

MERKEZ SINIR SİSTEMİ TÜMÖRLERİNİN ORTAK  
ANTİJENLER YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

SAKIZLI, MERAL

**ÖZET:**İnvitro koşullarda yapılan bu çalışmada, insan merkez sinir sistemi (CNS) tümörlerinden meningiom (7), glioblastom (3), astrositom (2), ependimom (1), ve medulloblastom (1) hücreleri, meningiom hücrelerine karşı tavşandan elde edilen anti-meningiom serumu (5) ile ve indirek immün floresans (IIF) yöntemiyle tarandı. Normal insan beyin ve meninks hücreleri kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca, föetal meninks hücreleri, anti-meningiom serumu ile karsino-embriyonik antijen yönünden incelendi.

Sonuç olarak, 5 anti-meningiom serumunun her birinin meningiom, glioblastom, ependimom, medulloblastom ve föetal meninks hücrelerle reaksiyon verdiği saptandı. Astrositom hücrelerinde ise ortak bir tümör özgül antijen gösterilemedi. Serumun föetal meninks hücrelerle absorpsiyonundan sonra, tümör hücrelerindeki floresansın azalması, ortak tümör antijeninin bir kısmının karsino-embriyonik olabileceği fikrini verdi.

**ABSTRACT:** Assoc.Prof.Meral SAKIZLI, Hacettepe University, Faculty of Medicine. In this in vitro study, cultures of 7 meningioma, 3 glioblastoma, 2 astrocytoma, 1 ependymoma and 1 medulloblastoma type human tumors were examined by indirect immuno fluorescence (IIF) against anti-meningioma sera (5) obtained from rabbits immunized by human meningioma cell extracts. Normal human brain and normal human meningeal cells and rabbit sera against them were used as controls. Results obtained with fetal meningeal cells and anti-meningioma sera were also evaluated with respect to carcino-embryonic antigens.

As a result, each anti-human meningioma serum cross-reacted with the meningioma, glioblastoma, ependymoma, medulloblastoma and fetal meningeal cells. No common tumor specific antigen could be detected in astrocytomas. Fluorescence obtained with meningioma cells and anti-meningioma sera, was decreased after the absorption of sera with fetal meningeal cells showing at least a part of tumor specific antigens could be carcino-embryonic antigens.

---

Doç.Dr.Meral SAKIZLI, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD.

**Anahtar sözcükler:** Merkez sinir sistemi tümörleri, tümör-özümlü antijenler, karsino-embriyonik antijenler, indirek immün floresans.  
**Key words:** Central nervous system tumors, tumor-specific antigens, carcino-embryonic antigens, indirect immuno fluorescence.

**GİRİŞ:** Türk toplumunda oldukça sık görülen CNS tümörlerinden biri olan meningiom, benign olmasına karşın önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır (3,25,29). Bu tümörün etyolojisinde çeşitli faktörlerden söz edilmiş, ancak kesin bir kaniye varılmamıştır. Viral etyolojiyi destekleyen bulgulara sıklıkla rastlanmaktadır (2,11,18,24,32,34,36). Viral etyolojili tümörlerde ortak ve tümöre özgül antijenlerin varlığı da çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (4,6,12,13,17, 21, 22,28,30,33). Bu nedenle, tümörlerde ortak antijen araştırılması tümör etyolojisi açısından, önemlidir (14). Son yıllarda, tümör antijenlerine karşı elde edilmiş monoklonal antikörlerin tümör izlenmesi ve tedavisi amacıyla kullanılması alanında büyük gelişmeler kaydedilmiştir (26,35). Bu amaçla da, ilk adım olarak, tümör-özümlü, kross reaksiyon veren antijenlerin saptanması önem kazanmaktadır. Ayrıca, kanser hücrelerinde ortak antijenlerin, diğer bir deyişle yeni ortak proteinlerin gösterilebilmesi, o kanser tipiyle belli bir onkogen ürününün, dolayısıyla onkogenin ilişkisini kurmak bakımından da önemlidir (1,27,31).

#### **GEREÇ VE YÖNTEM:**

**Hücre Kültürleri:** Tümör Dokuları Hacettepe Üniversitesi Hastanesi, Nöroşirürji bilim dalı ameliyatlarından sağlanmıştır. Patoloji için alınan parçadan 1cm<sup>3</sup> büyüklüğünde doku parçası alınarak, hücre kültür ortamı içerisinde laboratuvara iletilmiştir. Normal, gelişkin insan beyin (NB) dokusu ve meninks (NM) dokusu enfeksiyon ve tümör belirtisi olmayan bir otopsi olgusundan sağlanmıştır. Fötal meninks hücre kültürleri ise 4 ve 5 aylık iki tane, enfeksiyonsuz düşük materyelinden elde edilmiştir. Tümör dokuları kültüre alındıktan sonra klinik tanı, patolojik tanı ile korele edilmiştir.

