Original Article / *Özgün Araştırma*

Bezmialem Science 2015; 3: 1-4
DOI: 10.14235/bs.2015.449

The Effectiveness of Hyperbaric Oxygen Therapy in an Established Intracerebral Tumor Model

İntraserebral Tümör Modelinde Hiperbarik Oksijen Tedavisi Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Tolga Turan DÜNDAR[1], Mehmet Hakan SEYITHANOĞLU[1], Şefika KORPINAR[2], Raziye ATAR[3], Şevket EVRAN[1]

[1]Department of Neurosurgery, Bezmialem Vakıf University Faculty of Medicine, İstanbul, Turkey
[2]Private Medok Hyperbaric Oxygen Therapy Centre, Istanbul, Turkey
[3]Institute of Cardiology, Istanbul University, Istanbul, Turkey

ABSTRACT

Objective: Gliomas are the most common brain tumor in adults. Tumor-related endothelial cells are of neoplastic nature and have malignant properties such as proliferation and invasion. Therefore, antiangiogenic approaches have several advantages compared with conventional chemotherapeutic approaches. The target of antiangiogenic treatment is to ensure a decrease in systemic side effects because there are endothelial cells and other supportive cells belonging to the vessel walls. The purpose of this study was to increase the oxygenation of the environment with hyperbaric oxygen therapy (HBOT) and to prevent the angiogenic effect of hypoxia-related factors. We also tried to prevent angiogenesis by using sorafenib (SOR), which is a chemotherapeutic agent that blocks the receptors of these factors. Also, this study compared the effect of these both and to put into for their effect. In this regard, parameters such as the tumor size, vascularization rate, midkine (MK), apoptosis- and angiogenesis-related transcription tumor necrosis factor (TNF) alfa, and IL6 were compared in the relevant groups.

Methods: For this purpose, a convenient trial model was formed and the following 4 groups were determined: The study population was divided into four main groups: G1-control group, G2-group given HBOT, G3-group given SOR, G4-group given HBOT and SOR. Ten rats were included in each group. After 2 weeks, the rats were sacrificed. After being sacrificed based on the date and surgery determined, the tumor volume and vascularization ratio were checked with light microscope. Serum samples are evaluated by using ELISA for TNF-alpha, Interleukin-6 (IL-6) and midkine (MK) levels.

Results: The underlying mechanism of HBOT by evaluating MK levels was shown for the first time in this study. We have found that HBOT potentializes the sorafenib efficacy. HBOT increased MK levels and HBOT decreased anti-apoptotic TNF-α and IL-6 levels. MK levels show inverse correlation with TNF-α levels and IL-6 levels. TNF-α and IL-6 levels are directly proportional.

Conclusion: There is a need for further studies to evaluate the correct time of application of HBOT.

Keywords: HBOT, sorafenib, GBM, IL6

ÖZET

Amaç: Gliomalar erişkinlerde en sık görülen beyin tümörüdür. Primer beyin tümörlerinin yaklaşık olarak 1/3'ünü oluşturmaktadır. Genetik ve sitolojik bulgulara göre yüksek grade gliomalar oldukça heterojen etyopatogeneze sahiptirler. Hiperoksi-Sorafenib ve bunların beraber etkinliklerinin ortaya konulması çalışmamızın amacıdır. Bu doğrultuda tümör boyutu ,damarlanma oranı, midkine, apopitoz ve anjiogenezisle ilgisi olan TNF alfa (Tumor necrosis factor alpha), IL 6 (İnterlökin 6) seviyeleri ilgili gruplarda karşılaştırıldı.

Yöntemler: Bu amaç için,genel kabul görmüş deney modeli ile dört grup belirlendi. Bu popülasyon G1-kontrol grubu, G2-HBOT verilen grup, G3-SOR verilen grup, G4-hem HBOT hemde SOR verilen grup olarak dört ana gruba bölündü. 2 hafta sonra ratlar sakrifiye edildi. Daha sonra tümör volümü ve damarlanma oranı ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Alınan serum örnekleriyle ise Elisa metodu ile TNF-alpha, interlökin 6 (IL6) ve midkine (MK) seviyeleri değerlendirildi.

Bulgular: HBOT VE SORAFENİB ve kombinasyonun tümör içi damarlanma oranını ve tümör çapını azalttığı. HBOT'un serum MK seviyelerini arttırdığı,anti apopitotik TNF-α ve IL-6 seviyelerini azalttığı saptandı.

