

Mesane kanserlerinde deneysel hayvan modelleri

Experimental animal models for bladder cancer

Dr. Şevket Tolga Tombul¹, Dr. Talha Müezzinoğlu²

¹Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Kayseri

²Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Manisa

ÖZET

Mesane tümörleri üriner sistemin en sık görülen kanserlerinden biridir. Çevresel ve mesleki birtakım karsinojenlerin etiyolojisiindeki yeri çok iyi bilinmektedir. Sık tekrar eden ve progresyon gösterebilen bir tümör olması karakteristik özelliğidir. Bu nedenle mesane karcinogenezi, preventif ve küratif tedavilere yönelik preklinik çalışmalar literatürde geniş yer bulmaktadır. Bu derlemede, preklinik çalışmalardan deneysel hayvan modellerini gözden geçirmiştir.

Anahtar kelimeler: mesane kanseri, deneysel hayvan modelleri

ABSTRACT

Bladder cancer is one of the most common cancers of urinary system. A number occupational and environmental carcinogens have well known role in etiology of bladder cancer. Its high recurrence rate and progression is another characteristic feature of bladder cancer. For this reason many preclinical studies related with carcinogenesis, preventive and curative treatments of bladder tumors have been published so far. From these preclinical studies, experimental animal models for bladder cancer were reviewed in this paper.

Key words: bladder tumor, experimental animal models

İletişim (✉): stt79@yahoo.com • toltom@gmail.com

Mesane tümörleri üriner sistemin en sık görülen kanseridir. Dünya genelinde yaşa standardize inisidansı erkeklerde 100000'de 10,1 kadınlarda ise 100000'de 2,5'tir (1). Mesane kanserine bağlı mortalite erkeklerde 4/100000 ve kadınlarda 1,1/100000'dir (2). Mesane kanserlerinin tanı anında %75-80'i mukoza ve submukozaya sınırlıdır. Ancak bu yüzeysel tümörlerin %30 kadarı sık nüks ve bir kısmı da progresyon gösterirler (3). Progresyon gösteren mesane tümörlerinde yaşam beklentisi daha da düşmektedir. Ülkelere bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte bir mesane tümörü hastası için tanıdan ölüme kadar geçen süre içerisinde tedavi maliyeti 89287\$ ile 202203\$ arasında değişmektedir (4). Tedavi maliyetinin yüksek ve ileri evrede yaşam beklentisinin düşük olması nedeniyle yüzeysel evrede tümör progresyonunu engelleyecek tedaviler üzerine sayısız çalışmalar yapılmış ve yapılmaktadır. Bu nedenle mesane tümörü biyolojisi üzerine yapılacak olan preklinik çalışmalar insanlarda uygulanabilecek olan küratif ve preventif tedavilerin gelişmesi açısından önemlidir. Bu derlemede mesane tümörleri için geliştirilmiş hayvan modellerinin genel özellikleri gözden geçirilmiştir.

Temel bilimsel çalışmalar, hücre transformasyonu, kanser gelişimi üzerine yapılmış basit deneysel modelleri kapsar. Sonuçları yorumlamak kolaydır. Hücre kültürleri bunlardan en sık kullanılanıdır. Mesane kanseri hücre kültürü ilk defa He La tarafından 1952'de tanımlanmıştır (5). Hücre kültürü; herhangi bir hücre çeşidinin, tümör hücresi de olabilir, besin içeren solüsyonlarda büyütülmesi işlemidir. Plastik yüzey üzerinde tek bir hücre tabakası iki boyutlu bir yapıda büyüme gösterir. Hücre kültürleri yardımı ile mutogenez,

invazyon, migrasyon süreçlerinde olan proteolitik enzim üretimi gibi basamakları aydınlatmak mümkün olabilir. Ancak çıkarılan sonuçları insana uygun bir şekilde çevirebilmek her zaman mümkün olmaz. Çünkü kültürlerde tek katmanlı 2 boyutlu olan hücre organizasyonu dokularda 3 boyutlu ve birden fazla katmanlıdır. Aynı zamanda, hücre kültürlerinde bir veya en fazla iki çeşit hücre grubu bulunurken tümöral gelişimde ikiden fazla hücre grubu tümörün büyümesini arttıran veya azaltan bir etkileşim içindedir. İmmun hücreler, stromal hücreler, tümör hücreleri gibi. Benzeri sınırlamaların önüne geçmek 3 boyutlu model sağlayan hayvan modelleri ile mümkün olabilir (6).

