök hücreleri glioma hücrelerine çekmektedir.

Aynı zamanda Klopp ve arkadaşları tümöre uygulanan radyasyon tedavisinin inflamasyon sinyallerini arttırarak kök hücre göçünün arttığını göstermiştir [59].

Gliomaya yönelen kök hücrelere sitokinler, virüsler, matriks metalloproteinazları, antikolar, enzim/önilaç bileşenler yüklenerek yapılan çalışmalarda sonuçlar umut verici bulunmuştur. Multiple skleroz, ataksik telenjektazi, iskemik inme, amiyotrofik lateral skleroz gibi hastalıklarda da kullanılabilirler[60].

2.12.5. Mezenşimal Kök Hücrelerin Vektör Olarak Kullanılması

Mezenşimal kök hücrelerin tümör üzerine baskılayıcı veya destekleyici etkileri ne olursa olsun, MSC'lerin tümöre yönelebildiği belirlenmiştir. Bu özellikleri de kanser tedavisinde tümör hücrelerine yönelik ajanların taşınmasında bir vektör olarak kullanılacakları fikrini doğurmaktadır[35].

İn-vitro ortamda kanser tedavi amaçlı sayısız terapötik ajan ve molekül denenmiştir. Fakat, tedavideki en büyük engel terapötik ajanı normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerine ulaştırmak olarak görülmektedir. Daha da fazlası,

sistemik uygulanan ajanlar tümör hücrelerine ulaşmadan aktivitelerini kaybedebilme veya vücuttan atılarak konsantrasyonlarının düşme riski vardır. Mezenşimal kök hücrelerin tümöre yönelmeleri keşfedildikten sonra bu engellerin çözümü için gelecek vaat etmektedir. Mezenşimal kök hücrelerin potansiyel avantajları şu şekildedir:

1- Mezenşimal kök hücrelerintümöre yönelimi birçok kanser türünde gösterilmiş olup bu özelliği her invazif patern gösteren kanser türünde var olacağı düşünülmektedir. Dolayısı ile birçok kanser türünde kullanılacaklardır.

2- Kemik iliğinden kolay elde edilebilmektedirler ve kolayca hücre kültüründe çoğaltılabilmektedirler.

3- Genetik olarak modifiye edilebilirler ve istenilen gen ürününü üretebilirler.

4- Hücre kültüründe çoğaltıldıktan sonra tümöre yönlenebilirler ve çevresini sarabilirler.

5- Yüksek metabolik aktivite ve moleküler yapıları sayesinde yeterli terapötik ajan sentezi yapabilirler[35].

İnterferon β (IFN- β) tümör büyümesini inhibe eden bir ajandır ve sistemik enjeksiyon sonrası hızlıca yıkılmaktadır[61]. Deneysel fare akciğer melanom modelinde kemik iliği kaynaklı, genetik olarak INF- β ile modifiye edilmiş MSC'lerin tümöre göç ettiği ve tümör üzerine inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir[62].

Genetik olarak değiştirilmiş bağ dokusu hücreleri, MSC'ler gibi, bir taşıyıcı olarak kullanılabilir. Örneğin Hurwitz ve arkadaşları köpeğe genetik modifiye kemik iliği hücreleri enjekte ederek büyüme hormonu ve faktör IX üretmiştir[63]. Evans ve arkadaşları insanda artrit tedavisinde interlökin-1 reseptör antagonisti ekspresye eden fibroblastları kullanmışlar[64].

2.12.6. GBM Tedavisinde Kök Hücrelerin Kullanılması

Aboody ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada nöronal kaynaklı kök hücrelerin *in vivo* ve *in vitro* ortamda tümör hücrelerine göç ettiğini göstermiştir, bu da kök hücrelerin tedavide bir taşıyıcı olarak kullanılabileceğinin önünü açmıştır [65].

Nakamizo ve arkadaşları insan mezenşimal kaynaklı kök hücrelerin (hMSC), immün süprese farelerde oluşturulan beyin tümörü modelinde, kan dolaşımı ve beyin enjeksiyonu sonrası tümöre doğru göç ettiğini göstermiştir. Bunu tümör hücrelerinden salınan büyüme faktörlerine (PDGF-BB, EGF, FGF ve VEGF) bağlamış, yaptığı *in vitro* çalışmada PDGF-BB'nin göçe en fazla etkisinin olduğunu göstermiştir. Tümörlü farelere hMSC-IFN- β lokal ve sistemik enjeksiyonunda sağkalımın arttığını görmüştür[66].

Yukardaki faktörlere ek olarak IL-8, TGF β , TNF α , neurotroptin-3, IL-1 β ve SDF-1'in de MSC'lerin göçüne etkisi olduğu bildirilmiştir.[67]

Bexell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sıçan kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin 3 ayrı çeşit Fisher rat gliomunda göçü izlenmiştir. Tümör komşuluğuna enjeksiyonda kök hücrelerin glioma ulaştıkları, fakat uzak enjeksiyonlarda tümöre ulaşamadıkları izlenmiştir. Yapılan kısmi rezeksiyon sonrası enjeksiyonlarda daha yoğun kök hücre göçü izlenmiş; bu da artmış büyüme faktörü ve sitokin salınımına bağlanmıştır. Normal beyin enjeksiyonlarında ise kök hücre göçü izlenmemiş olup, yapılan karaciğer, dalak ve lenf nodu kesitlerinde kök hücre saptanmamıştır, kök hücrelerde proliferasyon ve teratojenite görülmemiştir[68].

Mezenşimal kök hücreler, asıl kaynağı olan kemik iliği dışında retinadan, yağ dokusundan, karaciğerden, iç kulaktan, gastrik epitelden, tendondan, sinovial membrandan, amniyotik sıvıdan, plasentadan, umbilikal kordan, kıl folikülünden ve diğten de izole edilebilmektedirler. Mezenşimal kök hücre immün fenotipinde MHC I⁺, MHC II⁻, CD40⁻, CD80⁻ ve CD86⁻ olduğundan dolayı bağışıklık dışı olarak kabul edilebilir ve transplantasyon sonrası host immüsupresyonu gerektirmez[69].

Subventriküler zonda ve hipokampus dentat girusta nöronal kök hücre olduğu gösterilmiş ve tamir süreçlerinde potansiyel olarak rol alabileceği literatürde bildirilmiştir [70-72]. Periventriküler alanda yerleşmiş kök hücreler gliom oluşumu için potansiyel bir kaynak oluşturmaktadır [73]. Ancak daha önce yapılan çalışmalarda dışarıdan verilen ve deneklerin kendisine ait olan kök hücreler arasında ayırım yapılamamıştır. Bu çalışmada, sıçan beynine enjekte edeceğimiz insan kaynaklı mezanşim kök hücreleri flöresan nanoparça ile işaretlenerek sıçanda bulunan nöronal kök hücrelerden ve kendi kemik iliğinden göç edebilecek mezenşimal kök hücrelerden ayırt edilecektir.

2.13. Deney Hayvanı Olarak Sıçan Seçilmesi

Sıçan beyninin fareye nazaran daha büyük olması (1200mg karşı 400 mg), ölüme kadar geçen sürede daha büyük tümör boyutlarına ulaşılması; dolayısıyla daha iyi cerrahi, görüntüleme ve tedavi teknikleri uygulanması, literatürde daha geniş bilgi olması, yapılacak deneyde sıçan kullanılmasının avantajlarıdır. Sıçanların daha pahalı olması, beyin tümörü modellerinin genetik mühendisliğinin zor olması ve sayıca azlığı ise dezavantajdır. Bilmek gerekir ki hiçbir hayvan beyin tümörü modeli Glioblastoma multiformeyi (GBM) birebir taklit edememektedir[74].

2.13.1. RG2 Sıçan Gliomu

RG2 sıçan gliomu hamile fischer sıçana N-etil-nitrozüre enjeksiyonu yapılarak oluşturulmuştur[75]. Yüksek derecede invazyon göstermesi GBM'yi iyi temsil eden bir model olmasını sağlamıştır[76]. Genetik çalışmalar IGF-1, ras, PDGFβ, Erb3/HER3 mRNA ve siklin D2 ekspresyonunun arttığını göstermiştir [77].

2.13.2. Deney Hayvanlarına Magnetik Rezonans Görüntüleme Yapılması

Magnetik rezonans görüntüleme (MRG) iyonizan radyasyon kullanmadan yüksek rezolisyonlu anatomik görüntülemeler elde etmemizi sağlar. MRG bir örneğe veya hastaya iyi ayarlanmış radyofrekans vererek ¹H protonlarının relaksasyonunun

izlenmesine dayanır. Aynı zamanda MRG proton yoğunluğunu, difüzyon sürecini görüntülemeye de kullanılır[78]. Faucher ve arkadaşları glioblastoma hücrelerini bir kontrast ajan olan gadolinium oksit ile işaretlemiş ve tavuk embriyo modelinde kontrast tutan tümörü görüntülemiştir [78].

Yaptığımız çalışmada tümör ekiminden sonra MRG yapılarak tümör oluşumu gösterilmiştir. Bu çalışma ülkemizde deney hayvanlarının magnetik rezonans görüntülemelerinin yapıldığı 2. çalışmadır[79]. Tümör oluşumunu invazif olmayan bir yöntemle teyit etmek ve tedavi/vektör vermek hayvan beyin tümörü modelinde önemli bir gelişmedir.

3.YÖNTEM ve GEREÇLER

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3. 1. Kullanılan kimyasal maddeler

DMEM F12 (Lonza)	BioWhittaker™ Cell Culture Media products, İsviçre
“Dulbecco’s Modified Eagle’s/ Ham’s F12” (DMEM/Ham’s F12)(1:1)	Biochrom AG, Almanya
Etanol (%100)	Merck, Almanya
Fetal sığır serumu (FBS)	Biochrom AG, Almanya
Floresan Nanoparça	Bilkent Üni. Kimya Bölümü
Formaldehit	Vural Medikal, Türkiye
Hoechst	Molecular Probes, ABD
Ketamin %10 10ml flakon	Richterpharma AG Avusturya
Ksilazin %2 50 ml flakon	Alfasan International BV Hollanda
L-glutamin	Biochrom AG, Almanya
MTT	Sigma, ABD
Penisilin/Streptomisin (10000U/10000µg/ml)	Biochrom AG, Almanya
Tripsin-EDTA çözeltisi	Biochrom AG, Almanya
Xylene	Merck, Almanya

3.1.2. Kullanılan Aletler

Tablo 3. 2. Kullanılan aletler

Dijjal Kamera	Nikon DXM 1200, Japonya
Floresan Mikroskop	Nikon Eclipse E 600, Japonya
Hassas Terazî	Shimadzu AX 200, Japonya
Hamiltom 10µL Enjektör	Hamilton Messtechnik GmbH, Almanya
Hücre Kültürü için Flask	Greiner bio-one, Almanya
Hücre Kültür Kuyucukları	Greiner bio-one, Almanya
Işık Mikroskobu	Leica, Almanya
İnkübatör	Sanyo MCO-18AIC, Japonya
Laminar Hava Akımlı Kültür Kabini	BHG 2000 S/D, D.: Grou Company, Almanya
Menbran Filtre	Millipore, ABD
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
pH metre	Sartorius, Almanya
Santrifüj, soğutmalı, değişken rotorlu	Hermle Z383 K, Almanya
Steril Pipet	Greiner bio-one, Almanya
Steril Santrifüj Tüpü	Greiner bio-one, Almanya
Surgical Blade, Braun	Braun, Almanya
Rat stereotaxic standart	Stoelting, Chicago, ABD
Ultra Saf Su Sistemi	Şimplicity 185-Millipore, ABD

3.1.3. Kullanılan Yazılımlar

Tablo 3. 3. Kullanılan Yazılımlar

Mikroskop dijital kamera yazılımı	Nikon Advanced Research 3.2, Japonya
-----------------------------------	---

3.2. In Vivo Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar ve Anestezi

In vivo çalışmaların gerçekleştirilmesi için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2012/48 nolu izin alınmıştır. Çalışmalarda Yemişçi ve ark. [80] ve Gelenetky ve ark. [81] tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için 48 adet Wistar dişi sıçan (250-300 gr.) üzerinde çalışılmıştır. Sıçanlara anestezi amacı ile 80 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin karışımı intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Sıçanlar standart kafeslerde ve standart şartlarda tutulmuştur.

3.3. Sıçanlarda Beyin Tümörü Oluşturulması

Sıçanlarda beyin tümörü oluşturulması amacıyla Yemişçi ve ark. [80] ve Gelenetky ve ark. [81] tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için öncelikle tümör ekiminde kullanılacak olan RG2 hücreleri hazırlanmıştır. RG2 hücreleri için kültür ortamı olarak 37⁰C de %5 CO₂'de glukoz (4.5 g.L⁻¹), fetal sığır serumu (FBS) (%10), L-glutamin (0.584 g.L⁻¹), sodyum pirüvat (0.11 g.L⁻¹), penisilin G sodyum (50 ünite.mL⁻¹) ve streptomisin sülfat (50µg.ml⁻¹) içeren "Dulbecco's Modified Eagle's" (DMEM) kullanılmıştır. Hücreler deney öncesi tripsin-EDTA çözeltisi (%0.002 tripsin-%0.005 EDTA) ile 2 dakika muamele edilerek hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonuna kültür ortamı ilave edilerek 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve taze kültür ortamı ilave edildikten sonra mikroskopta sayımı yapılmış ve 5µL'de 50x10⁴ RG2 hücresi olacak şekilde numuneler ekim için hazırlanmıştır.

Sıçanlara beyin tümörü oluşturmak için, öncelikle sıçanlar stereotaktik çerçeveye (Lab Standard Stereotaxic, Stoelting, Chicago, IL) yerleştirilmiştir. Kafa derisi açıldıktan sonra, 50×10^4 RG2 hücresi içeren $5 \mu\text{L}$ hücre süspansiyonu, $10 \mu\text{L}$ 'lik Hamilton cam şırınga (Hamilton, 32G, 700 seri RN) kullanılarak bregmanın 4mm lateral, 2mm posterior lokalizasyonda 6mm derinliğe sağ striatuma enjekte edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Stereotaksi cihazında sıçan beyine tümör hücreci enjekte edilmesi.

Sıçanlara RG2 hücre implantasyonunun ilk gününden itibaren günlük aktivitelerinin ve genel durumlarının takibi amacı ile gözlem altına alınmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonrasında etrafı ile ilgileri kesilen, kendi kendilerine beslenemeyen, gözleri kızaran ve dışarıdan verilen uyarılara yanıt vermeyen sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

3.4. Dental Pulp Kök Hücre (DPKH) İzolasyonu ve Hücrelerin Nanoparça ile İşaretlenmesi

Hastalardan alınan 20'lik dişler tarafımızdan kök hücre izolasyonu için kullanıldı. Dişe alındığı gün müdahale etmek önemlidir, böyle olmadığı takdirde diş

pulpa dokusu bozulmaktadır. DPKH izolasyonu için alınan dişler kırılıp içindeki pulpa dokusu çıkarıldı ve %1 penisilin-streptomisin (Hyclone) içeren DMEM F12 (Lonza) ile bir tüpün içine konuldu. Daha sonra uygun bir makas yardımıyla doku çok küçük parçalara bölündü. Fiziksel yöntemlerle parçalanmış dokuyu daha fazla parçalamak için 2 mg/ml collagenasa/ dispase eklendi ve iyice karıştırıldı. Örnek 37 derecede yarım saat bekletildi. Enzim ve makas yardımıyla parçalanmış doku daha sonra 1 dakika 500 rpmde santrifüj edildi. Elde edilen pelet DMEM F12 ile 5% CO₂ ile 37⁰C de kültür edildi. Çökeltinin üstünde yüzen kısmı da bazen DPKH verebilir bu yüzden DMEM F12 ile kültür edilebilir. Hücre medyası haftada 3 kere değiştirildi.

Hücreler yüzeyi alanını kaplayacak duruma geldiklerinde besi ortamı, içinde 1:4 oranında nano parçacık bulunan besi ortamıyla değiştirildi ve 5% CO₂ ile 37⁰C de 24 saat kültür edildi. 24 saatin sonunda hücreler PBS ile yıkanıp ardından tripsinle toplandı ve sayıldı. Hücreler farelere verilmek üzere 5µl PBS'te 5x10⁶ hücre olacak şekilde hazırlandı.[82-84]

3.5. VP-6 Nanoparçacığı

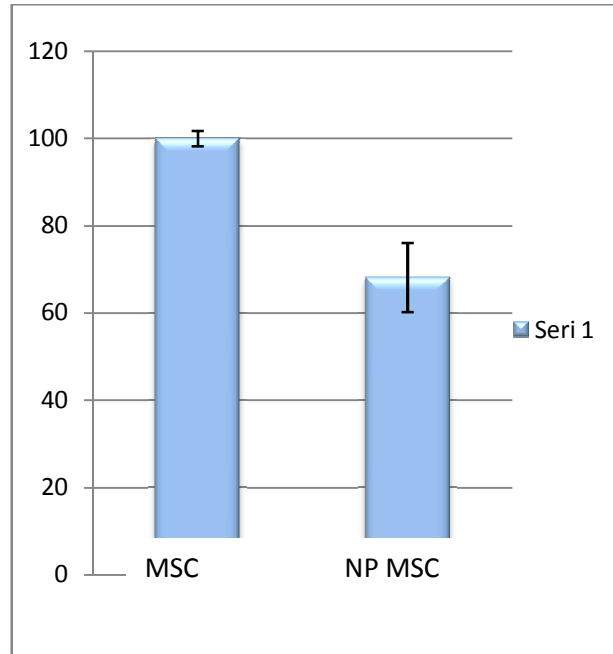
Polymer bağlı suda çözünebilen nanoparçacıklar hücre görüntülenmesi ve takibi için kullanılan yeni tür probe türüdür. V6-Nanoparçacıklar güçlü bir parlaklık, artmış *photostability*, geniş bir floresans aralığı sağlarken hücreler için kuantum *dot*'lara ve öteki boyalara göre daha az zararlıdır, bundan dolayı V6-nanoparçacıkları var olan diğer metaryellerin önüne çıkarmaktadır. Elimizdeki polymer bağlı nanoparçacık floresan yaymakta ve böylece işaretlenen mesenkimal kök hücrelerin enjekte edildiği canlıda takibini sağlamaktadır. Bu kopolymer Suziki Coupling polimerizasyon tekniği kullanılarak sentezlenmiş ve çökertme yöntemiyle nanoparçacığa dönüştürülmüştür.

