

KANSER ARAŞTIRMALARI VE DENEYSEL MODELLER

Ümit ZEYBEK, İ.Ü. DETAE MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

ÖZET

Kanser alanında uygulanan tedaviler ya bir önceki dönemin öğretisi ve tekniklerini kullanarak veya sistemli ilaç uygulamaları ile günümüze kadar gelişme kaydetmiştir. Yalnız hangi metod kullanılırsa kullanılsın ilaç geliştirme araştırmalarında hayvan modellerinden yararlanmak bir yerde zorunluluk göstermektedir. Zira son yıllarda ön plana çıkan hücre kültürü veya moleküler biyoloji tekniklerine rağmen, uygulanan ajanlara karşı metabolizma cevabında yaşanan eksiklikler, hayvan modellerinin kullanımından vazgeçilmesine engel olmaktadır.

Deneysel kanser araştırmalarının yapıldığı üç yüzyıllık dönem içinde özellikle kimyasal karsinojenler ile spontan veya transplante edilebilen tümörlerin kullanılması ön plana çıkmaktadır. Zira bu modeller her araştırma biriminde kolaylıkla üretilebilen, özellikleri iyi tanımlanmış, saklanabilen, uygulanması da diğer modellere nazaran daha kolay olan yöntemleri içermektedir. Son 35 senede ise önceleri xenograft çalışmaları (1969), sonraları ise transgenik (1984) hayvan üretimlerinde hızlı gelişmeler kaydedilmiş ve bilimsel amaçlı bu üretim alanı, bir ticaret sektörü haline almaya başlamıştır.

Makalemizde hayvan modellerinin her sınıfına ait tanımlamalar yaparak uygulama özellikleri hakkında bilgiler vermeye çalışacağız.

ABSTRACT

The treatments that has been used for cancer untill present day has been developed systematically by using the education and techniques of previous era. It is a fact that using animal model on drug development research is necessary in all methods that is used to. The reason of using animal models are, although the new cell culture and molecular biology techniques, the responce deficiencies of metabolism in case of applied agents are cause of cessation of the using animal models.

In the period of three centuries of experimental cancer research done specially used tumours are the ones that come to fore spontaneous or transplated tumours with chemical carcinogens. The main reason of using such models are they can easily produced in research unit, well-defined features, stored, includes methods that are easier to implement than the other models. In the last 35 years, has been recorded rapid advances in animal produces, firstly xenograft studies(1969) and later the transgenic(1984) animal models and this production area for scientific purposes has been started to become a trade sector.

In these atricle we will try to give information about the properties of application aby the deffinitions for each category of animal models.

2.1. Kimyasal veya Fiziksel Karsinojenler ile Oluşturulan Modeller:

Çeşitli kimyasal ajanları, deney hayvanlarına değişik yollarla vererek (intraperitoneal, intravenöz, subkutan ...), birbirinden farklı özellikte tümör modelleri oluşturulabilmektedir.

Ancak burada kullanılacak karsinojenlerin uygun şartlarda saklanarak hem araştırmacıya hem de çevresindeki diğer kişilere zarar vermesini önlemek önemlidir. Diğer yandan hazırlanmış şekilleri, uygulama yolları, uygulama sonrası karsinojenin etki mekanizması iyi belirlenerek en verimli çalışma modeli ortaya konmalıdır.

2.1.1. P388 Leukemia;

3-methylcholanthrene (20mg/kg), intraperitoneal yolla DBA/2 soyu farelere uygulanarak lenfositik lösemi modeli oluşturulmaktadır. İlk defa 1955 yılında denenmiştir. Özellikle bitkisel kaynaklı olmak üzere, antikarsinojenik ajanlara karşı çok duyarlıdır. 1970 yılı ortalarına kadar 400 binin üzerinde bileşik P388 Leukemia modeli (L1210 Leukemia modeli ile birlikte) kullanılarak test edilmiştir.

Bununla birlikte NCI çalışmalarında uygulanan iki kademeli deneylerin 1. kademesinde ki P388 Leukemia modeline karşı ilaç cevaplarından alınan sonuca göre 2. kademeye geçilmektedir. Burada T/C % olarak ifade edilen değer > 120 olması 2. aşama deneylere geçişi sağlamaktadır. T değeri deney grubu tümör ağırlığını, C değeri ise kontrol grubu tümör ağırlığını göstermektedir. P388 modelinde denenilen ajanlar 2. kademe diğer (B16, L1210 ...) modellerde tekrar test edilmektedir. Hemen hemen her yıl 15.000 bileşiğe öncelikle P388 Leukemia testi yapılmakta ve bunun içinden 500 ile 1000 kadarı ikinci aşamaya geçmektedir.

Diğer yandan DBA/2 farelerde oluşturulan P388 leukemia tümörü, 0.1 ml. süspansiyonda 1×10^6 hücre olacak şekilde, intraperitoneal yolla, özellikle CD2F1 farelere verilerek, pasajı yapılabilmektedir.

2.1.2. L1210 Leukemia;

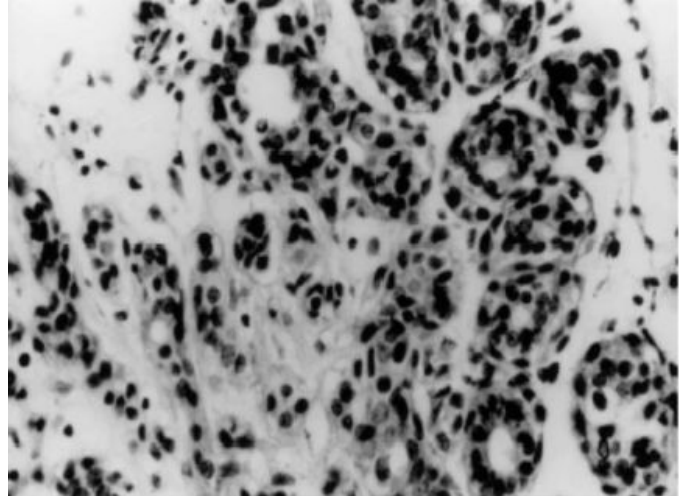
3-methylclonathrene (20mg/kg), etil eter içinde intraperitoneal yolla DBA/2 soyu farelere verilirse, lenfoid lösemi oluşur. 1948 yılından beri kullanılmaktadır. Tümörün tutma ve gelişme potansiyeli çok yüksektir. Hızlı büyüyen lösemik hücreler gözlenir. Lösemi ve lenfomaya yönelik tedavi çalışmalarında ve hızlı büyüyen lösemik hücrelerin gözlenip patolojisinin incelenmesinde uzun yıllardır kullanılmaktadır.

