مجـلـه‌ی علمـی، پژوهـشی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۰، شماره‌ی ۷۸، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۱، صفحات ۱۳ تا ۲۲

القای تومور آلوژنیک زیر جلدی گلایوما با سل لاین GL26 در Balb/c

عبدالرضا اسماعیل‌زاده[۱]، دکتر معصومه ابتکار[۲]، دکتر علیرضا بیگلری[۳]، دکتر زهیرمحمد حسن[۴]

نویسنده‌ی مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی پزشکی، گروه ایمونولوژی ebtekarm@modares.ac.ir

دریافت: ۹۰/۴/۲۰ پذیرش: ۹۰/۷/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: *گلایوما شایع ترین تومور اولیه‌ی مغز انسان است. با وجود پیشرفت‌های بسیاری در درمان، تمام بیماران ۶ تا ۱۸ ماه پس از تشخیص می‌میرند. در گلایوما سیستم ایمنی در محل تومورسرکوب می‌شود. بنابراین نیاز به پژوهش در مکانیزم‌های سلولی و مولکولی به منظور انتخاب روش درمانی تازه و اثر بخش از جمله ایمونوتراپی یک ضرورت است. لذا طراحی مدل حیوانی مناسب قبل از هرگونه کار آزمایی بالینی برای رسیدن به این هدف لازم بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه، ۱۵ موش ماده‌ی ۶ تا ۸ هفته‌ی Balb/C از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. از رده‌ی سلولی گلیومای موشی GL26 برای ایجاد تومور زیر جلدی آلوژنیک استفاده شد. پس از کشت سلول و بی‌هوش کردن موش، دوزهای مختلف به گروه‌های مجزا از موش‌ها تزریق شد و به گروه شاهد PBS استریل تزریق شد. رفتار و علایم بالینی به طور منظم کنترل گردید و پس از ایجاد تومور بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی بر روی آن انجام گرفت.*

یافته‌ها: *با تعداد بالای سلول تومور القا سریع‌تر انجام شد. آتروفی و ضعف در موش‌های مبتلا مشهود بود. در بررسی ماکروسکوپی، تومور نسبتا بزرگ، سفت و پر از خون مشاهده گردید. در آزمایش میکروسکوپی، تکثیر سلولی، میتوز، عروق فراوان و نکروز در محل تومور مشاهده شد.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به محدودیت دسترسی به مدل‌های حیوانی سینژنیک گلیوما، طراحی مدل آلوژنیک زیر پوستی، اجازه می‌دهد تا به آسانی یک ارزیابی از اندازه و حجم تومور، بدون نیاز به قربانی کردن حیوان به‌دست آید. ایجاد این مدل امکان بررسی برخی از پارامترهای ایمونولوژیکی، آزمایش داروهای جدید درمانی و اکتشافات جدید در تحقیقات پایه در مورد گلایوما را برای اولین بار در ایران فراهم می‌کند.*

واژگان کلیدی: ***ایمونوژنتیک، تومور مغز، گلایوما، GL26، زیرجلدی، مدل آلوژنیک، ایران***

مقدمه

گلایوبلاستوما شایع‌ترین تومور اولیه‌ی مغز انسان است (۲و۱). در حدود ۴۰ درصد تومورهای مغز به گلایوما اختصاص دارد (۳). معمولا ۶ الی ۱۸ ماه بعد از تشخیص همه‌ی بیماران مبتلا می‌میرند (۵ و۲،۴). با وجود پیشرفت‌های اخیر هنوز درمان‌های رایج از جمله شیمی درمانی، جراحی و رادیوتراپی موفق نبوده است (۷-۴و۲). لذا تحقیق در

۱- دانشجوی دکترای تخصصی ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
۲- دکترای تخصصی ایمونولوژی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس تهران
۳- دکترای تخصصی ژنتیک، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۴- دکترای تخصصی ایمونولوژی، استاد دانشگاه تربیت مدرس تهران