Bu nanoparça Bilkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü tarafından hazırlanmıştır.

3.6. Hücre Canlılığının MTT Testi ile Değerlendirilmesi

Çoğalma ve sitotoksite çalışmalarında yaşayan hücre sayısının tespiti için kullanılan, enzim aktivitesine dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem canlı hücrelerin renksiz yada az renkli MTT (3,(4,5-d,metiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromid)'yi, renkli formozan türevlerine dönüştürülmesi esasına dayanır. Metod ilk kez 1983 yılında Mossman tarafından immünolojik çalışmalar için hızlı bir kolorimetrik yöntem olarak tanımlanmıştır[85]. MTT (sarı) mitokondriyal süksinik dehidrogenaz enzimi tarafından çoğalan hücrelerde formazana (kırmızı-mor) dönüşür. Sadece indirgenen şekil (formazan) spektrofotometrik olarak ölçülebilir, bu nedenle orijinal boya ile herhangi bir girişim olmaz[80].

24 saat nanoparçacık verilmiş ve verilmemiş hücreler 96 kuyucuklu tabağa ekildi. Daha sonra Roche MTT Kit Assay kullanılarak MTT yapıldı ve hücrelerin yaşama aktivitelerine bakıldı. İstatistik yapmak için her grup için bu işlem 3 kere tekrarlandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kök hücreler ve nanoparça işaretli kök hücrelerin 24 saatlik MTT testi.

Nanoparça 50 ml'de 2 mg, $2.63 \times 10^{-3} \text{M}$ konsantrasyonunda 24 saat boyunca hücre kültüründe bekletildi. Bunun sonucunda işaretlenmiş hücrelerin %68'i yaşamsal aktivitelere sahip olduğu gösterildi.

3.7. Manyetik Rezonans Görüntüleme

İn vivo deneylerde tümör oluşumunun tespiti ve alan olarak büyüklüğünün hesaplanması için Manyetik Rezonans Görüntüleme kullanılmıştır. Bunun için Bilkent Üniversitesi "Ulusal Manyetik Rezonans Araştırma Merkezi (UMRAM)"nde bulunan MR görüntüleme cihazı (3 Tesla, Magnetom Trio, Siemens, Almanya [slew rate:200mT/m/ms, maksimum amplitude 45mT/m] kullanılmıştır (Şekil3.3).

Tümör hücresi ekimini takiben 9. ve 14. günde sıçanlara MR görüntülemesi yapılarak tümör oluşumunun tespiti ve alan ölçümü yapılmıştır. Görüntüleme sırasında sıçanlara anestezi uygulanmış olup, küçük FOV ile görüntü elde edebilmek için bu çalışmada kullanılmak üzere UMRAM'da küçük sarmallar (koil) geliştirilmiş ve kullanılmıştır (Şekil3.4).

MR görüntülemesi için, aksiyel düzlemde çekim sayısı (NEX: 5), T2A (TR/TE 3900/100ms) 2mm'lik görüntüler elde edilmiştir. Görüntünün değerlendirilmesi ve tümör alanının tespiti Hacettepe Üniversitesi Radyoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Ölçümler tümörün en büyük görüldüğü kesit üzerinde en büyük çaplar hesaplanarak yapılmıştır.



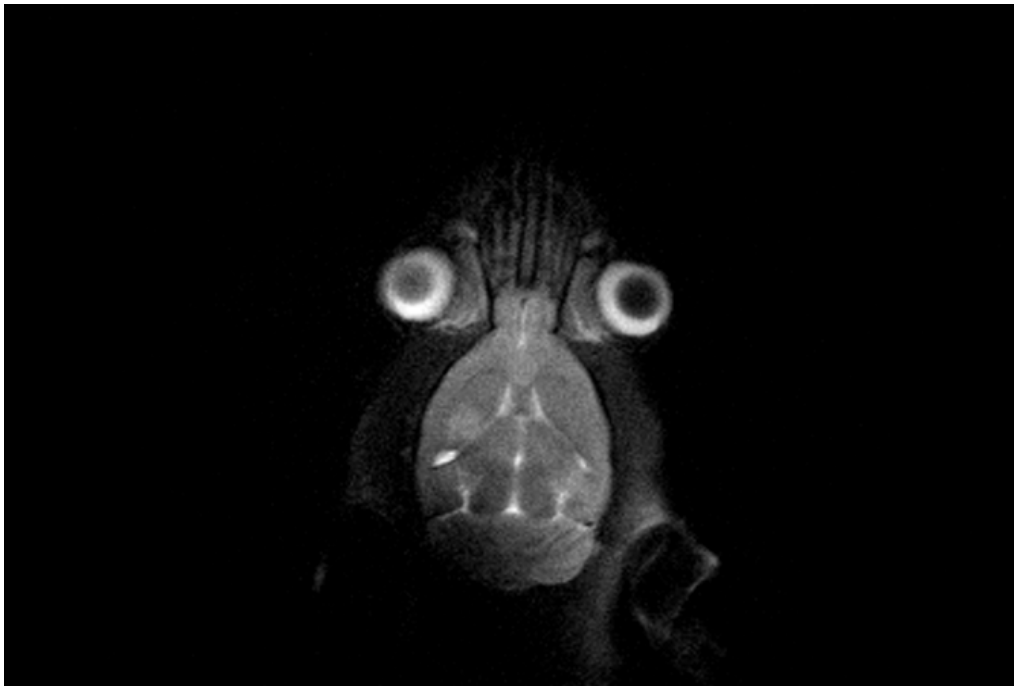
Şekil 3. 3. Siemens 3 Tesla MRG



Şekil 3. 4. Anestezi altındaki sıçan ve sıçan için geliştirilen sarmal.

3.8. MR Görüntüleme ile Tümör Büyüklüğünün Tespiti

Sıçanlara tümör hücresi ekiminden 9 gün sonra MR görüntüleme yapılarak oluşan tümörün başlangıç büyüklüğü tespit edilmiştir. Bu işlemi takiben, tümör taşıyan sıçanlara kök hücre enjeksiyonu yapılmıştır (tümör kontrol grubuna uygulanmamıştır). Kök hücre uygulamasından 5 gün sonra MR görüntüleme tekrarı yapılarak kök hücre enjeksiyonu sonrası tümör alanındaki değişim tespit edilip, başlangıçtaki büyüklüğü ile karşılaştırma yapılmıştır (Şekil 3.5, Şekil 3.6).



Şekil 3. 5. Tümör hizasından geçen aksiyel sıçan beyin MRG kesiti.



Şekil 3. 6. Şekil 3.5'in büyütülmüş hali. Tümör boyutları ölçülürken.

3.9. Histolojik Değerlendirme

Sıçanlarda MRG ile tespit edilen tümör oluşumunun teyidi için histopatolojik çalışma yapılmıştır. Bunun için, sıçanlara uygulana son MR görüntüleme sonrası aynı gün sıçanlar sakrifiye edilmiş ve beyinleri çıkarılarak %10'luk formalin içinde tespit edilmiştir. Daha sonra beyinler 2 mm'lik parçalara ayrılarak parafine gömülmüştür. Bu işlemi takiben, parafine gömülmüş parçalar 6µm'lik kesitlere ayrılmış ve her bir kesit Hematoksilen Eosin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda Hacettepe Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından incelenerek tümör varlığı değerlendirilmiştir.

3.10. Floresan Mikroskobu ile İnceleme

Daha önceden hazırlanan parafin bloklardan 6µm'lik kesitler alınmıştır. Takiben kesitlerin alındığı lamalar 20 dakika boyunca Xylene solüsyonunda bekletilerek parafinin erimesi sağlanılmıştır. Ardından her bir lam 5'er dakika sırası ile %100 etanol, %70 etanol, %50 etanol ve distile su içerisinde bekletilmiştir. Lamlar kurutulduktan sonra kesitler bir nukleus boyası olan Hoechst ile boyanıp lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar floresan mikroskobu altında değerlendirilmiştir.

3.11. Sıçanlarda Deney Gruplarının Oluşturulması

Sıçanlara tümör ekiminden 9 gün sonra ilk MR görüntülemesi yapılarak tümör oluşumu tespit edilmiş ve alan hesabı yapılmıştır. Görüntülemeye tümör boyutu 15-30 mm² arasında olan sıçanlar kök hücre enjeksiyonu yapılacak gruplara ayrılmıştır. Kök hücre enjeksiyonu, MRG'de tümör tespiti yapılan gün içerisinde uygulanmıştır.

Nanoparça ile işaretlenmiş kök hücreler hayvanlara verilmeden önce steril tüp içerisine konup, tüp tüm enjeksiyonlar bitene kadar buzlu su içerisinde muhafaza edilmiştir.

Kök hücre gruplarındaki sıçanlara 5µL içerisinde 500000 kök hücre enjeksiyonu yapılmıştır. Bu hacim intrahemisferik ve intra sisterna magna uygulamalar için sıçanların tolere edebileceği maksimum miktar olarak ön denemelerde tespit edilmiştir.

Kök hücre enjeksiyonunu takiben 5 gün sonra sıçanlara 2. MRG yapılmıştır, MRG sonrası dekapitize edilip beyinleri formaldehit solüsyonu içerisine konulmuştur.

Kök hücre enjeksiyonu için gruplar şu şekilde planlanmıştır:

A) Kontrol tümör grubu: tümör görüntülemesinden sonra hiçbir enjeksiyonun yapılmadığı grup (n=6)

B1)*Sham* cerrahi + karşı hemisfere kök hücre verilen grup: sağ hemisfere 5µL tümör besi medyumu enjeksiyonu, 9 gün sonra sol hemisfere 500000 işaretli kök hücre verilen grup (n=3)

B2)*Sham* cerrahi+ BOS'a kök hücre verilen grup: sağ hemisfere 5µL tümör besi medyumu enjeksiyonu, 9 gün sonra sisterna magnaya 500000 işaretli kök hücre verilen grup (n=3)

C1)Tümör + karşı hemisfere kök hücre verilen grup: sağ hemisfere 5µL içerisinde 50000 RG2 rat gliomu enjekte edildikten 9 gün sonra sol hemisfere 5µL içerisinde 500000 işaretli kök hücre enjekte edilen grup (n=6)

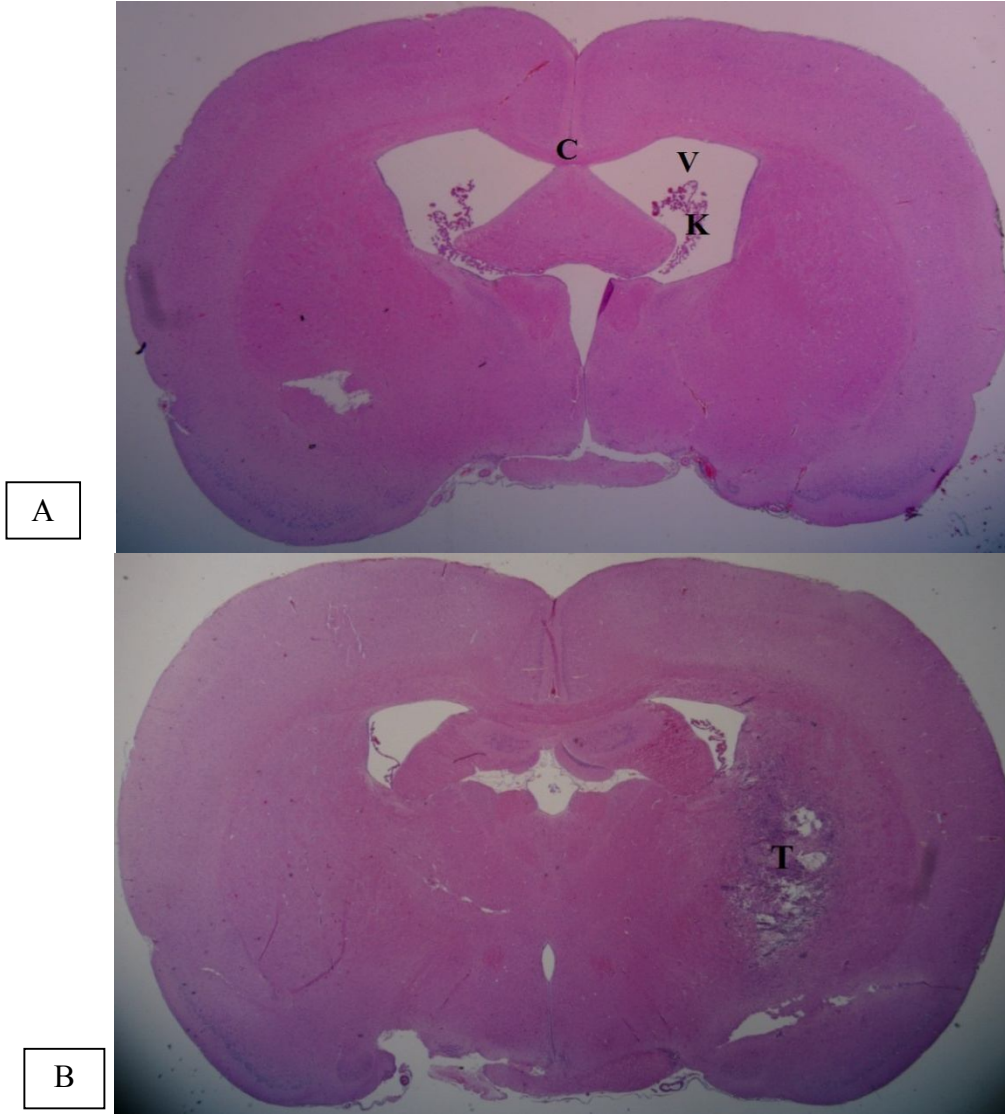
C2) Tümör + BOS'a kök hücre verilen grup: sağ hemisfere 5µL içerisinde 50000 RG2 rat gliomu enjekte edildikten 9 gün sonra sisterna magnaya 5µL içerisinde 500000 işaretli kök hücre enjekte edilen grup (n=6)

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Değerlendirme

Sıçanlara uygulanan ikinci MRG sonrası (tümör ekiminden 14 gün ve ilk MRG'den 5 gün sonra) aynı gün hayvanlar sakrifiye edilmiştir, çıkarılan beyinlerden 6 µm'lik parafin kesitler hazırlanarak ve her bir kesit HE ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir.

Tüm örnekler üzerinde yapılan histolojik değerlendirilmelerde tümörün varlığı teyid edilmiştir. Histolojik değerlendirme sırasında elde edilen ışık mikroskobu görüntülerine ait bir örnek şekil 4.1'de verilmiştir. Şekil 4.1'de görüldüğü üzere, tümör oluşmamış (a) sıçan beyninin tümü HE ile boyamada pembe renkte izlenirken, tümör oluşmuş (b) sıçan beyninde tümör bölgesi mor renkte karakterize olmuş ve içerisinde nekroz alanları görülmüştür.

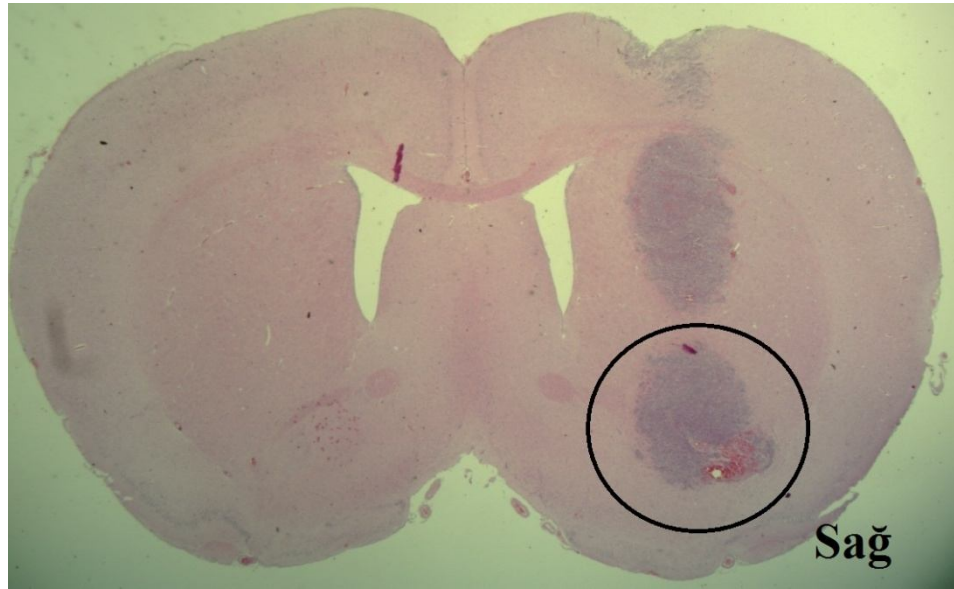


Şekil 4. 1. Tümör oluşmamış (A) ve tümör oluşmuş (B) sıçan beynine ait kesitlerin Hematoksilen Eosin boyası ile boyanması sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntülerine ait bir örnek (10 X büyütme ile).