Sonuç: Bu çalışmada HBO terapisi ile iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan antineoplastik ajan sorafenib kombinasyon terapisinin etkinliği araştırıldı. Bu çalışmada ilk defa HBOT'un sorafenib ile sinerjistik etki gösterdiği, HBOT'un serum MK seviyelerini arttırdığı,anti apopitotik TNF-α ve IL-6 seviyelerini azalttığı saptandı.

Anahtar Sözcükler: HBOT, sorafenib, IL6, GBM

This study was presented as oral presentation at the 2nd International Excellence in Midkine Research Conference, 28-30 June 2012, Istanbul, Turkey.
Bu çalışma 2. International Excellence in Midkine Research Conference'nda sözlü olarak sunulmuştur. 28-30 Haziran 2012, İstanbul, Türkiye.
Address for Correspondence / Yazışma Adresi: Tolga Turan Dündar; Department of Neurosurgery, Bezmialem Vakıf University Faculty of Medicine, İstanbul, Turkey. Phone: +90 212 331 92 29 E-mail: drtolgadundar@hotmail.com

©Copyright 2015 by Bezmialem Vakif University - Available online at www.bezmialemscience.org
©Telif Hakkı 2015 Bezmialem Vakif Üniversitesi - Makale metnine www.bezmialemscience.org web sayfasından ulaşılabilir.

Giriş

Gliomalar erişkinlerde en sık görülen beyin tümörüdür. Primer beyin tümörlerinin yaklaşık olarak 1/3'ünü oluşturmaktadır. Genetik ve sitolojik bulgulara göre yüksek grade gliomalar oldukça heterojen etyopatogeneze sahiptirler. Hastalar arasındaki sağ kalım süresi ve tedaviye yanıttaki farklılık bu genetik etiyolojik çeşitliliğe bağlıdır (1). Günümüzün ileri tetkik ve tedavi imkanlarına rağmen, bu tümörler içinde en sık görülen ve en agresif davranan glioblastoma multiformenin 5 yıllık yaşam oranı %5'ten azdır (2-4).

Hipoksi embriyogenez döneminde ve kanser dokusunun büyüyüp gelişmesinde yönlendirici rol oynar. Hipoksi vaskülarizasyona ve dolayısı ile tümörün boyutunda artışa sebep olan bir çok büyüme faktörü salgılatmaktadır. VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ve PDGF (trombosit türevli büyüme faktörü) bu salınan faktörlerden yalnızca ikisidir. Hipoksi bunların düzeyini artırırır. Sorafenib isimli kemoterapatik ajan bu iki faktörün reseptör blokörüdür. Bu çalışmada HBOT (hiperbarik oksijen tedavisi) ile ortamın oksijenizasyonunu arttırarak hipoksinin salgılattığı faktörlerin, tümör angiogenezisine olan etkisini önlemeyi amaçladık.

Sorafenib tümör hücresi proliferasyonunu azaltan,oral yolla kullanılan bir reseptör tirozin kinaz inhibitörüdür. VEGF ve PDGF reseptörlerini bloke eden sorafenib kullanarak anjiogenezisi önlemeyi amaçladık.

Her iki etkinin kıyaslanması (hiperoksi-sorafenib) ve bunların beraber etkinliklerinin ortaya konulması çalışmamızın amacıdır.Bu doğrultuda tümör boyutu, damarlanma oranı, midkine, apopitoz ve anjiogenezisle ilgisi olan TNF alfa (Tumor necrosis factor alpha), IL 6 (İnterlökin 6) seviyeleri ilgili gruplarda karşılaştırıldı.