سازوکارهای سلولی مولکولی و بررسی پاتوژنز بیماری برای انتخاب راه درمانی مناسب در اولویت است (۹و۲۸). امروزه استفاده از درمان‌های نوین و اثر بخش از جمله ژن درمانی از اهداف اصلی در درمان گلایوما است (۱۱و۲،۱۰). با توجه به اینکه در گلایوما سیستم ایمنی در محل تومر سرکوب می‌شود (۱۲و۲،۱۱)، ایمونوژن درمانی و ایمونوتراپی در راستای ارتقای سیستم ایمنی بافت مغز برای مقابله با تومور مهاجم یک ضرورت است (۱۴و۲،۱۳)، استفاده از مدل حیوانی به‌عنوان پلی بین مطالعات آزمایشگاهی (۱۵) و قبل از کارآزمایی‌های بالینی ضروری است (۱۵و۶). لذا از ۵۰ سال قبل استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در تحقیقات سرطان شروع شده (۱۵) و در ۳۰ سال گذشته استفاده از جوندگان خصوصا رت و موش در تحقیقات گلایوما رایج شده است (۱۵). مدل حیوانی ایده‌ال برای این مطالعه باید قابلیت رشد و نمو تومور القایی را داشته باشد، هیستوپاتولوژی تومور شبیه انسان باشد، بعد از تشکیل تومور ماندگاری لازم را داشته باشد تا فرصت کافی برای مطالعه مکانیسم‌های سلولی مولکولی در اختیار محقق قرار بگیرد و از نظر ایمونولوژیک تحمل لازم برای عملکرد سلول یا بافت توموری برای تشکیل تومور را داشته باشد و با پاسخ ایمنی و التهابی منجر به رد تومور نشود (۱۵).

از بین جوندگان رت و موش بیشتر استفاده شده است که هرکدام دارای مزایا و معایب خاص خودش است (۱۷و ۱۶). از نظر ایمونوژنتیک نیز انواع مدل‌ها برای این منظور تا به‌حال آزمایش شده است، از جمله مدل‌های سینژنیک، گزنوژنیک و آلوژنیک (۱۸) که هرکدام از این مدل‌ها نیز دارای مزایا و معایبی است (۱۲و۹). بهترین مدل برای مطالعات گلایوما مدل سینژنیک است که منشا سل لاین تزریقی و حیوان از جهت فاکتورهای زنتیکی و گونه کاملا یکی است و سلول تزریقی به حیوان ایمونوژنیک نیست؛ لذا بدون محدودیت‌های ناشی از عملکرد سیستم ایمنی برای حذف زود هنگام سل لاین قبل از تشکیل تومور قابل استفاده‌اند (۱۹و۱۵). ولی به‌دلیل محدودیت تعداد این مدل‌ها و عدم دسترسی به آن‌ها عملا کار با آن‌ها در انحصار معدود کشورها و موسسات می‌باشد. از بین مدل‌های موشی سینژنیک گلایوما مدل GL26 با C57BL/6 بهترین مدل در مطالعات مختلف می‌باشد (۲۰و۷،۱۹،۱۵). در مدل‌های گزنوژنیک منشا حیوان و سلول تزریقی کاملا از نظر گونه متفاوت است (مثل انسان و موش) و بدلیل تفاوت‌های ایمونوژنتیک عمده (آنتی‌ژن‌های اصلی سازگاری بافتی)، بدون تضعف ایمنی با راهکارهای مختلف با موفقیت کامل همراه نبوده است (۱۸). برای ایجاد مدل‌های آنرژیک یا با استفاده از داروهای سرکوبگر ایمنی مثل سیکلوسپورین آ ایمنی میزبان کاملا تضعیف می‌گردد و یا از موش‌های نود (Nude) که سیتم ایمنی آن‌ها فاقد سلول‌های ایمنی خصوصا از نوع T است استفاده می‌شود؛ در این صورت میزبان توان شناسایی و پاسخ به سلول‌های تزریقی متفاوت از نظر فاکتورهای ایمونوژنتیکی را ندارد (۱۸و۶). در خصوص مدل‌های آلوژنیک (سلول تزریقی و حیوان از یک گونه بوده ولی فاکتورهای ایمونوژنتیکی آن‌ها با هم متفاوت است) نیز هر چند با محدودیت‌های خاص (خصوصا در مطالعات ایمونولوژیک) همراه است (۲۳-۲۱و۱۸،۱۷)؛ ولی با در نظر گرفتن فاکتورهای دیگر که در تشکیل تومور موثرند و تغییر آنها (۲۴و۱۸،۶) به نظر می‌رسد بتوان مدل موشی مناسب برای مطالعه‌ی تومور طراحی و در مطالعات آینده برای آزمایش درمان‌های جدید و کشف ایمونوبیولوژی تومور استفاده کرد. مدل زیر جلدی اجازه‌ی ارزیابی آسان از اندازه و حجم تومور بدون نیاز به قربانی کردن حیوان را می‌دهد (۹). علاوه بر این، تفاوت عمده در هیستوپاتولوژی بین تومور ایجاد شده در زیر جلد و در بافت مغزی نشان داده نشده است. هرچند که از نظر الگوی بافتی و عروقی این دو بافت با هم متفاوت‌اند و علاوه بر آن سد خونی- مغزی در مدل زیر جلدی وجود ندارد (۹). هدف این مطالعه طراحی مدل