Ayrıca P388 Leukemia modelinde olduğu gibi intraperitoneal yolla, CD2F1 farelere verilerek, pasajı yapılabilmektedir. Ancak 0.1 ml. süspansiyonda 1×10^5 hücre olmalıdır.

2.1.3. DMBA ile İndüklenmiş Meme Tümörü;

Polisiklik hidrokarbonlardan olan 7,12-

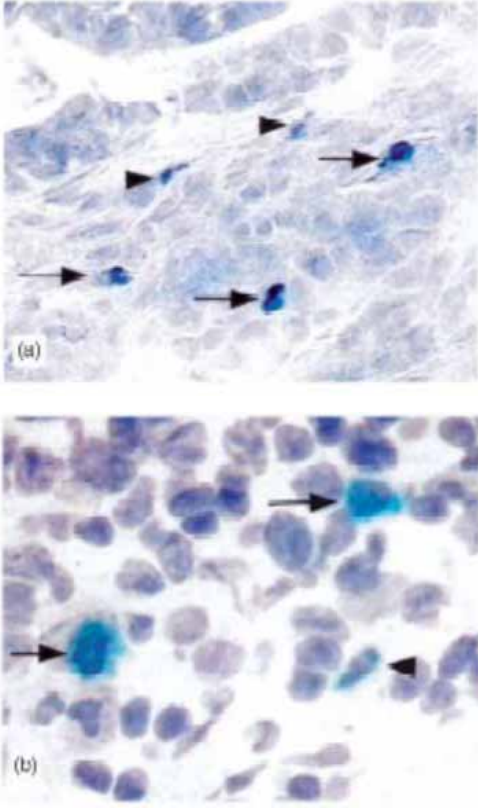
dimethylbanz(a)anthracene(DMBA) kullanılarak, özellikle Sprague Dawley soyu sıçanlarda tek doz uygulama ile meme bezine spesifik tümörler oluşturulmaktadır. Hayvan başına 12-20 mg arası DMBA denk gelecek şekilde, 1ml. susam yağı içinde çözülerek, gavaj yoluyla 8-10 haftalık dişi sıçanlara verilmektedir. 3 ile 4 aylık zaman içinde meme tümörü gelişmektedir. DMBA doza göre en iyi tutma gösteren ve hiç sistemik toksisiteye yol açmayan bir model ortaya koyma özelliğindedir. Reprodüktiftir. DMBA, tümör oluşturmak için metabolik aktivasyona gereksinim duyar. Antikarsinojenik ajanların etkilerini değerlendirmede, tümörün başlangıç ve ilerleme dönemlerindeki metabolizma ve aktivasyonunu gözlemede kullanışlı bir modeldir. Ancak DMBA uygulaması ile oluşan modelin %60'ı adenokarsinom, % 40'ı ise selim fibroadenomdur. Bu yüzden hangi kanser tipinin geliştiğini belirlemek için histopatolojik inceleme yapılması yerinde olur. (Şekil.1 ve 2)



Şekil.1. Sprague Dawley soyu sıçanda DMBA ile DMBA oluşturulmuş meme tümörünün histolojisi



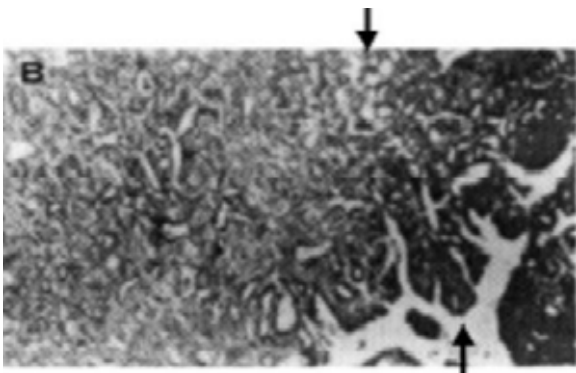
Şekil.2. Sprague Dawley soyu sıçanda ile oluşturulmuş meme tümörü modeli



Şekil.3. SA-β-Gal Pozitif Boyanan MNU ile İndüklenmiş Meme Tümörü Hücreleri (Mavi renkte)

2.1.5. DMH (1.2 Dimethylhydrazine) ile İndüklenmiş Kolon Kanseri;

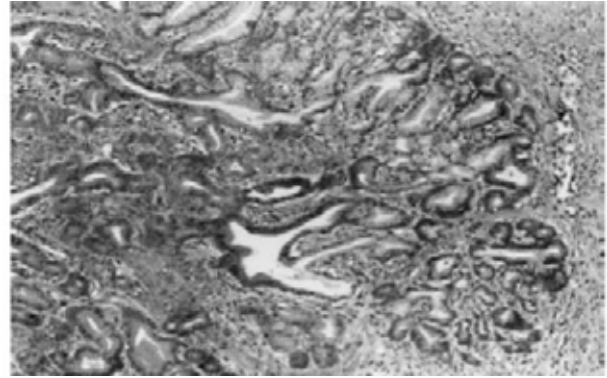
DMH çevreyi kirleten toksik bir kimyasaldır ve kolona özel bir karsinojendir. 8 haftalık sıçanlara, 1'er hafta aryla olmak üzere 15 hafta süresince 1mM EDTA içinde 20 mg/kg DMH, kasık bölgesine subkutan enjeksiyon ile verildiğinde, insan kolon kanserine yakın özelliklere sahip bir kolon kanseri modeli oluşturulmaktadır. 32. hafta sonunda yapılan histopatolojik incelemelerde adenokarsinom yapısı belirlenmektedir. Displazi, hücresel pleomorfizm ve karsinomatoz bezler göze çarpar. (Şekil.4.) Sıçanların doku kolesterol seviyelerinde ve fosfolipaz aktivitelerinde anlamlı derecede artışlar olur.