“Tedavi maliyetinin yüksek ve ileri evrede yaşam beklentisinin düşük olması nedeniyle yüzeysel evrede tümör progresyonunu engelleyecek tedaviler üzerine sayısız çalışmalar yapılmış ve yapılmaktadır. Bu nedenle mesane tümörü biyolojisi üzerine yapılacak olan preklinik çalışmalar insanlarda uygulanabilecek olan küratif ve preventif tedavilerin gelişmesi açısından önemlidir.”

Hayvan modellerinin karakteristik özellikleri

Hayvan modelleri hücre tabanlı deneyler ile yeni geliştirilen ajanların insanlarda görülen kanserlerde kullanımına olanak sağlayan bir köprü vazifesi görür. Hastalık gelişimi ve progresyonun incelenmesine, yeni tedavilerin test edilmesine olanak sağlar. Hazırlanan modeller insan patolojisine olabildiğince yakın olmalıdır. Kullanılan hayvanlar genellikle kemirgenlerdir. Sıklıkla fare ve sıçanlar tercih edilir. Bu hayvanların üretimi kısa ve kolaydır. Bakımları ucuzdur ve bazı özellikleri genetik olarak değiştirilebilir. Hayvan modellerini kullanılarak;

- Tümör biyolojisine: Tümör büyümesi, latent evre, büyüme hızı, invazyon, metastaz
- Karsinojenik ajanlara
- Karsinogenezin önlenmesine
- Sitotoksik ve immun tedavilere olan cevabın değerlendirilmesine yönelik çalışmalar yapmak mümkündür.

Zenojenik modeller

İnsanlardan elde edilmiş kanser hücrelerinin kullanıldığı deneysel hayvan modelleridir. Genellikle 'nude' fare kullanılır. Bu farelerin 11. Kromozomlarında spontan gelişen bir mutasyon mevcuttur. Bu mutasyona bağlı olarak hayvanlar kılsız ve fonksiyonel timus dokusundan yoksundur. Fonksiyonel timus dokusunun yokluğu düşük sayıda olgun T lenfositlerine ve sonuçta başka bir türden (zenograft) yapılan hücre naklini kabul eden bir bünyeye sebep olur. Zenojenik modeller yardımı ile tümör hücrelerinin biyolojisinin yanı sıra monoklonal antikolar, sitotoksik tedavilerin ve radyoterapinin etkinliği incelenebilir (7). Örneğin, mesane tümörlerinde vasküler epitelyal büyüme faktörü (VEGF) ve onun reseptörünün (VEGFR) ekspresyonu artmıştır. Buna dayanarak yapılan çalışmada, reseptörleri hedef alan antikolar sitotoksik bir ajan olan

“Hayvan modelleri hücre tabanlı deneyler ile yeni geliştirilen ajanların insanlarda görülen kanserlerde kullanımına olanak sağlayan bir köprü vazifesi görür.”

paklitaksel ile kombine olarak verildiğinde tümör büyümesinin ve anjiogenezin durduğunu gözlenmiştir (8). Başka bir radyofarmositik çalışmada epitelyal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) için geliştirilmiş monoklonal antikoları radyoaktif bizmut (²¹³Bi) ile kombine ederek intrakaviter bir tedavi planlamıştır. Verilen ajan antikolar yardımı ile reseptör blokajı sağlarken aynı zamanda bizmut yardımı ile lokal radyoterapi yapılmaktadır. Araştırma da bu tedavi mitomisin-C ile zenojenik fare modelinde etkinlik ve nefrotoksisite açısından karşılaştırılmıştır. Bu tedavi sonrası nude farede sağ kalımın uzadığı ve mitomisine göre nefrotoksisitenin daha az olduğu görülmüştür (9).

