

**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EHRlich ASİT TÜMÖRLERİNİN SİTOGENETİK  
AÇIDAN İNCELENMESİ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**LEMAN ERGÜL  
EYLÜL 2011**

**Ehrlich Asit Tümörlerinin Sitogenetik Açısından  
İncelenmesi**

**Gaziantep Üniversitesi  
Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans Tezi**

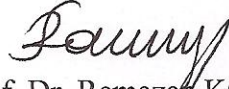
**Danışman  
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN**

**Leman Ergül  
Eylül 2011**

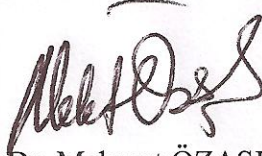
T.C.  
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Ehrlich Asit Tümörlerinin Sitogenetik Açından İncelenmesi  
Öğrencinin, Adı Soyadı: Leman ERGÜL  
Tez Savunma Tarihi: 14 Eylül 2011


Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

  
Prof. Dr. Ramazan KOÇ  
FBE Müdürü

Bu tezin yüksek lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

  
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:


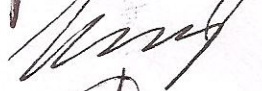
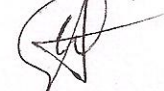
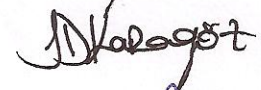
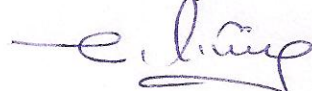
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Prof. Dr. Eyüp RENCÜZOĞULLARI

Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

Yrd. Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

Yrd. Doç. Dr. Murat KÜTÜK

  
İmzası:  
  
  
  


## ÖZET

### EHRlich ASİT TÜMÖRLERİNİN SİTOGENETİK AÇIDAN İNCELENMESİ

ERGÜL, Leman  
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü  
Danışman: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Eylül 2011, 73 sayfa

Kanser sitogenetiği, kanser araştırmalarına yönelik olarak spesifik kromozom anomalilerinin tanımlanmasına, primer ve sekonder değişikliklerin ve özellikle kırık noktalarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır.

Pasajlanarak devamı sağlanan deneysel Ehrlich asit tümörünün agresifliğinin arttığı çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak bu durumun moleküler mekanizması hakkında herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada, *Mus musculus* Balb/C türü farelerde oluşturulan Ehrlich asit tümörü, fareye inoküle edildiği ilk günden itibaren, ardı ardına, toplamda 20 adet pasaj yapılmıştır. Ehrlich asit hücrelerinin 19'dan 31'e kadar farklı sayılarda kromozomlara sahip olduğu gözlenmiş ve kromozom görüntüleri fotoğraflandırılmıştır. Bunun yanı sıra, hücre kinetikleri de değerlendirilmiştir. Ehrlich asit hücrelerinde mitotik indeks oranları, her pasaj için logaritmik bir artış göstermemesine rağmen tüm pasajların mitotik indeks oranı %50'den fazla çıkmıştır.

Sonuç olarak; Ehrlich asit tümörü pasajlandıkça, kromozom sayısında veya mitotik indeksinde paralel olarak logaritmik bir artış gözlenmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ehrlich asit tümörü, klasik sitogenetik, mitotik indeks, kromozom aberasyonları.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF PERSPECTIVE CYTOGENETIC OF EHRlich ASCITES TUMORS

ERGÜL, Leman  
M. Sc. In Biology  
Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
September 2011, 73 pages

Cancer cytogenetics, cancer research is to identify specific chromosome abnormalities, especially in primary and secondary changes and determination. Passaged provided more, experimental Ehrlich ascites tumor's Increased aggressiveness have been reported in the studies. However, no studies have been performed on the molecular mechanism of this condition.

In this study, Ehrlich ascites was passeded totaly 20 times by injected to mice from first day to end of the study. It was observed to have different numbers of chromosomes from 19 to 31 of Ehrlich ascites tumor cells. Ehrlich ascites cells contain different number of chromosomes changing from 19 to 31 of Ehrlich ascites tumor cells and was photographed chromosomes. Although, Ehrlich ascites cells was not shown logarithmic increasing, mitotic index rates in Ehrlich ascites cells was increased up to 50%.

In conclusion, as Ehrlich ascites tumor chromosomes number and mitotic index of Ehrlich ascites tumor cells was not shown logarithmic increasing.

**Key words:** Ehrlich ascites tumor, classic cytogenetic, mitotic index, chromosome aberration.

## **TEŞEKKÜR**

Tez çalışmam boyunca maddi-manevi desteklerini asla esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN 'a,

Tez laboratuvar çalışmamda, deneyimlerini ve bilgilerini benimle paylaşan ve esirgemeyen hocam Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI' na,

Tez konumun belirlenmesi ve tez çalışmam boyunca daima bana destek olan, görüşlerini ve bilgilerini esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. I.Didem KARAGÖZ' e ve Yrd. Doç. Dr. Halil İbrahim KILIÇ' a,

Tüm eğitimim boyunca maddi-manevi yönden desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve amaçlarıma ulaşmam konusunda bana büyük destek ve ilgi gösteren, beni daima cesaretlendiren, zor günlerimde gösterdikleri büyük ilgi ve sabırlarından dolayı CANIM AİLEME, özellikle canım ANNEM ve Demet Ablam' a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yaşadığım zor günlerimde daima beni cesaretlendiren, sendelediğim her anda beni yeniden ayağa kaldıran ve destekçi olan canım arkadaşım Fevzi BOZGEYİK' e,

Tez aşaması boyunca bilgilerini benimle paylaşan, desteğe ihtiyacım olduğu her anda daima yanımda olan lisans eğitimimden beri desteklerini hissettiğim arkadaşım Arş. Gör. Burak KOÇAK' a,

Tez yazım aşamasında bilgisayarımın gazabından koruyan ve beni daima destekleyen hocam Arş.Gör. Fatih YAYLA' ya,

Çalışmam boyunca özellikle fotoğraflama aşamasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, daima desteğini hissettiren arkadaşım Arş.Gör. Mehmet YARAN'a,

Biyoloji bölümünde yüksek lisans/doktora yapan arkadaşlarıma da ilgi ve desteklerinden dolayı,

Teşekkür ederim...