آلوژنیک برای ایجاد تومور زیر جلدی با استفاده از سل لاین گلایوما موشی GL26 در موش Balb/C در ایران برای استفاده در مطالعات پایه و کار آزمایی‌های بالینی است.

روش بررسی

کشت و آماده سازی سل لاین تومور: سل لاین GL26 موشی گلایوما با منشا موش ماده C57BL/6 برای القای تومور زیر جلدی از دپارتمان مهندسی بافت و سلول‌های بنیادی انستیتو فن آوری بن یاخته تهران-ایران تهیه گردید. سلول‌ها با رعایت شرایط استاندارد کشت سلولی در محیط کشت RPMI1640 غنی شده با سرم گاوی ۱۰ درصد (Fetal Bovine Serum=FBS) و پنی‌سیلین –استربتومایسن (۱%) از شرکت این ویتروژن و در شرایط CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد. در فاز لگاریتمی رشد سلول‌ها با تریپسین از فلاسک جدا و بعد از شمارش و تعیین قابلیت زیستی (بالای ۹۰ درصد)، به‌شکل سوسپانسیون در محیط بافر فسفاتی Phosphate Buffer Solution (PBS) استریل در تیترهای مختلف $۲*۱۰^{۶}$ و $۱*۱۰^{۶}$ و $۵*۱۰^{۵}$ و $۱*۱۰^{۵}$، آماده‌ی تزریق شد. سلول‌ها از پاساژ شماره‌ی ۱۳ مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱).

مدل حیوانی گلایوما، تکنیک بی‌هوشی حیوان و تزریق سلول: این مطالعه تجربی است. در این مطالعه ۱۵ موش سوری BALB/c (MHC H-2^{d}) (۶ تا ۸ هفته) از انستیتو پاستور ایران تهیه و در ۵ گروه مساوی مورد آزمایش قرارگرفتند. القای تومور آلوژنیک زیر جلدی گلایوما بعد از تزریق سلول‌های گلایومای موشی GL26 (MHC H-2^{b}) به‌روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی بررسی گردید. با بررسی چندین مقاله مربوط به تکنیک‌های بیهوشی حیوان، با توجه به تفاوت‌های موجود و سویه‌ی حیوان مورد نظر ما یک تکنیک آسان و کارا انتخاب کردیم. این تکنیک ترکیبی از دو داروی کتامین و زیلازین به نسبت ۱۰ به یک بود. زیلازین از شرکت Alfasan Woerden-Holland ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و کتامین از شرکت Alfasan Woerden Holland ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. بی‌هوشی بعد از ۳ دقیقه از تزریق سلول داخل بریتوان با سرنگ انسولین در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰ گرم وزن موش ایجاد شد و ۲۰ تا ۳۰ دقیقه ادامه داشت. در این مدت شل شدن عضلات به‌خوبی انجام شد و علایم حیاتی مثل تنفسی و قلبی نیز کاملا طبیعی بود و حیوان بدون استرس برای تلقیح سلول به فلانک راست (Right Flank) آماده شد. از سلول‌ها قبل از تلقیح، در پلیت‌های کشت سلولی جهت اطمینان از قابلیت زیستی و رشد آن‌ها کشت انجام و سلامت سلول‌ها تایید شد (شکل ۱). تیتر سلولی مورد نظر به شرح فوق به همه حیوان‌ها تزریق گردید. ۳ مورد از حیوان‌ها نیز به عنوان کنترل فقط PBS استریل دریافت کردند. حیوانات روزانه از نظر آب و غذا و رفتار و هفتگی با معاینه‌ی بالینی محل تزریق از جهت تشکیل تومور به‌طور مرتب ارزیابی شدند.