Şekil.4. DMH ile İndüklenmiş Kolon adenokarsinomunda papiller bölge ve displastik alanın histolojik görünümü

2.1.6. MX Furanone(3-chloro-4-(dichloromethyl) 19-5-hydroxy-2 (5H)-furanone) ile İndüklenmiş Mide Kanseri;

6 haftalık sıçanlara öncelikle 100 ppm N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) intraperitoneal yolla enjekte edildikten sonra, MX Furanone 30 ppm dozunda içme suyuna katılarak hayvanlara verilmektedir. 57 haftalık uygulama sonrası glandüler midede, adenokarsinom tipi, kanser modeli ortaya çıkmaktadır. Pilor bölgesinde atipik hiperplaziler, gastrik mukoza epitelinde hücre proliferasyonunda artış görülmektedir. (Şekil.5.)



Şekil.5. Glandüler Midede MNNG+MX Furanone ile İndüklenmiş Adenokarsinom

2.2. Spontan veya Transplante Edilebilen Tümör Modelleri:

Bu grup içinde bulunan transplante edilebilen tümör modelleri spontan oluşan tümörlerden elde edilen süspansiyonlardan türetilmektedir. Spontan tümörler genelde idiyopatiktir. Geç dönemde ölçülebilir duruma gelirler. İnsan kanser tiplerine kinetik özellik açısından benzerlik gösterirler. Ayrıca karsinogenezin biyolojisinin anlaşılmasında, kemopreventif ve kemosüpresif ilaçların geliştirilmesinde önemli rol oynayan modellerdir.

Solid tümörler, subkutan, intradermal, intramuskuler, intraperitoneal veya intravenöz yolla hücre süspansiyonlarının inokulasyonu sonucunda transplante edilirler. Transplante edilen tümörler, kökenlendikleri spontan tümörlere erken oluşum fazları açısından oldukça benzerlik gösterirler. İyi karakterize edilmiş ve üretilebilir özelliktedirler ve ilaç takip çalışmalarında tercih edilmektedirler.

Diğer yandan transplante edilen tümör hücreleri kendilerine özgü histokompatibilite antijenlerine sahiptir. Bu antijenlere Tümöre Spesifik Transplantasyon Antijenleri (TSTA) veya Tumor Associated Transplantation Antigens (TATA) adı verilmektedir. TSTA'ların yüksek immünite meydana getirme kapasiteleri vardır. Spontan veya transplante edilebilen tümörlerin çoğunluğunda TSTA bulunmaktadır.

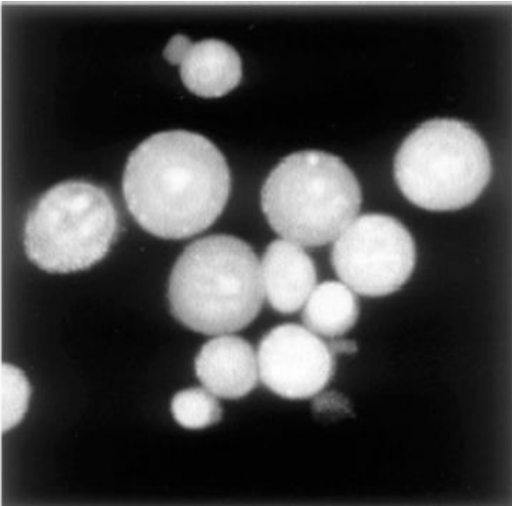
2.2.1. Ehrlich-Lette Asit Tümörü ;

Solid Formu: Ehrlich ve Apolant tarafından 1907 yılında bir farenin meme bezinden çıkarılmış olan Ehrlich Mouse Carcinoma'dan türetilmiştir. Farelere özgü olan (Mouse Spesifik Tumor) ve günümüze kadar diferansiye olmadan gelmiş, yaygın olarak kullanılan bir tümör modelidir. %100'e yakın transpante edilebilme oranına sahiptir. Tümöre Spesifik Transplantasyon Antijenleri (TSTA) yoktur. Hiç regresyon göstermez. Virulan özelliğindedir. Malign ve %100 ölüme götürür. Hızlı büyüme özelliği ortaya koyar. Tümör hücreleri eşit büyüklükte değildir ve 20-30 mikron çapındadır.

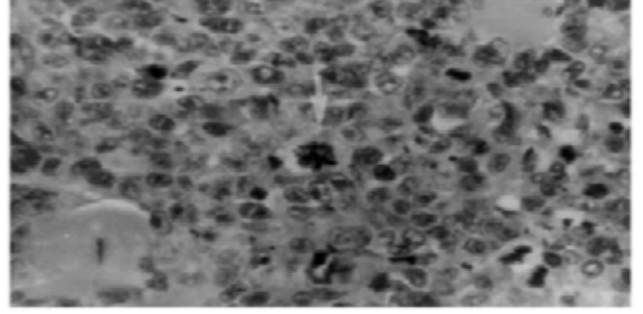
Solid form elde etmek için subkutan olarak tümör hücre süspansiyonunu uygulamak gerekir. 1×10^6 /ml.'lik hücre süspansiyonu deri altına enjekte edildiğinde, 1 haftalık bir süre sonunda ölçülebilecek düzeyde solid tümör saptanabilir. Hiçbir tedavi yapılmazsa 35-40 gün içinde farelerde ölüm gözlenir.

