

Bożena Romanowska, Barbara Kukielczak², Janusz Bryk, Barbara Mirkiewicz-Sieradzka, Jolanta Heitzmann¹ i Stanisław Łukiewicz²

Nowa technika implantacji czerniaka Bomirskiego do przedniej komory oka chomika syryjskiego

New implanting technique of Bomirski melanoma into anterior chamber of Syrian hamsters eyes

Summary: Purpose: To describe a newly elaborated ocular tumor model, obtained by implanting Bomirski melanoma into the anterior chamber of the eye in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). Material and methods: The experiments were carried out using pigmented and non-pigmented lines of the tumor. Attempted injections of suspension of malignant melanoma cells in physiological salt solution to the anterior chamber with an infusion pump did not give the expected results. The growth of the tumor occurred only in 8% of eyes. The research material contained 132 adult pigmented hamsters. Tumor fragments of the size of 0,4-1,0 mm were implanted to the anterior chamber of the eyes. Melanotic cells were implanted in 71 hamsters, amelanotic ones in 61 hamsters. Hamsters were anesthetized with intravisceral vetbutal. The examination was carried out in 24 hour intervals. Results: During the first 2 to 3 days the disappearance of the cells were observed, and then iris tumors appeared, in the cases of amelanotic cells after 4-6 days, and in the cases of melanotic cells after 8-10 days. Enucleated eye-balls were examined histopathologically. In all cases confirmation of the growth of melanoma in the iris was obtained.

Hasła: model nowotworowy, czerniak, przednia komora oka chomika
Key words: tumor model, melanoma, anterior chamber of the hamster eye

Dotychczas opisano tylko jeden doświadczalny model zwierzęcego czerniaka oka⁴. Uzyskuje się go na drodze mikrochirurgicznej ksenotransplantacji skrawka nieubarwionego (amelanotycznego) czerniaka Greena do przestrzeni podnaczyniówkowej oka królika, przy czym dawcą wszczepu jest chomik. Takie umiejscowienie powoduje trudności w obserwacji wzrostu i ocenie wyników leczenia guza w porównaniu z guzami rosnącymi w przedniej komorze oka.

Wspomniany wyżej model doświadczalnego nowotworu ma co najmniej dwie główne wady: biorca

i dawca należą w tym przypadku do odmiennych gatunków zwierzęcych a wszczepiana linia czerniaka nie zawiera melaniny (amelanotyczna).

Celem niniejszej pracy jest opracowanie nowego, lepszego modelu, przy zastosowaniu transplantacji allo- lub syngenicznej, które odznaczają się większą częstością przyjęcia w porównaniu z ksenotransplantacją. Niestety króliki, o stosunkowo dużych gałkach ocznych dogodnych z punktu widzenia techniki przeszczepu, nie nadają się do roli dawcy i biorcy, ponieważ nie znany jest u nich żaden przeszczepialny czerniak. Duża trudność natury technicznej podjętych w tych badaniach doświadczeń wynika z okoliczności, iż wszystkie zwierzęce czerniaki doświadczalne występują tylko u kilku gatunków małych zwierząt laboratoryjnych. Średnica gałki ocznej jest u nich niewielka i z reguły nie przekracza kilku milimetrów. W niniejszym doniesieniu opisano udaną próbę opracowania nowego modelu czerniaka oka u chomika.

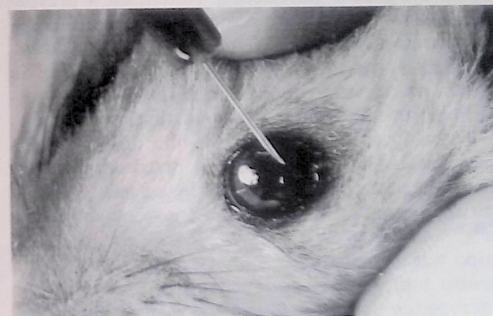
Materiał i metodyka

Jako materiał doświadczalny posłużyły dwie linie czerniaka Bomirskiego pochodzące ze skóry: ubar-

wiona (melanotyczna) BHM Ma oraz nieubarwiona (amelanotyczna) BHM Ab, które wszczepiano do przedniej komory oka chomika syryjskiego odmiany złocistej (*Mesocricetus auratus*). Ze względu na niewielkie rozmiary przedniej komory oka tego zwierzęcia zabiegu transplantacji oraz pomiarów wielkości guzów trzeba było dokonywać przy użyciu mikroskopu chirurgicznego. Wykorzystano Model produkcji Moller Optische Werke GmbH.