Kültür hazırlanması için, parça koyma yönteminden yararlanıldı (5,23). Bunun için, alınan doku olabildiğinde küçük parçalara kesildi ve %30 fötal dana serumu (Gibco), 100 U/ml penisilin 100ug/ml streptomisi içeren glutaminli MEM(Minimal Essential Medium) (Gibco) hücre kültürü ortamı içerisine kondu. Kültürler %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında 36C° de inkübasyona bırakıldı. Kültürler ilk birkaç pasaj süresinde kullanıldılar.

**B-İmmünizasyon:** Sadece 5 meningiom olgusunda hazırlanmış kültürlerde, immünizasyon için yeterli hücre sayısına ulaşıldı. Her meningiom kültürü için iki gelişkin albino tavşana üçer kez, 10<sup>6</sup> hücrenin özütü enjekte

edildi. Hücre özütü elde etmek amacıyla hücreler, üç kez dondurulup (-70°C) çözülerek (37°C) parçalandı. Enjeksiyon öncesi parçalanmış hücreler ile komple Freund adjuvanı (Difco) eşit miktarda karıştırılarak homojenize edildi. Tavşanlar, sırt deri altına üç ayrı yerden enjeksiyonla immünize edildiler. 21 gün arayla üç enjeksiyonu izleyen 10.gün kan alınarak serumu ayrıldı ve -70°C de saklandı. Anti-meningiom, anti-NB ve anti-NM serumları aynı yöntemle hazırlandı.

**Serum absorpsiyonu:** Normal insan hücresi antijenlerine karşı yapılan antikolların serumlarından uzaklaştırılması ve özgül olmayan bağlanmanın enaza indirilmesi için serumlar, kendi hazırladığımız insan karaciğer tozu ile absorbe edildiler (19). Karaciğer tozu 100mg/ml konsantrasyonda serum içerisine ilave edildi ve 36°C de bir saat, 4°C de 12 saat inkübasyondan sonra 13000 rpm de (Sorvall, RC2-8) 30 dakika santir-fugasyonla serumlar ayrıldı. Bu serumlar, çift absorpsiyon için NB ya da NM hücre tabakası üzerine yayılarak aynı şekilde absorbe edildiler.

**IIF boyama:** İndirekt immün floresans boyama, anti-meningiom, anti-NB ve anti-NM serumları ile tüm tümör ve kontrol hücrelerin karşılaştırılması yoluyla yapıldı. Anti-tavşan FITC konjuge serum (keçi) (Wellcome Reagents) marker serum olarak kullanıldı (16). Preparatlar floresan mikroskopla incelenerek fotoğrafları çekildi.

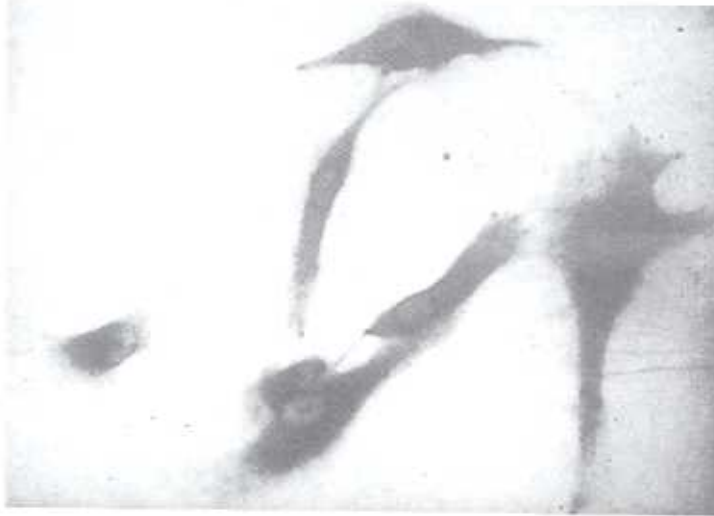
**SONUÇLAR:** Farklı serumlarla farklı hücre karşılaştırmalarının sonuçlarını ayrı ayrı verecek olursak;

a) Absorbe edilmemiş anti-meningiom serumu ile elde edilen sonuçlar: Astro sitom hücrelerinde en az olmak üzere, tüm tümör hücrelerinde yaygın floresans gözlemlendi (Resim 1). Normal gelişkin beyin ve fetal meninks hücreleri de pozitif floresans göstermekteydi. Özgül olmayan bu boyanmanın özellikle fetal hücrelerde yoğunlaşmış olduğu da saptandı.