تهیه‌ی بافت و رنگ آمیزی هماتوکسیلن-ائوزین: بعد از ایجاد تومور (شکل ۲)، حیوان به‌روش فوق مجددا بیهوش و بافت توموری بعد از جراحی موش‌ها از آن جدا شد (شکل ۳). از بافت‌های فیکس شده در فرمالین ۱۰ درصد با میکروتوم برش‌های ۳ الی ۵ میکرومتری تهیه و با رنگ آمیزی هماتوکسیلن- ائوزین (H & E) رنگ شد.

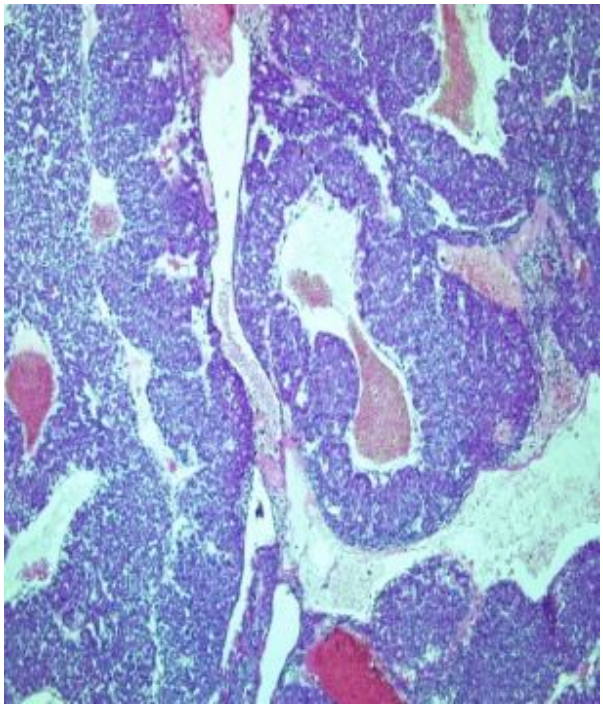
یافته‌ها

تومور در گروه ۵ حیوانی دریافت کننده‌ی دوز $۲*۱۰^{۶}$ نسبت به سایر گروه‌ها زودتر ایجاد شد. به‌طوری‌که اولین علایم فیزیکی و بالینی بروز تومور بعد از ۵ ماه در طول ۱۰ روز در همه موش‌ها ظاهر شد و در ابتدا به‌کندی ولی بعد از ۶ ماه، رشد و توانایی موش مبتلا شدیدا کم و کمتر شد.

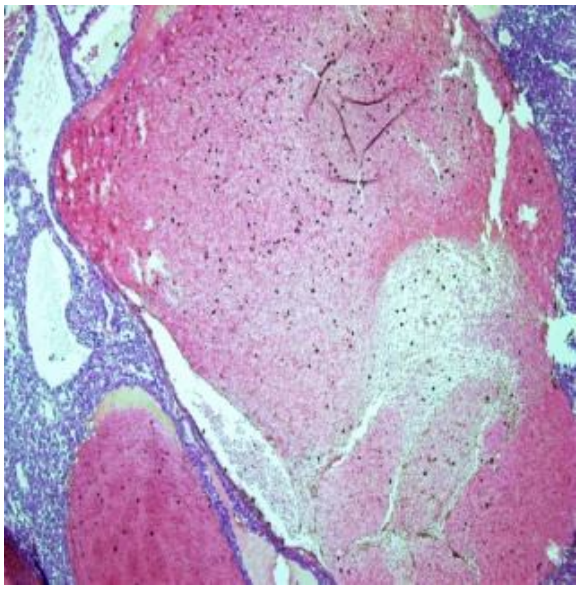
شکل ۱: رده‌ی سلولی گلیومای موشی (GL26) ۱ روز بعد از کشت