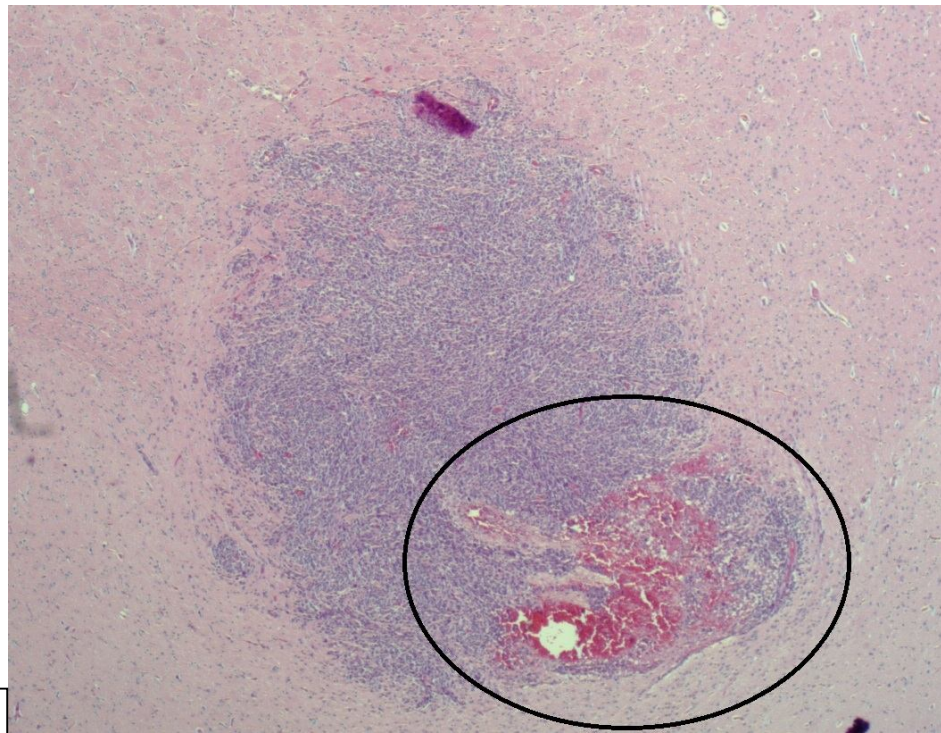
C: corpus callosum, V: ventrikül, K: Koroid pleksus, T: Tümör

4.1.1. Kontrol Tümör Grubu

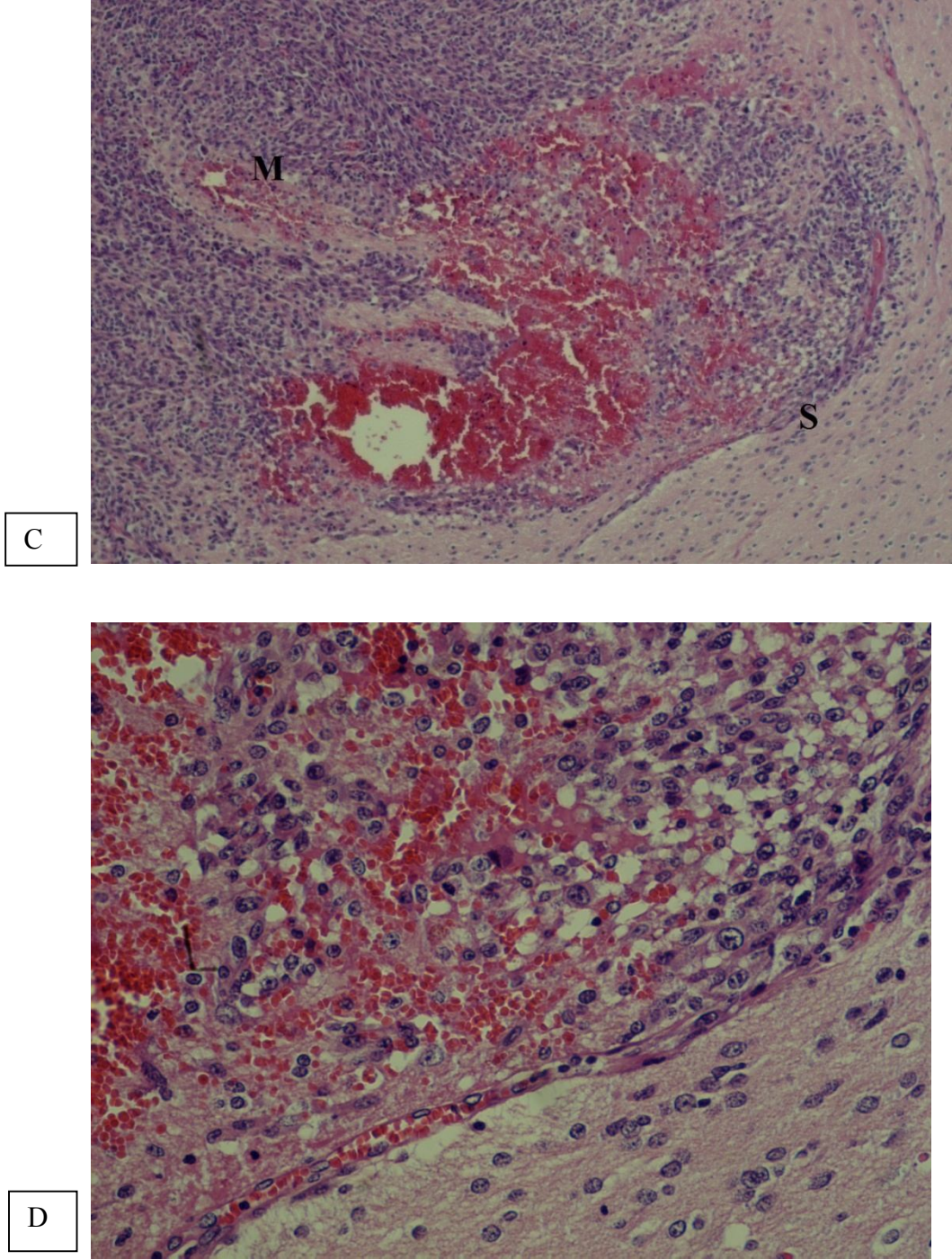
Oluşan tümörün hücre çekirdeklerinin pleomorfik olduğu ve hemoraji, nekroz, mikrovasküler proliferasyon gibi GBM tanısında önemli kriterlere sahip tümörler olduğu histopatolojik olarak gösterildi. Tümörler tamamıyla tümör hücrelerinden oluşmakta ve inflammatuar yanıt görülmemekteydi (Şekil 4.2).



A



B



Şekil 4. 2. Kontrol tümör grubundaki sıçandan elde edilen beyin kesitleri.

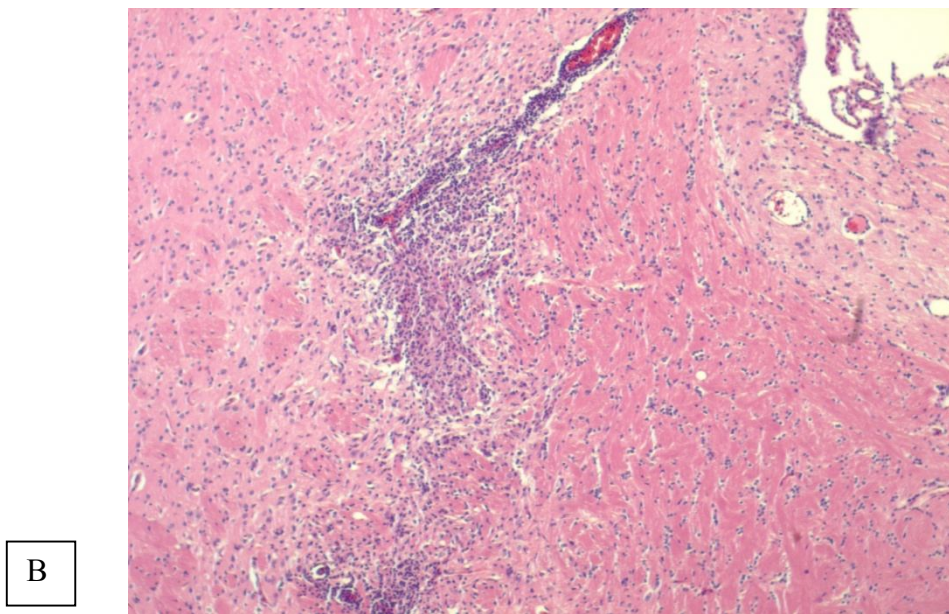
A) 10 X büyütmede sağ hemisferde 2 adet tümör odağı ve enjektör giriş yerinde tümör oluşumu görülmektedir.

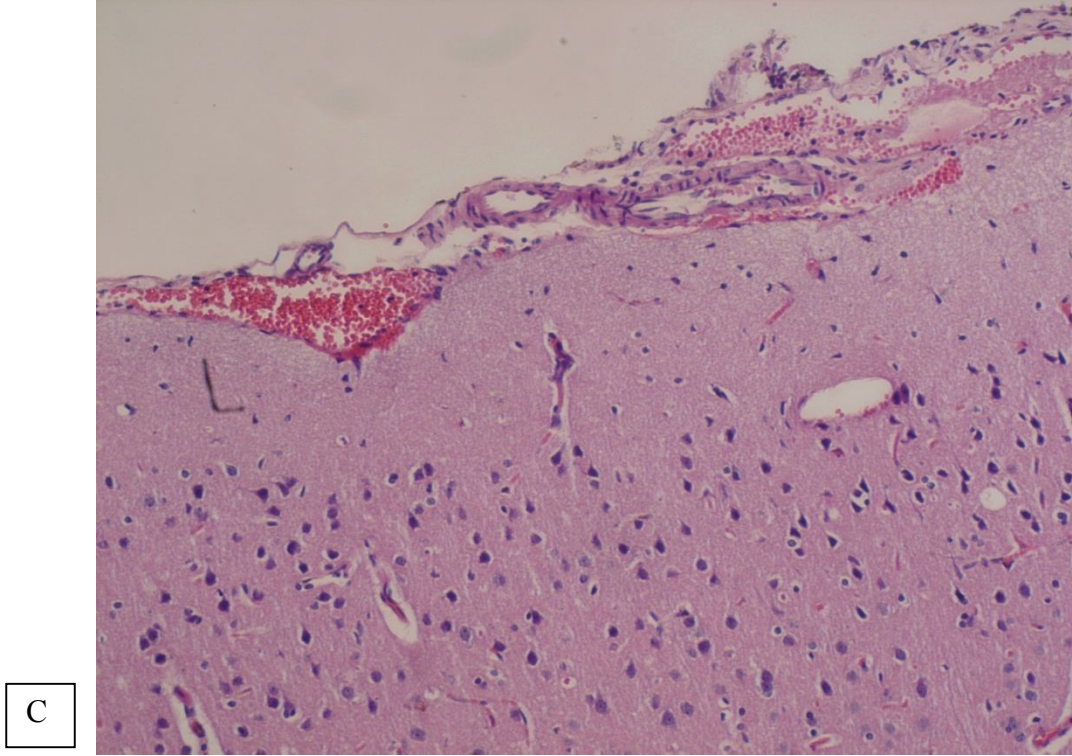
B) 40 X büyütmede alttaki tümör odağı (kare ile işaretlenmiş alan). Tümör içindeki kanama alanı görülüyor

C) 100 X büyütmede daire ile işaretlenmiş alan. Mikrovasküler proliferasyon (M) ve tümör sınırı (kapsülü) (S) görülüyor.

D) 400 X büyütmede hücre çekirdeklerinin pleomorfik olduğu ve yer yer hemorajik alanlar olduğu görülüyor.

4.1.2. Sham Cerrahi ve Karşı Hemisfere Kök Hücre Verilen Grup





Şekil 4. 3. *Sham* cerrahi + karşı hemisfere kök hücre verilen sıçan beyninden alınan kesit

A) Sağda üstte enjektör giriş noktasında (üst ok) pial inflamasyon mevcut. Tümör besi medyumunu enjeksiyonu bölgesinde (alt ok) inflamasyon gözlenmedi. Solda kök hücre enjekte edilen bölgede (kare) inflamasyon mevcut (10 X büyütme)

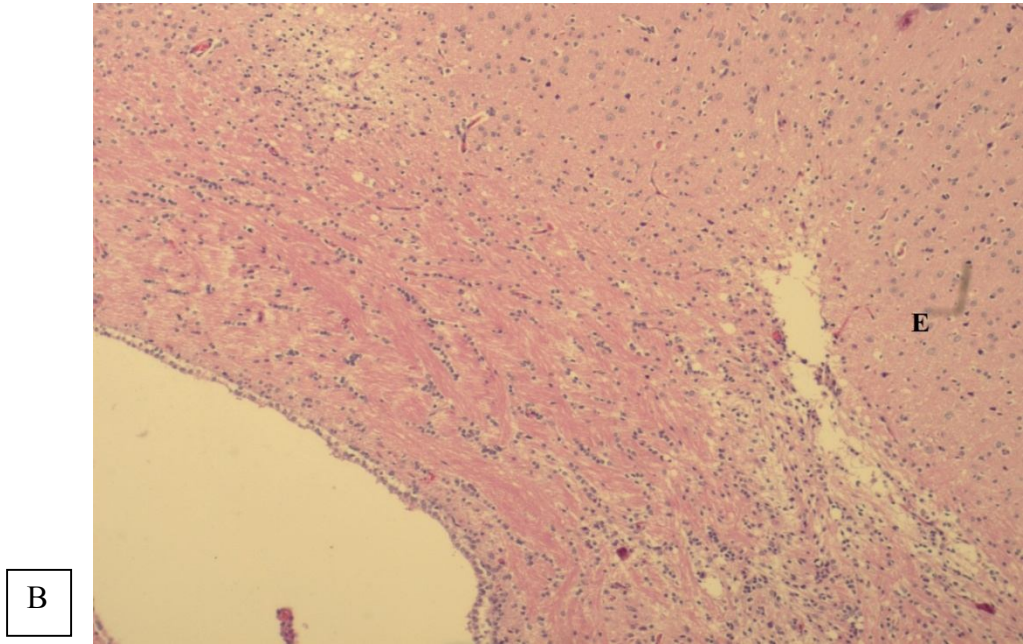
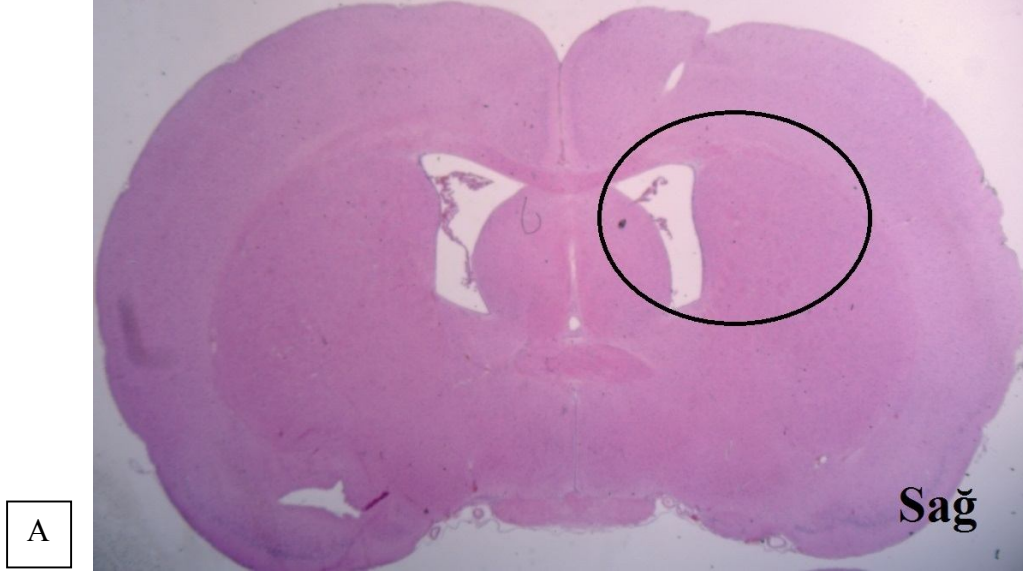
B) Solda kök hücre enjeksiyonu yapılan bölgedeki inflamasyon görülüyor (100 X büyütme)

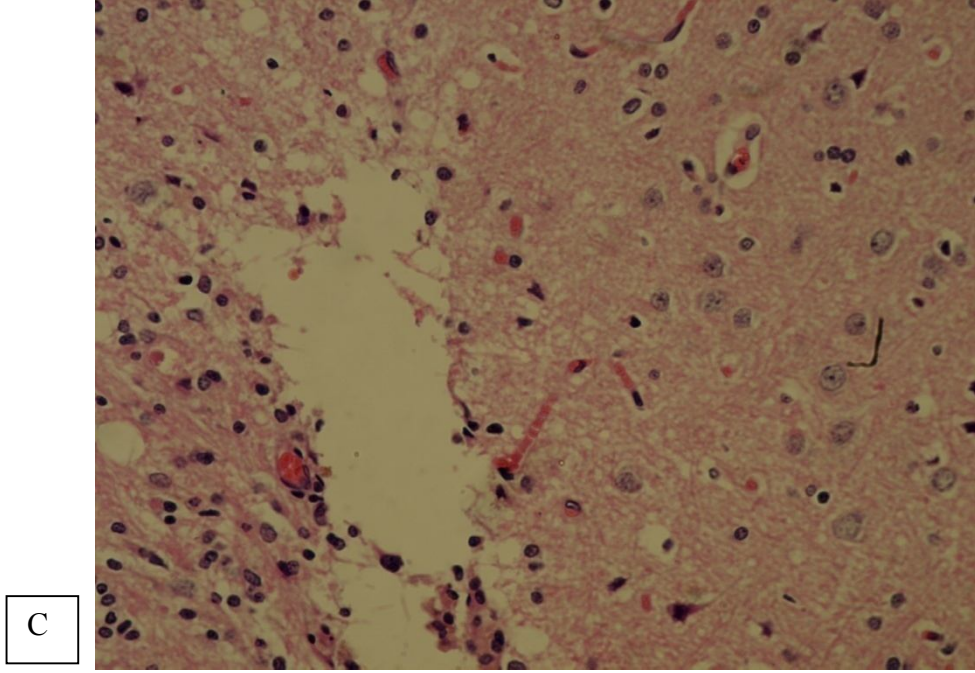
C) Leptomeningeal bölge (üst ok). Yaygın lenfeosit artışı mevcut (200 X büyütme).

Sham hemisfer grubundaki sıçanların sadece 1 tanesinde kök hücre enjeksiyonu yapılan bölgede inflamatuvar reaksiyon görüldü. Diğer sıçanların hiçbirinde serum fizyolojik enjeksiyonu ve kök hücre enjeksiyonu yapılan bölgede bir reaksiyon görülmedi.