**Leman ERGÜL**

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>Sayfa No</b>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vi
TABLolar LİSTESİ .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
BÖLÜM 1: GİRİŞ .....	1
1.1. Kanser Tarihçesi .....	3
1.2. Deneysel Kanser Modellerinin Tarihçesi.....	6
1.2.1. Spontan veya Transplante Edilebilen Tümör Modelleri .....	7
1.2.1.1. Sitogenetiğin Tarihçesi .....	8
1.3. Tümör Hücresinin Özellikleri .....	12
1.3.1. Ehrlich-Lettre Asit Tümörü (EAT) .....	13
1.3.1.1. Solid Formu .....	17
1.3.1.2. Asit (Sıvı) Formu .....	18
BÖLÜM 2: LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ .....	20
BÖLÜM 3: MATERYAL ve METOT .....	24
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışı .....	24
3.1.1. Kromozom Besi Ortamları .....	24
3.1.2. Kolşisin .....	24
3.1.3. Hipotonik Eriyik .....	24
3.1.4. Fiksatif .....	24
3.1.5. Sorensen Tamponu .....	25
3.1.6. Giemsa .....	25
3.1.7. Entellan .....	25
3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları .....	25
3.3. Araştırmada Kullanılan Deney Hayvanları .....	25
3.4. <i>Mus musculus</i> Balb/C Türü Farelerde Ehrlich Ascites Tümör (EAT) Oluşturulması .....	28

3.5. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması .....	28
3.6. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması .....	32
3.6.1. %5'lik Giemsa'nın Hazırlanışı .....	32
3.7. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme.....	34
3.8. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması .....	35
3.9. Ehrlich Asit Tümör Sıvı Pasajlarının Hücre Kinetiği .....	35
BÖLÜM 4: BULGULAR .....	36
4.1. Ehrlich Asit Tümör Hücrelerinin Mitotik Aktivitesi .....	39
BÖLÜM 5: TARTIŞMA ve SONUÇ .....	55
KAYNAKLAR .....	61



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Fizyoloji Deney Hayvanları Laboratuvarı .....	26
Şekil 3.2. Deney Hayvanlarının Yetiştirildiği Kafesler .....	27
Şekil 3.3.a. Tüplerin Santrifüje Yerleştirilişi .....	29
Şekil 3.3.b. Tüplerin Süpernatant Kısımının Atılışı .....	29
Şekil 3.4. Tüplere Hipotonik Solüsyonun (KCl) Damlatılışı .....	30
Şekil 3.5. Preparatların Pasteur Pipetinden Soğuk Lam Üzerine 45 cm Yükseklikten Farklı Alanlara Damlatılışı .....	31
Şekil 3.6. Bir Günlük Preparatların Şaleye Dizilişi .....	32
Şekil 3.7. Şaleye Dizilen Preparat Örneklerinin Boyanışı .....	33
Şekil 3.8. Preparatların Giemsa Boyasında Bekleyişi .....	33
Şekil 3.9. Boyama Sonrası Preparatların 3 Ayrı Kaptaki Saf Sudan Geçirilişi.....	34
Şekil 3.10. Preparatların Etiketlendirilip 1 Günlük Kurumaya Bırakılışı .....	34
Şekil 4.1. 1. Pasajdan Alınan Ehrlich Asit Sıvısı İçinde Yer Alan Canlı ve Ölü Hücre Görüntüsü .....	41
Şekil 4.2. 10. Pasajdan Alınan Ehrlich Asit Sıvısı İçinde Yer Alan Canlı ve Ölü Hücre Görüntüsü .....	41
Şekil 4.3. 12. Pasajdan Alınan Ehrlich Asit Sıvısı İçinde Yer Alan Canlı ve Ölü Hücre Görüntüsü .....	42
Şekil 4.4. 20. Pasajdan Alınan Ehrlich Asit Sıvısı İçinde Yer Alan Canlı ve Ölü Hücre Görüntüsü .....	42
Şekil 4.5. 1. Pasajdaki Metafazdaki Kromozom Dağılımı ve İnterfaz Hücreleri ...	43
Şekil 4.6. 3. Pasajdaki Hücre Büyüme Evreleri .....	44
Şekil 4.7. 10. Pasajdaki Hücre Büyüme Evreleri .....	45
Şekil 4.8. 12. Pasajdaki Metafazdaki Kromozom Dağılımı,.....	46
Şekil 4.9. 13. Pasajdaki Hücre Büyüme Evreleri .....	47
Şekil 4.10. 14. Pasajdaki Hücre Büyüme Evreleri .....	48
Şekil 4.11. 18. Pasajdaki Hücre Büyüme Evreleri .....	49

