

Hematolojide Hayvan Deneyleri: Temel Prensipler

Ali Uğur URAL

GATA İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı

Hematopoetik sistem, çok sayıda olgun diferansiye olmuş hücreden az sayıda kendi kendini yenileme ve diferansiyasyon kapasitesine sahip pluripotent kök hücreye kadar değişen organize bir hiyerarşiyi içerir. Hematopoetik sistemin organizasyonu ve regülasyonuna ait bilgilerimizin çoğu, uzun süreli in vitro kültür ve kök hücrelerini tanımlamak üzere kısa- ve uzun- süreli yapılanma çalışmalarının uygulandığı fare çalışmalarından oluşturulmuştur. Aksine, insan hematopoetik sisteminin biyolojisi konusundaki bilgilerimiz uygun bir in vivo kök hücre assay'ının olmaması nedeniyle eksiktir. İnsan hematopoetik kök hücrelerinin immün-yetersiz farelerde engraftment'ı konusunda birçok farklı yaklaşım, erişkin KI, olgun lenfoid hücreler veya fetal organların transplantasyonu şeklinde tanımlanmıştır. Bu tip fare modelleri, lösemi, otoimmünite ve enfeksiyon hastalıkları gibi çeşitli hastalıkları çalışmada halen kullanılmaktadır. Fakat, hematopoezin normal gelişiminin incelenmesi konusu, engraftment'ın fare dokusunda sadece lenfoid ve makrofaj serilerinde sınırlı kalması nedeniyle uygun bulunmamıştır.

Özellikle hematopoez birçok büyüme faktörü tarafından düzenlendiğinden, insan KI'nin transplante edilmiş olduğu immün-yetersiz farelerde multilineage diferansiyasyonun olmaması ve düşük engraftment hızı, fare büyüme faktörlerinin yeterli konsantrasyonda olmamasına bağlanabilir. Eritropoetin, PIXY321 (IL-3 ve GM-CSF'in oluşturduğu bir füzyon proteini), insan mast-hücresi büyüme faktörü ve GM-CSF kombinasyonunun insan KI hücrelerinin transplante edildiği sublethal doz-

da ışınlanmış SCID farelere verilmesiyle fare KI'de insan myeloid, lenfoid ve eritroid seri olgun ve progenitorlarının oluşturduğu engraftment gözlenmiştir.

Bir hayvan modeli; insanlardaki aynı hastalığı taklit eden ve o hastalığın kalıtsal, doğal olarak veya çeşitli şekillerde oluşturulduğu canlı bir organizma olarak tanımlanabilir. İyi bir hayvan modeli için yaygın kriterler ortaya konmuş olmasına rağmen, insan hastalıkları için ideal modeller yoktur. İnsan hastalıkları sıklıkla değişicidir ve birçok formu olabilir, bu nedenle spesifik bir hastalığı çalışabilmek için birden fazla hayvan modeline ihtiyaç olabilir. Tersine, bir hastalığın bir özel bir formunu veya tedavisini değerlendirebilmek için tek bir hayvan modeli yeterli olabilir.

İnsanlarda oluşan kanserlerin hayvan modellerinin oluşturulmasının birkaç önemi vardır. a) Genetik olarak geçerli bir hayvan modeli oluşturulması bize, insan tümörlerinde bulunan mutasyonlarla bu tümörlerin oluşumu arasındaki ilişkiyi gösterebilmemizi sağlar. b) Kanser biyolojisinde sorumlu olan biyolojik yolların çoğu hücre kültür çalışmalarında geniş olarak çalışılmıştır. Ancak, kanserin kompleks biyolojisinin tamamına hücre kültür sistemleri ile deneysel olarak erişilemez. Örneğin, tümörlerin biyolojik davranışlarını etkileyen sinyal ileti yollarının tanımlanması ve bu yolların host hücre mikroçevresi ile etkileşimleri, deneylerin in vivo sistemlerde yapılmasını gerektirir. c) Kanser tedavisi için etkin olacak hedeflerin tanımlanabilmesi, bu hedeflerin hayvan

sistemlerinde test edilmesini gerektirir. Böylece bu hedeflerin hastalık prosesinde gerekli olduğu onaylanır. d) Bu hedefler tanımlanır ve bu hedeflerin aktivasyonu ile hastalık için hayvan modelleri oluşturulursa, preklinik hayvan modelleri bu hedeflere yönelmiş tedavi girişimleri için ideal modeller oluşur.

İnsan hastalıkları için hayvanlar içerisinde en ideal model organizma fare olarak gözükmektedir. Bunun sebebi sadece farenin fizyolojik olarak insana çok benzemesi değil, aynı zamanda 1000'in üzerinde spontan, radyasyon veya kimyasal madde ile indüklenmiş mutant lokusun tanımlanmasıyla oluşturulmuş insan hastalıkları için geniş bir genetik rezervuarı taşımasından gelir. İlave olarak, teknolojideki ilerlemeler insan hastalıkları için fare modelleri oluşturabilme kapasitesini artırmıştır. Bunlar arasında, fare genomunun yüksek rezolüsyon genetik ve fiziksel bağlantı haritalarının geliştirilmesi ve buna bağlı olarak fare hastalık lokusunun klonlanması ve tanımlanmasının kolaylaşması gelmektedir.