Zenojenik modellerde immun sistemi basılanmış hayvanlar kullanıldığı için konak immun sistem – tümör etkileşimini çalışmak mümkün olmaz. Benzer şekilde karsinogenez ile ilişkili biyolojik mekanizmaların incelenmesinde ve karsinogenez engelleyen mekanizmaların incelenmesi noktasında zenojenik modeller faydalı değerlerdir.

Sinojenik modeller

Deneyde kullanılan hayvanda tümör oluşan modellerdir. Bu ya hayvanda kimyasal karsinogenler ile tümör oluşturularak sağlanır ya da genetik olarak aynı başka bir hayvandan elde edilen tümör hücreleri deney modeline inoküle edilerek sağlanır. Bu modeller konak tümör etkileşiminin çalışılabileceği yararlı deneysel araçlardır (7).

Sinojenik modeller ile immunoterapi etkinliği ve etki mekanizması ile ilgili çalışmalar yapmak mümkündür. İntravezikal immunoterapi olarak uygulanan BCG'nin rekürens ve progresyon önleyici etkisi bilinmektedir. Ancak bu etkilerden tüm hastalar aynı oranda faydalanmazlar. Hastaların %20'si ya en başta fayda görmezler ya da 5 yıl içinde nüks gösterirler. Mangsbo ve arkadaşları, C57BL/6J farelerinin cilt altına MB49 mesane tümörü enjekte ederek oluşturdukları modelde BCG tedavisini incelemişlerdir. MB49 hücreleri negatif etkili immün regülör proteinleri (Programmed death ligand-1, PDL1, cytotoxicity T lymphocyte antigen-4, CTLA-4) sentezler. Bu hücreler T regülör hücrelerinin etkisini artırır. Bu hücrelerin etkileride BCG'ye olan cevabı azaltır. İntramural olarak PDL-1 ve CTLA-4' ü bloklayan antikoların BCG ile eş zamanlı verilmesi, sağ kalımı ve tümöre reaktif T hücrelerin sayısının artmasına neden olurken T regülör hücrelerinin sayısı azalmıştır (10).

“Mesane tümörleri sık rekürens gösterdikleri için ve çevresel bir takım ajanlara maruziyet sonucu oluşmasından dolayı kemopreventif tedaviler için adaydır. Bu tedavilerin şekillendirilmesi için hayvan modelleri vazgeçilmez araçlardır.”

Bir başka çalışmada Lodillinsky ve arkadaşları BCG'nin etki mekanizmasını incelemek için sinojenik heterotopik fare modeli kullanılmışlardır. MB49 mesane tümör hücreleri subkutan olarak inoküle edilmiş takiben oluşan tümöre intramural olarak BCG verilmiştir. Tümör gelişen hayvanlardan elde edilen makrofajların fibroblast proliferasyonunu uyaran birtakım faktörleri sentezlediğini göstermişlerdir (Fibroblast büyüme faktörü-2- FGF-2 gibi). BCG verilen tümör dokusunda kollejen miktarında artış, alfa-düz kas aktin miktarında artış olduğu gösterilmiştir. Bunların ışığı altında BCG tedavisinde meydana gelen olayların doku onarım mekanizmaları ile benzerlik gösterdiği yorumu yapılmıştır (11).