## TABLULAR LİSTESİ

## Sayfa No

<b>Tablo 3.1.</b> Deney Hayvanlarına Verilen Yemin İçeriği .....	27
<b>Tablo 3.2.</b> Deney Hayvanlarına Verilen Yemdeki Besin Maddeleri Ve Enerji Düzeyi .....	28
<b>Tablo 4.1.</b> Çalışmada Kullanılan EAT Sıvı Pasajları .....	38
<b>Tablo 4.2.</b> Ehrlich Asit Tümör Hücrelerinin %MI Değerleri .....	39
<b>Tablo 4.3.</b> Ehrlich Asit Tümör Hücrelerinin Kromozom Sayısı, Mitotik İndeks ve Hücre Kinetiği .....	40
<b>Tablo 4.4.</b> 2. Pasaj ve 3. Pasajın Ölü ve Canlı Hücre Sayılarının ve Hücre Kinetiklerinin Kıyaslanması.....	50
<b>Tablo 4.5.</b> 1., 10., 13., 14., 15. ve 16. Pasajların Canlı Hücre Sayılarının ve Hücre Kinetiklerinin Kıyaslanması .....	50
<b>Tablo 4.6.</b> 3., 8. ve 15. Pasajların Canlı Hücre Sayılarının, Hücre Kinetiklerinin ve Mitotik İndekslerinin Kıyaslanması .....	52
<b>Tablo 4.7.</b> 1., 2. ve 14. Pasajların Canlı Hücre Sayılarının, Hücre Kinetiklerinin ve Mitotik İndekslerinin Kıyaslanması .....	52
<b>Tablo 4.8.</b> 5., 7., 8., 14. ve 17. Pasajların Kromozom Sayıları, Mitotik İndekslerinin ve Hücre Kinetiklerinin Kıyaslanması .....	53
<b>Tablo 4.9.</b> 2., 6., 15. ve 20. Pasajların Kromozom Sayıları, Mitotik İndekslerinin ve Hücre Kinetiklerinin Kıyaslanması .....	53

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ADR : Adriamisin

CDK : Sikline bağlı kinaz

DNA : Deoksiribonükleik asit

EAT : Ehrlich Ascites Tumor, Ehrlich Asit Tümörü

EACF : Ehrlich ascites karsinoma faktörü

EEAT : *Azima tetracantha* 'nın ethanol ekstratı

EPI : Epirubisin

FISH : Floresan *in situ* Hibridizasyon

GSH : Glutatyon

i.p : İntraperitoneal

i.v. : intravenoz

KA : Kromozom aberasyonları

KML : Kronik Myeloid Lösemi

MI : Mitotik İndeks

MN : Mikronukleus

MPCE : Mikroçekirdekli Polikromatik Eritrositler

NPYR : Nitrosopirolidin

PBS : Fosfat tamponu

Ph : Philadelphia

PHA : Phytohemagglutinin

RNA : Ribonükleik asit

s.c. : subcutan

TATA : Tmrle İlişkili Transplantasyon Antijenler

TAM : Tamoxifen

TSTA : Tümöre Spesifik Transplantasyon Antijenleri

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Günümüzün en önemli ölüm nedenlerinden olması sebebiyle kanser oluşumunun önlenmesi, üzerinde en çok çalışılan konulardan biridir (Kumar ve ark, 1995).

Günümüzde kanserden korunma yollarının bilinmesi, erken tanı yöntemleri ve tedaviden elde edilen başarıların artması ile birlikte insan, kansere karşı duyduğu korkuyu içinden atabilmesi için birçok nedene sahip olmaktadır. Ancak bazı kanser türlerinin iyileştirilebilmesi ya da bu hastalıkla birlikte daha uzun süre yaşamak olanaklı olsa da kanser korkulan bir hastalık olmaktan, ölümlerle eş anlamlı görülmekten kurtulamamaktadır.

Kanser denildiği zaman, bir grup hücrenin vücutta normal sellüler büyüme ve çoğalma mekanizmalarından kurtulmuş olarak, kontrolsüz bir şekilde çoğalmaları ve yayılmaları anlaşılmaktadır.

Kanser hücrelerinin başka biyolojik karakteristikleri de vardır. Bunlar arasında hücre kültürlerinde kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyaranlara (sinyallere) gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarması ve metastaz yapabilme sayılabilir.

Normal bir hücrenin neoplastik formasyonu çok basamaklı ve çok etkenle ortaya çıkan bir süreçtir. Bu süreçteki ana etken ise sonradan kazanılan somatik mutasyonlarla hücrenin genetik yapısındaki değişikliklerdir. Bu değişiklikler ya kromozomal düzeyde ya da DNA düzeyinde ortaya çıkmaktadır. Kromozomal düzeyde bir mutasyonun ortaya çıkabilmesi için neoplastik hücrelerde iki major mitotik olay kromozom yapısını etkilemektedir (Karaüzüm, 2006).

1- Anormal segregasyon: Ayrılama ve anafaz lag olayları ile ortaya çıkar ki bunlar monozomi, trizomi, haploidi ve poliploidi gibi kromozom sayısında

değişikliklerle sonuçlanır.

2- Kromozom kırıkları: Oluşumunda iki ayrı etken bulunmaktadır. Birincisi, fiziksel ajanlar, viruslar ve kimyasal mutajenik ajanlar gibi ekzojenik faktörlerdir. İkincisi ise DNA replikasyonu, transkripsiyon ve rekombinasyon sırasında meydana gelen ve tamir edilemeyen hataların oluşturduğu endojenik faktörlerdir. Endojenik ya da ekzojenik faktörlerle oluşan kromozom kırıkları ise yapısal kromozomal abnormalitelere neden olmaktadır. Yapısal kromozom anomalileri dengeli (resiprokal translokasyon, insersion, inversiyon gibi) ve dengesiz (delesyon, duplikasyon, izokromozom, ring gibi) olmak üzere iki alt grupta toplanmaktadır.

Sonradan kazanılmış olan ve mikroskopik olarak incelenebilen kromozomal abnormaliteler, kanser sitogenetiğinde üç kategoride toplanmaktadır:

1. Primer abnormaliteler: Tümöre spesifik, rastgele olmayan, genellikle tek bir karyotipik değişiklik olup, neoplazinin oluşumu için gerekli ve tümör oluşumu kontrol edilebilen basamak olarak tanımlanmaktadır.