Sıçanların hepsinde leptomeningeal bölgede, menenjitte olduğu gibi lenfosit artışı görüldü

4.1.3. *Sham* Cerrahi + BOS'a Kök Hücre Verilen Grup





Şekil 4.4. *Sham* cerrahi+ karşı hemisfere kök hücre verilen grubundan alınan kesitte;

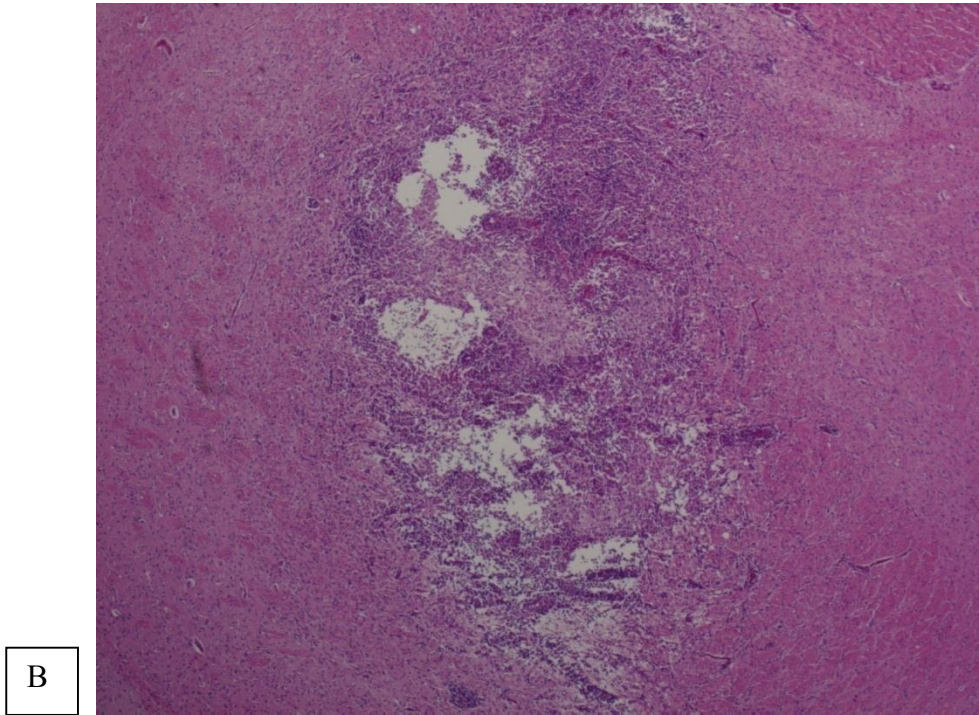
A) Tüm beyin alanında besi yeri enjeksiyonu yapılan bölge görülüyor (ok) (10 X büyütme).

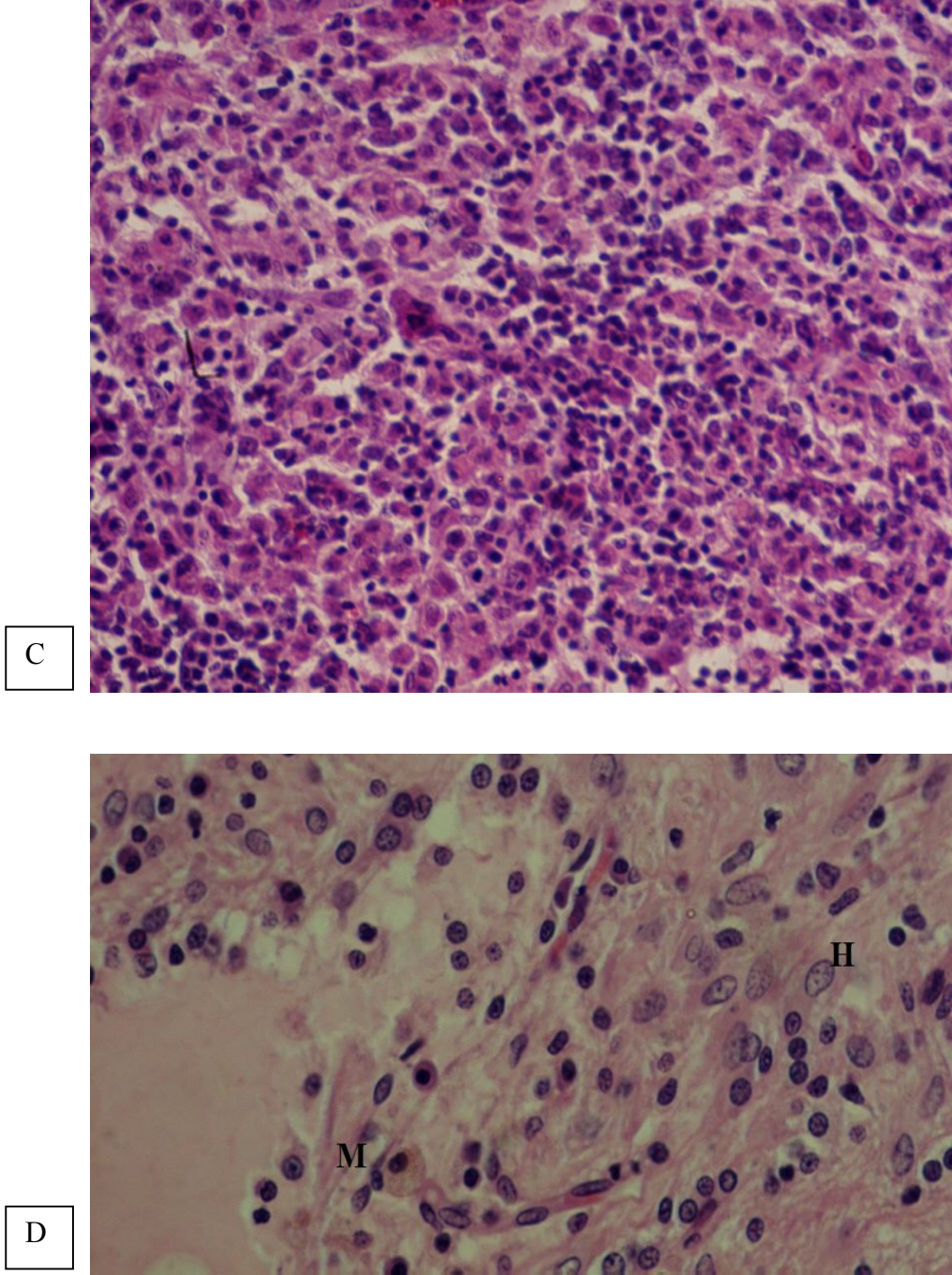
B) Besi yerienjeksiyonu yapılan bölgede enjektörün oluşturduğu defekt (E) görülüyor (200 X büyütme).

C) Defektin görüntüsü; inflamasyon veya tümör gelişiminin olmaması (400 X büyütmede)

Şam BOS grubunda hiçbir sıçanda serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan bölgede herhangi bir oluşum izlenmemiştir. Subependimal bölgede ise artmış hücre hareketi görüldü.

4.1.4. Tümör + Karşı Hemisfere Kök Hücre Verilen Grup





Şekil 4. 5. Tümör + hemisfere kök hücre verilen gruptaki bir sıçandan alınan beyin kesitlerinde;

- A) Sağ hemisferde tümör oluşumu (10 X büyütmede)
- B) Tümör alanı içerisinde nekroz alanları (4000 X büyütmede)
- C) Tümör alanı içerisinde pleomorfizm (400 X büyütmede)

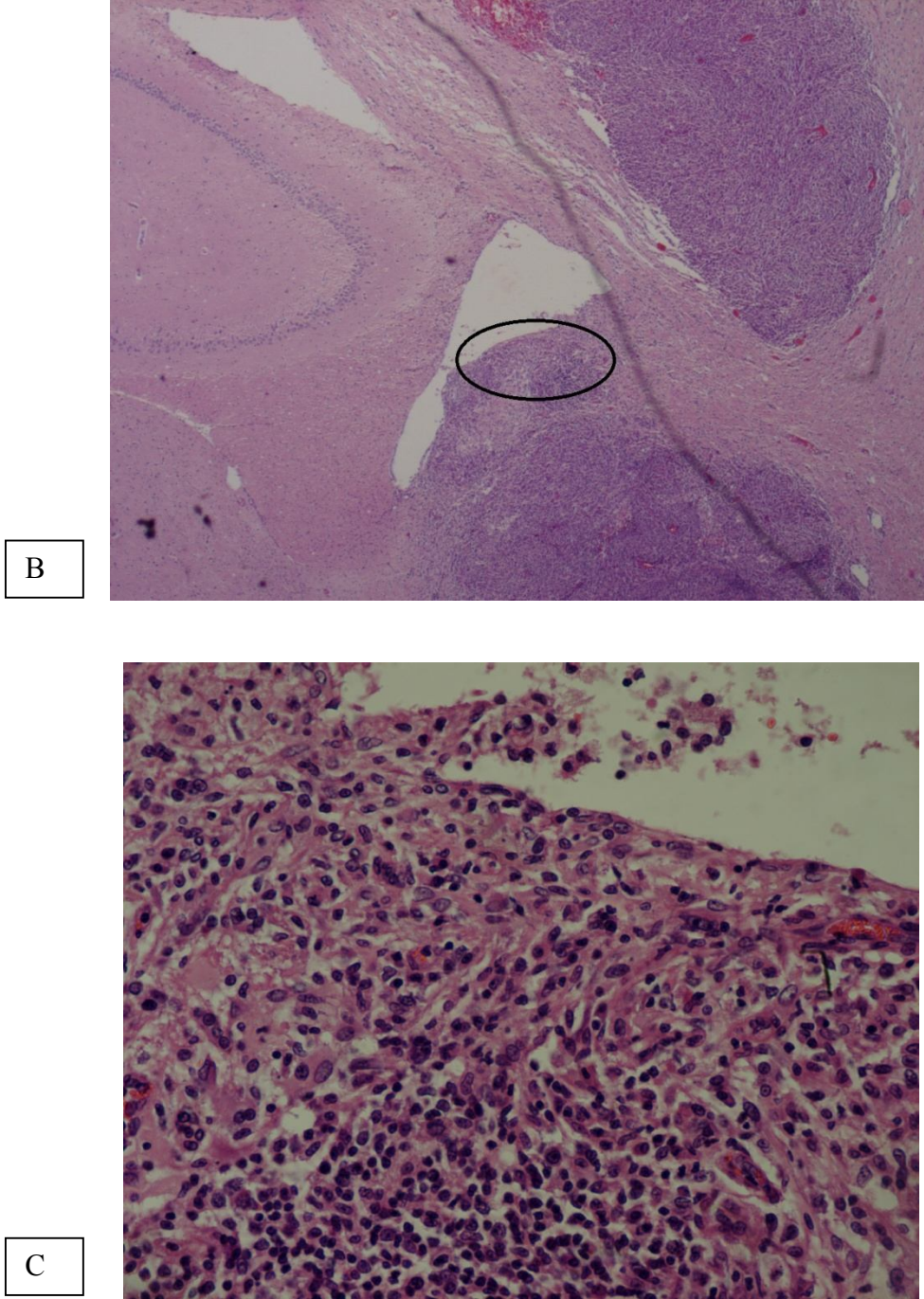
D) Tumor alanının arkasından alınan kesit, tumorle normal doku sınırından geçmiş. Dev çekirdekli histiyosit (H) ve hemosiderinli makrofaj (M) görülüyor (400 X büyütmede).

Tumor hemisfer grubundaki sıçanların hepsinde tumor bölgesinde histiositlerin hakim olduğu inflamatuvar reaksiyon görüldü.

4.1.5. Tumor + BOS'a Kök Hücre Verilen Grup

Tumor + BOS'a kök hücre verilen gruptaki tüm sıçanlarda, tumor + hemisfere kök hücre verilen grupta da olduğu gibi, tumor bölgesinde histiyositlerin hakim olduğu inflamatuvar reaksiyon görüldü.





Şekil 4. 6. Tümör + BOS'a kök hücre verilen gruptaki sıçandan alınan beyin kesitinde;

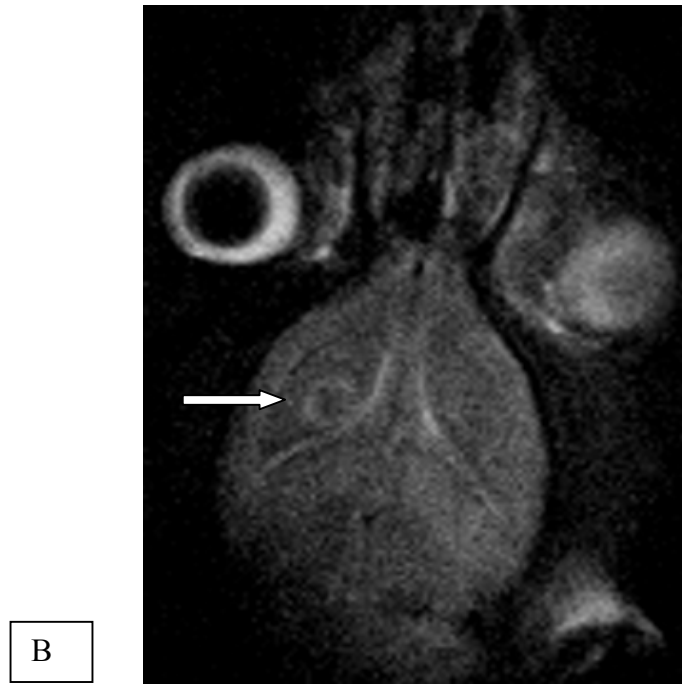
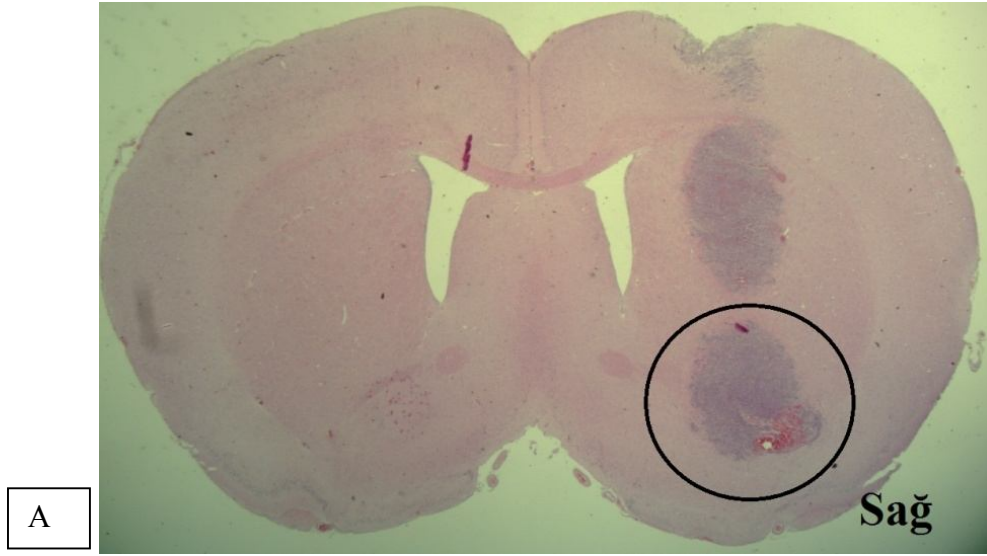
A) Sağ hemisferde çoklu tümör oluşumu izleniyor (10 X büyütmede).

B) Her iki tümör odağı daha yakından görülüyor (40 X büyütmede)

C) Yuvarlak içerisinde alınmış alan, pleomorfik hücreler ve arasında inflammatuar hücreler görülüyor (400 X büyütmede)

4.2. Magnetik Rezonans Görüntülemelerinin Histoloji ile Karşılaştırılması

4.2.1. Kontrol Tümör Grubu





Şekil 4. 7.Tümör kontrol grubu, MRG ve histiyoloji karşılaştırılması

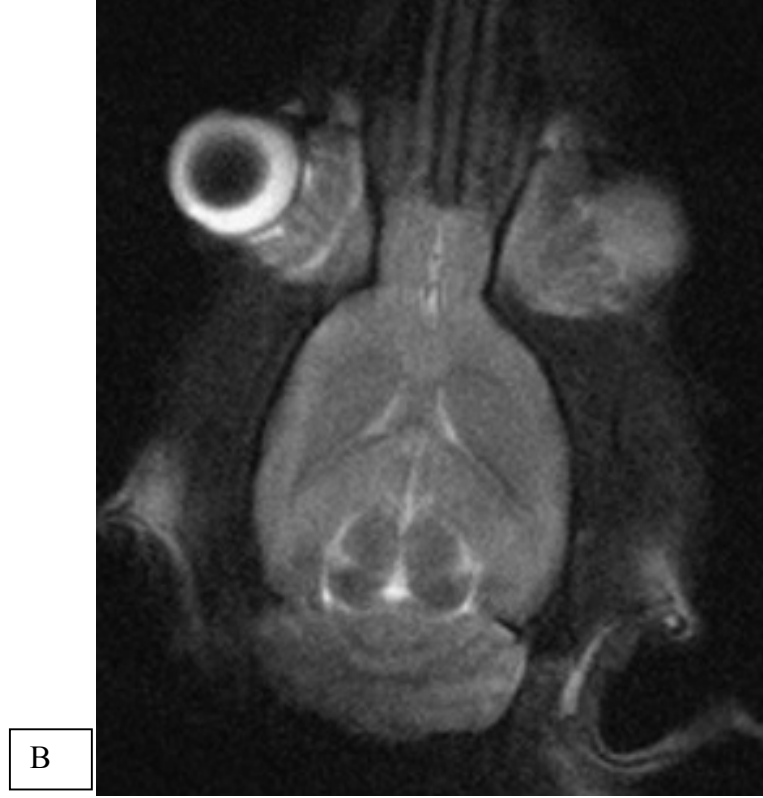
A) Kontrol tümör grubundaki bir sıçanın HE kesiti (10 X büyütme)

B) Aynı sıçanın sakrifiye edilmeden önce çekilen MRG’de tümör üzerinden geçen T2 görüntüsü. MRG’de solda (sıçanın sağında) kitle görüntüsü (ok).

C) Tümör boyutunun ölçülmesi (2.7 mm X 2.9 mm).