شکل ۳: نمای ماکروسکوپی تومور زیر جلدی در موش

شکل ۲: فنوتیپ موش Balb/C و تومور در فلانک راست حیوان



شکل ٤: نمای میکروسکوپی تومور زیر جلدی



شکل ۵: نمای میکروسکوپی تومور زیر جلدی

وزن کل موش سرطانی نسبت به موش کنترل، کاهش معنی‌دار نداشت، ولی لاغری و ضعف موش سرطانی مشهود بود. گروه دریافت کننده‌ی دوز $1*10^{6}$ علایم اولیه و بالینی تومور را به فاصله‌ی ۳ ماه نسبت به گروه فوق نشان دادند. در گروه‌های دیگر بعد از گذشت ۸ ماه توموری در هیچیک از موش‌ها مشاهده نشد. در بررسی ماکروسکپی (شکل ۳) به طور متوسط توموری به اندازه ۲۵ در ۲۱ در ۱۸ میلی‌متری به‌رنگ قهوه‌ای تیره (خرمایی رنگ) با قوام نسبتا سفت و پرخون مشاهده گردید. در بررسی میکروسکوپی (شکل ۴) پرولیفراسیون سلولی توام با افزایش کمی و تغییرات کیفی سلول، میتوز و نسبت بالای هسته به سیتوپلاسم در سلول‌ها در مقایسه با بافت نرمال مشاهده گردید. همچنین عروق فراوان و نکروز در توده‌ی توموری مشهود بود (شکل ۵).

بحث

به‌کارگیری مدل حیوانی به عنوان حلقه‌ی واسط بین کارهای کشت سلولی و کارآزمایی‌های بالینی محسوب می‌شود؛ از طرف دیگر بعضی از بررسی‌ها را در محیط کشت سلول نمی‌توان انجام داد؛ لذا ضروری است برای رسیدن به پاسخ مطمئن در خصوص بیولوژی سرطان از مدل حیوانی استفاده کنیم (۲۵و۸) تا کلیه‌ی ملاحظات لازم، مزایا و معایب کار قبل از آزمایش روی انسان به‌درستی شناسایی و راه کار احتمالی جهت تصحیح، بهبود روش‌ها و بررسی داروهای جدید را مد نظر داشته باشیم (٦). مدل حیوانی می‌بایستی از نظر ایمونوژنتیکی خصوصا از نظر آنتی ژن‌های اصلی سازگاری بافتی با رده‌ی سلولی ایجاد کننده‌ی سرطان همخوانی داشته باشد تا سلول‌ها بتوانند با کمترین چالش از طرف میزبان خصوصا از جنبه‌های ایمونولوژیکی بتوانند تومور ایجاد کنند؛ مگر اینکه از موش‌های نود (Nude) که سیتم ایمنی آن‌ها فاقد سلول‌های ایمنی خصوصا از نوع T است، استفاده کرد (٦) یا با استفاده از داروهای سرکوب کننده‌ی ایمنی مثل سیکلوسپورین (۹) تضعیف ایجاد کرد؛ لذا معمولا مدل‌های سینژنیک، آنرژیک، آلوژنیک، گزنوژنیک بیشتر در مطالعات بیولوژی تومور مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۸و۹). در مطالعه‌ی ما، بعد از حدود ۵ ماه از تزریق سلول گلایومای موشی، علایم بروز تومور مثل ضعف و لاغری مشهود بود و به طور متوسط تومورهایی به اندازه ۲۵ در ۲۱ در ۱۸ میلی‌متری به‌رنگ قهوه‌ی تیره (خرمایی رنگ) با قوام نسبتا سفت و پرخون مشاهده گردید. همچنین در بررسی میکروسکوپی، پرولیفراسیون سلولی توام با افزایش کمی و تغییرات کیفی سلول و نسبت بالای هسته به سیتوپلاسم در سلول‌ها در مقایسه با بافت نرمال مشاهده گردید. همچنین عروق فراوان و نکروز در توده‌ی توموری مشهود بود. تهیه و نگهداری موش سوری (BALB/c) نسبت به رت آسان و ارزان است و امکان دستکاری‌های ژنتیکی و سایر مطالعات مداخله‌ای در آن بیشتر است (۱۷و۱۶). بهترین مدل برای مطالعات گلایوما مدل سینژنیک است که منشا سل لاین و حیوان یکی است و ایمونوژنیک نیست یعنی با تزریق رده‌ی سلولی GL26 به موش C57BL/6 با توجه به سازگاری و