Resim 1: Meningiom hücresinde anti-meningiom serumu ile elde edilen yaygın floresans (1000X).

b. Absorbe edilmemiş negatif kontrol serumu ile alınan sonuçlar: CNS tümör hücreleri ve kontrol hücrelerde çok siliik, yaygın bir floresans gözlemlendi (Resim 2), bu da özgül olmayan bağlanmanın varlığının kanıtı olarak değerlendirildi. Serumların absorpsiyonunun gerekli olduğuna karar verildi.



Resim 2: Absorpsiyon öncesi anti-meningiom serumu ile NM hücrelerindeki özgül olmayan floresans (1000 X).

c. Absorbe edilmiş anti-meningiom serumu ile alınan sonuçlar: Kontrol hücrelerde ve astrositom hücrelerinde floresans boyanmanın tamamen ortadan kalktığı görüldü. Fötal meninks hücreleri ile diğer CNS tümörü hücrelerinde ise çoğunlukla perinükleer bölgede olmak üzere sitoplazmik, granüler ve parlak bir floresans saptandı (Resim 3,4 ).



Resim 3: Tek absorpsiyon sonrası anti-meningiom serumu ile meningiom hücresinde floresans boyanma (1000 X).



Resim 4: Karaciğer tozuyla absorpsiyondan sonra fötal meninks hücrelerinde, anti-meningiom serumuna karşı elde edilen floresans (1000X).

d. Absorbe edilmiş negatif kontrol serumu ile alınan sonuçlar: Tüm hücrelerde özgül olmayan floresansın ortadan kalktığı gösterildi.

e. Karaciğer tozu ile ve hücre tabakası üzerinde olmak üzere çift absorpsiyondan sonra anti-meningiom serumu ile astrositom hücreleri ve kontrol beyin hücreleri dışında tümör hücrelerinde ve fetal meninks hücrelerinde parlak, granüler, sitoplazmik floresans görüldü (Tablo 1). Fetal hücrelerle CNS tümör hücrelerdeki floresans boyanan moleküllerin aynı olup olmadığının saptanması amacıyla, anti-meningiom serumları fetal meninks hücreleri ile absorbe edildikten sonra tekrar boyama yapıldı.

f. Fetal meninks hücreleriyle absorpsiyondan sonra alınan sonuçlar: Kontrol hücrelerin ve fetal meninks hücrelerinin tamamen negatif boyanma verdikleri saptandı. Meningiom, glioblastom, ependimom hücrelerinde ise floresansın hafiflemiş olarak, granüler ve periplazmik bölgede lokalize şekilde bulunduğu görüldü (Resim 5).



Resim 5: Fetal meninks hücreleriyle absorpsiyondan sonra anti-meningiom serumu ile meningiom hücrelerinde elde edilen periplazmik floresans (1500 X).

Tablo 1: İnsan karaciğer özütü ve normal meninks hücreleri ile çift absorbsiyondan sonra elde edilen IIF sonuçları.

ANTİSERUM	Anti-Meng 1	Anti-Meng 2	Anti-Meng 3	Anti-Meng 4	Anti-Meng 5	Anti-NB	Anti-NM
HÜCRE							
Meng 1	++	++	++	++	++	-	-
Meng 2	++	++	+	++	++	-	-
Meng 3	++	++	+	++	++	-	-
Meng 4	++	++	++	++	++	-	-
Meng 5	++	++	+	++	++	-	-
Meng 6	++	++	+	++	++	-	-
Meng 7	++	++	+	++	++	-	-
GB 1	++	++	+	++	++	-	-
GB 2	++	++	+-	++	++	-	-
GB 3	++	++	+	++	++	-	-
Ast 1	-	-	-	-	-	-	-
Ast 2	-	-	-	-	-	-	-
Ep 1	++	++	+	++	++	-	-
MB 1	+	++	+	++	++	-	-
NB	-	-	-	-	-	-	-
NM	-	-	-	-	-	-	-
NFM	++	++	++	++	++	-	-

Meng: meningiom, GB,: glioblastom, Ast: astrositom, Ep: ependimon, MB: medulloblastom, NB: normal gelişkin beyin, NM: normal gelişkin meninks, NMF: normal fütal meninks.  
Kuvvetli floresans++, zayıf pozitif floresans+, çok zayıf floresans+-, negatif boyanma-.