2. Sekonder abnormaliteler: Tümör spesifitesi düşük, rastgele olmayan değişiklikler olup, tümör hücresinin ilave aberasyonlara yatkınlığı genetik insitabilitenin habercisi olarak vurgulanmaktadır.

3. Sitogenetik noise: Her hücrenin farklı bir kromozom anomalisine sahip olması durumudur. Bu tümöre klonal çoğalabilme şansı verdiği için genomik insitabilitede artış ve tümör progresyonu ile ilişkilendirilmektedir (Karaüzüm, 2006).

Hematolojik maligniteler, kemik iliğinden türeyen hücrelerde meydana gelen bir grup neoplazmadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, hematolojik tümörlerin büyük bir çoğunluğunun yapısal veya sayısal kromozom anomalileri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu kromozom anomalileri gen ekspresyonunun bozulmasına ya da yeni bir füzyon proteinin oluşmasına yol açmışlardır (Paietta, 2003).

Maligniteli olgularda sitogenetik çalışma yapabilmek için tümör hücresi gerekmektedir. Lösemilerde örnek, genellikle kemik iliği aspirasyon materyalinden elde edilmiştir (Fıratlı, 2003).

## 1.1. Kanserin Tarihçesi

Kanser teriminin ilk defa Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) organizmanın şifa bulmayan yeni yapılanmaları için kullanıldığı görülmektedir. Vücut yüzeyinde büyüyen ve genellikle ülserle neden olan, kırmızı, sıcak, ağrılı, diğerlerinden farklı karakterde olup daha yavaş büyüyen şişliklere Hipokrat, “karkinos” ya da “karkinoma”, Galen (M.S. 2. yüzyıl) ise yengece benzettiği görünümü nedeniyle “kanser” adını vermiştir. (Atıcı, 2007).

Türk tıp tarihinde ise kansere “seretan” adı verilmektedir. Tarsuslu Osman Hayri Efendi'nin “Kenzüsıhhatül Ebdaniye” (1298) adlı eserinde seretan, fındık ya da küçük yumru büyüklüğünde, ağrılı, etrafı damarlı bir oluşum olarak tanımlanmaktadır. İshak bin Murad'ın “Havasüledviye” (1390) adlı eserinde kanser tedavisinde günlük önerilmektedir. Şerafettin Sabuncuoğlu'nun “Cerrahiye-i İlhaniye” adlı eserinde (1465) ise seretanın çevresinin dağlanarak kitlenin kesilmesi önerilmektedir. Ancak uzun zamandır duran ve büyük olan kitlenin dağlanmaması gerektiği belirtilmektedir. Seretanın açılıp yara olması durumunda ise kurşun ya da tutyaya merhemi sürülmektedir (Ünver, 1938). Yine aynı eserde seretan tedavisinde kullanılan ilaç terkipleri yer almaktadır (Baylav, 1953).

Kanser üzerinde ilk bilimsel, mikroskopik inceleme Marcello Malpighi (1628-1694) tarafından yapılmıştır. On yedinci yüzyıl cerrahları ile birlikte kanser, dokunulmaması gereken bir olgu olmaktan çıkmıştır (Bettman, 1956).

Hücrenin kinetik parametreleri açısından konuya bakıldığında, hücre sayısındaki artış büyük önem kazanmaktadır. Hücre sayısındaki artışı, dolayısıyla büyümeyi etkileyen temel faktörlerin hücre siklusu zamanı, çoğalan fraksiyon ve hücre kaybı olduğu bilinmektedir. Erişkin bir canlının vücudunu oluşturan hücrelerin çoğu çeşitli fonksiyonları yapmak üzere farklılaşmıştır ve bölünmemektedirler. Buna karşılık deri, bağırsak, kemik iliği gibi bazıları ise oldukça sık bölünmektedirler. İçerdikleri hücrelerin bölünme yetenekleri ve popülasyonun hücre kaybı gibi özelliklerine göre, normal büyüme gösteren memeli hücre popülasyonları Gilbert ve Lajtha (1965) tarafından tiplere ayrılmıştır.

EAT hücrelerinin platoya eriştiği 14. günde biriken asit sıvısının boşaltılmasıyla tümörün yeniden büyümeye başladığını gösteren Burns (1968), tümör büyümesi üzerine asit sıvısının inhibe edici etkisi olabileceğini ileri sürmüştür. Son yıllarda Burns'un aksine Yeh ve vd. (1985) ise, EAT hücrelerinin çoğalmasına paralel olarak artan asit sıvısından elde edilen Ehrlich ascites karsinoma faktörü (EACF) 'nın farelerin karaciğerinde, submandibular, ekstraorbital lakrimal bezlerinde ve dil epitelinde DNA sentezinin başlamasına neden olduğunu kaydetmişlerdir (Altun, 1993).

Rönesans ile birlikte Avrupa tıbbında kanserin tanımlanması ile ilgili yeni gelişmeler olmuştur. Bu dönemin büyük cerrahı Ambroise Paré (1510-1590), malign tümörleri, "meydana geldiği yerin elemanlarından oluşan etin fazla büyümesi" olarak tanımlamış ve kadınlarda kanserin daha fazla olduğunu, meme kanserlerinin ise koltukaltı gangliyonları aracılığı ile yayılım yaptığını belirtmiştir (Yener, 1973).

Günümüzde bilinen birçok kanser türünü ise Morgagni (1682-1771) tanımlamış ve primer tümörleri sekonder tümörlerden ayırmıştır (Yener, 1973).