Bugüne kadar hayvan modelleri oluşturmada dört asıl metodoloji kullanılmıştır. Kimyasal mutagen ile oluşturulmuş modeller, xeno- veya allograft transplantasyonla oluşturulmuş modeller, germli-ne genetik modifikasyonla oluşturulmuş modeller, somatik genetik modifikasyonla oluşturulmuş modeller.

a) Çeşitli hayvan modellerinde çeşitli kimyasal maddelerin verilmesiyle tümörler oluşturulabilir. Lewis ratlara intraperitoneal olarak azaserin'in verilmesiyle pankreatik karsinoma veya BALB/c farelere intraperitoneal pristan yağının verilmesiyle multiple myeloma oluşturulması örnekleri buna verilebilir.

b) Xeno- veya allograft transplantasyonda, elde bulunan hayvan türüne veya insana ait hücre dizilerinin veya hayvanda oluşturulan tümöral doku homojenatlarının hedef teşkil edecek immün olarak baskılanmış hayvanlara verilmesini gerektirir. Burada intraperitoneal veya hedef dokuya malign hücreler verilerek, bir kitle halinde veya hedef dokuda tümör oluşturulmaya çalışılır. Bu amaçla çeşitli hayvan modelleri kullanılmaktadır.

Atimik Nude (nu/nu) farelerde antikor oluşturan B lenfositler, kompleman ve NK hücreler bulunur, T lenfositler yoktur. Bu tip fareler kılıksızdır ve transplantasyon modelinin en iyi çalışıldığı fare

grubundandır. İnsanlardan elde edilen lösemik hücreler veya hücre dizileri nude farelere verildiğinde lokalize solid tümör veya ascite olarak büyür, bu yörelerde tümör oluşması insanlardaki gerçek tümör karakteristiklerini yansıtmayabilir. Bu ve bundan sonra bahsedilecek immün yetersiz fare tipleri bazı fare patojenlerine karşı aşırı hassastırlar, bu nedenle SPF (spesific pathogen free) ortamlarda idame ettirilebilirler. HEPA filtrelili ortamlar ve farelere sağlanan her şeyin otoklavdan geçirilmesi gerekir.

Bosma ve Carrol tarafından severe combined immün-deficient (SCID) farelerin oluşturulması xenotransplantasyonunda büyük etki yaratmıştır. SCID fare scid genindeki mutasyon için homozigottur. Scid genindeki mutasyonlar başarısız DNA rearrangement'i ile sonuçlanır, immünglobulin ve T hücre reseptör genlerinin produktif rearrangement'i engellenir, bu da T ve B hücre eksikliği ile sonuçlanır. Fakat, NK hücreleri formunda immü-nite, kompleman ve myeloid hücreler normaldir. Scid mutasyonunu taşıyan farelerde ayrıca jeneralize radyasyon tamir defekti vardır, bu da onları iyonizan radyasyona karşı wild-type ile kıyaslandığında iki kez daha hassas kılar. Bu immün yetersiz farelere insan KI, periferik kanı veya fetal karaciğer veya timusunun transplantasyonundan 6-12 ay sonra, fare hematopoetik dokularında ve periferik kanlarında normal myeloid progenitörlere ve lenfoid hücrelere rastlanmıştır. Scid- lösemi modeli lösemik progresyona yol açan genetik faktörleri çalışmak için ideal biyolojik ortam oluşturur. Bu lösemi modelininin yüksek etkinlikte gen transferi teknikleri ile birleştirilmesiyle, onkojenler ve tümör baskılayıcı genler gibi genetik faktörlerin lösemik transformasyon ve progresyonundaki rolünü öğrenmek mümkün olacaktır. Ancak lösemi modellerini SCID farede çalışma konusunda birkaç sınırlayıcı nokta olabilir. İlki, SCID fare mikroçevresi insan organ mikroçevresini aynen yansıtmayabilir. Bu nedenle SCID farede lösemi biyolojisi ile ilgili çalışmaların neticeleri dikkatli olarak değerlendirilmelidir. Benzer şekilde, SCID fare modelinde yeni ilaçlar çalışılırken bunların terapötik etkinlikleri konusunda yorum yapmadan önce dikkat edilmelidir. Böylece farede beklenmeyen olumlu etkileri gözlenen yeni ajanların detaylı farmakokinetik çalışmalarının yapılması gerekir. Yeni bir tedavi test edilirken azami dikkat sarfedilmelidir, çünkü toksisite sonuçları ve etkinlik sonuçları yanıltıcı olabi-

lir. Farede toksisitenin olmaması, hayvanlarda minimal veya hiç toksisite olmayacak anlamına gelmemelidir. Özel olarak insan lösemi hücrelerine yönelmiş bir ilaç, fare dokusunda sistemik toksisitede azalma ve daha fazla antilösemik güç şeklinde bir etki göstermeyebilir. Hastalarda, lösemik hücreler ve diğer dokular ilaçlarla etkileşebilir ve lösemi hücresi başına daha az molekülün düşmesine sebep olabilir. Bu nedenle denenen ilacın toksisite ve aktivitesinin belirlenebilmesi açısından hastalığın farklı dönemlerinde fare modellerinde denemesi gerekir. Ayrıca SCID fare modelleri otoimmün disfonksiyon, HIV enfeksiyonu ve EBC transformasyonunu çalışmak için de kullanılabilirler.