Mesane tümörleri sık rekürens gösterdikleri için ve çevresel bir takım ajanlara maruziyet sonucu oluşmasından dolayı kemopreventif tedaviler için adaydır. Bu tedavilerin şekillendirilmesi için hayvan modelleri vazgeçilmez araçlardır. Organa özgü modeller yardımı hangi ajanlar karsinogenez önlemede etkili çalışılabilir. Bu hayvan modellerinde tümör oluşumu kimyasal induksiyon, spontan gelişim veya transjenik farelerin kullanımı ile yapılabilir. Kullanılacak modellerin organa özgü olmasının yanında insan tümörleri ile benzer histolojik ve genetik özelliklere sahip olmalıdır. Makul süre içerisinde yeterli sayıda hayvanda tümör oluşturulabilmelidir. Aynı zamanda modelden elde edilen sonuçlar klinik etkinlik açısından tahmin edilebilir olmalıdır. Yani elde edilecek negatif veya pozitif sonuçlar insanlarda yapılacak çalışmalar ile ilişkilendirilebilmelidir. Bu alanda kullanılan modellerde mesane tümörü en sık hidrok-sibütıl nitrozamin (OH-BBN) induksiyonu ile oluşturulur. Lu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada OHBBN induksiyonu ile sıçan ve farelerde oluşturulan mesane tümörlerinin insanlardaki tümörler ile benzer olduklarını

göstermişlerdir. Bundan yola çıkarak birçok araştırmacı sıçanlarda oluşturulan bu tümörlerde nonsteroid analjeziklerin, EGFR inhibitörlerinin ve bazı doğal bileşiklerin mesane tümörü gelişimini engellediklerini göstermişlerdir (7,12). Bu deneysel modellerin dezavantajları uzun süre almaları (8-12 ay), deneyde çalışan ekibin karsinojenlere maruz kalmasıdır.

Transjenik hayvan modelleri

Onkogenleri aktive etmek veya supresör genleri deaktive etmek için genetiği oynanmış hayvan modelleridir. Tranjenik modeller bir çeşit sinojenik modellerdir. Genetik olarak özel üretilen knockout fareler, spesifik bir genin yoksunluğunun yarattığı etkiyi çalışmak için kullanılır. İnsan mesane tümörlerinde Rb-1, p53 gibi supresör genler baskılanırken Ha-ras gibi onkogenler aktive olur. Rb geninden yoksun fare embriyosu 14. Günde ölürken, p53'den yoksun farelerde 7. Ayda timusta lenfoma gelişir. Bu nedenle kondisyonel tranjenik modeller geliştirilmiştir. Bu modellerde organizmanın tümü yerine çalışılmak istenen dokuda ilgili gen fonksiyonlarının kaybı sağlanır. Bunları sağlamak için bazı tanımlanmış özel işlemler (Cre/loxP işlemi gibi) vardır (13). Yapılan çalışmalarda, Rb1'in her iki allelinin kondisyonel deaktivasyonu ürotelyumda apoptozise sebep olurken p53 allellerinin inaktivasyonun proliferasyonda artışa yol açtığı görülmüştür. Rb proteininden yoksun farelerde p53'ün fonksiyon kaybetmesi ürotelyumda hiperplazi, şemsiye hücrelerde atipi ve yüzeysel papiller mesane tümörü gelişimine yol açtığı gösterilmiştir. Aynı zamanda bu iki tümör supresör geninin etkilerinden yoksun farelerin çevresel karsinojenlerin etkilerine daha yatkın oldukları gösterilmiştir (14).

Heterotopik tümör büyümesi

Hedef organ dışında başka bir dokuda tümör geliştirilmesi heterotopik tümör modelidir. Ortotopik inokülasyonun kompleks olduğu modellerde faydalıdır. Tümör inokülasyonu kolaydır ve kısa bir eğitim sonrası yapmak mümkündür. Tümör büyümesinin tespiti kolaydır. Çoğunlukla cilt altı kullanılır. Palpasyon ile tümör büyümesi tespit edilebilir. Tümör kitlesini hesaplamak için değişik