**TARTIŞMA:** CNS tümörleri üzerinde benzer çalışmaların az oluşu, sonuçlarımızın kesin değerlendirmesine olanak vermemektedir. Ancak, 7 meningiom, 3 glioblastom, 1 ependimom ve 1 medulloblastom olgusunda tümör hücrelerinde ortak tümör antijenlerinin var olduğunu, 2 astrositom olgusunda ise aynı antijenlerin bulunmadığını söyleyebiliriz. Bu sonuç, anti-astrositom serumu ile, benzer şekilde ancak kompleman yoluyla sitotoksizite (CMC) yöntemi kullanılarak yapılmış olan bir araştırmanın sonuçlarıyla uyum göstermektedir (15). Şöâl edilen çalışmada, astrositom hücrelerine karşı sitotoksik aktivite göstermesine karşın, meningiom dokusuna karşı herhangi bir aktivite gösterilmemiştir ki bu da, iki tip tümörde antijenite farklılığı bulunduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, fetal meninks hücreleri antijenlerine karşı antikorların uzaklaştırılmasından sonra CNS tümör hücrelerindeki floresansın azalması ve nükleus çevresindeki floresansın tamamen ortadan kalkması, embriyonik dönemde bölünme kontrolü ile ilgili olan ve tümör hücrelerinde yeniden ortaya çıkan karsino-embriyonik antijenlerin CNS tümörlerinde varlığını göstermektedir. Bu konuda daha önce yapılmış olan iki çalışmanın sonuçları birbirine zıttır. Kehayov ve ark.(20) tavşandan normal insan fetal beyin dokusuna karşı elde ettikleri serum ile meningiom hücrelerinde tarama yapmışlar ve embriyonik antijen varlığını göstermişlerdir. Buna karşın, Dittmann ve arkadaşları (10), benzer bir çalışma sonunda meningiom dokusunda embriyonik antijen verisi elde etmediklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmaların her ikisi de doku kesitleri üzerinde yapılmış olup hücre kültürü çalışmalarına rastlanmamaktadır.

Bulgularımız, diğer araştırmacıların çalışmaları ile desteklendiği takdirde, ortak antijenlerin moleküler analizi, monoklonal antikor yapımı ve CNS tümörlerinde ayırıcı kriterlerin konulması gibi ilerlemelere basamak oluşturmaktadır.

#### KAYNAKLAR

1. Barnakow, A., Paul, E., Schart, M. Expression of the c-src protooncogene in human skin tumors. *Cancer Res.*, 1987; 47:235-240.
2. Bendheim, P.E., Dinowitz, M. Particles resembling oncornaviruses. Spontaneous release from cultured meningioma cells. *Arch. Neurol.*, 1977; 34:105-108.
3. Biggart, J.H., *Pathology of the Nervous System. (Third Ed.)* The Williams Wilkins Company, Baltimore, 1961.



4. Billings, R., Terasaki, P.I. Human leukemia antigen I. Production and characterization of antisera. *J.Natl. Cancer Inst.*, 1974; 53: 1635-1638
5. Bottenstein, J.E., Sato, G. *Cell Culture in the Neurosciences.*, s. 3-43, 1985.
6. Brodt, P. Tumor immunology-three decades in review. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1983; 37:447-476.
7. Butel, J.S. SV40 large T-antigen: dual oncogene, *Cancer Surveys*, 1986; 5:343-365.
8. Chang, C., Anderson, J.L., Martin, R.G., Mora, P.T. Expression of tumor specific transplantation antigen in cell lines transformed by wild-type or ts mutant simian virus 40. *J.Virol.*, 1977; 22:281-289.
9. D'Alisa, R.M., Korf, S.R., Gershay, E.L. T-antigen banding on chromosomes of simian virus 40 infected muntjac cells. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1979; 24:27-36.
10. Dittman, L., Axelsen, N.H., Norgaard-Pedersen, B., Bock, E. Antigens in human glioblastomas and meningiomas: Search for tumor and onco-foetal antigens. Estimation of S-100 and GPA protein. *Br.J.Cancer*, 1977; 35:135-141.
11. Doerfler, W. Animal virus-host genome interections. *Comprehensive Virology* 10. Fraenkel-Contrat and Robert, R.W. Plenum Press. 1977; S.279-367,
12. Ernberg, I., Anderssen-Anvret, M., Klein, G. Relationship between amount of Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen per cell and number of EBV-DNA copies per cell. *Nature*. 1977; 266:269-270.
13. Fleissner, E. Virus-specific antigene in hamster cells transformed by RSV. *J.Virol.*, 1970; 5:14-21.
14. Fukuda, M., Wanebo, H.J., Tsui, L., Ashkari, R., Sarkar, N.H. Leukocyte migration inhibition among breast cancer patients in response to various oncogenic viruses. *J.Natl. Cancer Inst.*, 1980; 64:431-437.
15. Gold, D.V., Goldenberg, D.M. Antigens associated with human solid tumors, in: *Cancer Markers. Diagnostic and Developmental Significance.* Stewart Sell, The HUMANA press. s. 1980; 329-365.