یکسان بودن ساختارهای ایمونوژنتیکی واکنش رد سلول تزریقی اتفاق نمی‌افتد. لذا بدون محدودیت‌های ناشی از عملکرد سیستم ایمنی برای حذف زود هنگام سل لاین قبل از تشکیل تومور قابل استفاده‌اند (۱۹و۱۵،۷) ولی به‌دلیل محدودیت تعداد این مدل‌ها و عدم دسترسی به آن‌ها عملا کار با آن‌ها در انحصار معدود کشورها و موسسات می‌باشد. مدل‌های گزنوژنیک نیز به‌دلیل تفاوت‌های ایمونوژنتیک عمده بدون تضعیف ایمنی با راهکارهای مختلف با موفقیت کامل همراه نبوده است (۲۳و۱۸). به‌کارگیری مدل‌های آلوژنیک موش صحرایی (رت) در مطالعات محققین با سختی‌ها و محدودیت‌های خاص همراه بوده است (۲۳-۲۱و۱۸،۱۷). ولی با در نظر گرفتن فاکتورهای دیگر مثل بالا بردن غلظت سلول تزریقی (۲۴) می‌توان مدل موشی سوری مناسب برای مطالعه‌ی تومور گلایوما طراحی و برای آزمایش درمان‌های جدید و کشف ایمونوبیولوژی تومور استفاده کرد. در مقایسه با مدل داخل جمجمه‌ایی، مدل زیر جلدی اجازه ارزیابی آسان از اندازه و حجم تومور بدون نیاز به قربانی کردن حیوان را که برای پیگیری‌های بعدی لازم هست، فراهم می‌کند (۹). هرچند که از نظر الگوی بافتی و عروقی این دو بافت با هم متفاوت‌اند و علاوه بر آن سد خونی- مغزی در مدل زیر جلدی وجود ندارد؛ ولی تفاوت عمده در هیستوپاتولوژی بین تومور ایجاد شده در زیر جلد و در بافت مغزی نشان داده نشده است (۹). لذا با ایجاد مدل زیر جلدی تومور گلایوما گامی نو برای شروع مطالعه در این زمینه برداشته خواهد شد.

در مطالعه‌ای که در مدل گلایومای رت ویستار انجام شده، یافته های مشابه در تومور داخل جمجمه‌ایی و زیر جلدی از جمله نسبت بالای هسته به سیتوپلاسم در سلول‌ها، میتوزیس و پسودوپالیسدینگ (Pseudopalisading) مشاهده گردید (۲۶). با تزریق دوزهای پایین سلول گلایوما موشی به مغز در مدل سینژنیک، تومور واضح و بزرگ تشکیل می‌شود. به‌طوری‌که تشکیل تومور با تزریق دوز ۵۰۰۰(۲۷)، ۱۰۰۰۰ (۲۹ و ۲۸) و ۲۰۰۰۰ (۱۵) در مغز موش سینژنیک در مطالعات دیگران گزارش شده است. همچنین با دوزهای پایین GL26 و آنالوگ آن GL261 به‌شکل زیر جلدی نیز در حیوان سینژنیک تومور ایجاد می‌کند (۳۰). این در حالی‌است که در مطالعه‌ی ما با دوزهای پایین در مدل آلوژنیک موش Balb/c تومور رشد نکرد. کی و همکاران در مطالعه‌ای روی مدل‌های گزنوژنیک در موش‌ها دریافتند که تشکیل تومور، اندازه‌ی توده‌ی توموری و ماندگاری حیوان بعد از ابتلا به تومور مستقیما به تعداد سلول تزریقی وابسته است (Dose Response). با توجه به توانایی القای تومور توسط سلول، به نظر می‌رسد ساختار متفاوت ایمونوژنتیکی موش‌های سوری دریافت کننده‌ی سلول، توان مقابله و رد تومور را در دوزهای پایین در اختیار سیستم ایمنی حیوان قرار می‌دهد، ولی در دوزهای بالا ایمنی حیوان فرصت کافی برای ممانعت از تشکیل تومور را پیدا نمی‌کند (۲٤). از طرف دیگر، رشد سریع سلول‌های توموری نیاز به مواد غذایی و انرژی دارد که این کار در تومور با ایجاد رگ‌های جدید و عملکرد فاکتورهای آنژیوژنز تامین می‌شود (۳۱). در مطالعه‌ی ما نیز عروق فراوان و نکروز در توده‌ی توموری مشهود است تا احتیاجات رشد و نمو سلول‌های سرطانی را تامین کند. این یافته‌ها با نتایج کارهای محققین دیگر مطابقت دارد (۲۶و۹). مطالعات تکمیلی شامل ارزیابی‌های ایمونوژنتیکی و پاسخ‌های ایمنی سلولی و مولکولی بعد از ایجاد مدل ادامه دارد.