Hipokrat'la başlayan ve Galen'le devam eden humoral patoloji teorisi doğrultusunda, tümör oluşumundan kara safra sorumlu tutulmuştur. Kanserden korunmak için diyet önerilmesi 18. yüzyıla kadar güncelliğini korumuştur. Tedavide, aynı zamanda ülser tedavisinde kullanılan metalik tuzlar (bakır, kurşun, sülfür, arsenik vb.) kullanılmıştır (Bettman, 1956; Yener, 1973).

Marie François Xavier Bichat (1771-1802), on dokuzuncu yüzyılın başlangıcında genel patolojik anatominin temellerini kurarken malign tümörler için "normal örgülere benzer iğreti örgü" deyimini kullanmıştır ve tümöral yapıda parankim ve strumayı tanımlamıştır. On sekizinci yüzyılda lenfatik sistemin bulunuşu, lenf sıvısının tümörlerin toplanmasından sorumlu tutulmasına neden olmuştur. Böylece John Hunter ile birlikte, lenf bezlerinin çıkarılması kanserin tedavisinde uygulanmaya başlanmıştır. İlk defa tümörlerin anatomik ayrımını yapan Laönnec (1781-1826), organizmanın normal yapısına benzeyen tümörlere "homolog", farklı olanlarına ise "heterolog" tümör adını vermiştir (Yener, 1973).



“Kanser” adlandırması, kanser ağrısının, yengeç ısırması ile oluşan, ortadan çevreye doğru yayılan kemirici tarzdeki ağrıya benzerlik göstermesi nedeniyledir. Bu dönemde sadece epitelyal kökenli malign tümörlere kanser denildiğini ve nedeninin diğer hastalıklarda olduğu gibi vücut sıvıları arasındaki dengesizliğe bağlandığı görülmüştür. Galen, tümörleri, doğaya aşan (gebelik durumunda uterusun gelişimi), doğayı aşan (hipertrofi) ve doğaya karşı olan (malign tümörleri) şeklinde üç grupta sınıflandırmıştır (Yener, 1973).

Çeşitli asit tümörlerinde dokuya özgü inhibitörlerden başka, dokuya özgü olmayan büyüme inhibitörlerinin bulunduğu da tespit edilmiştir (Elleman ve Eidinger, 1977; Rothbarth vd., 1977) ve Ehrlich ascites tümöründe (EAT) bu faktörlere bağlı olarak DNA replikasyonunun artan hücre sayısına paralel olarak Rothbarth ve arkadaşları (1981) tarafından ortaya çıkarılmıştır.

Periton gibi vücut boşluklarında gelişen ve sıvı özellik taşıyan tümörler ise, hızlı hücre bölünmeleri ile çoğalarak hacimce artmaktadır ve bulunduğu boşluğu tamamen kaplamaktadırlar. Bu hızlı artış sonucunda tümör hücrelerinin yanı sıra asit sıvısı denilen bir sıvının da biriktiği görülmektedir. Tümörün büyümesi ile birlikte sıvının miktarı da artmakta ve sonuçta, konak hayvan hem tümör hacminin oluşturduğu basınç, hem de tümörün organizmaya verdiği hasar sonucu ölmektedir (Altun, 1993).

Gerek katı, gerekse sıvı tümörlerde hem hücre bölünmesi hem de hücre kaybı görülmektedir. Ancak hücre bölünmesi o kadar fazladır ki, hücre kaybına rağmen tümör büyümeye devam etmektedir (Altun, 1993).

Onkoloji çalışmalarında kullanılan spontan veya indüklenen tümör modelleri için çok sayıda hayvan sayısına ihtiyacın olması, maddi olanakların fazla miktarda olması ve uzun zaman gerektirmesi nedeniyle birçok araştırmacı tarafından pek tercih edilmemişlerdir. Bunun yanında transplante edilebilen tümörler, söz konusu dezavantajları avantaja çevirdiğinden dolayı kullanım açısından daha çok tercih edilmişlerdir. Dolayısıyla özellikle 1950’li yıllardan sonra transplante edilebilen tümörlerin oluşturduğu modellerin tercih edildiği kanser araştırmaları ön plana çıkmaktadır (Zeybek, 1996).

Kanserin genetik etiyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda, kromozomlarda delesyon, translokasyon, duplikasyon, nokta mutasyonları ile onkojenlerin aktivasyonu ve tümör supresör gen kayıplarının tümör oluşumunda önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (Ah-See vd., 1994; Rowley, 1998).

Paul Ehrlich'in, 1877'de kan hücreleri arasındaki farklılaşmayı gösteren boyama yöntemini bulması, tıpta yeni bir çağı başlatmıştır. Beyaz kan hücrelerinin üç farklı granülosit tipi (eozinofil, bazofil, nötrofil) olduğunu göstermiştir (1880). Bu yeni bulgu, kronik lösemide kemik iliğinin hastalığa tutulan hücre dizisinin tipine göre, lenfoid ve myeloid olarak sınıflandırmasını kolaylaştırır (Hamblin, 2001; Holyoake, 2001).

## **1.2. Deneysel Kanser Modellerinin Tarihçesi**

Kanser üzerine yapılan araştırmalar yaklaşık 14. yüzyıldanbu yana devam etmektedir. Söz konusu dönem içinde kanser ilaçlarının araştırılma ve geliştirilme çalışmalarında her zaman deneysel çalışmalara gereksinim duyulmuş ve çeşitli modeller kullanılmıştır (Manson ve ark, 2000). Diğer bütün tedaviye yönelik denemelerde olduğu gibi kanser araştırmalarında da deneysel modelleri kullanmak zorunluluğu vardır. Deneysel kanser araştırmalarının yapıldığı yüzlerce yıllık dönemde kimyasal karsinojenler veya transplante edilebilen tümörlerin kullanılması ön plana çıkmaktadır (Yuspa ve Poirier, 1988).