Yöntemler

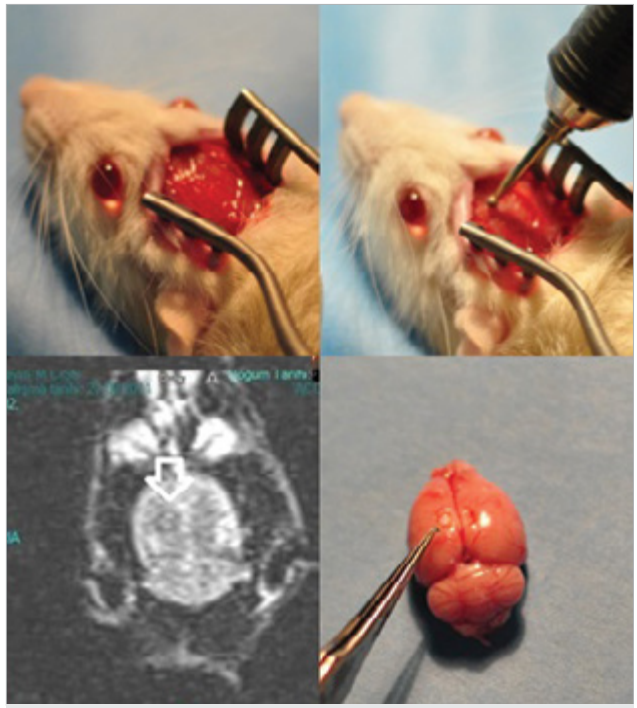
Deney Planı

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi BAP desteği ile yapılmıştır. İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Protokol numarası: 2011/03). Çalışmada kullanılan 9 haftalık, in-bred üretim, 200-300 gram ağırlığa sahip Wistar-albino erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar 14 saat ışık:10 saat karanlıkta tutularak ticari sıçan yemi ile beslendi.

Çalışma 4 ana grup olarak planlandı. Grup1 kontrol grubu; **c**errahi işlem yapılıp, tümör implantasyonu sonrası tümoral dokunun doğal seyrine bırakılan grup. Grup2 hiperbarik oksijen tedavisi verilen grup; tarif edilen şekilde cerrahi müdahale edildi ve tümör implantasyonu yapıldı, 7. gün kranial MR ile tümör implantasyonu doğrulandı 7. günden sonra hiperbarik oksijen tedavisine başlanıldı. 2.5 ATAbasınçta 90 dakika günde iki defa hiperbarik oksijen tedavisi uygulandı. Grup3 sorafenib verilen grup; tümör implantasyonu yapılarak, 7. gün kranial MR ile tümör implantasyonu doğrulandı. 7. günde sorafenib adlı ilaç ile günlük 10 mg/kg dozunda oral yol ile medikal tedaviye başlanıldı. Grup4-hiperbarik oksijen ve sorafenib verilen grup**; t**ümör implantasyonu yapılarak, 7. gün kranial MR ile tümör implantasyonu doğrulandı. 7. günde günlük 10 mg/kg sorafenib ile birlikte hiperbarik oksijen tedavisine başlanıldı. 14 gün oral yolla, günlük tek doz sorafenib ve 2,5 ATA basınçta 90 dakika günde iki defa hiperbarik oksijen tedavisi uygulandı.

Cerrahi işlem, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünde yapıldı. Sıçanlara kranial anterior-parasagital burr-hole ile sağ frontal loblarına 10^6 sayıda C6 sıçan glial hücre implante edildi. (Resim 1) Çalışmada kullanılan sıçan C6 glioma hücre soyu (CCL-107) Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından sağlandı ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı'nda üretildi. İmplantasyon sonrası 7. günde kranial MR görüntüleme ile hücre proliferasyonu doğrulandı. Sağ frontal lobda sinyal değişikliği pozitif olarak kabul edilerek gruplar oluşturuldu. Hiperbarik Oksijen Tedavisi İstanbul Üniversitesi Hiperbarik ve Oksijen ABD da deney hayvanları kabininde uygulandı. 21. günde dekapitasyon yapılarak serum örnekleri alındı (Resim 1).

ELISA ile TNF alfa, IL6 ve midkine seviyeleri bakıldı. Hemotoksilen-Eozin boyama ile nekroz ve damarlanma oranları belirlendi.Tümör alanı (mm^2) olarak hesaplandıktan sonra kesit kalınlığı ile çarpılarak tümör hacmi saptandı. Tümör içi damarlanma oranı % olarak tümör içi damar sayısı/total tümör alanı x100 formülü ile belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS 17.0 programı kullanılmıştır. Tüm verilerin istatistiksel analizi varyans analizlerine göre Student t test kullanılarak yapılmıştır



Resim 1. Cerrahi işlemin sıralı gösterilmesi ve sıçan kranial MR'ı ile doğrulanması.Neticede sakrifiye beyin dokusunda tümoral yapının gösterilmesi.

ve sonuçlar ortalama±standart hata (SD) olarak gösterilmiştir. P<0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