Asit (Sıvı) Formu : Loewenthal ve Jahn 1930'lu yıllarda bu tümörün asit şeklini elde etmişlerdir. İntraperitoneal yolla minimum 500.000/ml. hücre farelere verildiğinde asit formda tümörün oluştuğu gözlenmektedir. Ayrıca çalışma harici, tümörü bu yolla pasajlayarak, devamını sağlamak mümkündür. Tümör pasajlandıkça virulansı artar. Metastatik özelliğe sahiptir. Tedavi uygulanmadığında tümör enjeksiyonundan 7,8 gün sonra ölümler görülmeye başlanır. Eğer ortalama 2×10^6 /ml hücre enjekte edilirse yaklaşık 1 haftada 1 cm çapında tümör oluşur.

Ehrlich Asit Tümörü, heterotransplantabilite yeteneğine sahiptir. Yayma preparatlarda asit forma ait hücrelerin solid form hücrelerine benzediği görülmektedir. Ancak solid formun hücrelerinin membranlarını farkedilemezken, asit formda membran açıkça gözlenir. Viseral ve parietal periton tabakaları kalınlaşıp granüllü bir hal almışlardır.(Şekil 6 ve 7)



Şekil.6. Ehrlich Asit Tümör Hücrelerinin Floresans Mikroskop Altında Görünümleri. (Acridine orange ethidium/ bromide boyama)



Şekil.7. Ehrlich Asit Tümör Hücrelerinin Elektron Mikroskop Altında Görünümleri.

2.2.2. Transplante Edilebilen Wilm's Renal Tümörü;

İlk defa Charles River Laboratuvarlarında üretilen Wistar albino soyu bir dişi sıçanda spontan olarak gözlenmiştir. Yenidoğan veya 2-14 gün arasındaki yavrulara, 0.2 ml. sıvı içinde ortalama 10×10^6 /ml hücre intraperitoneal veya subkutan yolla verilir. Tümörün tutma oranı %50-60 civarındadır. İki haftadan büyük olan sıçanlarda tutma oranı oldukça düşer. 10 milyon hücreden az verilirse başarı yüzdesi azalır.

Diğer yandan Wilm's Renal Tümörü, intra-abdominal bölgeyi sarar ve özellikle böbreklere etki ederek yapısını değiştirir. Diğer abdominal organlara sıçramaz, metastaz yapmaz. Tümör, inokulasyondan sonraki 2-3 hafta içinde genelde palpe edilebilir ve 2-6 hafta arası bir dönemde ise tümürlü hayvanlar her an ölebilirler.

Bununla birlikte intraperitoneal uygulamada tümör daha kısa zamanda farkedilir ve hayvanların ölümleri daha kısa zamanda gerçekleşir. Hızlı büyüyen ve uniform yapıda bir tümördür. Histolojik incelemede, az veya spontan olmayan kanlanma farkedilmektedir. Bazı bölgelerde ise sıvı nekrotik durum göze çarpmaktadır. Tubular formasyonlar ile glomerulusa benzer yapıların sık aralıklarla dağılmış olduğu görülmektedir. Mitoz nadiren gözükmektedir.

2.2.3. Lewis Lung Carcinoma;

İlk defa 1951 yılında C57BL/6 soyu bir farenin akciğerinde spontan olarak bulunmuştur. İki ayrı enjeksiyon yoluyla farelere uygulanabilmektedir;

a) En çok tercih edilen metotta 1×10^6 /0,2 ml doz kuyruk veninden intravenöz yolla uygulanır. 5. güne doğru tümör oluşumu şekillenir. Fareler tedavi edilmezler ise ortalama sağ kalımları süreleri 20-25 gündür.

b) Lewis Lung Carcinoma'yı yine 1×10^6 / 0,2 ml dozda bu sefer sırt bölgesine uygulayarak solid form elde edilir. Bu modelde hayvanların sağ kalım süreleri 19 ile 36 gün arasında gerçekleşir.

2.3. Tümör Xenograftı Modeli:

İlk dönemlerde timektomi, steroidler ve radyasyon içermeyen işinlar ile immün sistemi hasara uğratılmış farelerde insan tümör xenograftı çalışılmıştır.

Ancak ilk nude farenin, 1969'da Glasgow Ruchill hastanesi virus laboratuvarında albino fare üretim bölümünde, spontan olarak ortaya çıkmasıyla, xenograft araştırmaları için çok uygun bir model kanser çalışmalarında yerini almıştır.



Isaacson ve Catanach'ın isim babaları olduğu (tüysüz fare) nude farelere ilk xenograft, 1969'da insan kolon karsinoması ile Rygaard ve Poulsen tarafından uygulanmıştır.

Yine aynı yıl içinde Partelouis, ilk kez nude farelerde timus bezi olmadığını belirledi. Daha sonra Flanagan, nude farelerde immün eksikliğe neden olan genetik komponenti tanımlayarak, bir otozomal resesif mutant genin 11. kromozomda olduğunu bulmuştur, (nu) .

Tüysüzlüğün de sorumlusu olan bu genetik defekte paralel, büyüme geriliği, düşük fertilitte, kısa ömür (doğum sonrası 25 hafta içinde % 100 ölüm, 2 hafta içinde ise % 45 mortalite) gibi özellikler tespit edilmiştir. Bu farelerde, bir homozigot mutasyon nu/nu söz konusudur İmmunolojik açıdan bakıldığında, nu/nu atimik fareler, heterozigot anneden plasental geçişle kalıntı şeklinde bulunan çok az miktarda T hücrelerine sahiptirler ancak bu T hücreleri nakillerde red etkisi gösteremeyecek düzeydedir. Diğer taraftan B hücre fonksiyonlarını korurlar ve NK hücrelerinin yüksek aktivitesini sergilerler.

Bu özelliklerinden dolayı doku nakil çalışmaları ile insan tümör xenograft modellerinin de içinde olduğu biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılırlar.

Nude farelere veya benzer immunogenetik yapıya sahip diğer laboratuvar hayvanı soylarına (SCID fare gibi) subkutan, intravenöz, intraperitoneal, intrakraniyal, intrasplenik, renal subkapsuler yollarla veya bölgeye özel organ inokulasyonu şeklinde bir ortotopik model kullanarak tümör hücre nakli yapılır. Her uygulama bölgesinin kendine göre avantaj ve dezavantajları söz konusudur.