geometrik formüller kullanılabilir. Cetvel ile tümörün uzun ve kısa boyutu ölçülür. Bu boyutlar uygun olan formüllere yerleştirilerek kitle hesaplanabilir. Diğer bir yolda tümör kitlesinin çıkarılarak ağırlığının ölçülmesidir. Cilt altı dışında heterotopik modellerde ekstravazasyonun, akciğer veya kemikte kolonizasyonun çalışılması amacı ile kuyruk veni ve sol ventrikül de inokülasyon için kullanılmıştır (7). Öte yandan heterotopik tümörler olağandan daha farklı dokulara metastaz geliştirebilir, farklı histolojik ve moleküler özellikler gösterebilir. Black ve arkadaşları, heterotopik ve ortotopik tümör büyümesini karşıladıkları çalışmalarında; ortotopik tümör modellerinde lenf nodu ve akciğer metastazı gelişirken, mikrodamar dansitesi, büyüme faktörü ekspresyonu ve proteolitik enzim aktivitesinde artış olduğunu göstermişlerdir. Bu farklılıklar heterotopik modellerde izlenmemiştir (15).

Ortotopik tümör büyümesi

Konak tümör etkileşiminin en iyi incelendiği hayvan modelleridir. Hayvan mesanesinde tümör oluşturulur. Kimyasal karsinojen ile induksiyon yapmak teknik olarak kolayken tümör inokülasyonu ile yapmak zordur. Kalifiye teknisyen ihtiyacı vardır. Hayvanlara anestezi verilmesini gerektirir. Anesteziyi takiben üretra 24G IV kateter ile kateterize edilir. Tümör inokülasyonundan önce ürotelyumda hasar oluşturulması gerekir. Bunun için ya kimyasal ajanlar (HCl, NO3Ag gibi) veya TUR benzeri yöntemle elektrokoterizasyon ile ürotelyumda hasar meydana getirilir. Hasar için polilizin insitilasyonu, laparotomi ile intramural inokülasyon gibi yöntemler tariflenmiştir. Ürotelyumun elektrokoterizasyonu ilk defa 1999'da Gunther ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Üretradaki kateterden geçirilen kılavuz tel ürotelyuma değdikten sonra monopolar koterizasyon yeterli olmaktadır. Ortotopik modellerde karşılaşılan diğer bir zorluk da tümör büyümesinin tespitidir. Hematüri farelerin büyük çoğunluğunda görülebilir. Mesane palpasyonu gelişen kitle hakkında bilgi verebilir. Ancak mesane retropubik yerleşimli olduğundan ve bazen gelişen globu kitleden ayırt etmek olduğundan objektif yöntemler değildir. Bu nedenle ortotopik modellerde end point deneyler olarak adlandırılan çalışmalar tasarlanır. Deney sonunda hayvanlar sakrifiye edilecek

mesanelerinde kitlenin boyut ölçümü ya da ağırlık ölçülümü yapılır. Bu deneylerde sadece deneyin sonunda gelişen tümör kitle ile ilgili ölçümler yapıldığından deney süresince olan gelişmelerden bahsetmek mümkün değildir (16,17).

Deney hayvanları için geliştirilmekte olan ultrason (US), manyetik rezonans görüntüleme (MRG), biyoluminisan görüntüleme (BL) gibi invazif olmayan görüntüleme yöntemleri ortotopik modellerde karşılaşılan zorluğun aşılmasına yardımcı olacaktır. MRG hayvan modellerinde erken tumor tespiti için kullanılmaktadır. Tümör implantından 14 gün sonra herhangi bir klinik belirti yokken tümör gelişimini tespit edebilir. Aynı zamanda tümör gelişiminin izlenmesinde de yardımcıdır. Ancak duyarlılığının düşük, işlem zamanının uzun olması, donanım maliyetinin yüksek ve her merkezde kolay bulunmaması dezavantajdır. Biyoluminisan görüntüleme yöntemi son zamanlarda ilgi odağı olmuştur. Lusiferaz enziminin luciferin maddesini yıkması sırasında oluşan ışık sinyallerinin vücut dışında özel kameralar ile tespitine dayanır. Kanser hücreleri implantasyondan önce lusiferaz enzimi ile modifiye edilir. BL ile tümör tedavilerinin etkinliğini ölçmek mümkündür. Fakat bu reaksiyonun hayvan modelinde bağırsık sistemini ve intravezikal tedaviyi ne kadar etkilediği kesin olarak bilinmemektedir. Ultrason daha yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Nispeten ucuz olması, gerçek zamanlı görüntüleme sağlaması ve tekrar edilebilir olması avantajlarıdır. Ultrasonun değişik formatları (doppler, yüksek çözünürlüklü, kontrast fazlı gibi) çalışmalarda ortotopik mesane tümörü tespiti için tanımlanmıştır (16).