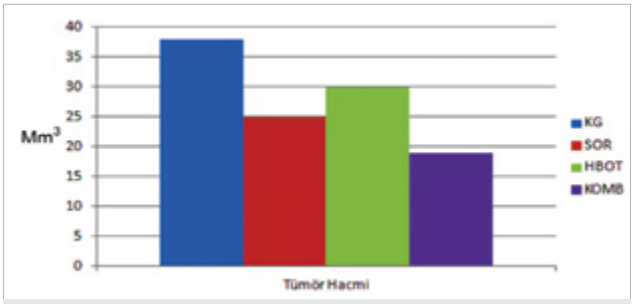
Bulgular

Işık Mikroskobu ile Tümör Hacmi ve Damarlanma Oranı: Yapılan tüm uygulamaların tümör hacmini kontrol grubuna (38±8,3mm^3) göre azalttığı saptandı. Tek başına SOR ve HBOT uygulaması ile kıyaslandığında tümör hacminde en yüksek azalma kombinasyon grubunda saptandı (P_{SOR}<0,01, P_{HBOT} <0,001) (Şekil 1).

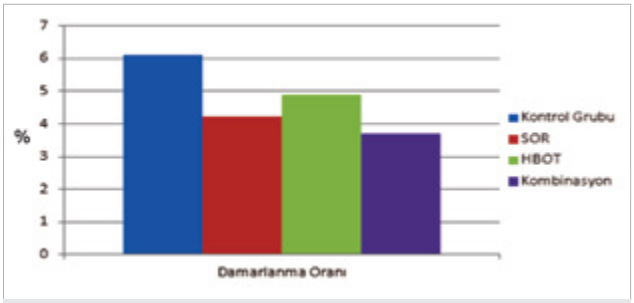
Kontrol grubunda tümör içi damarlanma %6,1±0,7 olarak saptandı. Bu damarlanma oranının tüm gruplarda azaldığı saptandı. En yüksek azalma kombinasyon grubunda (%3,78±0,1; $P_{KONTROL}$ <0,001; P_{HBOT}<0,01; P_{SOR}<0,01), daha sonra sırasıyla SOR grubu(%4,24±0,9; $P_{KONTROL}$ <0,05; P_{HBOT}<0,01; $P_{KOMBİNASYON}$<0,01) ve HBOT grubu (%4,9±0,2; $P_{KONTROL}$ <0,05; P_{SOR}<0,01; $P_{KOMBİNASYON}$<0,01) olarak saptandı (Şekil 2, Resim 2).

Elisa ile TNF Alfa ve IL 6 Seviyeleri: HBOT'nin TNF-α seviyelerini azalttığı (p<0,01), Sorafenibin TNF-α seviyelerini artırdığını (p<0,05), kombinasyon grubu ve kontrol grubunda ise TNF-α seviyelerinin benzer sonuç verdiği bulundu (p>0,05) (Şekil 3).

HBOT'nin IL-6 seviyelerinde azalmaya yol açtığı (p<0,01), Sorafenibin IL-6 seviyelerini arttırdığı (p<0,05), kontrol grubu ve kombinasyon grubunda bu değerlerin benzer olduğu bulundu (Şekil 4).



Şekil 1. Hematoksilen-Eozin boyama sonrası elde edilen görüntüler elde edildi ve NIH Image software adlı yazılımla değerlendirildi.Tümör alanı (mm2) olarak hesaplandıktan sonra kesit kalınlığı ile çarpılarak tümör hacmi saptandı.



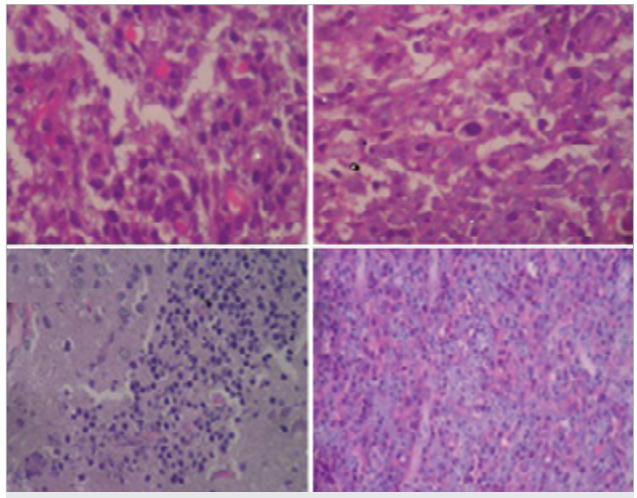
Şekil 2. Tümör içi damarlanma oranı % olarak tümör içi damar sayısı/total tümör alanıx100 formülü ile belirlendi.