W początkowych badaniach przeprowadzonych na 16 chomikach, podjęto próbę podawania zawiesiny komórek nowotworowych w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS), otrzymanej na drodze trypsynizacji guzów, testując 2 stężenia: 5 mln komórek/ml i 10 mln komórek/ml. Doświadczenia prowadzono na obu liniach czerniaka. Próbkę zawieszoną w oku chomika z użyciem pompy perystaltycznej. Liczba przyjętych wszczepów nie przekraczała jednak przy tej metodzie 15%. W związku z tym podjęto próbę wszczepienia skrawków guza zamiast zawiesiny izolowanych komórek.

Skrawki ubarwionego nowotworu wszczepiono 49 chomikom, zaś nieubarwionego 62 chomikom, zawsze tylko do jednego oka, aby nie pozbawiać zwierząt zdolności widzenia (ryc. 1).



Ryc. 1. Moment wszczepu skrawka tkanki nowotworowej do przedniej komory oka chomika

Przed zabiegiem usypiano chomiki przez dootrzewnowe podanie Vetbutalu rozcieńczonego 20-krotnie zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej, stosując dawkę 0,015 ml na 1 g wagi ciała. Wprowadzane mikrochirurgicznie skrawki guza zawieszono w roztworze soli miały wielkość od 0,4 mm do 1,0 mm.

Umieszczano je tuż przy ostrzu igły i wypychano po wkłuciu do przedniej komory oka z możliwie jak najmniejszą ilością płynu. Istotne było aby w trakcie zabiegu koniec igły ze skrawkiem znalazł się w przedniej komorze oka tuż ponad tęczęwką. Przy wszczepie zwracano uwagę na dobór skrawków o podobnej wielkości, aby uzyskać możliwie jak największą porównywalność wyników.

Dla określenia wielkości guzów nowotworowych zastosowano metodę Schrecka². Za wskaźnik roz-

miarów guza przyjmuje się w tej metodzie średnią geometryczną δ trzech średnic, mierzonych wzdłuż wzajemnie prostopadłych osi guza: $\delta = \sqrt[3]{abc}$, gdzie a, b, c — średnicami guza wzdłuż trzech prostopadłych osi.

Pomiar wielkości guzów wykonano bezpośrednio przy użyciu okularu z podziałką: umożliwiało to ocenę tempa wzrostu guza w płaszczyźnie pola widzenia (a więc w dwu wymiarach). Wielkość trzeciej średnicy guza ustalano z preparatów histopatologicznych. Biorąc pod uwagę zjawisko kurczenia się materiału wynikające z preparatyki utralajającej ustalono wzór, przedstawiający obkurczanie się fragmentów tkanek, w funkcji ich objętości. Jest to zależność logarytmiczna. Aby obliczyć rzeczywistą wielkość trzeciej średnicy guza y, należy wartość, zmierzoną na preparacie histologicznym x wstawić do następującego równania: $y = (19.9)^{-1} (10^{-7} \ln x - 5.35)$.

Parametry powyższego równania oznaczono doświadczalnie przez pomiary skrawków przed i po preparatyce utralajającej; przy wyznaczaniu tej zależności posłużono się programem „Sigma Plot”. Uzyskane na tej drodze wartości są porównywalne z otrzymanymi przy pomocy innych technik — ustalania wielkości guzów^{3,7}. Wszystkie pomiary przeprowadzono w odstępach 24 godzinnych.

Wyluszczone gałki oczne poddano badaniu histopatologicznemu. Przy ocenie preparatów korzystano z mikroskopu świetlnego LABORLUX S LEITZ. Preparaty wybarwiano standardową metodą; eozyną — hematoksyliną, stosując grubość preparatu 4 μ m.

Wyniki badań

W ciągu pierwszych 2 do 3 dni po wszczepieniu tkanki nowotworowej obserwowano zanikanie skrawka a następnie pojawienie się guzka tęczęwki, co w przypadku linii ubarwionej trwało około 4-7 dni, a w przypadku linii nieubarwionej 1-3 dni. W przypadku linii ubarwionej był to wyraźnie ograniczony, ciemnobrunatny, okrągły lub owalny guzek, natomiast w przypadku linii nieubarwionej na powierzchni tęczęwki pojawił się kożuchowaty białoszary rozrost. Wszczepy przyjmowały się w 68% oczu po wprowadzeniu skrawków nieubarwionych i w 70% po wprowadzeniu skrawków ubarwionych. Kinetykę wzrostu guzów obu linii przedstawia tabela I i ryc. 2. Na ryc. 3 przedstawiono guz linii ubarwionej rosnący w przedniej komorze oka chomika.