Subkutan implantasyon, insan tümörünün nude fareye naklinde öncelikle tercih edilmektedir. Zira hem basit hemde tümörün verilmiş yolu kolaydır. NCI'ın ilaç araştırma ve geliştirme

programlarında in vivo testlerde kullanılmaktadır. Bu yolla yapılan uygulamada farenin yan tarafına subkutan enjeksiyon yapılmaktadır. Kullanılan hücre soyunun klonogenik ve büyüme özelliklerine göre tümörün tutması birkaçgün ile birkaç ay sürebilmektedir. Örneğin insan kolon kanseri ile melanom uzun zaman gerektirir. Beyin tümörlerinin oluşmasını sağlamak ise oldukça güçtür.

Bunun yanında subkutan xenograftların metastazı seyrek ve nadiren komşu dokulara sıçrarlar. Bu durum bir ölçüde NK (natural killer) hücreleri gibi bazı konak savunma sistemlerinin engellenmesinden kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı nude farelerde ilaç etkinliğini değerlendirirken hayvanın sağ kalım süresini baz almak yerine tümörün büyüme zamanı veya klonogenik içerikli analizleri kullanmak yerinde olur. Diğer taraftan metastazın şansını arttırmak için önceden siklofosamid, β -estradiol veya diğer ajanlarla NK hücrelerinin etkinliği azaltılabilir.

İnsan tümör hücrelerinin nude farelere pasajı veya naklinden sonra tümör hücreleri kinetik değişikliklere uğrar. Çoğu zaman izole edildiği orjinal tümöre göre transplante edilen tümörler daha kısa zamanda büyürler. Nakledilen tümör daha iyi kanlanma gösterir ve düşük nekrozlanma olur. Aynı zamanda heterojen özellikteki hayvanlara ait parakrin büyüme faktörlerinin salgılanması sonucunda tümör boyutları etkilenir. İnvaze olma potansiyellerinin kinetik özelliklerindeki değişikliklere rağmen, xenograftlanmış insan tümörleri orjinal biyokimyasal ve morfolojik özelliklerini korurlar. (İnvazive potensiyel kinetiks) Bundan dolayı xenograft tümörlerin kemosenitiviteleri kökenlendikleri kanser tipine benzerlik gösterirler.

Ayrıca antikarsinogenik ilaçlarla tedavi edilen nude farelerdeki insan tümörlerinin büyük kısmında görülen geç büyüme, daha sonra yapılan klinik çalışmalara karşı cevapla paralellik göstermektedir. Bu yakın sonuçlar küçük hücreli akciğer kanseri, kolon kanseri, meme kanseri, malign melanom xenograftlarında gösterilmiştir. (Şekil.8.)



Şekil. 8. Tümör transplante edilmiş Nude fare

2.3.1. Ortotopik Xenograft Model:

Bu modelde tümör hücreleri orjin organın bir bölgesine nakledilir. Bu organa spesifik alan tümör hücrelerinin büyüme ve gelişmesi için optimal bir çevredir. Pahalı ve alışılmamış olan bu model akciğer kanseri gibi durumlarda, organ bölgesine spesifik sitotoksik ajanların etkilerini in vivo değerlendirmede kullanılmaktadır. Şu anda nude farelerle yapılan renal hücrekarsinomu, pankreatik karsinom, beyin tümörleri, prostat, kolon ve akciğer kanserleri potansiyel ortotopik model kullanım alanlarıdır.

Diğer yandan NCI tarafından akciğer tümör modelinde ortotopik uygulamalar ön plana çıkmaktadır.

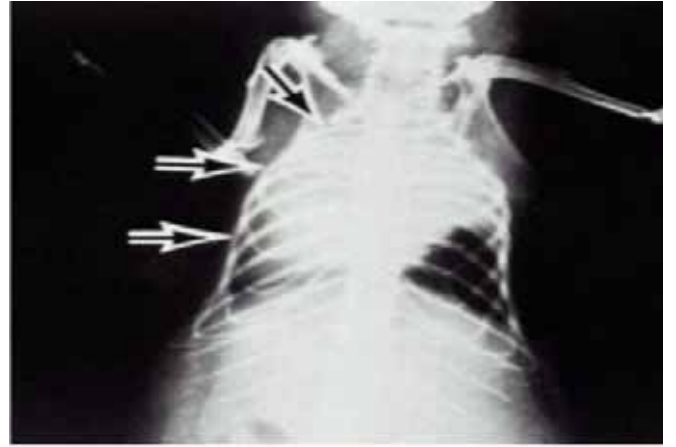
Akciğer kanserinde, süspanse haldeki tümör hücreleri anestezi altındaki hayvanın sağ akciğerinin sağ bronş sapına doğrudan inokule edilir. (intrabronşiyal uygulama) Tümör cevabı hayvan sakrifiye edilerek değerlendirilebilir. Tümör büyümesine histolojik inceleme yapılır veya akciğer grafisi ile yayılmamış tümörün durumu görüntülenebilir. (Şekil 9 ve 10)

Bir diğer akciğer tümör ortotopik modeli, doğrudan perkutan intratorasik implantasyondur. Pleural alan, karın duvarı çevresi veya akciğer parenkimasının dışına implante edilen süspanسیونun % 30'unun kaçabilme ihtimali bu modelin dezavantajıdır. İntratorasik implantasyona göre intrabronşiyal uygulamada, tümöre bağlı ölüm oranı daha yüksektir.