Elisa ile Midkine Seviyeleri: HBOT'nin midkine seviyelerini en yüksek oranda arttırdığı (p<0,01), Sorafenib grubunda ikinci olarak arttırdığı (p<0,01) bunlara rağmen kombinasyon grubu ile kontrol grubunun benzer düzeyde olduğu bulundu (p>0,05) (Şekil 5).

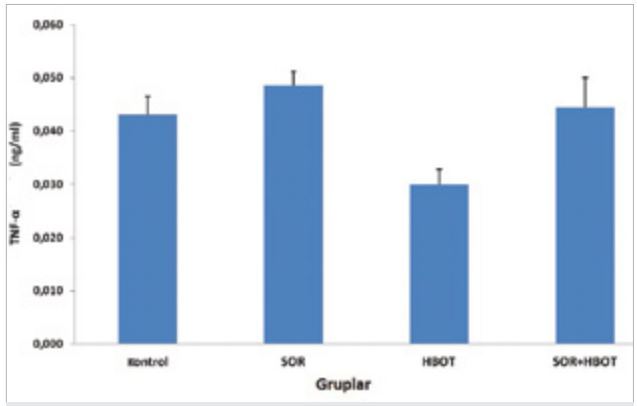
Tartışma

Hipoksi,neovaskülarizasyonun temel yöneticisidir. Fetal dönemde doku gelişimine katkı sağlayan bu fenomen tümoral dokuda ise tümörün gelişimine katkı ve tümör dokusunun tedaviye yanıtında azalma yönünde olumsuz rol oynar (5-6).

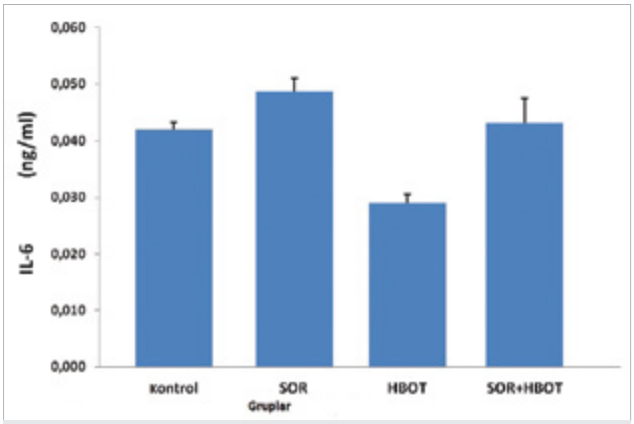
Membranda yerleşim gösteren proteinlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denilmektedir. RTK süperailesinde 58 transmembran protein bulunmaktadır. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri (EGF, VEGF, PDGF, FGF,NGF) reseptörleri ve efrin reseptörleri (EphA, EphB) yer almaktadır (7). Karsinogenez sürecinde ise, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur (8). Sorafenib adlı



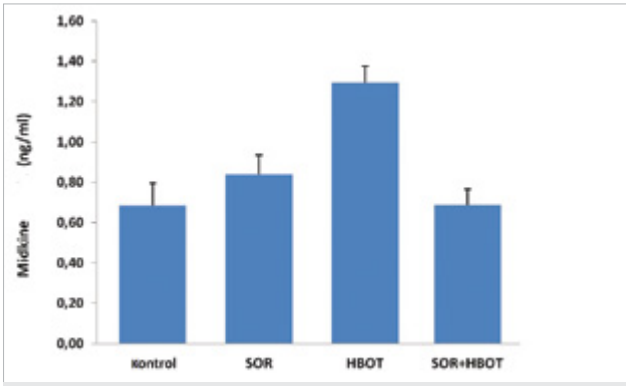
Resim 2. Hematoksilen-Eozin boyama sonrası elde edilen görüntülerin kamera (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI) ile gösterilmesi



Şekil 3. Elisa yöntemi ile serum TNF alfa seviyeleri (ng/mL). SOR ve kombinasyon gruplarının TNF alfa seviyelerini, kontrol grubuna göre artırdığı görülüyor. HBOT grubu ise TNF alfa seviyelerini kontrol grubuna göre azalttığı saptandı.