SCID fare modeli nonobez diabetik (NOD)/SCID farelerin oluşturulmasıyla daha da geliştirilmiştir. NOD farelerde kompleman yolağında ve makrofaj fonksiyonunda da defektler olduğundan SCID fareden daha az rezidüel immünitesi vardır. NOD/SCID farelerde SCID mutasyon nedeniyle T ve B hücreleri de olmadığından otoimmün diabetleri yoktur. Bu tip farelere hücrelerin verilmesiyle sıklıkla bir kitle halinde veya sistemik olarak tümör doku gelişir. Yeni tanı konmuş KML'li hastaların Ph+ saf CD34+ hücrelerinin NOD/SCID farelere verilmesinin bu farelerde engraftment'ı sağladığı ve fare kemik iliğinde bcr/abl eksprese eden progenitorların bulunması örneği buna verilebilir. İnsan hematopoetik hücrelerin in vivo büyümesini ve böylece neoplastik hematopoezisi değerlendirmekte ideal olarak kullanılır. Bu model, primitif hematopoetik progenitör hücreleri değerlendirmek, lösemik transformasyon için hedef hücreleri tanımlamak ve bazı solid tümörlerin doğal gidişini tanımlamakta kullanılmıştır. Ayrıca, in vivo terapötik stratejileri değerlendirmede de kullanılabilir.

c) Gain-of-function (fonksiyon kazanılması) veya loss-of-function (fonksiyon kaybı) germline genetik modifikasyonlar, transgenic veya gen hedefleme teknikleri ile oluşturulabilir. Özel hücre topluluğu içinde eksprese olan gain-of-function mutasyonları, doku spesifik promoter'lardan onkojenlerin ekspresyonlarından elde edilebilir. Loss-of-function mutasyonları için, konvansiyonel gen hedefleme teknikleri tüm hücrelerdeki hedef genin delesyonuna sebep olur ve böylece o hücrelerde eksprese olacak delesyona uğramış genin biyolojik etkilerinin de kaybolmasını sağlar. Örneğin, pankreas karsinomu oluşturmak amaçlandığında pankreatik elastaz gibi pankreas için spesifik olan bir

genin enhancer-promoter yöresine yabancı bir transforming gen (tümör virus SV40 geniş T-antijen geni gibi) yüklenir. Fare yumurtası içine böyle bir yeni DNA yapısının enjekte edilmesi, pankreas hücreleri içinde genin müteakiben ekspresyonunu ve yaklaşık 3-6 ay sonra pankreas asiner hücreli karsinom gelişmesini sağlar.

d) Somatik genetik modifikasyonla modellerin oluşturulmasında retroviral vektörler kullanılır. Bu amaçla kullanılan iki sistem tanımlanmıştır. Bunlardan birisi MMLV (moloney murine leukemia virus)- kökenli replikasyon kompetan vektörler olup, enfekte dokulara bütünüyle yayılır. Diğer sistem de ALV (avian leukosis virus)- kökenli replikasyon inkompetan vektörler olup, enfeksiyonu spesifik hücre tiplerine sınırlar ve enfekte dokulara bütünüyle yayılmaz. Replikasyon kompetan sistemde çok sayıda hücre enfekte edilir ve bu da tümörlerin oluşumuna katkıda bulunabilecek sekonder mutasyonların ortaya çıkması ile sonuçlanır.

Normal insan kök hücre programında bozukluklar neticesinde ortaya çıkan lösemik hücre proliferasyonunu, normal ve lösemik hücrelerin kompleks büyüme faktörü ihtiyaçları ve hücre-hücre etkileşimleri nedeniyle in vitro kültür ortamında çalışmak zordur. Ayrıca, lösemik hücre dizisini immortal yapmak üzere yapılan girişimler bu hücreleri başlangıçta alınmış olduğu hasta örneklerinden önemli derecede farklı bir hale getirebilir. Bu nedenle, son 20 yılda hematolojik malignitelerin in vitro kültür sonrasında hayvan modellerinin oluşturulması konusunda girişimler, insan tümör xenograftlarının özellikle immün yetersiz farelerde geliştirilmesi konusunda odaklanmıştır.

Multiple Myeloma modeli

Multiple myeloma (MM) plazma hücrelerinden kaynaklanan bir malignitedir ve tedaviler sonucunda kür sağlanamaması, MM ile ilgili çalışmaların sayısını son derece artırmaktadır. Özellikle patobiyolojisini aydınlatmaya yönelik çalışma yapılabilmesi için in vitro ve in vivo deney modellerine ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmalarda kullanılan MM hücre dizilerinin çoğu dirençli hücrelerden türetildiği için in vitro modeller uygun olmamakta, özellikle prelinik çalışmaları için in vivo modeller gerekmektedir.

IL-6 MM patogenezinde rol oynayan en önemli sitokindir ve hem insan hem de farelerde neoplas-

tik plazma hücrelerinin oluşumunu tetiklemektedir. Şimdiye kadar kimyasal ajan pristan yağı (2,6,10,12-tetramethylpentadecane) ile oluşturulmuş fare plazmositom (MPC) modeli en çok kabul edilen ve kullanılan modeldir. Pristan yağı etkisini IL-6 üzerinden oluşturmaktadır. IL-6 defisiti olan BALB/c farelerde pristan yağı etkili olamamaktadır. MM modeli için BALB/c dişi farelere pristan yağı intraperitoneal (IP) olarak 0. 60. ve 120. günlerde 0.5 ml veya 0. günde 1 ml verilebilir. Biz de yaptığımız bir çalışmada BALB/c dişi farelere 0. 60. ve 120. günlerde 0.5 ml IP uygulama ile 300. günde farelerin %86'sında plazmositom oluştuğunu gözledik.