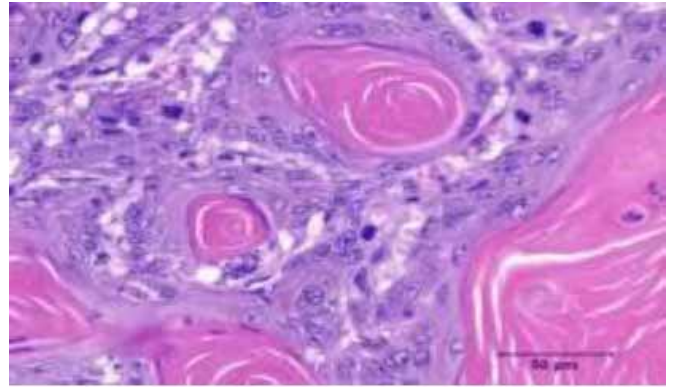
Şekil.9. Atimik Farede Akciğer Karsinomanın Görüntülenmesi



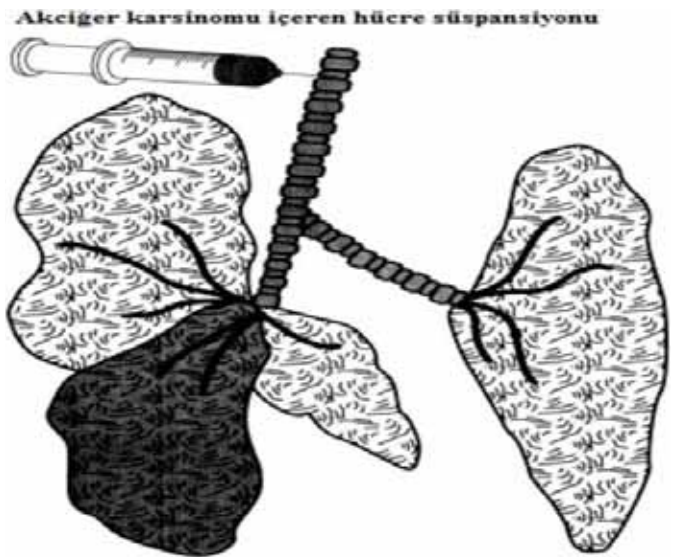
Normal atimik farenin akciğer grafisi



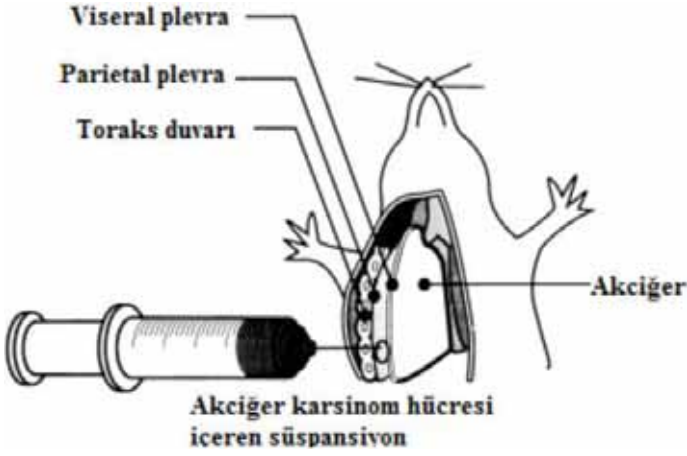
İnsan akciğer kanser hücresinin intrabronşiyal inokulasyonu ile elde edilen sağ akciğerde ki karsinomanın grafisi



Şekil.10. Fare akciğerinde keratinize skuamoz karsinomanın histolojik görünümü



Şekil.11. Akciğer Karsinomalı Hücre Süspanسیونunun Enjeksiyonu (Orthotopic Xenograft Model)



Şekil.12. Perkutan yolla intratorasik implantasyon (Orthotopic Xenograft Model-2)

2.4. Transgenik, Knockout veya Kimerik Modeller:

Transgenik hayvan, yabancı bir gen enjekte edilmiş fertilize bir yumurtanın pronukleusundan elde edilen progen sonucunda ortaya çıkarılır. Genler pronukleusa mikroenjeksiyon, retroviral uygulama veya embriyonal kök hücre transferi ile aktarılır. (Şekil 13 ve 14)

Transgenik hayvanlar, bilinen bir genin düzensiz çalışmasından doğan onkogenik fenotip araştırmalarında harika modellerdir. Spesifik gen defekti ile kanser gelişimine yatkın hale getirilen transgenik fareler karsinogenez gelişimi takip edilir. Örnek olarak nörofibromatozis ile ilgili NF-1 geni, c-fos, N-myc gibi onkogenler verilebilir.

Onkogen eksprese eden transgenik hayvanlar, bilinen bir kademenin defektinin sonucunda spontan tümör gelişimi ile ilgili olarak spesifik moleküler kademenin doğrudan ilaçla hedef tedavisini test etme açısından çok iyi bir modeldir. Örneğin ras inaktivasyonu meme kanserinin de içinde olduğu bir çok kanser patogenezinde temel rol oynar. Ras mutasyonlu transgenik fare (meme tümörü gelişen) de, meme kanserine özel aktivitesi olan yeni kemoterapötik ajanların etkinliği gösterilebilir. Ayrıca bu modellerle yeni ilaçların ras oluşum kademelerindeki meme ve lenfoid malignitelerine yol açan farnesil transferaz inhibitörlerine karşı direkt etkisi araştırılabilir.

Diğer yandan multipl ilaç direnç geni (mdr) transfekte edilerek,

doğal ürün sınıfındaki önemli ilaçların direnç durumlarına değişik açıklamalar getirilebilir. Çünkü transgenik farelerin normal hücreleri, toksisite dışında, doğal kaynaklı ürün grubunda bulunan antikanser ilaçların letal dozunu tolere edebilmektedir. Böylesi modeller kanser ilacı geliştirmede birincil rol oynar.

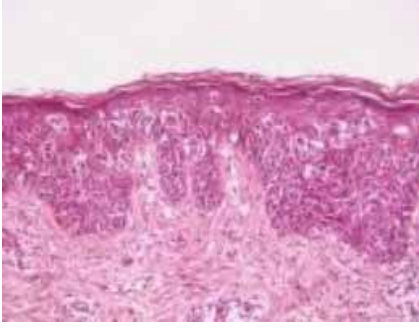
Transgenik teknoloji ayrıca karsinogenez alanında da uygulanmaktadır. Spesifik gen defektli hayvan kanser gelişimine yatkın hale getirilerek karsinogenezin izlemesinde uygun bir model elde edilmektedir. Örneğin MT-mER fareleri ostrojen eksprese eder ve dietilsbestiol (DES)'e maruz kalan yabancı tip farelerden sonra en yüksek uterin adenokarsinom insidansına sahiptir.