Sonuç

Deneysel hayvan modelleri, onkolojik çalışmaların her dalında olduğu gibi mesane tümörlerine yönelik karisnogeneze, preventif ve küratif tedavi çalışmalarının ayrılmaz bir parçasıdır. Ancak ülkemizde akademik çalışmalar daha çok klinik araştırmalar olarak yer bulmakta ve literatürdeki prelinik çalışmalara ülkemizden olan katkılar oldukça sınırlıdır. Bu derleme yazımız ile ülkemizdeki akademisyenlerin prelinik çalışmalara olan heyecanlarını yeniden uyandırmayı ve arttırmayı umut etmekteyiz.

Kaynaklar

1. Ploeg M, Aben KKH, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* 2009 Jun;27(3):289–93.
2. Ferlay J, Randi G, Bosetti C, et al. Declining mortality from bladder cancer in Europe. *BJU Int* 2008 Jan;101(1):11–19.
3. M. Babjuk, W. Oosterlinck, R. Sylvester, E. Kaasinen et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol*, 59: 997-1008.
4. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A et al. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*, 21:1315–1330.
5. Gey GO, Cofmann WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer research* 12 (1952):264–265.
6. Gabriel U, Bolenz C, Michel MS. Experimental models for therapeutic studies of transitional cell carcinoma. *Anticancer Research* 27(2007):3163–3172.
7. Eijan AM, Lodillinsky C, Sandes EO. Animal Models for Basic and Preclinical Research in Bladder Cancer. In *Bladder Cancer- From Basic Science to Robotic Surgery*. Ed: Dr. Abdullah Cancda. Croatia: InTech, 2012. Sayfa 383-404.
8. Davis DW, Inoue K, Hicklin DJ, Abbruzzese JL et al. Regional effects of an antivascular endothelial growth factor receptor phosphorylation and apoptosis in human 253J B-V bladder cancer xenografts. *Cancer Res.* 13:4601-4610.
9. Pfost B, Seidl C, Autenrieth M, Saur D et al. Intravesical alpha-radioimmunotherapy with 213Bi-antiEGFR-mAb defeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice. *J Nucl Med* 50: 1700–1708.
10. Mangsbo SM, Sandin LC, Anger K, Korman AJ et al. Enhances tumor eradication by combining CTLA-4 or PD-1 blockade with CpG therapy. *J Immunother.*, 33: 225-235.
11. Lodillinsky C, Rodriguez V, Vauthay L, Sandes E et al. Novel invasive orthotopic bladder cancer model with high cathepsin B activity resembling human bladder cancer. *J Urol*, 182: 749–755.
12. Lu Y, Liu P, Wen W, Grubbs CJ et al. Crossspecies comparison of orthologous gene expression in human bladder cancer and carcinogen-induced rodent models. *Am J Transl Res.*, 20: 8-27.
13. Mo L, Cheng J, Lee EY, Sun TT et al. Gene deletion in urothelium by specific expression of Cre recombinase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289:F562-563.
14. He F, Mo L, Zheng XY, Hu C et al. Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis. *Cancer Res.*, 69:9413-9421.
15. Black PC, Dinney CP. Bladder cancer angiogenesis and metastasis: Translation from murine model to clinical trial. *Cancer Metastasis Rev.*, 26: 623-624.
16. Chan E, Patel A, Heston W, Larchian W. Mouse orthotopic models for bladder cancer research. *BJU Int.*, 104:1286-1291.
17. Günther JH, Jurczok A, Brandau S, Dienert I et al. Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res.*, 59: 2834-2837.