Pristan yağı ile oluşturulmuş plazmositom lokalize olarak gözlenmekte ve karaciğer, dalak, böbrek, omentum gibi IP organlarda tutulum izlenmektedir. Plazmositom oluşturulmuş farenin periton mayisinden elde edilen plazma hücreleri, sağlıklı bir BALB/c dişi farenin kuyruk veninden enjekte edilir ise sistemik MM oluşturulabilir. Çalışmamızın ikinci aşaması olan sistemik MM oluşturma girişimimiz ise devam etmektedir. Ancak çok uzun süre gerektiren ve zahmetli bir aşamadır.

Alsina ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da sublethal ışınlanmış SCID farelere insan MM hücre dizisi ARH-77'nin IV olarak verilmesinden yaklaşık bir ay sonra hayvanlarda hiperkalsemi gelişmiş, yaygın osteopenik kemik lezyonları oluşmuş ve hayvanların KI, dalak ve karaciğerlerinde plazma hücreleri infiltrasyonu gözlenmiştir. In vitro olarak ARH-77 hücreleri IL-6 ve TNF- β sekrete ettikleri halde, ARH-77 farelerin KI plazmalarında bu sitokinler bulunamamıştır. Myeloma hücrelerine komşu kemik yörelerinde osteoklast sayılarında belirgin derecede artış izlenmiştir. Bu modelde, ARH-77 fare KI hücrelerinin kültüre edilmesiyle tanımlanabilen en erken osteoklast prekürsörü olarak CFU-GM koloni oluşumu gözlenmiştir.

SCID farelere insan ve fare KI hücrelerinin transplantasyonu

SCID fareler 375-400 cGy ile sublethal dozda ışınlandıktan sonra kuyruk veninden insan KI hücrelerinin verilmesi ile 1-3 ay sonra farelerin %1-5'inde düşük oranda engraftment sağlanmıştır. Engraftment gösteren bu hücreler semisolid mediyada kültüre edildiklerinde, sadece düşük seviyede CFU-GM kolonileri gözlenmiştir. Bir ay süreyle in

vivo olarak steel faktör, IL-3, GM-CSF ve EPO'dan oluşan kokteyle stimülasyon %10-50 fare KI'de insan hücrelerinin 10 kat artışına sebep olmuştur. Yüksek oranda engraftment gözlenen farelerde multilineage insan hematopoezisi içermekte olup, bu hücreler myeloid, eritroid ve CD19+ pre-B lenfoid hücrelerden oluşmaktadır.

Farelerden KI harvest edilmeden 48 saat önce olgun hücreleri ablasyona uğratmak ve progenitor hücreleri siklusa sokmak için 150mg/kg dozunda 5-FU IV olarak uygulanır. Sekiz haftalık farelerin tibia ve femurları ekstrakte edilerek shaftlarından 26 G iğne ile PBS + %0.5 FBS içeriği ile yıkanır. Olası kemik artıklarını tutmak için 30 μ M 'lik naylon mesh'den süzülür. Buffer eklenerek 10 dk. 200g de santrifüje edilir. Hematopoetik stem hücreleri ayırmak için Magnetik Hücre Sorting kit kullanılarak KI hücreleri Sca1+ mikrobeads'leri (Stem Cell Antigen-Fareler için insandaki CD34+ hücre karşılığı) ile işaretlenir. Ayrılan hücreler DMEM + %15 FBS +Erken hematopoetik hücreleri siklusda tutmak için IL3 (50ng/ml) + IL6 (100ng/ml) + Stem Cell Faktör (100ng/ml) içinde 48 saat kültüre edilir. Hücreler harvest edilerek 1x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde PBS içinde sulandırılır. Sublethal dozda ışınlanmış farelere kuyruk veninden 2-3x10⁶ hücre/fare hücre verilir.

İmmün yetersiz farelere insan periferel kanının implantasyonu

SCID farelere insan PK'nın IP olarak implantasyonu ile olgun B ve T lenfositler, farenin peritoneal kavitesinde ve dalağında korunmuşlardır. Böyle bir yaklaşım bize insan B hücre EBV transformasyonu, CD4+ T hücrelerinin HIV enfeksiyonu ve otoimmünite ile ilgili iyi bir model oluşturur. Burada yeni doğmuş SCID fareler alıcı olarak kullanılırsa engraftment daha çabuk olur ve olgun T ve B lenfoid hücrelerin aracılık ettiği GVHD daha sık oranda oluşur.

Sublethal olarak ışınlanmış SCID farelere insan KI hücrelerinin transplante edilmesini takiben hemen veya 1 ay sonra başlanan PLYX321 ile insan mast-hücresi büyüme faktörüne cevaben fare KI'de myeloid ve lenfoid serilere ait diferansiye insan hücreleri gözlenmiştir. Bu büyüme faktörlerine eritropoetin eklenmesi periferel kanda insan eritrositlerinin görülmesine sebep olmuştur. Büyüme faktörlerinin verildiği fare grubunda multipotent ve

committed myeloid ve eritroid progenitörler olduğu halde, büyüme faktörü verilmemiş olduğu grupta az sayıda insan hücresi ile birlikte sadece granülosit-makrofaj progenitorları gözlenmiştir.

Bunun yanında, SCID fare KI ile radyasyondan korunmuş olan ve split olarak ışınlanmış 6-10 haftalık BALB/c farelere insan periferik lenfositleri IP olarak verilerek engraftment özellikleri incelenmiştir. Periferik kanda fare T lenfositleri ile peritonda insan CD45 hücreleri ters orantılı olarak bulunmuştur. T ve B hücrelerinin peritonda engraftment 2 ayda olurken, birkaç gün içerisinde dalak, karaciğer, böbrek ve akciğerlere insan lenfositlerinin migrasyonu izlenmiştir.