Şekil 4. Elisa yöntemi ile serum IL6 seviyeleri (ng/mL). IL6 seviyelerindeki değişim TNF alfa seviyelerindeki değişime benzer bulundu.



Şekil 5. ELISA yöntemi ile serum midkine seviyeleri. (ng/mL) HBOT'nin midkine seviyelerini artırdığı,kombinasyon grununun ise kontrol grubuna göre azalttığı bulundu

kemoterapotik ilaç,neovaskülarizasyonu önleyen yeni nesil antineoplastik ajandır.

Midkine (MK) bir karbonhidrat bağlayan proteindir ve sitokin veya growth faktör olarak da tanımlanır. Çeşitli hedef hücrelerde; büyüme, migrasyon ve gene ekspresyonunda görevi vardır. Reprodüksiyon (çoğalma), onarım görevinin yanı sıra bir çok hastalıkdada patolojik rol oynar. Yüksek oranda MK seviyeleri tespit edilen hastaların prognozunun MK seviyeleri düşük olanlara göre daha kötü olarak bulunmuştur (9,10). TNF-α ve IL-6 hem hücre transformasyonunda hem de neovaskülarizasyonda ortaya çıkan moderatörlerdir (11).

Sonuç

Bu çalışmada HBO terapisi ile iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan antineoplastik ajan sorafenib kombinasyon terapisinin etkinliği araştırıldı. Bu çalışmada ilk defa HBOT'un sorafenib ile sinerjistik etki gösterdiği, HBOT'un serum MK seviyelerini arttırdığı, anti apopitotik TNF-α ve IL-6 seviyelerini azalttığı saptandı. Sorafenibin MK seviyelerini insan T98G GBM hücre kültürlerinde azaltmasına rağmen bu in vivo çalışmada artırmış olduğu saptandı. Aynı zamanda HBOT'nin, sorafenibin sitotoksisitesini azalttığı ve tümoral doku üzerine etkisini potansiyelize ettiği bulundu. Moleküler düzeyde bilgilerimiz artdıkça, görevli moleküllerin bazı durumlarda zıt etki dahi gösterebildiği görülmektedir. Patolojik süreç dahi olsa hassas dengenin bir çok kontrol mekanizması altında olduğunu göstermektedir. Bu mekanizmaların aydınlatılması için çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - T.T.D.; Tasarım - T.T.D., M.H.S.; Denetleme - M.H.S.; Malzemeler - S.K.; Analiz ve/veya yorum - T.T.D.; Literatür taraması - T.T.D., R.A., Ş.K.; Yazıyı yazan -T.T.D.; Eleştirel inceleme - M.H.S. ,Ş.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için Bezmialem Vakıf Üniversitesi BAP Desteği ile desteklenmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was obtained.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - T.T.D.; Design - T.T.D., M.H.S.; Supervision - M.H.S.; Funding - T.T.D.; Materials - Ş.K., R.A.; Data Collection and/or Processing - T.T.D.; Analysis and/or Interpretation - T.D.; Literature Review - T.T.D., R.A., Ş.K.; Writer - T.T.D.; Critical Review - M.H.S., Ş.K.

Conflict of Interest: The authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: The authors supported by the Bezmialem Vakıf University BAP Support.

Kaynaklar

1. World Health Organization, International agency for research on cancer. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Fourth edition, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2007.
2. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. Cancer Res 2004; 64: 6892-9. [CrossRef]
3. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2008. CBTRUS 2012; 1-48.
4. Eisele G, Weller M. Targeting apoptosis pathways in glioblastoma. Cancer Lett 2011; 335-45.
5. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990; 82: 4-6. [CrossRef]
6. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. Curr Opin Biotechnol 2000; 11: 617-24 . [CrossRef]
7. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. Nature 2011; 411: 355-64. [CrossRef]
8. Doğan L, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35: 34-42.
9. Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2010; 86: 410-25. [CrossRef]
10. Mishima, K, Asai A, Kadomatsu K, Ino Y, Nomura K, Narita Y, et al. Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. Neurosci Lett 1997; 233: 29-32. [CrossRef]
11. Suganuma M, Okabe S, Kurusu M, Iida N, Ohshima S, Saeki Y, et al. Discrete roles of cytokines, TNF-alpha, IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation. Int J Oncol 2002; 20: 131-6.