16. Goldman, M. Fluorescent Antibody Methods. Academic Press. s. 1968; 157-159.
17. Habel, K. Specific complement-fixing antigens in polyoma tumors and transformed cells. *Virology*, 1965; 25: 55-61.
18. Illis, L.S. *Viral Diseases of the Central Nervous System*. (First Ed.) R and Clark Ltd. 1975.
19. Kawamura, A.Jr. *Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications* (Second Ed.) University of Tokyo Press. 1977; s. 5-75.
20. Kehayov, I., Botev, B., Vulchanov, V., Kyurkchiev, S. Demonstration of a phase (stage) specific embryonic brain antigen in human meningiomas. *Int. J.Cancer*, 1976; 18: 587-592...
21. Kluchareva, T.E., Shachanina, K.L., Belova, S., Chibisova, V., Deichman, G.T. Use of immuno-fluorescence for detection of specific membrane antigen in SV40 infected nontransformed cells. *J.Natl. Cancer Inst.*, 1967; 39: 825-832.
22. Kurth, R., Macpherson, I.A. Avian cell transformation and the expression of avian sarcoma virus-specific tumour antigens. *Nature*, 1976; 264: 261-263.
23. Lennete, E.H., Schmidt, N.J. *Diagnostic Procedure for Viral and Rickettsial Infections*. (Fifth Ed.). American Public Health Association. 1980.
24. May, G., Fischer, H., Zang, K.D. SV40 related T-antigen expression in human meningiomas with normal and G-22 monosomic karyotype. *J.Gen. Virol.*, 1979; 43: 697-700.
25. Mc Donald, J.V., Salazar, O.M., Rubin, P., Lapham, L.W., Bakemeler, R.F. *Central nervous system tumors*, in: *Clinical Oncology for Medical Students and Physicians*. (Sixth Ed.) Rubin, P. 1983; s. 262-278.
26. Nedler, L.M., Stavshenko, P., Hardy, R., Kaplan, W.D., Button, L.N., Kufe, D.W., Antman, K.H., Schlossman, S.F. Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen, *Cancer Res.*, 1980; 40:3147-3154.
27. Ocadiz, R., Saucedo, R., Cruz, M., Graef, A.M., Gariglio, P. High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res.*, 1987; 47:4173-4177.

28. Pasternak, G. Antigens induced by mouse leukemia viruses. *Adv. Cancer Res.*, 1969; 12:1-99.
29. Rubinstein, L.J. Tumors of the Central Nervous System. *Armed Forces Institute of Pathology*, 1970; s.169-204.
30. Schultz, D.R., Yunis, A.A. Tumor associated antigen in human pancreatic cancer. *J.Natl. Cancer Inst.*, 1979; 62:777-785.
31. Slamon, D.J., de Kernion, J.B., Verma, I.M., Cline, M.J. Expression of Cellular Oncogenes in human malignancies. *Science*, 1984; 224: 256-262.
32. Tabuchi, K., Kirsch, W.M., Low, M., Gaskin, D., Buskirk, J.V., Maa, S. Screening of human brain tumors for SV40 related T-antigen. *Int.J.Cancer*, 1978; 21: 12-17.
33. Thorpe, W.P., Rosensberg, S.A. Serologic analysis of human tumor antigens. I. Antisarcoma antibodies in the sera of patients with osteogenic sarcomas. *J.Natl. Cancer Inst.*, 1979; 62: 1143-1150.
34. Weiss, A.F., Portmann, R., Fischer, H., Simon, J., Zang, K.D. Simian virus 40 related antigens in three human meningiomas with defined chromosome loss. *Proc.Nat. Acad. Sci. USA.*, 1975; 72: 609-613.
35. Whittater, L, Fuks, A., Hand, R. Plasma membrane orientation of simian virus 40 T-antigen in three transformed cell lines mapped with monoclonal antibodies. *J.Virol.*, 1985; 53: 366-373.
36. Zur Hausen, H. The role of viruses in human tumors. *Adv. Cancer Res.* 1980; 33: 77-107.