4.2.2. Sham Cerrahi Grupları



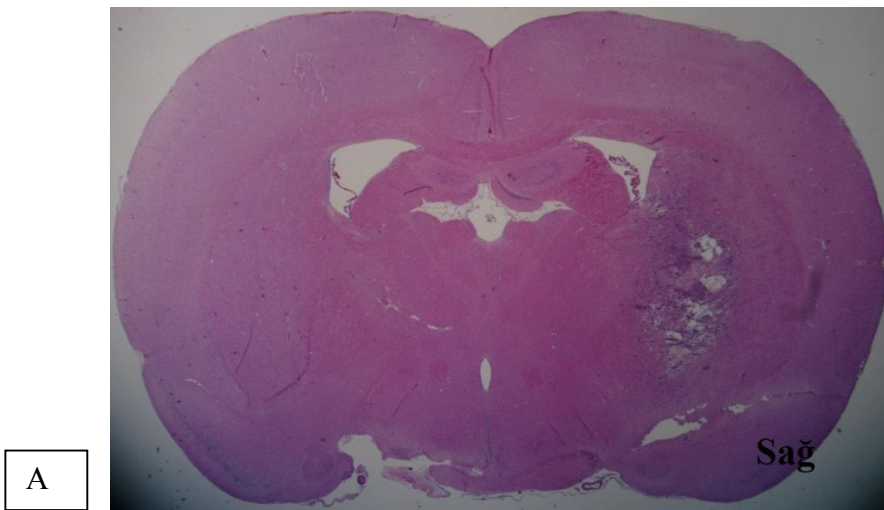


Şekil 4. 8. *Sham* cerrahi gruplarında MRG ve histiyoloji karşılaştırılması

A) *Sham* grubundan bir sıçanın 10 X büyütmede HE kesiti

B) Aynı sıçanın MRG T2 görüntüsü

4.2.3. Tümör+ Karşı Hemisfere Kök Hücre Verilen Grup





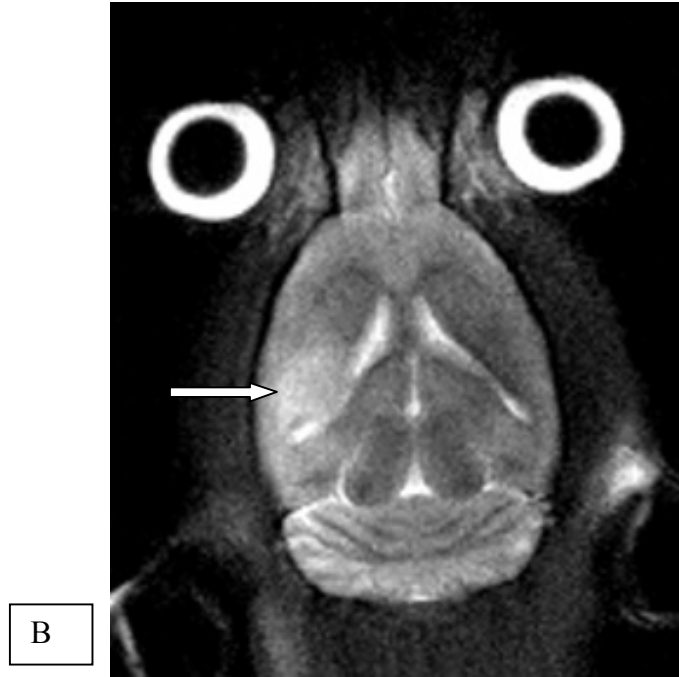
Şekil 4. 9.Tümör + karşı hemisfere kök hücre verilen grupta MRG ve histiyoloji karşılaştırılması

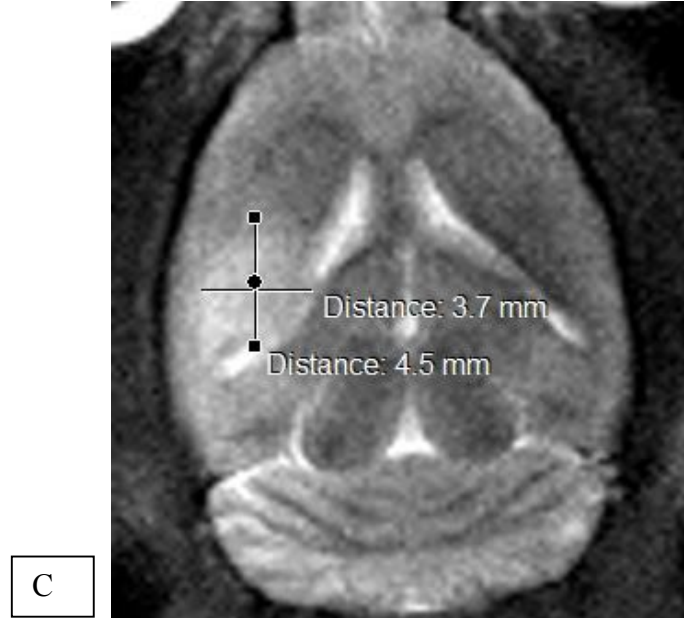
A)Tümör + karşı hemisfere kök hücre verilen gruptaki bir sıçanın HE kesiti (10 X büyütmede)

B) Aynı sıçanın MRG T2 görüntüsü. MRG'de tümör görüntüsü mevcut (ok).

C) Tümör boyutunun ölçülmesi (2.0 mm X 2.7 mm)

4.2.4. Tümör +BOS'a Kök Hücre Verilen Grup





Şekil 4. 10.Tümör + BOS'a kök hücre verilen grupta MRG ve histiyoloji karşılaştırılması

- A) Tümör + BOS'a kök hücre verilen gruptaki bir sıçanın 10 X büyütmede HE kesiti
- B) Aynı sıçanın MRG T2 görüntüsü. MRG'de tümör görüntüsü mevcut (ok).
- C) Tümör boyutunun ölçülmesi (3.7 mm X 4.5 mm)

4.3. Floresan Mikroskopi Değerlendirilmesi

Floresan mikroskobu, organik ve inorganik maddelerin yansıtma ve emme özelliklerinin yanında fosforensını ve florensasını değerlendiren gelişmiş bir ışık mikroskobudur. Örnek belli bir dalga boyundaki ışık ile aydınlatılır, bu ışık floroforlar (floresan özellik gösteren maddeler) tarafından emilip daha yüksek dalga boyuna sahip ışık yansıtırlar. Bu yansıtılan ışık emisyon filtresinden geçtikten sonra mikroskop okülerine yansıtılır. Aynı anda yalnızca 1 filtre kullanılabilir, dolayısı ile 1 renk tonunda görüntü alınabilmektedir. Farklı renk tonlarındaki görüntüler aynı alanın farklı filtreler (mavi, kırmızı, yeşil) ile resimlerinin çekildikten sonra resimlerin üst üste konması ile elde edilir[86].

Çalışmada kullandığımız örnekler bir DNA işaretleyici olan Hoechst ile boyanmıştır. Hoechst hücre çekirdeklerini işaretleyip mavi filtrede çekirdekleri görünür hale getirmektedir.

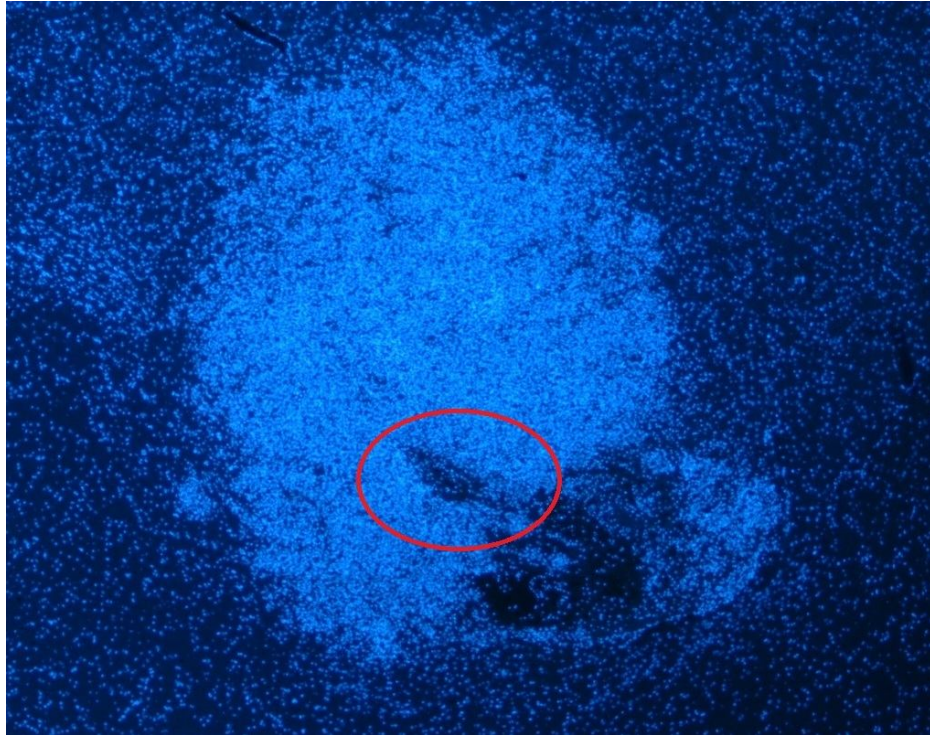
Kök hücreleri işaretlemek için kullandığımız nanoparça yeşil filtrede (absorbance 450 nm, intensity 540 nm) floresans vermektedir.

Sıçan beyninden elde ettiğimiz preparatlarda damar epitel duvarı, eritrositler ve diğer hücreler de otofloresan ışık yaymaktadır. Kullanılan nanoparçaları ayırtetmek için aynı alanı hem yeşil hem de kırmızı filtrede karşılaştırıldı (nanoparçalar sadece yeşil filtrede floresans vermektedir).

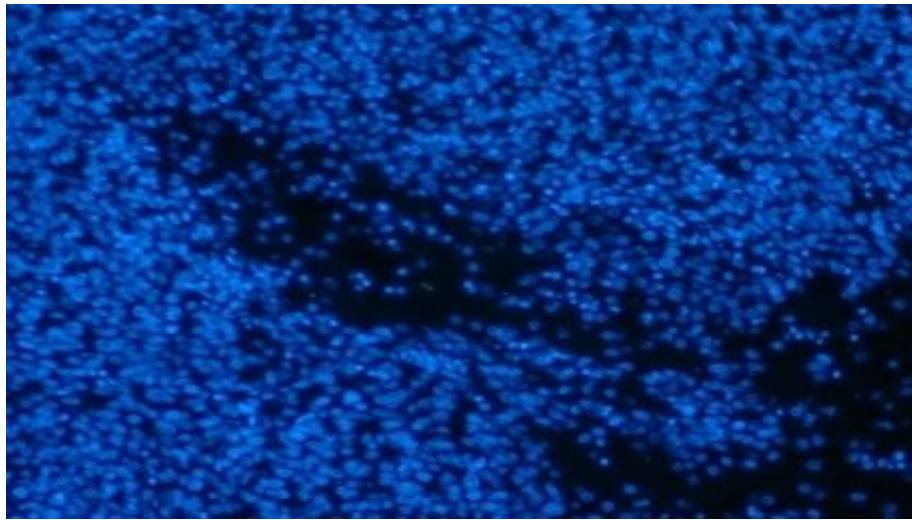
4.3.1. Kontrol Tümör Grubu

Hiç kök hücrenin verilmediği sadece tümör oluşturulan grupta yeşil filtrede nanoparçaya ait görüntü bulgusu elde edilmemiştir (Şekil 4.11).

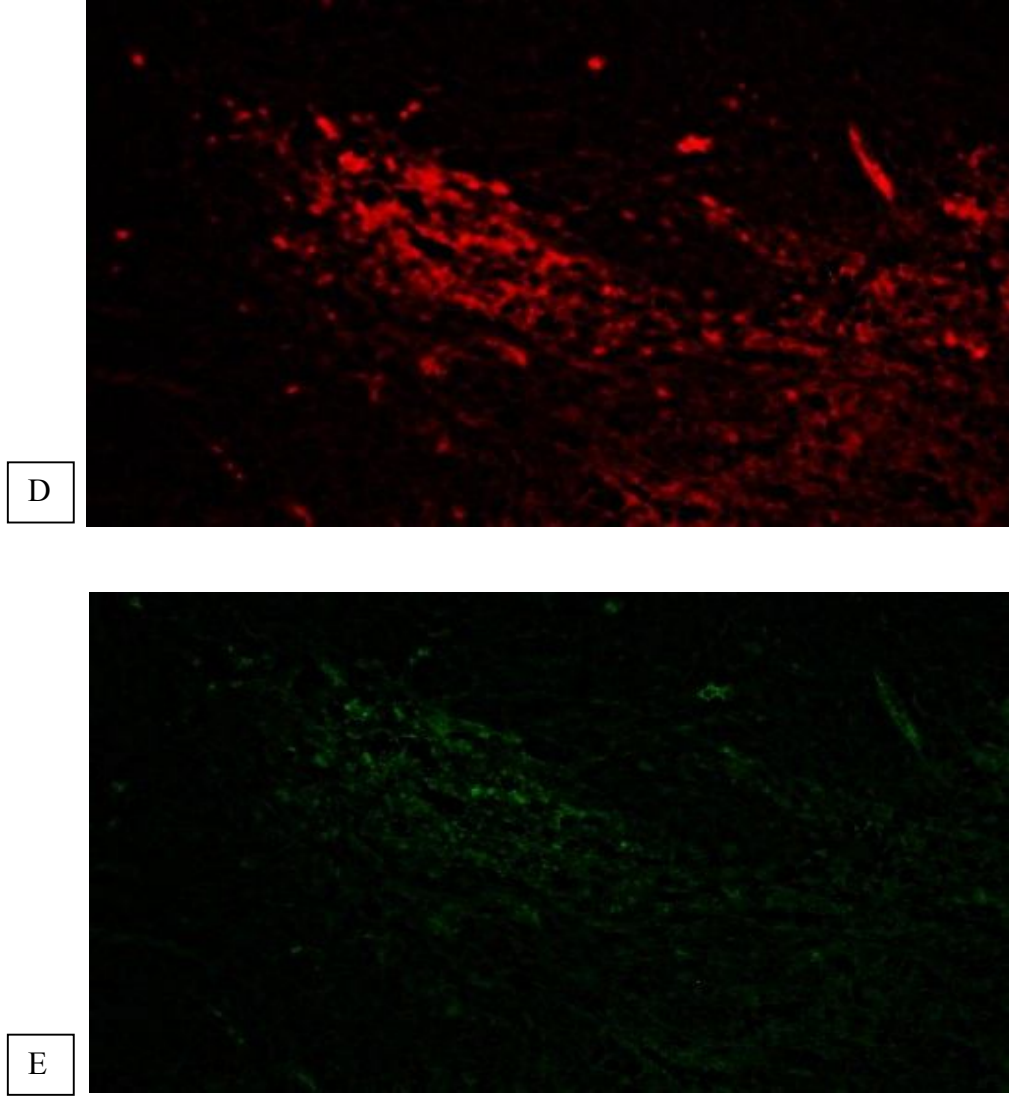




B



C



Şekil 4. 11.Tümör kontrol grubunda tümör alanından alınan kesitte floresan mikroskopi incelemesi

A) HE kesitte kontrol grubundaki bir sıçanda oluşmuş çoklu tümör odakları (10 X büyütmede)

B) Alttaki tümör odağının mavi filtrede görüntüsü. Tümör sınırları içerisinde artmış çekirdek sayısı ve nekroz bölgesinde azalmış çekirdek sayısı göze çarpıyor (40 X büyütmede)

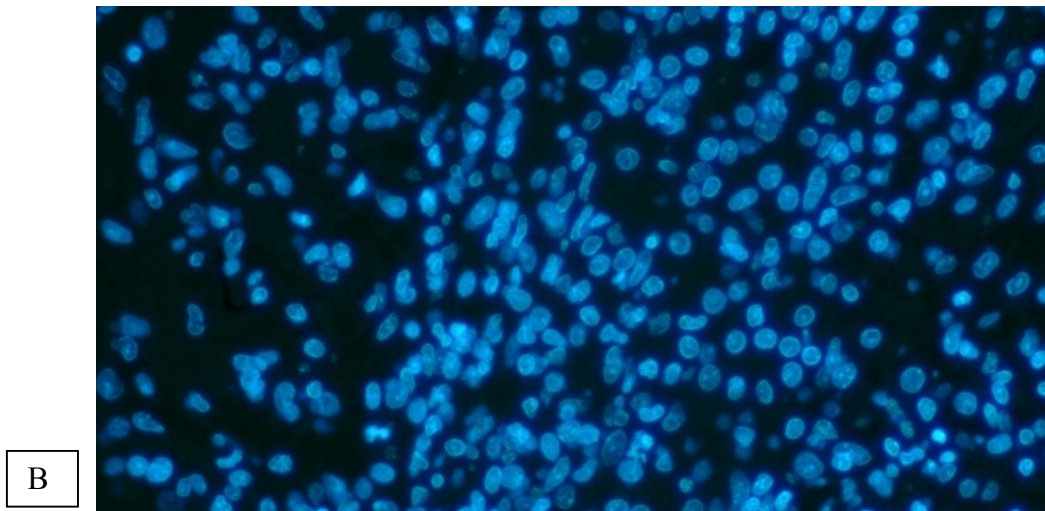
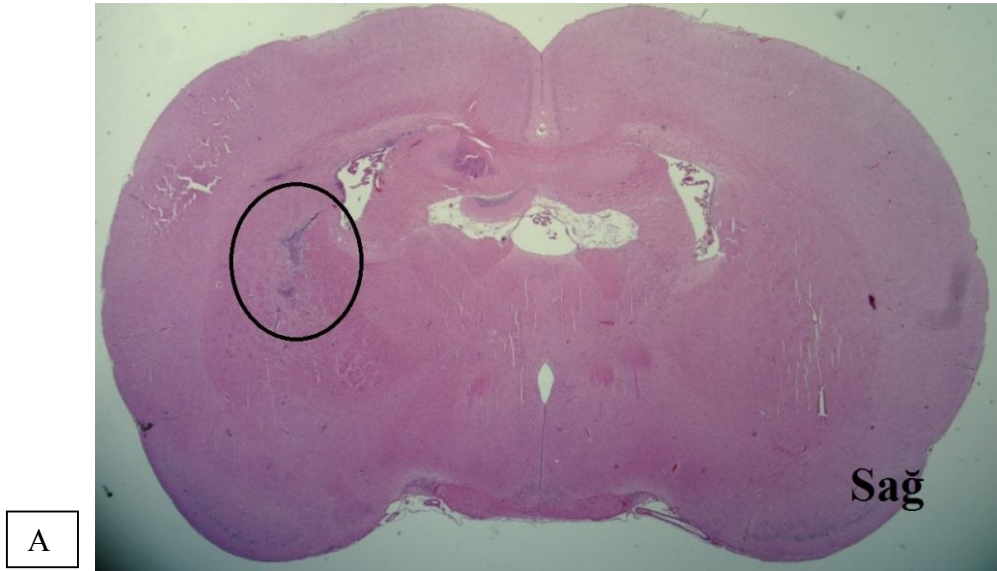
C) İşaretlenmiş alanın mavi filtre görüntüsü (200 X büyütmede)