نتیجه گیری

با توجه به ضرورت تحقیق در ایمونوبیولوژی تومور مغزی گلایوما در ایران و محدودیت دسترسی به مدل‌های حیوانی سینژنیک، ایجاد مدل آلوژنیک زیر پوستی، این امکان را فراهم می‌کند که به آسانی یک ارزیابی از اندازه و حجم تومور و بعضی پاسخ‌های ایمنی، بدون نیاز به قربانی کردن حیوان به‌دست آید و امکان آزمایش

عوامل درمانی برای کشف تازه‌های درمانی در مدل میسر گردد. همچنین ایجاد تومور در مدل برای اولین بار در ایران منجر به آغاز تحقیقات پایه و بالینی گلایوما در کشور می‌شود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از آقای دکتر مسعود سلیمانی از موسسه فن‌آوری بن یاخته و مهندسی بافت به‌خاطر اهدای سلول کمال تشکر را داریم.

References

1- Shabason JE, Tofilon PJ, Camphausen K. Grand rounds at the National Institutes of Health: HDAC inhibitors as radiation modifiers, from bench to clinic. *J Cell Mol Med*. 2011; 15: 2735-44.

2- Curtin JF, King GD, Candolfi M, et al. Combining cytotoxic and immune-mediated gene therapy to treat brain tumors. *Curr Top Med Chem*. 2005; 5: 1151-70.

3- King GD, Curtin JF, Candolfi M, Kroeger K, Lowenstein PR, Castro MG. Gene therapy and targeted toxins for glioma. *Curr Gene Ther*. 2005; 5: 535-57.

4- Shelton LM, Mukherjee P, Huysentruyt LC, Urits I, Rosenberg JA, Seyfried TN. A novel pre-clinical in vivo mouse model for malignant brain tumor growth and invasion. *J Neurooncol*. 2010; 99: 165-76.

5- Castro MG, Cowen R, Williamson IK, et al. Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol Ther*. 2003; 98: 71-108.

6- Brehar FM, Ciurea AV, Chivu M, Zarnescu O, Radulescu R, Dragu D. The development of xenograft glioblastoma implants in nude mice brain. *J Med Life*. 2008; 1: 275-86.

7- Rajčević U. A rodent brain orthotopic model to study human malignant glioma. *Slov Vet Res*. 2011; 48: 5-14.

8- Dai C, Holland EC. Glioma models. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001; 1551: M19-M27.

9- Cunha AM, Nascimento FS, Amaral JC, et al. A murine model of xenotransplantation of human glioblastoma with imunosupression by orogastric cyclosporine. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011; 69: 112-7.

10- Castro MG, Curtin J, King GD, et al. Novel gene therapeutic approaches to brain cancer. In: Castro MG, Lowenstein PR, editors. Gene therapy for neurological disorders. Taylor and Francis Group. New York. 2006: 229-264.

11- Biglari A, Bataille D, Naumann U, et al. Effects of ectopic decorin in modulating intracranial glioma progression in vivo, in a rat syngeneic model. *Cancer Gene Ther*. 2004; 11: 721-32.

12- Sughrue ME, Yang I, Kane AJ, et al. Immunological considerations of modern animal models of malignant primary brain tumors. *J Transl Med*. 2009; 7: 84.

13- Sikorski CW, Lesniak MS. Immunotherapy for malignant glioma: current approaches and