Badania histologiczne potwierdziły wzrost czerniaka w tęczęwce we wszystkich przypadkach. Ryc. 4. przedstawia nacieki nowotworu linii ubarwionej w obręb prawidłowych tkanek oka. Stwierdzono, że czerniak w większości swego utkania zbudowany jest z komórek nabłonkowo-podobnych, zawierających liczne ziarna barwnika. Niewielką komponentę stanowią komórki wrzecionowate, w obrębie których stwierdza się skąpą ilość melaniny.

Z Katedry i Kliniki Okulistyki Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Kierownik: prof. dr hab. Helena Żygulska-Mach

Z Zakładu Patomorfologii Klinicznej i Doświadczalnej¹ Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Kierownik: prof. dr hab. Jerzy Stachura

Z Pracowni Radiospektroskopii i Radiobiologii Nowotworów Instytutu Biologii Molekularnej² Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Kierownik: prof. dr hab. Stanisław Łukiewicz

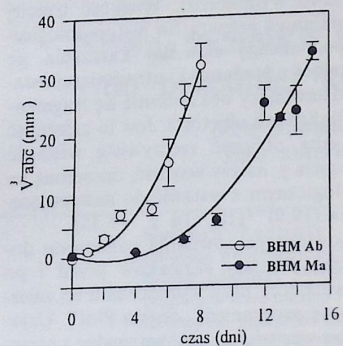
Reprint requests to:

Dr med. Bożena Romanowska

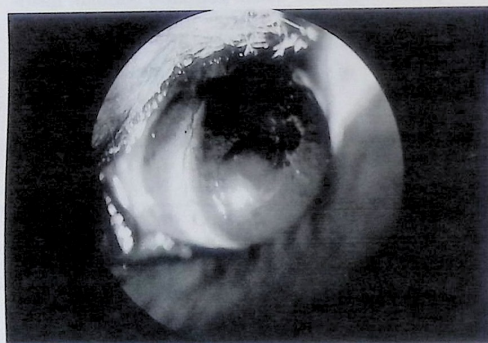
ul. Sienkiewicza 10 m. 8, 30-033 Kraków

Tabela I
Kinetyka wzrostu ubarwionej (BHM Ma) i nieubarwionej (BHM Ab) linii czerniaka Bomirskiego w przedniej komorze oka chomika

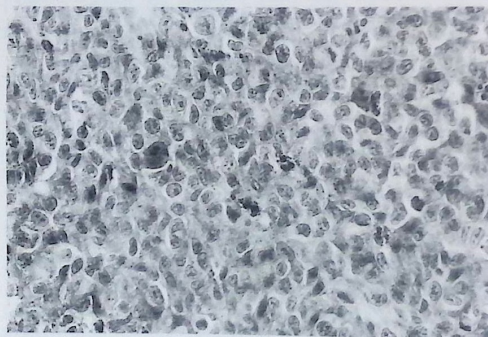
Dni	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13
Ma	0.041 ± 0.005	0.79			0.79 ± 0.12			2.78 ± 0.45		3.14 ± 0.29		25.00 ± 0.54	22.50 ± 4.04
Ab	0.048 ± 0.01	2.35 ± 0.41	3.18 ± 0.60	7.15 ± 0.92		7.60 ± 1.04	15.6 ± 3.86	25.7 ± 2.86	31.66 ± 3.64		30.45		



Ryc. 2. Kinetyka wzrostu guzów linii ubarwionej BHM Ma i nieubarwionej BHM Ab, rosnących w przedniej komorze oka chomika syryjskiego



Ryc. 3. Guz ubarwionej linii czerniaka Bomirskiego rosnący w przedniej komorze oka chomika syryjskiego



Ryc. 4. Naciek ubarwionej linii czerniaka w obręb prawidłowych tkanek oka chomika

Omówienie

Podawanie zawiesiny komórek czerniaka Bomirskiego w roztworze soli fizjologicznej do przedniej komory oka okazało się nieskuteczną metodą wszczepiania guza u chomików. Niski odsetek przyjęcia się wszczepów (15%) spowodowany był prawdopodobnie uszkodzeniem komórek podczas przygotowywania zawiesiny i mniejszą ich żywotnością. Aby nie powiększyć zbyt raptownie ciśnienia w gałce ocznej, posłużono się pompą perystaltyczną, podającą płyn w tempie zbliżonym do jego fizjologicznego wchłaniania. Zaletą tego sposobu była dokładna znajomość liczby komórek w jednostce objętości wstrzykiwanej zawiesiny. Niestety jednak nie zawsze udawało się uniknąć wypadnięcia tętnicy wraz z wypływem nadmiaru płynu. Ponadto ilość materiału nowotworowego wprowadzonego na tej drodze okazała się zbyt skąpa dla rozwoju guza w gałce ocznej. Natomiast w przypadkach wszczepiania do przedniej komory oka skrawków tkanki nowotworowej proporcje między łączną objętością wprowadzanego do oka materiału a ilością ośrodka, w którym były zawieszane skrawki przesunęły się wyraźnie na korzyść wprowadzanych skrawków.