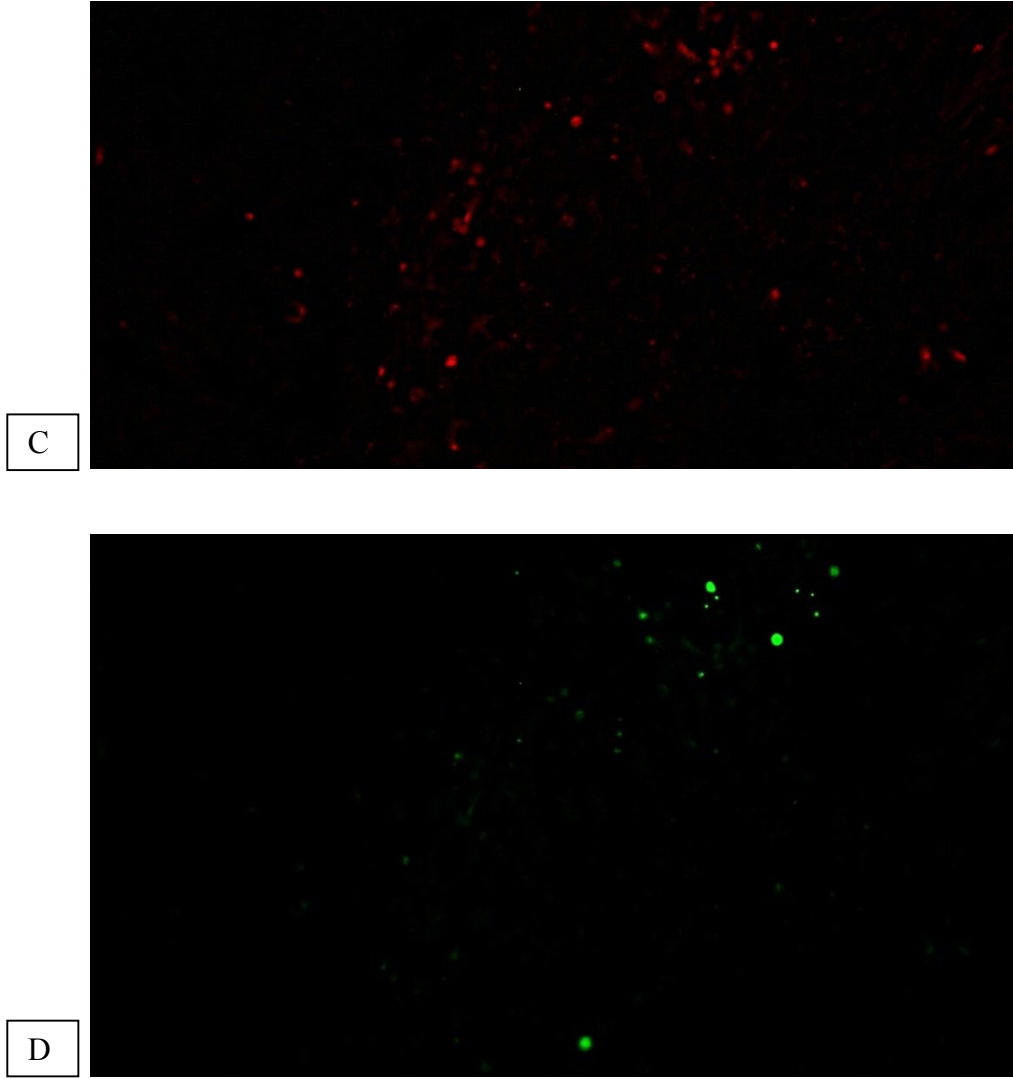
D) İşaretlenmiş alanın kırmızı filtre görüntüsü (200 X büyütmede)

E) İşaretlenmiş alanın yeşil filtre görüntüsü (200 X büyütmede)

4.3.2. *Sham* Cerrahi + Karşı Hemisfere Kök Hücre Verilen Grup

Bu grupta kök hücre enjeksiyon alanında kök hücreler görülmüştür. İnflamasyon sadece bir sıçanda görülmüştür. Diğer sıçanların kök hücre enjeksiyon bölgesinde inflamasyon görülmemiştir. Tümör besi medyumu enjeksiyonu yapılan bölgede hiçbir sıçanda kök hücre veya inflamasyon görülmemiştir (Şekil 4.12).





Şekil 4. 12. *Sham* cerrahi + karşı hemisfere kök hücre verilen gruptaki sıçandan alınan kesitte kök hücre enjeksiyonu yapılan bölgenin floresan mikroskop incelemesi.

A) HE kesit; Kare içerisine alınan bölge floresan mikroskobu altında incelendi (10 X büyütmede)

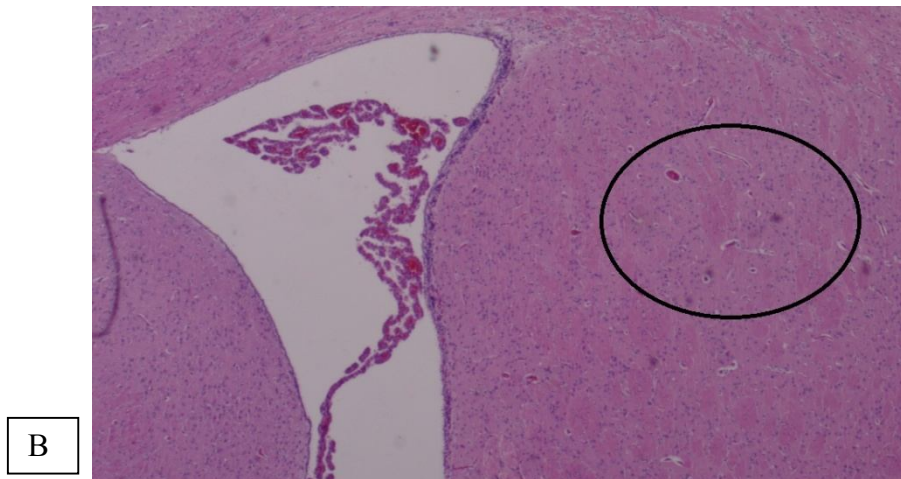
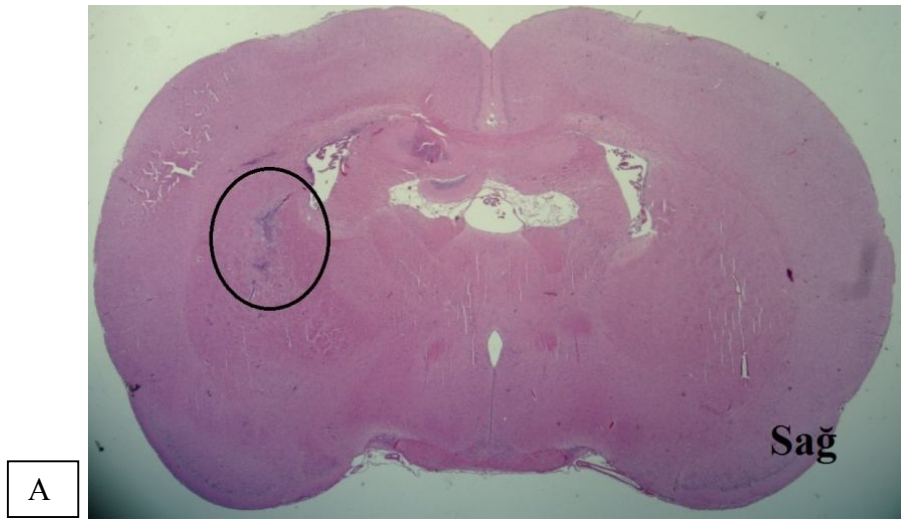
B) Mavi filtrede tüm hücre çekirdekleri boyanması(400 X büyütmede)

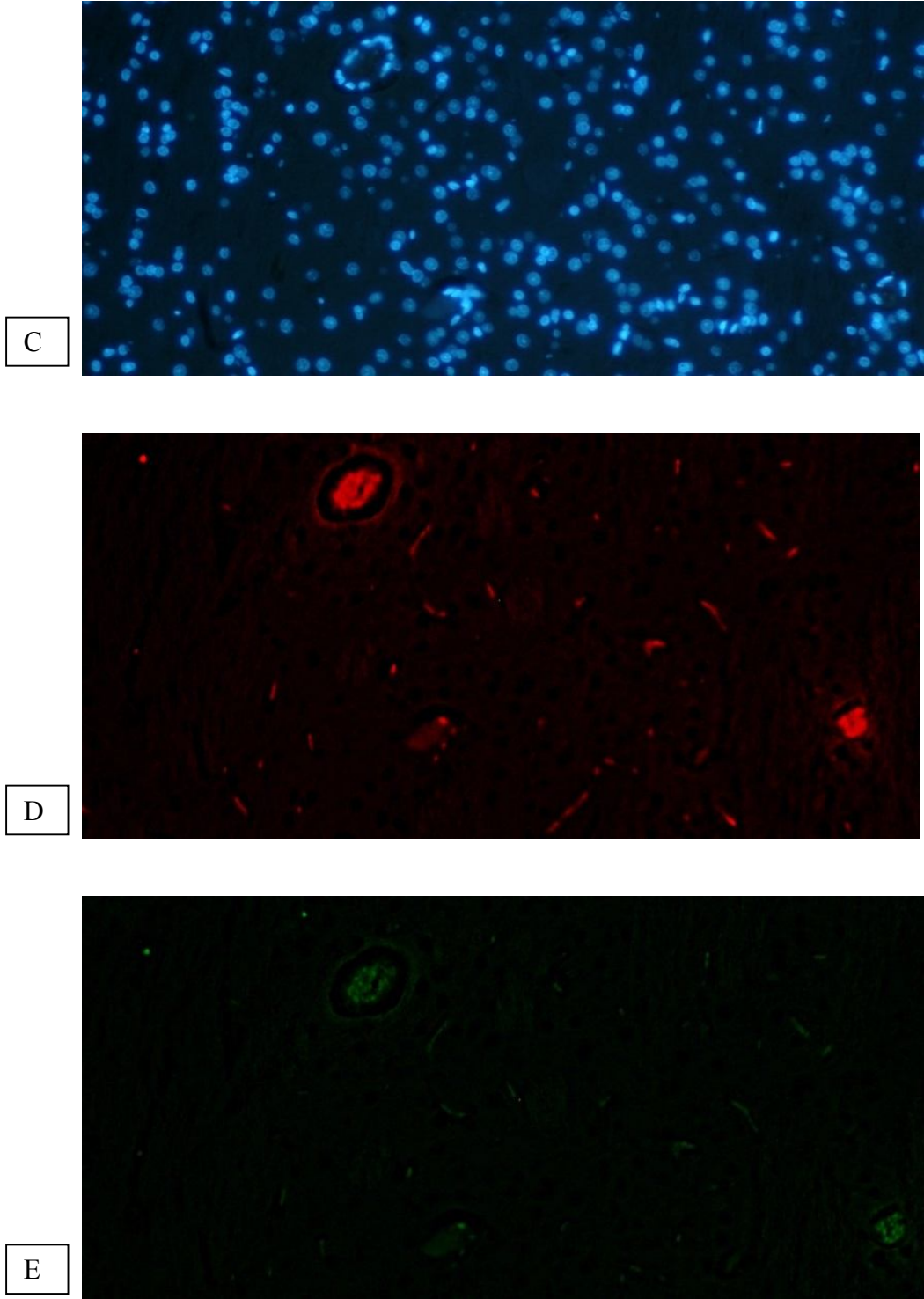
C) Kırmızı filtrede otoflorösan veren epitel hücreleri görülmesi(400 X büyütmede)

D) 400 X büyütmde yeşil filtrede, otoflorösan veren hücrelerin dışında daha parlak yeşil florösan veren kök hücre işaretlemekte kullanılan nanoparçalar görülmektedir.

4.3.3. *Sham* Cerrahi + BOS'a Kök Hücre Verilen Grup

Sham cerrahi + BOS'a kök hücre verilen grupta tümör besi medyumu enjeksiyonu yapılan bölgede kök hücre veya inflamasyon görülmedi (Şekil 4.13)





Şekil 4. 13. *Sham* cerrahi + BOS'a kök hücre verilen gruptaki sıçanda floresan mikroskop incelemesi.

A) *Sham* cerrahi + BOS'a kök hücre verilen gruptaki bir sıçandan HE Kesit (10 X büyütmede)

B) Tümör besi medyumuenjeksiyonu yapılan bölge işaretlenmesi (100 X büyütmede)

C) Tümör besi medyumuenjeksiyonu yapılan bölgenin mavi filtre altındaki görüntüsü (200 X büyütmede)

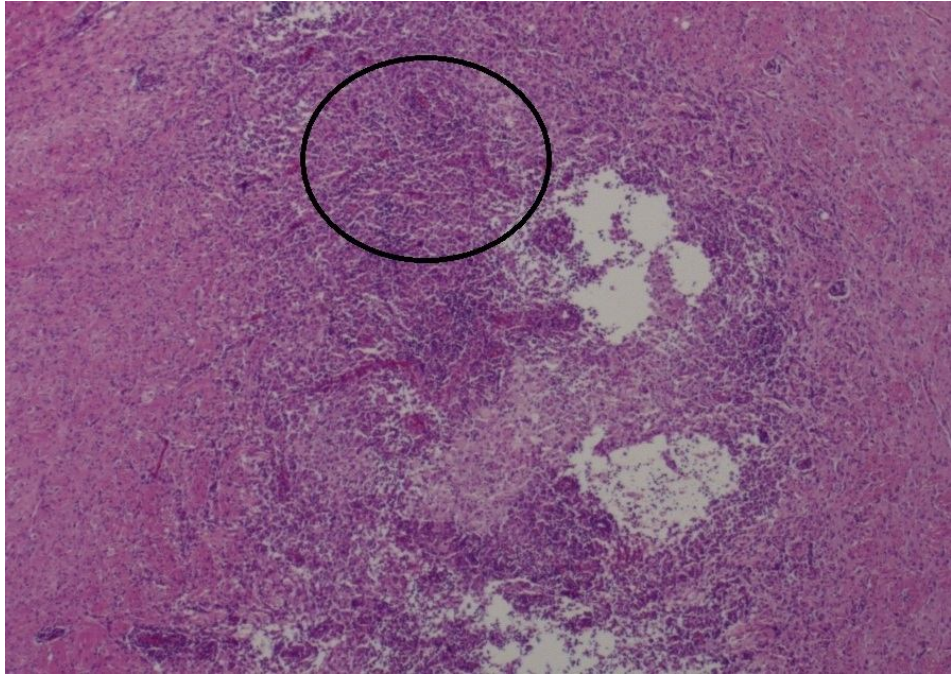
D) Tümör besi medyumunu enjeksiyonu yapılan bölgenin mavi kırmızı altındaki görüntüsü (200 X büyütmede)

E) Tümör besi medyumunu enjeksiyonu yapılan bölgenin yeşil filtre altındaki görüntüsü (200 X büyütmede)

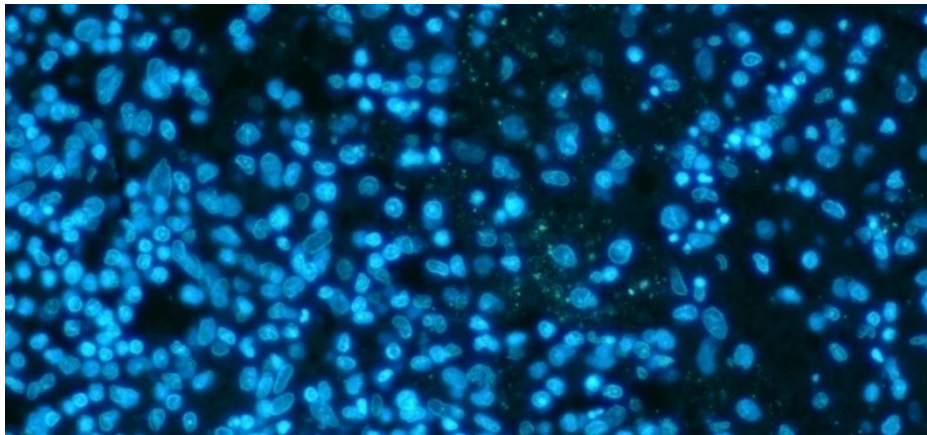
4.3.4. Tümör + Karşı Hemisfer'e Kök Hücre Verilen Grup

Tümör + karşı hemisfere kök hücre verilen grupta tüm sıçanlarda tümör alanında kök hücreler görüldü. Ayrıca tümörün içinde yaygın bir inflammatuar yanıt, histiositler, lenfositler ve makrofajlar görüldü. Bu grupta tümörün yerini inflamasyonun aldığı ve tümörün büyümediği görüldü (Şekil 4.14).