future directions. *Neurol Res*. 2005; 27: 703-16.
14- Okada H, Kohanbash G, Zhu X, et al. Immunotherapeutic approaches for glioma. *Crit Rev Immunol*. 2009; 29: 1-42.
15- Candolfi M, Curtin JF, Nichols WF, et al. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J Neurooncol*. 2007; 85: 133-48.
16- Reilly KM, Rubin JB, Gilbertson RJ, et al. Rethinking brain tumors: the fourth mouse models of human cancers consortium nervous system tumors workshop. *Cancer Res*. 2008; 68: 5508-11.
17- Barth RF, Kaur B. 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: 299-312.
18- Mathieu D, Lamarche JB, Fortin D. The importance of a syngeneic glioma implantation model: Comparison of the F98 cell line in Fischer and Long-Evans Rats. *J Appl Res*. 2005; 5: 17-25.
19- Kim CH, Hong MJ, Park SD, et al. Enhancement of anti-tumor immunity specific to murine glioma by vaccination with tumor cell lysate-pulsed dendritic cells engineered to produce interleukin-12. *Cancer Immunol Immunother*. 2006; 55: 1309-19.
20- Irvin DK, Jouanneau E, Duvall G, et al. T cells enhance stem-like properties and conditional malignancy in gliomas. *PLoS ONE*. 2010; 5: e10974.
21- Beutler AS, Banck MS, Wedekind D, Hedrich HJ. Tumor gene therapy made easy: allogeneic major histocompatibility complex in the C6 rat glioma model. *Hum Gene Ther*. 1999; 10: 95-101.
22- Parsa AT, Chakrabarti I, Hurley PT, et al. Limitations of the C6/Wistar Rat intracerebral glioma model: implications for evaluating immunotherapy. *Neurosurgery*. 2000; 47: 993-1000.
23- Miura FK, Alves MJF, Rocha MC, Silva R, Oba-Shinjo SM, Marie SKN. Xenograft transplantation of human malignant astrocytoma cells into immunodeficient rats: an experimental model of glioblastoma. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010; 65: 305-9.
24- Kaye AH, Morstyn G, Gardner I, Pyke K. Development of a xenograft glioma model in mouse brain; *Cancer Research*. 1986; 46: 1367-73.
25- Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol*. 2007; 170: 793-804.
26- Watanabe K, Sakamoto M, Somiya M, Amin MR, Kamitani H, Watanabe T. Feasibility and limitations of the rat model by C6 gliomas implanted at the subcutaneous region. *Neurol Res*. 2002; 24: 485-90.
27- Prins RM, Incardona F, Lau R, et al. Characterization of defective CD4-CD8- T cells in murine tumors generated independent of antigen specificity. *J Immunol*. 2004; 172: 1602-11.

28- Hu J, Yuan X, Belladonna M, et al. Induction of potent antitumor immunity by intratumoral injection of interleukin 23–transduced dendritic cells. *Cancer Res*. 2006; *66:* 8887.

29- Ehtesham M, Samoto K, Kabos P, et al. Treatment of intracranial glioma with in situ interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha gene transfer.*Cancer Gene Ther*. 2002; 9: 925-34.

30- Szatmari T, Lumniczky K, Désaknai S, et al. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci*. 2006; 97: 546-53.

31- Karmakar S, Olive MF, Banik NL, Ray SK. Intracranial stereotaxic cannulation for development of orthotopic glioblastoma allograft in Sprague-Dawley rats and histoimmunopathological characterization of the brain tumor. *Neurochem Res*. 2007; 32(12): 2235-42.

Induction of Allogeneic Subcutaneous Glioma Tumor with GL 26 Cell Line in Balb/c Mice

Esmaeilzadeh AR[1], Ebtekar M[1], Biglari AR[2], Hassan ZM[1]

[1]Dept. of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University ,Tehran, Iran

[2]Dept. of Genetics and Molecular Medicine ,Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Ebtekar M, Dept. of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Email: ebtekarm@modares.ac.ir

Received: 11 Jul 2011 **Accepted:** 2 Oct 2011

Background and Objective: Glioma is the most common primary brain tumor. Despite many advances in treatment, all patients die within 6 to 18 months after diagnosis. In the cases of glioma, the immune system is suppressed in a local fashion. Therefore, unveiling the cellular and molecular mechanisms involved, with the aim of obtaining an appropriate new treatment is a priority. Designing an appropriate animal model is necessary before any clinical trials.

Material and Methods: In this study, we prepared fifteen 6-8 week-old female mice (Balb/C) from the Pasteur institute, Tehran,and also selected the mouse glioma cell line GL26 to induce a allogeneic subcutaneous tumor. After culturing the cell and anesthetization of the mice, we injected different cell doses into distinct groups of mice. Sterile PBS was injected into the control group. Animal behavior and clinical symptoms were regularly followed and recorded, and after tumor induction, it was surgically removed and evaluated in terms of macroscopic and microscopic characteristics.

Results: The tumor was induced more quickly with higher number of GL26 cells in mice. Atrophy and weakness was observed in the affected animals. In macroscopic examination, the tumor was relatively large, thick and full of blood. Moreover, in microscopic examination, cell proliferation, mitosis, abundant vessels, and tumor necrosis were observed.

Conclusion: Regarding the limitations of a glioma syngeneic animal model, establishment of an allogeneic subcutaneous model, allows an easy evaluation of the size and volume of the tumor, without a requirement for sacrificing the animal. This model has the potential to provide opportunities for research on some immunological parameters, the testing of new therapeutic agents, and new discoveries in basic research, concerning glioma, for the first time in Iran.

Keywords: Immunogenetic, Brain tumor, Glioma, GL26, Allogeneic model, Subcutaneous, Iran