Kronik myelositer lösemi modeli

KML'li hastalardan elde edilen K562, EM-2, KBM-5 veya BV173 hücre dizilerinin subletal ışınlanmış SCID farelere IV olarak enjeksiyonu ile bu farelerde insan KML'sini taklit eden yaygın lösemi tablosu gözlenmiştir.

Dazzi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada BV173 hücre dizisinin ve kronik, akselere ve blastik fazdaki KML'li hastaların periferik kanlarının NOD/SCID farelere verilmesinden 1 saat sonra CD45 ekspresyonu ile hücrelerin akciğer (%78) ve karaciğerde (%79) biriktikleri gözlenmiş, 2 hafta sonra bu organlarda bir birikim gözlenmemiş, 8 hafta sonra KI'de %54, dalakta %61 ve kanda %35 oranında infiltrasyon gözlenmiştir. 8 haftada kronik fazdaki hücrelerle fare KI'de %4, akselere faz hücrelerle %11, blastik faz hücrelerle %38.5 ve BV173 hücre dizisiyle %54 oranında bulunmuştur. Kronik fazdaki hücrelerle 18-20 haftada KI'de %21 ve dalakta %6 progressif infiltrasyon gözlendiği halde, blastik fazdaki hücreler 12 haftadan daha fazla yaşamamışlardır.

Lenfoid veya myeloid blastik krizde olan KML'li hastaların hücrelerinin SCID farelere verilmesi ile farelerde engraftment sağlanmış olup, yüksek oranda bcr/abl+ progenitorları göstermişlerdir ve invaziv bir paterndedir. İnsan GF stimülasyonuna cevaben, orijinal hastalardaki çoğu özellikleri taklit ederler. Kronik fazdaki KML hücrelerinin subletal ışınlanmış SCID farelere verilmesi ile noninvaziv fokal büyüme paterni gözlenmiştir. Bu farelerdeki lösemik hücre büyümesi eksojen sitokinlerden etkilenmemiştir. Buna göre, blastik krizdeki

hastalardan alınan lösemik hücreler, kronik fazdaki hücrelerle kıyaslandıklarında daha hızlı engraftment olurlar ve daha yaygın proliferasyon gösterirler.

Kronik fazdaki KML hücreleri NK hücrelerine aşırı duyarlıdır, bu nedenle bu deneylerde NOD/SCID fareler kullanılmış olup, transplantasyon yapılan farelerin KI ve dalaklarında lösemik Ph+ hücreler gözlenmiştir. Yeni KML tanısı konmuş hastaların saf CD34+ hücrelerinin de NOD/SCID farelerde engraftment olduğu ve KI'lerinde bcr/abl eksprese eden progenitorların bulunduğu tespit edilmiştir.

Bu verilere göre, tüm stage'deki KML formları farelerde oluşturulabilir. İmmün yetersiz farelerdeki biyolojik farklılıklar, NOD/SCID farelerin KML'nin progresyonu, transformasyonu, KML'de myeloid ekspansiyonun altında yatan kinetik anormalliği araştırmak ve yeni tedavi girişimlerini çalışmak için ideal model olduğunu ancak bu durumun normal hücreler için geçerli olmadığını göstermektedir.

Voncken ve arkadaşları tarafından bcr/abl P210 kodlayan DNA'nın fare germi içerisine verilmesiyle oluşturulan transjenik fare modelinde uzun bir latent dönem sonrasında B,T veya myeloid kökenli lösemi oluşturulmuştur.

Skorski ve arkadaşları, blastik krizde KML'li hasta KI hücrelerini SCID farelere vererek oluşturdukları modele, bcr-abl veya c-myc antisense oligonükleotid uygulayarak hastalık gerilemesini akım sitometri, klonojenik assay ve RT-PCR ile göstermişlerdir.

Klonojenik Juvenil KML progenitorlarının semi-solid mediada idame ettirilememelerinin en önemli sebebi, birkaç hafta içinde diferansiye olabilmeleri ve böylece lösemik klonun kaybedilmesidir. Tanı veya tedavi esnasındaki JKML'li hastaların KI, periferik kan veya dalak hücrelerinin subletal dozda ışınlanmış SCID'li farelere nakledilmesi ve eksojen olarak GM-CSF verilmesi ile fare KI'de yaygın proliferasyon gözlenmiştir.

Kronik lenfositer lösemi modeli

KLL'li hastalardan alınan primer lösemik hücreler, IV olarak enjekte edildiklerinde, SCID fare organlarında engraftment olamamışlardır. Transfer

edilmesinin ilk birkaç günü içerisinde dalakta sekestre olmuşlar ve 2 haftadan daha az yaşamışlardır. EBV-transforme kronik lenfositler lösemi hücreleri SCID farede progressif hastalığa sebep olsa da, hastalık belirti ve progresyonu KLL'den farklı bulunmuştur. Buna göre, SCID farelerin lenfopoetik organları primer insan KLL hücreleri için uygun bir mikroçevre oluşturmazlar.