Bir diğer model olan *MMTV-Ha-ras transgenik fare modeli*, beslenme tarzı ile karsinogenez ilişkisi (yağ veya diğer besin maddelerinin meme tümörigenezine etkisi) çalışmalarında kullanılmaktadır. MMTV/ v-Ha-ras meme karsinoma modelinde FVB / N soyu fare kullanılır.

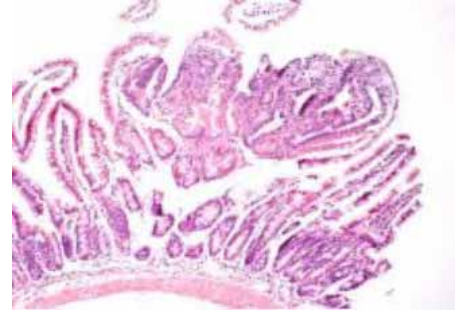
Transgeni viral Harvey ras onkogeni, promotörü fare meme tümör virüsüdür. Parotid başta olmak üzere tükürük bezleri ve meme de adenokarsinom oluşur. Özellikle 3 ile 6 ay arası dönemde dişilerde spontan meme tümörü gelişir. Bununla birlikte aynı sürelerde hem dişi hem de erkek farelerde Parotid tümörü görülür. Yine FVB/N soyu fare kullanılan MMTV/c-myc meme karsinoma modelinin ise transgeni fare c-myc onkogeni, promotörü fare meme tümör virüsüdür. Meme adenokarsinomu görülür ve tümör sadece dişilerde 3 ay sonra etkisini göstermeye başlar.

Ayrıca intestinal sistem tümör modeli özelliğindeki Apc Min/+ transgeniklerde ise hem meme hem de intestinal sistem tümörlerine yatkınlık söz konusudur. Bununla birlikte C57BR/cdJ X C57BR/6J fareler, meme skuamöz hücre karsinomunun gelişimine, C57BR/6J farelerden ve C57BR/6J ile FVB/Ntac hibridlerinden daha iyi cevap verir.

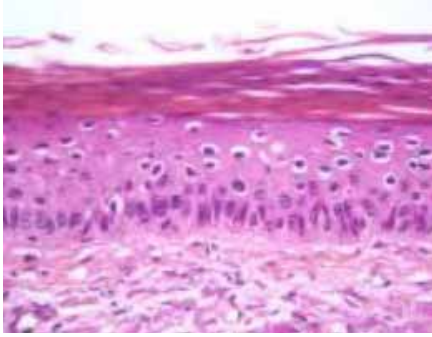
Diğer taraftan melanosit spesifik tirozinaz promotörünün kontrolü altında olan, SV40 bölgesi ile aktive olan H-ras alellerini içeren bir transgenin ekspresyonu sonucunda elde edilen fare melanom modeli ile çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Melanom modeli oluşturulan farelerin histolojisine bakıldığında ise insan melanomları kadar Pagetoid dağılımının yaygın olmadığı görülmektedir. Ancak perinatal dönemde radyasyon içermeyen ultraviyole ışın uygulaması ile birlikte Pagetoid yayılma gözlenmektedir. Bununla birlikte DMBA gibi başlatıcı ve TPA gibi etkinliğini arttırıcı kimyasal ajanlarla beraber, knockout farelerin melanom oluşma insidansı arttırılmaktadır. (Şekil.13.)



İnsan melanomunda görülen pagetoid yayılma. İntraepidermal yayılım. (Pagetoid yayılma belirgin özelliktedir.) Fare melanom modelinde pagetoid yayılma.



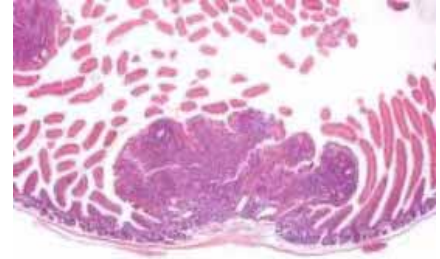
AKR ApcMin/+ farede gastrointestinal intraepiteliyal neoplazma.



Metallothionein-hepatosit büyüme faktör transgenik farede, perinatal UV ışınları ile oluşturulan melanom modelinde belirgin intraepidermal yayılma görülmekte.

Şekil. 13. İnsan ve fare melanomlarının histolojik görünümü

Apc Min/+ germline mutasyonu ile indüklenmiş ilk fare intestinal tümör modelidir. (Min: Murine Intestinal Neoplasia) *Apc Min/+* fare adenomları öncelikle ince barsakta gözlenir. C57BL/6 soyu fareden kökenlenen ve *Apc Min* aleli eksprese olmuş 4 aylık farelerin ince barsaklarında ortalama 24, kolonlarında ise 5 adenomatoz polip gelişmektedir. Lezyonlar genellikle enflamasyonsuz ve mukozal kökenli saplı adenokarsinom yapısında ve barsak lümeninden çıkıntı yapmış şeklindedir. Histolojik açıdan genel olarak insan kolon adenomasına benzerler. Ancak insan adenomunun mukozal yüzeyinde displastik hücreler görülürken farelerde normal epitelin yüzey tabakası bulunur. İnvaziv adenokarsinoma doğru ilerleme olmaz ve metastaz gözlenmemektedir. (Şekil.14.)



Blm+/- x ApcMin/+ farede papillar adenom.

Şekil. 14. *Apc Min/+* farenin gastrointestinal adenomlarının histolojik görünümü

Bunun yanında örnekleme çalıştığımız transgenik ve knockout laboratuvar hayvanı üretiminde yaşanan son yıllarda ki hızlı gelişmeler özel üretim üniteleri ve bazı üniversiteleri bu konuda spesifik konuma getirmiştir. Bu yerler üretim bölümlerinde bulunan transgenik ve knockout laboratuvar hayvanlarının özellikleri ve ücretlerinin yer aldığı katalog ve web sayfalarıyla ürünlerini bütün dünyaya sunmaktadır. (Tablo.1.)