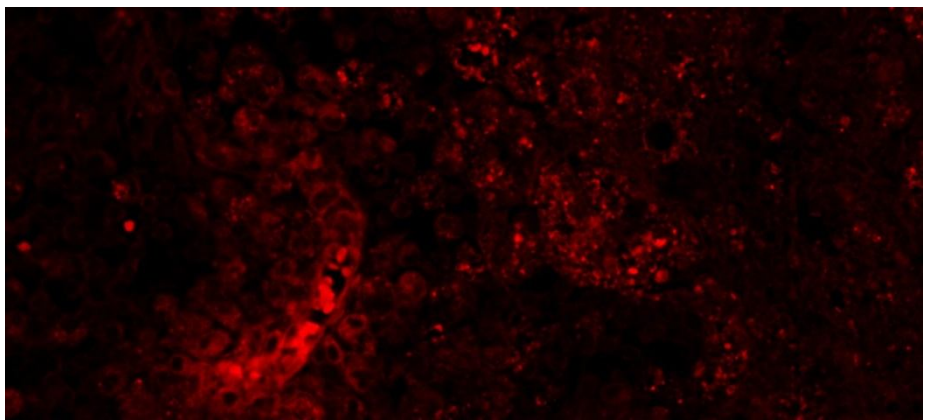




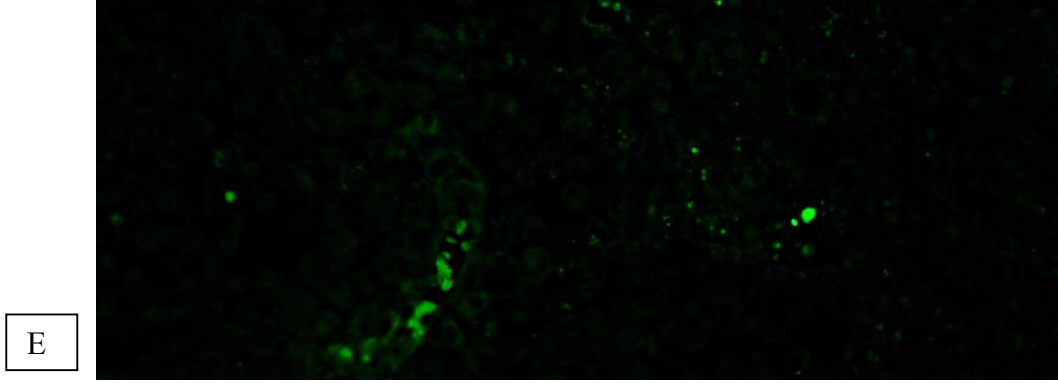
B



C



D



Şekil 4. 14.Tümör + karşı hemisfere kök hücre verilen gruptaki sıçanda tümör alanının floresan mikroskop incelemesi.

A) Tümör + karşı hemisfer'e kök hücre verilen gruptaki sıçandan alınan HE kesit (10 X büyütmede)

B) Tümör alanı, floresan mikroskobu ile incelenen işaretlenmiş kısım (daire)(40 X büyütmede)

C) Mavi filtrede işaretlenmiş tümör alanı, tüm hücrelerin çekirdekleri görülüyor (400 X büyütme)

D) Kırmızı filtrede işaretlenmiş tümör alanı. Otofloresan veren eritrosit ve epitel hücreleri görülüyor(400 X büyütme)

E) Yeşil filtrede işaretlenmiş tümör alanı. Otofloresan veren eritrosit ve epitel hücrelerinin dışında daha parlak yeşil olan kök hücrelerin işaretleyici nanoparçaları (400 X büyütmede)

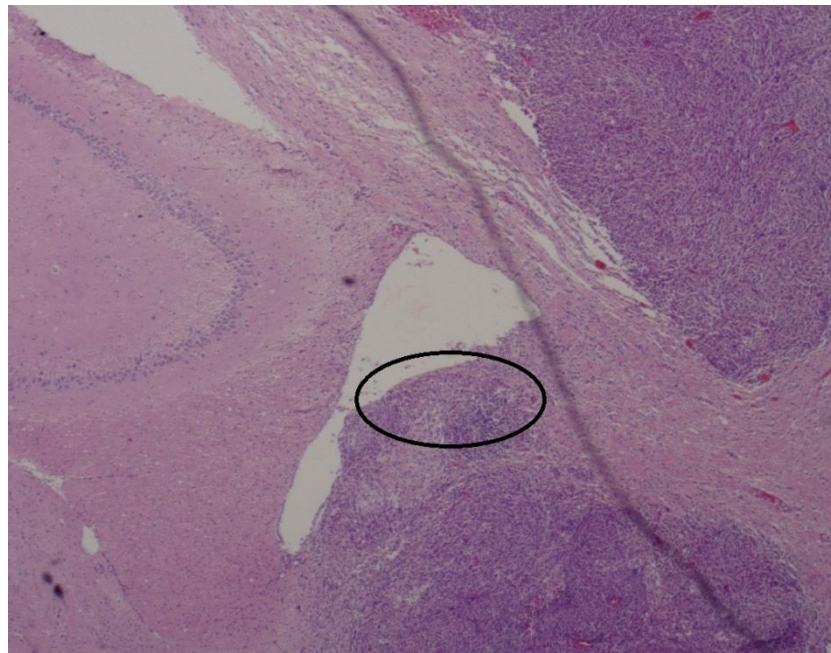
4.3.5. Tümör + BOS'a Kök Hücre Verilen Grup

Tümör + BOS'a kök hücre verilen grupta hiçbir sıçanda tümör alanında kök hücre görülmedi. Kök hücrenin tümör alanında görülmemesine rağmen tümör içinde inflammatuar yanıt gözlemlendi (ŞEKİL 4.15).

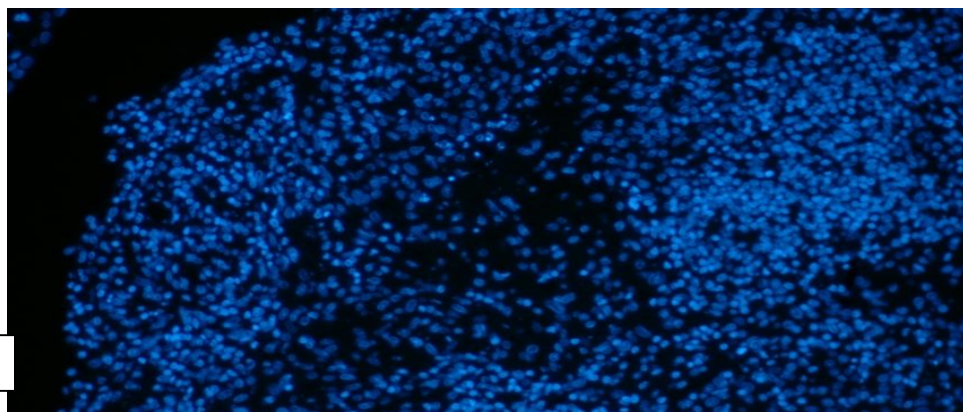
A

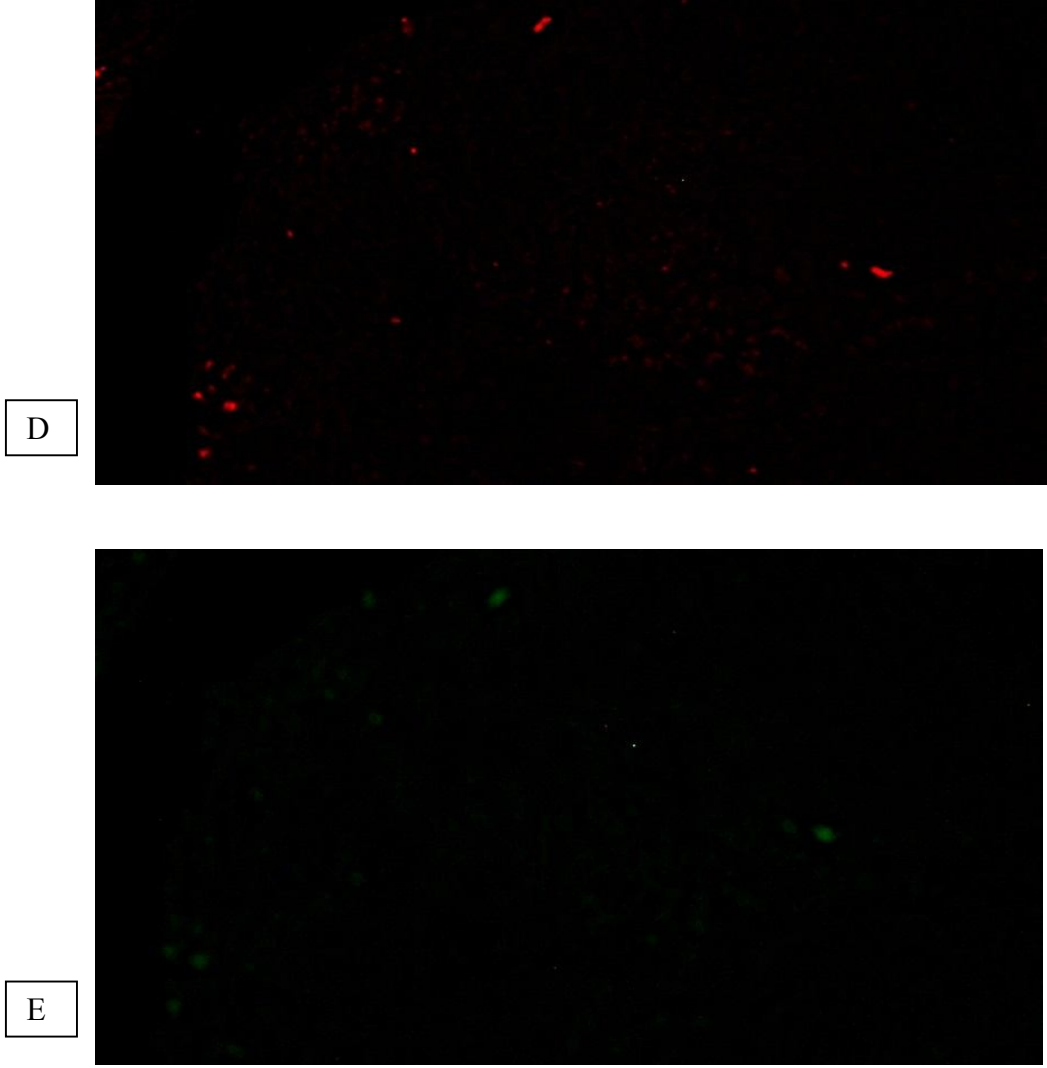


B



C





Şekil 4. 15.Tümör + BOS'a kök hücre verilen gruptaki sıçanda tümör alanının floresan mikroskop incelemesi.

A) Tümör + BOS'a kök hücre verilen gruptaki sıçandan HE kesit. Çoklu tümör oluşumu görülüyor (10X büyütmede)

B) Alttaki tümör odağı. Floresan mikroskobu ile incelenen kesim daire ile işaretlenmiştir (40 X büyütmede)

C)Mavi filtrede hücre nükleuslarının izlenmesi (200 X büyütmede).

D) Kırmızı filtrde otofloresan veren hücreler (200 X büyütmede) .

E) Yeşil filtrede otoflorösan veren hücrelerin görülmesi. İncelenen tüm alanlarda kök hücrelerin işaretlendiği yeşil nanoparçaların görülmemesi (200 X büyütmede).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada mezenşimal kök hücrelerin beyinde glial tümöre göç ettiği ve onların tümör tedavisinde bir araç olarak kullanılabilceği gösterilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda fare ve sıçan beyin tümörü modellerinde mezenşimal ve nöronal kök hücrelerin intravenöz ve hemisferik uygulamalarda tümöre göç ettiği gösterilmiştir[10, 60, 65, 66, 68, 87]. Yapılan bir başka çalışmada verilen kök hücrelerin sadece tümör içine verildiğinde göç edebildiğini, aynı hemisferde uzak bir noktadan veya karşı hemisferden tümöre geçemediğini göstermektedir[68].

Bu çalışmada verilen yeşil floresan proteinin kök hücrenin yaşamı ve migrasyonu üzerine etkisi değerlendirilmemiştir. Biz çalışmamızda MTT *assay* ile işaretleyici nanoparçanın kök hücre yaşamı üzerinde etkisi olmadığını gösterdik. İki çalışmada da hücreleri MRG'de görülebilen paramanyetik parçacıklar ile işaretleyerek MRG ile *in vivo* olarak takip etmek mümkün olmuştur. Ancak bu parçacıkların kök hücrelere geçiş oranları ve canlı sistemlerde toksisitesi tartışma konusu olmuştur [88].

Bu çalışmalarda kök hücreler sistemik venöz yoldan veya ventrikül içine verilmiştir. MRG ile kıyaslandığında histopatolojik incelemelerde de kök hücrenin tümör içinde olduğu görülmüştür. Bu çalışmalara bizim yaptığımız çalışmanın üstünlüğü daha basit ortamlarda ve daha kısa sürede kök hücre içine nanoparça verebilmek ve hücrelere veya canlının kendisine toksik etki oluşturmamaktır. Ventrikül içine verilen kök hücrenin geçişinin gösterildiği çalışma bulgularının tersi olarak bizim çalışmamızda tümörün ancak karşı hemisferine kök hücre enjekte edince kök hücrelerin tümöre göç ettiklerini; intraventriküler olarak BOS'a kök hücre enjeksiyonu yapınca tümöre göç olmadığını gördük. Çalışmamızın eksik yönlerinden biri sistemik yoldan kök hücre vermeyişimiz olabilir. İleride yapmayı planladığımız çalışmalarda kuyruk veni veya femoral ven yolu kullanılarak kök hücre vermeyi ve tümöre göçünü izlemeyi planlıyoruz.

Magnetik Rezonans Görüntüleme deney hayvanlarında beyin tümörü ve kök hücre çalışmalarında son zamanlarda birkaç çalışmada kullanılmış yeni bir yöntemdir [88]. Ülkemizde de deney hayvanına MRG yapılması yeni bir uygulama olup, ilk kez Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Eczacılık Fakültesinde “malign gliomların tedavisi için lipit ile işlevselleştirilmiş PLGA nanopartiküllerin tasarımı, in vitro ve in vivo değerlendirilmesi” adlı master tezinde kullanılmıştır [79]. Bizim çalışmamız ülkemizde hayvan beyin tümörü görüntülemesinde MRG'nin kullanıldığı ikinci çalışmadır. Bu çalışmaları yapabilmek amacı ile sıçan kafasına özel koil dizayn edilmesi ilk kez Uluslararası Magnetik Rezonans Araştırma Merkezi'nde (UMRAM) yapılmıştır. Bu sayede MRG tümör oluşumunun gösterilmesinde ve ancak tümör teyit edildikten sonra kök hücre uygulanmasının güvenilir olarak yapılmasına izin vermiştir.

Manyetik rezonans görüntülemenin çalışmaya katkılarının yanında MRG merkezinin başka bir üniversitenin kampüsünde oluşu, deney hayvanlarının uzun yol taşınması deney sürecinde zorluklara ve ek morbidite/mortaliteye neden olmuştur.

Yapılan diğer çalışmalarda kök hücreler mikroskop altında CD 133 antikorlarıyla değerlendirilmiş. Bu işaretleyiciler genel bir kök hücre işaretleyicisi olup hem konağın kendi kök hücrelerini hem de verilen hücreleri işaretlemektedir. Yaptığımız çalışmada kök hücreler enjeksiyon yapılmadan önce floresan nanoparça ile işaretlenerek konağın kendi kök hücrelerinden net olarak ayırt edilebilmişlerdir.

Çalışmamız sıçanda glioma oluşturma deneysel modeli üzerine kurulmuştur. Literatürdeki hayvan beyin tümörü modellerinde doğal olarak bağışıklık sistemi olmayan atimik ve çıplak (genetik olarak immünsüprese) fare ve sıçanlar tercih edilmektedir. Genetik olarak immünsüprese hayvan kullanılmayan birkaç deneyde ise hayvanlar deneyden 48 saat önceden başlanılarak tüm deney boyunca siklosporin ile immünsüprese edilmiştir. Yaptığımız çalışmada Wistar sıçanların bağışıklık sistemi normal olarak çalışmaktaydı ve herhangi bir immun supresyon uygulanmadı. Hayvanların immünsüprese olmaması nedeni ile tümör hücresi enjeksiyonu sonrası tümör oluşma oranı düşük kalmıştır (66 sıçanda 21 tümör). Ancak immünsüprese olmayan ve insan sistemine daha yakın oluşturduğumuz deneysel modelde diğer

çalışmalarda gözlenmeyen yepyeni bir bulgu ile karşılaştık; bu da kök hücreler tarafından induklenen ve tümörün regresyonuna neden olan yoğun inflammatuar yanıt. Sadece kök hücre verilen deneklerde (hem hemisfer, hem de BOS gruplarında) ve bu deneklerin istinasız hepsinde tümörün histiosit, makrofaj ve lenfosit gibi inflammatuar hücreler ile sarılması literatürde daha önce sadece bir çalışmada gösterilmiştir [52]. Bu inflammatuar yanıt kök hücrenin tümöre ulaşmadığı BOS'a ekilen grupta da gözleendiğinden kök hücre tarafından salınan muhtemelen parakrin faktörler yoluyla olduğunu düşündürmektedir.

Böyle bir yanıt görmemizi birkaç nedene bağladık;

a) Deney hayvanlarının immünsüpre olmaması.

b) Tümörün sıçan kaynaklı olması, kök hücrelerin insan kaynaklı olması ve “*graft vs host*” reaksiyonu oluşması.

c) Dişten elde edilen mezenşimal kök hücrelerin kök hücre ağacında daha üst bir seviyede olması (daha multipotent), salgıladıkları sitokinler aracılığı ile inflammatuar yanıtı neden olması.

Gelecekte inflammatuar etkiyi incelemek için immünohistokimyasal çalışmaların yapılması ve başka bir tümör modelinde (U87 insan kaynaklı Glioblastoma hücre hattı) mezenşimal kök hücrelerin uygulanması planlanmaktadır. Bu sürpriz bulgunun daha fazla araştırılması için ileride yapmayı plandığımız çalışmalarda inflammatuar yanıtı neden olan bu faktörleri araştırmayı ve bulgularımız teyit etmek için başka bir GBM hücre hattı ile tümör modelini tekrar etmeyi amaçlamaktayız.

Kök hücrelerin glioma üzerinde izole etkisi net olarak bilinmemekle birlikte literatürde mevcut bazı çalışmalar bu etkileri araştırmıştır.

Sasportas ve arkadaşları fare beyin glioblastoma modelinde kaspaz aracılı apoptozu indukleyen sitokin tümör nekroz faktör apoptoz ligandı (TRAIL) eksprese

eden mezenşimal kök hücrelerinin tümör üzerine etkilerini gözlemladiler. Mezenşimal kök hücrelerinin tümöre göç edebilmelerine rağmen tümör üzerine hiçbir etkisini görmediler. Oysa TRIAL eksprese eden MSC'lerin tümör boyutlarını anlamlı ölçüde küçülttüğünü tespit etmişlerdir[89].

Bir diğer TRIAL kullanılan çalışmada, Menon ve arkadaşları bir lentovirüs vektörü ile TRIAL genini NSC'lere aktardılar. Takiben farede oluşturdukları glioblastoma modeline, tümörün karşı hemisferine NSC'leri enjekte ettiler. Alınan kesitlerde NSC'lerin tümörü çevresini sardığı ve içine ilerlediği görüldü. TRIAL içeren NSC'lerin ise tümörü küçülttüğü görüldü[90].