Ancak, Shimoni ve arkadaşları çeşitli stage'lerde KLL'li hastalardan aldıkları periferik kanları letal dozda ışınladıkları ve SCID farelerin KI'leri ile destekledikleri BALB/c farelere IP olarak verdiklerinde, bu hücrelerin farelerde yaklaşık 2 hafta sonra engraftment sağladıkları gösterilmiştir. Stage 0 KLL'li hastaların chimerik farelerdeki engraftment paterni peritonlarında insan T hücreleri şeklinde iken, stage III ve IV KLL'li hastaların hücrelerinin aktarıldığı modelde, tamamen tümör hücrelerinin hakim olduğu bir patern gözlenmiştir. Peritonlarında insan T hücreleri şeklinde patern gösteren BALB/c farelerin sadece peritonlarında değil aynı zamanda karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve nadiren de KI ve periferik kanlarında da infiltrasyon gözlenmiştir. Engraftment olan hücrelerin insan immünglobulini oluşturabilme kabiliyetleri de hastalık stage'i arttıkça hipogamaglobulinemiye kadar gitmiştir.

Akut myeloblastik lösemi modeli

AML'li hastaların yarısından çoğunda dominant multidrug ve radyasyon dirençli lösemik hücre subklonlarının bulunması ile multiajan kemoterapileri kür sağlamaktan uzak kalmaktadırlar. Bu nedenle AML için yeni tedavi programlarının geliştirilebilmesi, tam insan AML'sini karşılayabilecek bir hayvan modelinin olmaması nedeniyle engellenmektedir. Bu nedenle çoğu araştırmacı insan AML modelini SCID fare modelinde yarlaştırmeye çalışmışlardır. Ancak, insanlardan alınan primer AML hücrelerinin IV enjeksiyonu SCID farelerde engraftment ile sonuçlanmamıştır. Peritona veya renal kapsül altına implante edildiğinde az sayıda primer AML hücrelerinin büyüdüğü gözlenmiştir, ancak daha önce SCID fareye implante edilmiş olan fetal kemik içine implante edildiklerinde, fetal kemik içinde ve çevresinde lösemik hücrelerde lokal olarak büyüme gözlenmiştir. Ancak bazı araştırmacılar, SCID farelerde sitokin-bağımsız HL-60 hücre dizisi gibi hücreleri büyütme başarımlarıdır. Hatta ço-

ğunda KI, akciğer, dalak, over ve beyinde de yayılma tespit edilmiştir.

AML hücreleri in vitro koşullarda GF ihtiyacı gösterdiklerinden, Lapidot ve arkadaşları FAB AML-M1, M2 ve M4 hastalarından aldıkları KI, periferik kan veya dondurulmuş örnekleri kuyruk veninden enjekte edildiği subletal ışınlanmış olan SCID farelere 7µg PIXY321 ile 10 µg insan mast hücre büyüme faktörünün gūnaşırı IP olarak verilmesi ile 30-35 gün sonra %86 farenin KI'lerinde lösemik hücrelerin engraftment oldukları DNA ve sitolojik analizlerle tespit edilmiştir. İmmatür lösemik blastlar koloni forming ünitesi (AML-CFU) 11 donör örneğinin transplante edildiği farelerin tamamında gösterilmiştir, normal seriye ait progenitörler ise bulunamamıştır. AML-M1 tanılı hastanın CD34+ ve - fraksiyonlarının kullanılarak yapıldığı transplantasyonda, CD34+ ve sorting yapılmayan fraksiyonun aktarıldığı SCID farelerde lösemik hücre proliferasyonu ve AML-CFU gözlenmiştir. IV olarak aktarıldığında lösemik hücre proliferasyonunu göstermesi için gerekli minimum hücre miktarı 2×10^6 kadar yeterli bulunmuştur.

Sawyers ve arkadaşları ise, özellikle myeloid lösemi örneklerinin IP (7/7 örnek) veya renal kapsül (7/8 örnek) içerisinde daha efektif büyüdüğünü göstermişlerdir. Üç tane myeloid hücre dizisinin SCID fareye IV verilmesinden sonra, bu hücreleri %10 veya daha fazla oranda KI veya periferik kan da gösterdikleri halde, dalakta %0.1-1'den daha fazla gösterememişlerdir. Lenfoblastik lösemi örneği ile yapılan benzeri çalışmada ise, 4-6 hafta içerisinde lösemik infiltrasyona bağlı dramatik splenomegali ve lenfadenopati gözlenmiş, bu hayvanların dalak ve KI'lerinde %10'dan daha fazla insan DNA içeriği gösterilmiştir.

Bunun yanında bazı araştırmacılar da, yeni AML tanısı konmuş çocukların blastlarını subletal ışınlanmış SCID farelerde herhangi bir sitokin uygulamadan replike etmeyi başarmışlardır. Buna göre, özellikle inv(16) anormalliğini taşıyan AML'li hastalardan alınan primer lösemik hücreler subletal ışınlanmış SCID farelere verildiğinde otonom olarak KI ve timus gibi çoğu organda engraft olmuşlar ve belirgin insan AML'sine sebep olmuşlardır.

M1 hücrelerin engraftında undiferansiye blastların yaygın infiltrasyonu izlenmiş ve bazı lösemik

hücrelerde Auer body'ler tespit edilmiştir. Inv16 anormalliğini taşıyan hücrelerin transplantasyonu ile geniş bazofilik granüllü anormal eozinofiller ve lösemik hücreler periferik kanda izlenmiştir. M4 ve M5 hücreler diğer formlardan daha fazla ekstramedullar yöreye yayılmışlardır. Donör hücrelerinin FAB tipine bakmaksızın her AML tipinde, fare KI'lerinde immatür lösemik blast CFU'ler tespit edilmiştir.