Tablo 1. Transgenik ve Knockout Fare Meme Tümörü Modelleri

Model	Transgen/ Gen knockout	Promotörler	Fare fenotipi	Referans
Growth Factor	FGF3(int-2)	MMTV-LTR	Hiperplazi ve adenokarsinom	Müller ve ark.
	FGF3(int-2)x WNT1	MMTV-LTR	Bitransgenik fareler içinde hızlandırılmış tümörigenez ve en yüksek insidans	Kwan ve ark., 1992
	FGF7(KGF)	MMTV-LTR	Hiperplazi, adenokarsinom ve metaztas	Kitsberg ve Leder, 1996
	HEREGULIN(NDF)	MMTV-LTR	Hiperplazi, adenokarsinom	Krane ve Leder, 1996; Weinstein ve Leder, 2000
	HGF	MT	Anormal meme bezi gelişimi, adenokarsinom, adenoskuamoz karsinom.	Takayama ve ark., 1997
	IGFII	BGL, H19	Hiperplazi, adenom, adenokarsinom, adenoskuamoz karsinom, dalak, akciğer ve karaciğere metaztas	Bates ve ark., 1995; Pravtcheva ve Wise, 1998
	TGFa	MMTV-LTR	Anormal meme bezi gelişimi, hiperplazi, adenom, adenokarsinom	Matsui ve ark., 1990; Jhappan ve ark 1990 Sandgren, ve ark., 1995
Growth Factor Reseptörü	ErbB2 (neu)	MMTV-LTR	Hiperplazi, adenokarsinom, akciğer metastaz	Muller ve ark., 1988; Guy ve ark., 1992
	RET-1	MMTV-LTR	Hiperplazi, adenokarsinom	Iwamoto ve ark., 1990
	Tpr-MET	MMTV-LTR	Hiperplazi, displazi ve siroz, papiller veya nodüler karsinom	Liang ve ark., 1996
Diğer transgenler	MTS1	MMTV-LTR	Adenokarsinom and akciğer metastaz	Ambartsumian ve ark., 1996
	Beta-Catenin	MMTV-LTR	Hiperplazi, adenokarsinom	Michaelson ve ark., 2001
	COX-2	MMTV-LTR	Hiperplazi, displazi, adenokarsinom, lenf nodu metastaz	Liu ve ark., 2001

KAYNAKLAR:

1. Miyauchi M, Nakamura H, Furukawa F, Son HY, Nishikawa A, Hirose M. Promoting effects of combined antioxidant and sodium nitrate treatment on forestomach carcinogenesis in rats after initiation with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Letters* 178, 19-24, 2002.
2. Nishikawa A, Furukawa F, Lee IS, Kashara KI, Tanakamaru ZY, Nakamura H, Miyauchi M, Kinoshita N, Hirose M. Promoting effects of 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone- on Rat Glandular Stomach Carcinogenesis Initiated with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Research*, 59, 2045-2049, 1999.
3. Chow L.W.C, Cheung MNB, Loo WTY, Guan XY. A rat cell line derived from DMBA-induced mammary carcinoma.
4. Lippert TH, Adlercreutz H, Berger MR, Seeger H, Elger W, Mueck AO. Effect of 2-methoxyestradiol on the growth of methyl-nitrosourea(MNU)-induced rat mammary carcinoma. *J of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 84, 51-56, 2003.
5. Christov KT, Shilkaitis AL, Kim ES, Steele VE, Lubet RA. Chemopreventive agents induce-like phenotype in rat mammary tumors. *European J of Cancer* 39, 230-239, 2003.
6. Devasena T, Rajasekaran KN, Gunasekaran G, Viswanathan P, Menon VP. Anticarcinogenic effect of bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione a curcumin analog on DMH-induced colon cancer model. *Pharmacological Research* 47, 133-140, 2003.
7. Qureshi S, Al-Shabanah OA, Al-Harbi MM, Al-Bekairi AM, Raza M. Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. *Toxicology*, 165, 1-11, 2001.
8. Bydder S, Charles A, Hewitt I, Walpole I, Algar EM, Smith N, Philips MB. Wilms Tumor in a Pediatric Renal Transplant Recipient With Unexpected Denys-Drash Syndrome. *Transplantation Proceedings*, 34, 3203-3204, 2002.
9. Sandoval C, Ozkaynak FO, Tugal O, Jayabose S. Hyperdiploidy in a case of favorable histology Wilms tumor. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 127, 89-90, 2001.
10. Robert BC., Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E. *Cancer Medicine* 5, American Cancer Society, 2000.
11. Buzhurina IM, Chernaya NG, Panov MA. Glucose strongly stimulates rat of the rRNA synthesis in EAC cells. *Cell Bio Int*, 1994; 18:6.
12. Yuspa SH, Poirier MC. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. *Adv Cancer Res*, 1988; 50: 25-70.
13. Kaleoğlu Ö, İşli N. Ehrlich-Lette Asit Tümörü. *İst.Tıp Fak. Mecmuası*, 40: 978-984. 1977.
14. Kaleoğlu Ö. Ehrlich-Lette Asit Tümörü sıvısının antijen-antikor reaksiyonuna tesiri. *İst.Tıp Fak. Mecmuası*, 40: 851-855, 1977.
15. Peto R, Roe FJ, Lee PN. Cancer and ageing in mice and men. *Br J Cancer*, 32: 211-426, 1975.
16. Suguira K. Tumor Transplantation. American Cancer Society, 1962.
17. Devita TV, Hellman S Jr, Rosenberg SA. *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 1985.
18. Cotran R, Kumar V, Robbins S. *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 4th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 1989.
19. Diamandopoulos GT. Cancer: An historical perspective. *Anticancer Res*, 16:1595-1602, 1996.
20. Kardinal C, Yarbro JA. Conceptual history of cancer. *Semin Oncol*, 6: 396-408, 1979.
21. Metha RG. Experimental basis for the prevention of breast cancer. *European J of Cancer*, 36 1275-1282, 2000.