19. yy'la beraber, özellikle kimyasal karsinojenlerin kullanıldığı, ilk kayıtlı, deneysel kanser çalışmaları göze çarpmaktadır. 1874-1878 yılları arasında Edinburg Üniversitesi bünyesinde tavşanlarda meme kanseriyle ilgili araştırmalar yapılmış, 1910-1915 yıllarında ise; Jensen, Murray, Ehrlich, Little gibi bilim adamlarının geliştirdiği deneysel kanser modelleri kullanılmaya başlanmıştır (spontan veya indüklenmiş tümör modelleri) (Zeybek, 2003).

Ehrlich, 1907 yılında, albino bir farenin meme bezinden çıkartılan Ehrlich Mouse Carcinoma'dan türetilen EAT modelini ortaya koymuştur. 1911 yılında Tokyo Üniversitesi'nden tavuklarda viral kaynaklı kanser modeli uygulamaları olmuştur. Yine Tokyo Üniversitesi'nde (1915) tavşan derisine ilk defa kimyasal

karsinojen(kömür katranı) uygulanmıştır. Jensen, 1910-1915 yıllarında “Jensen Rat Sarcoma” yı deneysel kanser çalışmalarına kazandırdığı görülmektedir. Wilm, 1950’li yıllardan sonra, transplante edilebilen sıçan renal tümörünü kullanmaya başlamasıyla transplante tümör modelleri ön plana çıkmıştır. Bununla birlikte ortaya konan değişik tümör modellerinin gelişimi ile birlikte çeşitli anti-karsinojen ajanların denenmesinde hızlı bir artış gözlenmiştir. Gilman, 1940’lı yılların ortalarında lenfomaya karşı alkilenmiş ajanlarla yaptığı sistemik kanser tedavisi ilk önemli ilaç etkilerini ortaya koymuştur (Zeybek, 2003).

20. yüzyılın erken dönemlerinden itibaren ise “günümüzde dahil” canlı organizmaların yapı, fonksiyon ve kimyasının aydınlatılmasıyla birlikte kimyasal karsinojenler, hücre kültürü, tanı teknikleri, kemoterapi ve genetik manipülasyonlar gibi alanlarda kanser araştırmaları hız kazanmıştır (Zeybek, 2003).

Sitogenetik uygulamalar günümüzde başta klinik tanı, gen haritalaması, kanser sitogenetiği ve prenatal tanı gibi pek çok alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Bir kromozom raporunu yorumlamak, metodoloji ile ilgili bazı bilgilere sahip olmak, kromozom çalışmaları ve onların sınırları hakkında görüşü olmak bugün bu konu ile ilgili araştırmacıların, hekimlerin ve doğumsal anomalileri olan, mental retarde, cinsel gelişim bozuklukları ayrıca çeşitli kanserli kişilerle çalışanlar için temel beceri olarak görülmektedir (Karaüzüm, 2006).

### **1.2.1. Spontan veya Transplante Edilebilen Tümör Modelleri**

Bu grup içinde bulunan transplante edilebilen tümör modelleri spontan oluşan tümörlerden elde edilen süspansiyonlardan türetilmektedir. Spontan tümörler genelde idiyopatik olmaktadır. Geç dönemde ölçülebilir duruma gelmektedirler (Zeybek, 2003).

Solid tümörler, subkutan, intradermal, intramuskuler, intraperitoneal veya intravenöz yolla hücre süspansiyonlarının inokülasyonu sonucunda transplante edilmektedirler. Transplante edilen tümörler, kökenlendikleri spontan tümörlere erken oluşum fazları açısından oldukça benzerlik göstermektedirler (Zeybek, 2003).

Diğer yandan transplante edilen tümör hücreleri kendilerine özgü histokompatibilite antijenlerine sahip olmaktadır. 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 bulunmamaktadır (Zeybek, 2003).

#### **1.2.1.1. Sitogenetiğin Tarihçesi**

Sitoloji bilimi, 1665 yılında Robert Hook'un çalışmaları ile başlamıştır. Robert Hook mikroskopta ilk kez hücreyi görmüş, bunu izleyen çalışmalarda da hücrenin çekirdek ve sitoplazma olarak iki kısma ayrıldığı ve çekirdekte bulunan kromozom isimli organelle genetik materyalin taşındığı anlaşılmıştır. Sitoloji bilimi, hücrenin tümünü, sitogenetik ise yalnızca kromozomların morfoloji ve fonksiyonlarını inceler. Tıbbi sitogenetiğin konusu da, insanda patolojik durumlar meydana getiren kromozom anomalilerinin incelenmesidir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Sitogenetikle ilgili çalışmalar yüzyıl öncesine dayanmaktadır. İlk hücre bölünmesi Virchow (1857) tarafından gözlenmiştir. Bunu Arnold'un (1879) tümör hücrelerinde kromozomları görmesi izlemiştir ve 1888'de Valdeyer bunlara kromozom adını vermiştir. Weismann (1883), Strasburger (1884) ve Von Kolliker (1885) tarafından kromozomlarla kalıtım arasındaki ilişki ileri sürülmüş, 1902 yılında Sutton ve Boveri kromozomların bölünme ve yavru hücrelere taşınma özelliklerinin Mendel kurallarına uygunluk gösterdiklerini ortaya koymuşlardır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Anatomi profesörü olan Wilhem August Oscar HERTWIG (1849-1922), 1876-1877 yıllarında denizkestanesinde üreme üzerinde çalışmıştır ve döllenmenin sperm ve yumurtanın birleşmesi ile gerçekleştiği sonucuna varmıştır. Bu çalışma deneysel sitoloji periyodunun başlamasına sebep olmuştur (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Walter Flemming (1843-1915), 1882'de mitoz bölünmeyi gözlemiştir. Avusturyalı sitolog, kromozomların nükleer bölünme esnasında uzunluğuna bölündüğünü ve

yavru nukleusların oluşumunu göstermiş, ayrıca nukleusun boyanan kısmına kromatin adını vermiştir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Amerikalı biyolog ve Colombiya Üniversitesi'nde profesör olan Edmund Beecher WILSON (1856-1939), 1896'da sitoloji ve embriyoloji sahasında ilk defa "gelişme ve kalıtımda hücre" adlı eserini yayınlamıştır. Sitogenetik ve kalıtımda kromozom teorisi Wilson'la başlamıştır. Kromozomların üstünde kromomerlerin bulunduğunu ileri sürerek kromozom teorisini kurmuştur. Kromozom teorisinin temeli Wilson tarafından 4 prensibe dayandırılmıştır:

- Kromozomların yavru hücrelere dağılması için bunların kesin olarak boyuna bölünmesi gerekir.
- Mitozlar arasında nukleusta kromozom materyalinin mevcudiyeti kalıtımın sürekliliği için gereklidir.
- Hücrenin çalışmasında idare edici pozisyonda görünen yapı nukleustur.
- Birleşecek olan germ hücrelerindeki kromozomların dengesi, kalıtımda erkek-dişi dengesine yol açar (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Walter S. SUTTON (1876-1916), ilk yayınında çekirgenin (*Brachystola magna*) somatik hücrelerindeki kromozomları detaylı bir şekilde göstermiştir. Sutton'un teorisine göre meiosisda kromozom çiftleri tesadüfî bir şekilde meiotik iğ iplikleri üzerinde yer almaktadırlar (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Amerikalı botanikçi ve genetikçi olan Albert Francis BLAKESLEE (1874-1954), 1921 yılında *Datura stramonium*'da trisomikleri keşfetmiştir. 1937'de Oswald T. Avery ile birlikte kolşisin alkaloidinin kullanılması ile bitkilerde kromozom takımının iki katına çıktığını keşfetmiştir. *Datura*'nın trisomikleri morfoloji ve kapsül şekli yönünden normal yabani tiplerden farklı idi. Ekstra kromozomdaki tüm bu genlerin ekstra dozları bu bitki ve kapsül şeklini vermiştir. Bu da genlerin kromozom üzerinde lokalize olduğunu göstermektedir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Amerikalı biyolog olan Calvin Blackman BRIDGES (1889-1938), 1923 yılında *Drosophila* kromozomlarında duplikasyon, defisiens ve translokasyonu ilk defa keşfetmiştir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Alman biyokimyacı olan Robert Joachim FEULGEN (1884-1955), 1924 yılında DNA'nın mevcudiyetini gösteren testi H. Rossenbeck ile birlikte bulmuştur. Bu spesifik boyama reaksiyonu bugün meşhur Feulgen reaksiyonu olarak bilinmektedir. Feulgen reaksiyonu interfaz hücrelerinin kromozomlarında DNA'nın lokalize olduğunu göstermiştir. 1914'de Feulgen, nükleik asitin thymus tipinin stabil olmayan karbonhidratının (pentoz) heksoz olmadığını gözlemlemiştir. Hidroliz sonucunda pentozda meydana gelen aldehit grubu ile hidroklorik asit tarafından deklorize olmuş fuksin reaksiyona girmekte ve DNA'nın bulunduğu yerler menekşe renkte boyanmaktadır. 10 yıl sonra bu test mikroskop altında dokuların seçiminde kullanılmıştır. Feulgen ve Rossenbeck thymus tipi nükleik asiti bitki hücrelerinde de bulmuşlardır. Thymus tipi nükleik asit bu gün DNA olarak bilinmektedir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Alman asıllı Amerikalı genetikçi olan Curt STERN (1902), 1931 yılında *Drosophila*'da krossingover'ı sitolojik olarak gözlemlemiştir. Genler arasındaki rekombinasyon ile sitolojik rekombinasyonun aynı olduğunu açıklamıştır. Bu çalışma, kromozomlar arasındaki parça değişimi ile genetik krossingoverin birbiriyle eşdeğer olduğunu gösteren son sitolojik bulguları içermektedir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

G.K. Chrustschoff ve arkadaşları 1931 yılında periferel kandan yaptıkları ilk leukosit kültürü denemelerini yayınlamışlardır. 1935 yılında Chrustschoff ve Berlin insan lenfositleri için kültür tekniğinin detaylarını açıklamışlardır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

İsveçli biyolog Tobjörn Oscar CASPERSON (1910), Stockholm Karolinska Enstitüsü'nde genetik kürsüsünde çalışmış ve medikal hücre araştırmalarında bulunmuştur. Nukleus ve nükleik asitlerle çalışmak için 1936 yılında ultraviyole fotomiktografiyi geliştirmeye başlamıştır. 1969 yılında da metafaz kromozomlarını quinacrin mustard ile boyayarak Q bandlarını göstermiştir. Giemsa boyama

metodunu geliştirerek G bandlarının keşfi,1970 yıllarının başlarında olmuştur. Bugün kromozom bantlama tekniği, sitogenetikte kromozom analizi için büyük öneme sahip olmaktadır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