Akut lenfoblastik lösemi modeli

ALL'de şimdilerde asıl araştırma sahası, nüks açısından yüksek risk taşıyan vakalarda tedaviyi geliştirmek ve iyi prognozu olan vakalarda da tedavinin aşırılığını azaltmaktır. Bu nedenle, tanı aşamasında prognostik özellikleri ortaya koyan geçerli metodlar, gereksiz yoğun tedavi veya yetersiz tedaviden kaçınmak için gereklidir. Son zamanlardaki çalışmalarla SCID farelerde oluşturulmaya çalışılan ALL modeli de bu amaçla ortaya konmuştur. ALL'li hastalarda alınan hücrelerin IV verilmesi ile SCID farelerde lösemi gözlenmiştir. Yeni tanı konmuş ALL'li hastalardan alınan hücrelerin SCID farelerde lösemi oluşturma özelliği, insanlarda kötü event-free survi (EFS) ile birlikte bulunmuştur. Bunlara göre, SCID fare modeli ALL'li hastalar için iyi bir prognostik bilgi sağlar.

SCID fare modeli, lenfosit prekürsörlerinin migrasyonunu ve gelişimini etkileyen ve ALL hücrelerinin özel mikroçevreye selektif homing'ini regüle eden adezyon moleküllerini çalışmak için de iyi bir model oluşturur. Buna göre, t(1;9) veya t(4;11) gösteren lösemik hücrelerde VLA-4 ve VLA-5 ekspresyonunun yüksek olması, bu hücrelerin stromaya bağlanma kapasitelerini ve ekstramedullar dokulara migrasyonunu etkileyebilir.

SCID fare modeli, ekstramedullar lösemisinin biyolojisini çalışmakta da kullanılabilir. İnsan pre-B ALL hücrelerinin SCID fareye IV enjeksiyonu, fatal SSS lösemisine sebep olmuştur. Kafatasında veya vertebral KI'lerinde ve meninkslerde lösemik hücrelerin engraft olması, diğer yörelerdeki engraftment'dan daha önce olmuştur. Bu modele göre, SSS'deki blastlarla ekstramedullar yöre ve KI'nin enfekte olması lösemi progresyonunda önemli rol oynar.

Genelde bu tip modeller B-hücreli ALL'nin aktarılmasıyla oluşturulmuş modellerdir. Steele ve ar-

kadaşları T-hücreli ALL'li hastalardan alınan lösemik KI hücrelerini SCID farelere aktararak %63 farede KI ve/veya dalaklarında dissemine insan lösemik hücrelerini gözlemişlerdir. Bu lösemi tipi insanlardakine benzer klinikopatolojik patern gösterirler. Lösemiden erken dönemde ölen hastalarda daha kolay engraftment gözlenmiştir. SCID farelerde lösemi oluşturmayan T-ALL hücreleri NOD/SCID farelere verildiğinde, bunlarda lösemik engraftment gözlenmiştir.

De novo veya relaps döneminde alınan hücrelerle engraftment arasında da yakın ilişki bulunmuştur. Kamel-Reid ve arkadaşları tanıdan 13 ay sonra relaps olan pre-B ALL'li hasta KI örnekleri ile scid farelerde KI, dalak, timus ve periferik organlarda yaygın lösemik infiltrasyon ve hayvanlarda 4-16 hafta sonra öldüklerini gözlemişlerdir. Tanıdan 3.5 yıl sonra relaps olan KI örnekleri ile farelerin KI'lerinde 30 hafta sonra infiltrasyon izlenirken, tanı aşamasında alınan KI örnekleri ile scid farelerde 9 ay sonra bile düşük oranda lösemik hücre tespit edilmiştir. Örnekler içerisinde eşit sayıda blast olduğu için, hücrelerin in vivo büyüme özellikleri arasındaki fark KI örneklerindeki blast sayısına bağlanamaz. Bu çalışmaya göre scid farelerde lösemik proliferasyonu sağlayacak transplant edilmesi gerekli hücre sayısı $3-10 \times 10^6$ olarak verilmektedir.

Ayrıca, B-hücreli ALL de hücre-siklus geni p16 delesyonu ile engraftment arasında korelasyon gösterilmiştir.

Çocuk akut T-hücre lösemisinde tanımlanan t(9;12) kromozomal anormalliğindeki TEL-JAK2 cDNA'sının (tirozin kinaz aktivasyonuna sebep olur) hemaglutinine bağlanmasıyla oluşturulan tranşen'in C57B6 fareye aktarılmasıyla, yeni bir transgenik model oluşturulmuştur. Bu modelde, CD8+ T hücrelerin ekspansiyonuyla sonuçlanan 4-22 haftada fatal lösemi gelişir. Bu hücreler kan, lenf nodları, timus, dalak ve KI'de gösterilmiştir.