Jin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sıçan beyin tümörü modelinde nöronal kaynaklı kök hücreler (NSC) kullandılar. Bir grupta kök hücrelere citozin deaminaz (CD) ile yüklenirken, diğer grupta kök hücrelere CD geni lentovirüs vektörü ile aktarıldı. Sadece kök hücre verilen kontrol grubunda tümör büyümesine etki olmazken, CD yüklü NSC verilen grupta tümör boyutunda azalma görüldü, CD geni aktarılan NSC'lerin olduğu grupta ise tümör boyutunda daha belirgin azalma olduğu görüldü. Bu çalışma kök hücrelerin vektör olarak kullanılabileninden öte genetik uygulamaların umut verici olduğunu gösterdi[91].

EGFRvIII bir EGFR mutasyonu olup tüm glioblastomaların %20-30'da görülmekte, tümöre spesifik bir antijen olup normal beyin hücrelerinde yoktur, bu özelliği ise onu iyi bir hedef yapmaktadır. Balyasnikova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada EGFRvIII antikoru eksprese eden MSC'lerin etkilerini EGFRvIII reseptörü mevcut glioblastoma hattında gözlemladiler. Hücre kültüründe tümör hücre sayısını anlamlı düşürmediği görüldü. Oysa fare modelinde modifiye MSC'lerin tümör boyutu anlamlı oranda düşürdüğü ve farenin sağkalımını arttırdığı görüldü. EGFRvIII antikoru olmatan MSC'lerin tümör boyutuna bir etkisi görülmedi[92].

Hamada ve arkadaşları yaptığı çalışmada fare gliom modelinde interlökin-2 (IL-2) eksprese eden MSC'lerin tümörü küçültmesinin yanında MSC'lerin salgıladıkları mediatörlerin de tedavide etkili olduğunu savundu. Nöron kaynaklı büyüme faktörünün nöron apoptozunu önleyerek koruyucu etki yaptığını,

anjiopetin-1 ile tümör vasküleritesini azalttığı ve geçirgenliği azaltarak ödemi önlediğini, MSC'lerin tümör etrafında toplanarak bir bariyer oluşturup tümör hücrelerinin yayılımını engellediğini savunmuşlardır[87].

Kök hücrelerin neden olabileceği malignite ise bir endişe konusudur. Yapılan uzun dönem mezenşimal kök hücre kültürlerinde kök hücrelerin transforme olabileceği görülmüştür. Bu transforme olan kök hücrelerin fareye enjeksiyon sonrası akciğerde malignite oluşumu gözlemlenmiştir. Bu olay kök hücre tedavisinin güvenilirliğini sarsmaktadır[93].

Yapılan başka bir çalışmada, nöronal kök hücreler (NSC) hem in vitro hem de in vivo ortamda test edildi. İn vitro ortamda nöronal kök hücrelerin hem nöronal kaynaklı tümöre (sıçan gliom ve insan glioblastoma hücreleri) ve nöronal olmayan tümöre (melanom ve prostat kanseri) göç edebildikleri görüldü. Takiben fare fare modelinde sıçan gliom, insan glioblastoma ve melanom hücreleri subkütan ekim yapıldı, NSC'ler kuyruk veninden enjekte edildi, NSC'lerin ekstrakraniyal nöronal ve nöronal dışı tümöre göç edebildikleri gösterildi[94].

Yang ve arkadaşları ise farede beyin sapında gliom oluşturup hem MSC'lere hem de embriyonik fibroblast (NIH3T3) hücrelerine TRIAL ekleyip tümör üzerine etkilerini gözlemlemişler. TRIAL-MSC ve TRIAL-NIH3T3'ün farelerde sağkalımı arttırdığını, oysa sistemik TRIAL enjeksiyonunun ve sade MSC'lerin sağkalımı etkilemediğini bildirmişlerdir. MSC'ler gibi NIH3T3'ün de göç kabiliyeti olduğunu ve bir taşıyıcı olarak kullanılabileceğini savundular[95].

Kök hücreler başka molekülleri detaylı olarak tedavide rol almışlardır; beyin sapı gliomu modelinde mikro RNA[96] ve TRIAL [97] taşıyıcı olarak kullanılmışlardır.

6. SONUÇ

Bu çalışmada;

- Magnetik Rezonans Görüntüleme ile sıçan beyni gibi küçük bir organın patolojisinin dahi görüntülenebileceği

- Mezenşimal kaynaklı kök hücrelerin lokal uygulama ile beyin dokusu içerisinde göç ederek tümöre ulaşabileceği

- Mezenşimal kaynaklı kök hücrelerin Beyin Omurilik Sıvısına enjeksiyonunda tümöre ulaşamadığı

- İnsan dental kaynaklı Mezenşimal Kök Hücrelerin RG2 tümör üzerinde inflamatuvar etkisinin olduğu

Tespit edilmiştir.

7.KAYNAKÇA

1. Dolecek, T.A., et al., *CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009*. Neuro Oncol, 2012. **14 Suppl 5**: p. v1-49.
2. David N Louis, H.O., Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavanee, *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Glioblastoma, 2007: p. p33-49.
3. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
4. Shafqat, S., E.T. Hedley-Whyte, and J.W. Henson, *Age-dependent rate of anaplastic transformation in low-grade astrocytoma*. Neurology, 1999. **52**(4): p. 867-9.
5. Parney, I.F. and M.S. Berger, *Principles of brain tumor surgery*. Handb Clin Neurol, 2012. **104**: p. 187-213.
6. Hoover, J.M., S.M. Chang, and I.F. Parney, *Clinical trials in brain tumor surgery*. Neuroimaging Clin N Am, 2010. **20**(3): p. 409-24.
7. Markett J, D.V.V., Rosenberg SA, Hellman S (ed.s), *Glioblastoma Multiforme I st ed*. Jones & Bartlett Pub., 2005.
8. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
9. Andrew H. Kaye, E.R.L., Jr., *Brain Tumors, Third Edition*. 2012(Neurogenetics and the molecular biology of human brain tumors): p. 83-101.
10. Agarwal, S., et al., *Delivery of molecularly targeted therapy to malignant glioma, a disease of the whole brain*. Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: p. e17.
11. Pardridge, W.M., *The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development*. NeuroRx, 2005. **2**(1): p. 3-14.
12. Ahluwalia, M.S., *Schmidek & Sweet Operative Neurosurgical Techniques: Indications, Methods and Results Sixth edition*. Chemotherapy for Brain Tumors, 2012. **1**: p. 94-104.
13. Lai, A., et al., *Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme*. J Clin Oncol, 2011. **29**(2): p. 142-8.

14. Groves, M.D., et al., *Phase II trial of temozolomide plus marimastat for recurrent anaplastic gliomas: a relationship among efficacy, joint toxicity and anticonvulsant status*. J Neurooncol, 2006. **80**(1): p. 83-90.
15. Gladson, C.L., *Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors*. J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(11): p. 1143-9.
16. Nabors, L.B., et al., *Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(13): p. 1651-7.
17. Haas-Kogan, D.A., et al., *Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(12): p. 880-7.
18. Costa, S.L., et al., *Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation*. Eur J Cancer, 2001. **37**(4): p. 520-30.
19. Butowski, N., et al., *A phase II study of concurrent temozolomide and cis-retinoic acid with radiation for adult patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **61**(5): p. 1454-9.
20. Moolten, F.L. and J.M. Wells, *Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(4): p. 297-300.
21. Engelhard, H.H., *Gene therapy for brain tumors: the fundamentals*. Surg Neurol, 2000. **54**(1): p. 3-9.
22. Oldfield, E.H., et al., *Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir*. Hum Gene Ther, 1993. **4**(1): p. 39-69.
23. Trask, T.W., et al., *Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors*. Mol Ther, 2000. **1**(2): p. 195-203.
24. Zlokovic, B.V. and M.L. Apuzzo, *Cellular and molecular neurosurgery: pathways from concept to reality--part I: target disorders and concept approaches to gene therapy of the central nervous system*. Neurosurgery, 1997. **40**(4): p. 789-803; discussion 803-4.
25. Daneman, R., *The blood-brain barrier in health and disease*. Ann Neurol, 2012. **72**(5): p. 648-72.
26. Yang, H., *Nanoparticle-mediated brain-specific drug delivery, imaging, and diagnosis*. Pharm Res, 2010. **27**(9): p. 1759-71.

27. Hossain, S., T. Akaike, and E.H. Chowdhury, *Current approaches for drug delivery to central nervous system*. *Curr Drug Deliv*, 2010. **7**(5): p. 389-97.
28. Loscher, W. and H. Potschka, *Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases*. *Prog Neurobiol*, 2005. **76**(1): p. 22-76.
29. Fuchs, E. and J.A. Segre, *Stem cells: a new lease on life*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 143-55.
30. Ahmed, A.U., B. Auffinger, and M.S. Lesniak, *Understanding glioma stem cells: rationale, clinical relevance and therapeutic strategies*. *Expert Rev Neurother*, 2013. **13**(5): p. 545-55.
31. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. *Blood*, 2002. **99**(10): p. 3838-43.
32. Corcione, A., et al., *Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions*. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 367-72.
33. Sotiropoulou, P.A., et al., *Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells*. *Stem Cells*, 2006. **24**(1): p. 74-85.
34. Rutella, S., S. Danese, and G. Leone, *Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1435-40.
35. Kidd, S., et al., *The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe*. *Cytotherapy*, 2008. **10**(7): p. 657-67.
36. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
37. Barbash, I.M., et al., *Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution*. *Circulation*, 2003. **108**(7): p. 863-8.
38. Mahmood, A., et al., *Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells*. *Neurosurgery*, 2003. **53**(3): p. 697-702; discussion 702-3.
39. Ortiz, L.A., et al., *Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(14): p. 8407-11.
40. Wu, G.D., et al., *Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection*. *Transplantation*, 2003. **75**(5): p. 679-85.
41. Djouad, F., et al., *Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals*. *Blood*, 2003. **102**(10): p. 3837-44.

42. Karnoub, A.E., et al., *Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis*. *Nature*, 2007. **449**(7162): p. 557-63.
43. Houghton, J., et al., *Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells*. *Science*, 2004. **306**(5701): p. 1568-71.
44. Maestroni, G.J., E. Hertens, and P. Galli, *Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice*. *Cell Mol Life Sci*, 1999. **55**(4): p. 663-7.
45. Ohlsson, L.B., et al., *Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix*. *Exp Mol Pathol*, 2003. **75**(3): p. 248-55.
46. Khakoo, A.Y., et al., *Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorogenic effects in a model of Kaposi's sarcoma*. *J Exp Med*, 2006. **203**(5): p. 1235-47.
47. Kinnaird, T., et al., *Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms*. *Circ Res*, 2004. **94**(5): p. 678-85.
48. Potapova, I.A., et al., *Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro*. *Stem Cells*, 2007. **25**(7): p. 1761-8.
49. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. *N Engl J Med*, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
50. Li, Y., et al., *Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **356**(3): p. 780-4.
51. Kim, S.M., et al., *CXC chemokine receptor 1 enhances the ability of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells to migrate toward gliomas*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **407**(4): p. 741-6.
52. Chien, L.Y., et al., *In vivo magnetic resonance imaging of cell tropism, trafficking mechanism, and therapeutic impact of human mesenchymal stem cells in a murine glioma model*. *Biomaterials*, 2011. **32**(12): p. 3275-84.
53. Cheng, P., et al., *Platelet-derived growth factor BB promotes the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells towards C6 glioma and up-regulates the expression of intracellular adhesion molecule-1*. *Neurosci Lett*, 2009. **451**(1): p. 52-6.

54. Hata, N., et al., *Platelet-derived growth factor BB mediates the tropism of human mesenchymal stem cells for malignant gliomas*. *Neurosurgery*, 2010. **66**(1): p. 144-56; discussion 156-7.
55. Xu, F., et al., *Chemokines mediate mesenchymal stem cell migration toward gliomas in vitro*. *Oncol Rep*, 2010. **23**(6): p. 1561-7.
56. Egea, V., et al., *TNF-alpha respecifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and promotes migration toward experimental glioma*. *Cell Death Differ*, 2011. **18**(5): p. 853-63.
57. Hu, Y., et al., *Glioma cells promote the expression of vascular cell adhesion molecule-1 on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a possible mechanism for their tropism toward gliomas*. *J Mol Neurosci*, 2012. **48**(1): p. 127-35.
58. Gao, Z., et al., *Vascular endothelial growth factor participates in modulating the C6 glioma-induced migration of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and upregulates their vascular cell adhesion molecule-1 expression*. *Exp Ther Med*, 2012. **4**(6): p. 993-998.
59. Klopp, A.H., et al., *Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment*. *Cancer Res*, 2007. **67**(24): p. 11687-95.
60. Binello, E. and I.M. Germano, *Stem cells as therapeutic vehicles for the treatment of high-grade gliomas*. *Neuro Oncol*, 2012. **14**(3): p. 256-65.
61. Markowitz, C.E., *Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues*. *Neurology*, 2007. **68**(24 Suppl 4): p. S8-11.
62. Studeny, M., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors*. *Cancer Res*, 2002. **62**(13): p. 3603-8.
63. Hurwitz, D.R., et al., *Systemic delivery of human growth hormone or human factor IX in dogs by reintroduced genetically modified autologous bone marrow stromal cells*. *Hum Gene Ther*, 1997. **8**(2): p. 137-56.
64. Evans, C.H., et al., *Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(24): p. 8698-703.
65. Aboody, K.S., et al., *Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(23): p. 12846-51.
66. Nakamizo, A., et al., *Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas*. *Cancer Res*, 2005. **65**(8): p. 3307-18.

67. Ries, C., et al., *MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines*. Blood, 2007. **109**(9): p. 4055-63.
68. Bexell, D., et al., *Rat multipotent mesenchymal stromal cells lack long-distance tropism to 3 different rat glioma models*. Neurosurgery, 2012. **70**(3): p. 731-9.
69. Kumar, S., D. Chanda, and S. Ponnazhagan, *Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells*. Gene Ther, 2008. **15**(10): p. 711-5.
70. Doetsch, F., et al., *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. Cell, 1999. **97**(6): p. 703-16.
71. Johansson, C.B., et al., *Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system*. Cell, 1999. **96**(1): p. 25-34.
72. Chojnacki, A., C. Cusulin, and S. Weiss, *Adult periventricular neural stem cells: outstanding progress and outstanding issues*. Dev Neurobiol, 2012. **72**(7): p. 972-89.
73. Ignatova, T.N., et al., *Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro*. Glia, 2002. **39**(3): p. 193-206.
74. Barth, R.F. and B. Kaur, *Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas*. J Neurooncol, 2009. **94**(3): p. 299-312.
75. Ko, L., A. Koestner, and W. Wechsler, *Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones*. Acta Neuropathol, 1980. **51**(1): p. 23-31.
76. Weizsacker, M., et al., *Radiation and drug response of the rat glioma RG2*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1982. **18**(9): p. 891-5.
77. Sibenaller, Z.A., et al., *Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system*. Neurosurg Focus, 2005. **19**(4): p. E1.
78. Faucher, L., et al., *Ultra-small gadolinium oxide nanoparticles to image brain cancer cells in vivo with MRI*. Contrast Media Mol Imaging, 2011. **6**(4): p. 209-18.
79. Kaffashi, A., *Malign gliomların tedavisi için lipit ile işlevselleştirilmiş PLGA nanopartiküllerin tasarımı, in vitro ve in vivo değerlendirilmesi*. 2013(Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi).

80. Yemisci, M., et al., *Treatment of malignant gliomas with mitoxantrone-loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres*. Neurosurgery, 2006. **59**(6): p. 1296-302; discussion 1302-3.
81. Geletneky, K., et al., *Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models*. Neuro Oncol, 2010. **12**(8): p. 804-14.
82. Gronthos, S., et al., *Stem cell properties of human dental pulp stem cells*. J Dent Res, 2002. **81**(8): p. 531-5.
83. Seifrtova, M., et al., *The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment*. Int Endod J, 2012. **45**(5): p. 401-12.
84. Gronthos, S., et al., *Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13625-30.
85. Neun, B.W. and M.A. Dobrovolskaia, *Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro*. Methods Mol Biol, 2011. **697**: p. 215-24.
86. Spring KR, D.M., *Introduction to Fluorescence Microscopy*. Nikon MicroscopyU, Retrieved 2008-09-28.
87. Hamada, H., et al., *Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy*. Cancer Sci, 2005. **96**(3): p. 149-56.
88. Wu, X., et al., *In vivo tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-labeled mesenchymal stem cell tropism to malignant gliomas using magnetic resonance imaging. Laboratory investigation*. J Neurosurg, 2008. **108**(2): p. 320-9.
89. Sasportas, L.S., et al., *Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4822-7.
90. Menon, L.G., et al., *Human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expressing S-TRAIL as a cellular delivery vehicle for human glioma therapy*. Stem Cells, 2009. **27**(9): p. 2320-30.
91. Jin, G., et al., *VP22 and cytosine deaminase fusion gene modified tissue-engineered neural stem cells for glioma therapy*. J Cancer Res Clin Oncol, 2013. **139**(3): p. 475-83.
92. Balyasnikova, I.V., et al., *Mesenchymal stem cells modified with a single-chain antibody against EGFRvIII successfully inhibit the growth of human xenograft malignant glioma*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9750.
93. Rosland, G.V., et al., *Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation*. Cancer Res, 2009. **69**(13): p. 5331-9.

94. Brown, A.B., et al., *Intravascular delivery of neural stem cell lines to target intracranial and extracranial tumors of neural and non-neural origin*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(18): p. 1777-85.
95. Yang, B., et al., *Dual-targeted antitumor effects against brainstem glioma by intravenous delivery of tumor necrosis factor-related, apoptosis-inducing, ligand-engineered human mesenchymal stem cells*. Neurosurgery, 2009. **65**(3): p. 610-24; discussion 624.
96. Lee, H.K., et al., *Mesenchymal stem cells deliver synthetic microRNA mimics to glioma cells and glioma stem cells and inhibit their cell migration and self-renewal*. Oncotarget, 2013. **4**(2): p. 346-61.
97. Lee, D.H., et al., *Targeting rat brainstem glioma using human neural stem cells and human mesenchymal stem cells*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(15): p. 4925-34.

8. EKLER