Porównując kinetykę wzrostu obu linii czerniaka Bomirskiego, wszczepianych do przedniej komory oka chomika z kinetyką wzrostu tego samego nowotworu, obliczoną dla guzów implantowanych w skórze^{1,5,6}, zaobserwowano, iż w obydwu przypadkach tempo wzrostu ubarwionej linii jest niższe od tempa wzrostu linii nieubarwionej, odpowiednio 2-krotnie w przypadku skóry i 1,18-krotnie w przypadku oka.

Następstwem większej prędkości wzrostu guzów nieubarwionych, wyraźnie widocznej na ryc. 1, był krótszy czas wypełniania wnętrza całej przedniej komory oka tkanką nowotworową. W opisanych doświadczeniach wynosił on 10 dni dla guzów nieubarwionych i 14 dni dla ubarwionych.

Na uwagę zasługuje również fakt, iż przednia komora oka należy do tzw. „obszarów immunologicznie uprzywilejowanych”, leżących poza zasięgiem komórkowej obrony nowotworowej organizmu⁷. Zjawisko to było zapewne korzystne z punktu widzenia rozwoju wszczepów czerniaka umieszczonych w tym rejonie i być może przyczyniło się do powodzenia naszych doświadczeń.

Podsumowanie

Opisana technika mikrochirurgiczna okazała się efektywna, zapewniając przyjmowanie się wszczepów u 70% zwierząt. Dzięki możliwości wprowadzania

skrawka tkanki nowotworu w dowolny obszar przedniej komory uzyskaliśmy wzrost guzka tętnicy w wybranym miejscu. Ułatwia to ocenę jego zachowania się w trakcie leczenia oraz decyzję o momencie wyłuszczenia oka. Główną zaletą opisanego metody było zastąpienie modelu opartego na ksenotransplantacji (chomik/królik) modelem transplantacji allogenicznej. Ponadto zaistniała możliwość prowadzenia doświadczeń na ubarwionych czerniakach, które wyraźnie różnią się promienioopornością od nieubarwionych.

Piśmiennictwo

1. Bomirski A., Slonimski A., Bigda J.: The natural history of a family of transplantable melanomas in hamsters, *Cancer Metastasis Rev.* 7: 95-118 (1988).
2. Dux K.: Wstęp do bilogii nowotworów. 357-405, (PWN, Warszawa 1973).
3. Gibson

S. L., VanDerMeid K. R., Murant R. S., Raubertas R. f., Hilf R.: Effects of Various Photoradiation regimens on the Antitumor Efficacy of Photodynamic Therapy for R3230AC Mammary Carcinomas. *Cancer Res.* 50: 7236-7241 (1990).

— 4. Lambrou F. H., Chilbert M., Mieler W. F., Williams G. A., Olsen K.: New Technique For Subchoroidal Implantation of Experimental Malignant Melanoma, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29: 995-998 (1988).

— 5. Lukiewicz S.: Interference with endogenous radioprotectors as a method of radiosensitization, *Modification of Radiosensitivity of Biological Systems*, Int. Atomic Energy Agency: 61-76, Vienna (1976).

— 6. Lukiewicz S., Pitas B., Nowiska J.: Molecular and cellular basis of different radiosensitivity in pigmented and nonpigmented hamster melanoma cells, *Yale Journ. Biol. Med.* 53: 391-392 (1980).

— 7. Sorensen F. B., Gamel J. W., Jensen O. A., Ladekarl M., McCurdy J.: Prognostic value of nucleolar size and size pleomorphism in choroidal melanomas. *APMIS* 101: 358-368 (1993).

— 8. Streilein J. W.: Immunoregulatory mechanism of the eye. *Journ. Immunol.* 39: 185-200 (1992).

Praca wpłynęła: 31.05.1995 (328)

Komunikat

Zarząd Sekcji Wszczepów Wewnętrzząłkowych i Chirurgii Refrakcyjnej PTO prosi członków o uiszczenie składek za rok 1994 i 1995. Wpłaty prosimy kierować na konto Sekcji —

Górnośląski Bank Gospodarczy SA nr 632315-4662-139-312

Skarbnik
Sekcji Wszczepów Wewnętrzząłkowych
i Chirurgii Refrakcyjnej PTO

Dr n. med. Renata Wojciechowska