Barone ve arkadaşları nude ratlara (rnu/rnu) insan T-hücre ALL dizisi HPB-ALL hücrelerini sisterna magna seviyesinde IT vererek hayvanların %93'ünde meningeal lösemi modeli oluşturmuşlardır. Bu modelde hayvanlar ortalama 30-39 gün yaşamışlardır. Çoğu hayvan modelinde SSS hastalığına ilave olarak sistemik hastalık da tanımlanmıştır. Bu modelde ise, sadece servikal lenf nod-

larında muhtemelen lenfatik drenaj yoluyla ulaştığı tahmin edilen lösemik DNA tespit edilmiştir. İlginç olarak, enjeksiyondan 24 ve 48 saat sonra BOS'da PCR ile lösemik DNA tespit edilmemiştir. Muhtemelen çoğu hücre in vivo geçişte yaşamamış ve enjeksiyondan kısa süre sonra NK hücreler tarafından temizlenmişlerdir. Viable hücreler de meninkslere yapışmışlardır. Nitekim, 21 günden daha önceki dönemlerde BOS'da lösemik DNA tespit edilmezken beyin dokusunda ise gösterilmiştir. Enjeksiyondan 3 hafta sonra meningeal lösemi ilerledikçe, BOS'da lösemik hücre sayısında belirgin bir artış gözlenmiştir. Böyle bir model, hayvanların yaşam süreleri kısıtlı olsa dahi SSS lösemisi için daha az toksik olan gen tedavisi, immünoterapi gibi yöntemlerin çalışılabileceği bir modeli oluşturabilir.

KAYNAKLAR

- Westervelt P, Ley TJ. Seed versus soil: the importance of the target cell for transgenic models of human leukemia. *Blood* 1999; 93:2143-2148.
- Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, Murdoch B, Williams DE, Dick JE. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 1992; 255:1137-1141.
- Gado K, Silva S, Paloczi K, Domjan G, Falus A. Mouse plasmacytoma: an experimental model of human multiple myeloma. *Haematologica* 2001; 86:227-36.
- Lattanzio G, Libert C, Aquilina M, Cappelletti M, Ciliberto G, Musiani P, Poli V. Defective development of pristane-oil-induced plasmacytomas in interleukin-6-deficient BALB/c mice. *Am J Pathol.* 1997; 151:647-9.
- Alsina M, Boyce B, Devlin D, Anderson JL, Craig F, Mundy GR, Roodman GD. Development of an in vivo model of human multiple myeloma bone disease. *Blood* 1996; 87:1495-1501.
- Dazzi F, Capelli D, Hasserjian R, Cotter F, Corbo M, Poletti A, Chinswangwatanakul W, Goldman JM, Gordon MY. The kinetics and extent of engraftment of chronic myelogenous leukemia cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice reflect the phase of the donor's disease: an in vivo model of chronic myelogenous leukemia biology. *Blood* 1998; 92:1390-1396.
- Voncken JW, Kaartien V, Pattengale PK, Germeraad WTV, Groffen J, Heisterkamp N. BCR/ABL P210 and P190 cause distinct leukemia in transgenic mice. *Blood* 1995; 86:4603-4611.
- Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Wlodarski P, Zon G, Iozzo RV, Calabretta B. Antisense oligonucleotide combination therapy of primary chronic myelogenous leukemia blast crisis in SCID mice. *Blood* 1996; 88:1005-1012.
- Shimoni A, Marcus H, Canaan A, Ergas D, David M, Berrebi A, Reisner Y. A model for human B- Chronic lymphocytic leukemia in human/mouse radiation chimera: Evidence for tumor-mediated suppression of antibody production in low-stage disease. *Blood* 1997; 89:2210-2218.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645-648.
- Sills RC, french JE, Cunningham ML. New models for assessing carcinogenesis: An ongoing process. *Toxicology Letters* 2001; 120:187-198.
- Sawyers CL, Gishizky ML, Quan S, Golde DW, Witte ON. Propagation of human blastic myeloid leukemias in the SCID mouse. *Blood* 1992; 79:2089-2098.
- Uckun FM, Sather H, Reaman G, Shuster J, Land V, Trigg M, Gunther R, Chelstrom L, Bleyer A, Gaynon P, Crist W. Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 85:873-878.
- Carron C, Cormier F, Janin A, Lacronique V, Giovannini M, Daniel MT, Bernard O, Ghysdeal J. TEL-JAK2 transgenic mice develop T-cell leukemia. *Blood* 2000; 95:3891-3899.
- Steele JPC, Clutterbuck RD, Powles RL, Mitchell PLR, Horton C, Morilla R, Catovsky D, Millar JL. Growth of human T-cell lineage acute leukemia in severe combined immunodeficiency (SCID) mice and non-obese diabetic SCID mice. *Blood* 1997; 90:2015-2019.
- Barone TA, Plunkett RJ, Hohmann P, Lis A, Glenister N, Barcos M, Ostrow PT, Spence PM, Greenberg SJ. An experimental model of human leukemic meningitis in the nude rat. *Blood* 1997; 90:298-305.
- Kamel-Reid S, Letarte M, Doedens M, Greaves A, Mudoch B, Grunberger T, Lapidot T, Thorner P, Freedman MH, Phillips RA, Dick JE. Bone marrow from children in relapse with pre-B acute lymphoblastic leukemia proliferates and disseminates rapidly in scid mice. *Blood* 1991; 78:2973-2981.
- Lapidot T, Fajerman Y, Kollet O. Immune-deficient SCID and NOD/SCID mice models as functional assays for studying normal and malignant human hematopoiesis. *J Mol Med* 1997; 75:664-673.
- Lubin I, Segall H, Marcus H, David M, Kulova L, Steinitz M, Erlich P, Gan J, Reisner Y. Engraftment of human peripheral blood lymphocytes in normal strains of mice. *Blood* 1994; 83:2368-2381.
- Uckun FM. Severe combined immunodeficient mouse models of human leukemia. *Blood* 1996; 88:1135-1146.
- Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG. Mouse models of human disease. Part I: Techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes & Development* 1997; 11: 1-10.
- Bedell MA, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG. Mouse models of human disease. Part II: Recent progress and future directions. *Genes&Development* 1997; 11: 11-43.