İsveç'teki Lund Üniversitesi sitoloji profesörü olan John Albert LEVAN (1905), Joe Hin Tjio ile birlikte 1950 yılında Oxyquinolin ezme tekniği ile 40 bitki spesiyesinde kromozom incelemeleri için iyi sonuçlar elde etmiştir. Onlar ilk defa kromozom analizi için kimyasal ajan kullanımının önemini göstermişlerdir. Daha sonra iki bilim adamı ezme tekniğini insan dokularına uygulamışlardır. İnsan kromozomlarının sayısının  $2n=46$  olduğu, 1956 yılında yayınlanmıştır. O zamana kadar insan kromozomları  $2n=48$  olarak bilinmekteydi. İki ay sonra iki İngiliz araştırmacı (Ford ve Hamerton, 1956) üç yetişkin insanın testicular preparatlarında 46 kromozomun olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışma insan ve vertebralarda sitogenetik çalışmalar için temel teşkil etmektedir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Bunu takip eden yıllarda Turner, Klinefelter ve Down sendromlarının birer kromozomal aneuploidisi olduğu anlaşılmıştır. Levan'ın özel bilimsel ilgisi kanser ile kromozom arasındaki ilişkiye çevrilmiştir. İnsanın akciğer ve mide kanserinde yüksek derecede malign yaymada 70-80 kromozomun bulunduğu 1956 yılında rapor edilmiştir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Amerikalı araştırmacı J. Herbert TAYLOR, 1958 yılında trityumlu timidin ile işaretlenmiş *Bellevalia* (Liliaceae) kromozomlarında kardeş kromatidlerin farklı boyandığını ve kardeş kromatidler arasında parça değişimi olduğunu keşfetmiştir. Daha sonra (özellikle 1970'li yıllarda) kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlayan (sister chromatid differentiation) metotlar geliştirilmiştir. Bundan da mutajenik ve kanserojenik özelliğin saptanmasında bir indikatör test olarak kullanılan kardeş kromatid değişimi (sister chromatid exchange) testi geliştirilmiştir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

Konvansiyonel sitogenetik yöntem halen altın standart olarak yerini korumaktadır. Moleküler sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerle yalnızca hedefe yönelik bilginin alınması, konvansiyonel sitogenetik yöntemin ise tüm genom hakkında bilgi verici olması bu yöntemi vazgeçilmez kılmakta ve yetersiz kalması

konumunda mutlaka diğer yöntemlerle kombinasyonu gerekmektedir (Karaüzüm, 2006).

Günümüzde Philadelphia (Ph) translokasyonunun belirlenmesinde klasik sitogenetik halen altın standart yöntemdir. Ancak bu yöntem sadece bölünmekte olan hücreleri yani metafaz hücrelerini analiz edebilmektedir (Chase, 2001).

Theodor Boveri 1914 yılında yayınladığı “Malign tümörler nasıl oluşur?” isimli makalesindeki teorisi: “Hücre ve organizmadaki normal fonksiyonların meydana gelmesini sağlayan kromozomlar üzerinde yer alan kalıtım birimlerinin dengesidir. Bu dengenin kromozomal değişimler nedeniyle bozulması tümör oluşumuna sebep olur.”Boveri’nin bu teorisinin doğrulanması için yaklaşık elli yıl geçmesi gerekmiştir ve 1960 yılında Nowell ve Hungesford ilk kez bir kromozomal yeniden düzenlenmenin insanda tümöre neden olduğunu KML’ de “Philadelphia kromozomu” ile göstermişlerdir. Philadelphia kromozomunun keşfi ile genom, kromozomlar ve kanser arasındaki ilişki her geçen gün ivme kazanarak araştırılmış ve araştırılmaktadır. Bu sayede oluşan ve oluşmakta olan verilerin sonuçları tanı koyma, prognoz ve terapi planlamada özellikle lösemi ve lenfomada, sitogenetik tanının önemini ortaya koymuştur (Durak, 2005).

### **1.3. Tümör Hücresinin Özellikleri**

Tümör, kontrolsüz hücre proliferasyonu sonucu meydana gelen hücre kitlesine denir. Bu terim bir beden yüzeyinde şişliğe yol açan neoplastik kitleleri tanımlamaktadır.

Normal hücrelerde oluşan başkalaşım ile uyaranların birlikte etkileşimi hücrenin tümör hücresi haline dönüşmesine neden olmaktadır. Bu değişimler, hücrenin normal fonksiyonlarının bozulması ve farklı özellikler kazanmasında etkilidir. Tümör hücresinin bu özellikleri genel olarak aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Tümör hücreleri çok yüksek hücre yoğunluğu olsa da çoğalmaya devam ederler yani kontrolsüz proliferasyon gösterirler.
2. Ekstrasellüler büyüme faktörlerine ihtiyaç azalmıştır. Proliferasyon için kendi büyüme faktörlerini kendileri üretirler.



3. Büyüme faktörlerinin aşırı şekilde üretilmesi, hücre bölünmesinin sürekli uyarılmasına neden olurki bu da otokrin büyümeyi sağlar.
4. Normal hücrelerde hücreler arası iletişim vardır ve bu ilişki hücre bölünmesinin kontrolünde çok önemlidir. Ancak tümör hücrelerinde, hücreler arası iletişim bozulmuştur. Hücre bölünmesinin durdurulması özelliği yitirilmiştir. Bu nedenle, hücrelerde düzensiz çok katlı çoğalma ortaya çıkar.
5. Tümör hücreleri tarafından salgılanan proteazlarla, ekstrasellüler matriks elemanları parçalanır ve malign hücreler komşu dokuya invaze olur.
6. Tümör hücreleri yeni kan damarlarının formasyonunu ( anjiogenezis) sağlayan büyüme faktörlerini salgılar. Bu sayede proliferasyona giren tümör hücrelerine gerekli oksijen ve besin yeni kan damarları ile sağlanır.
7. Hücre farklılaşması yitirilmiştir.
8. Normal hücrelerde yaşanan hücreler apoptoza ( programlanmış hücre ölümü) girerken kanser hücrelerinde apoptozis kaybı vardır. Bu nedenle tümör hücreleri normal hücrelere göre daha uzun yaşarlar (Kumar ve ark, 2003; Nussbaum ve ark, 2005).

### **1.3.1. Ehrlich-Lettre Asit Tümörü (EAT)**

Kansere karşı yeni yöntemler geliştirmek ve tedavilerde başarılı olmak için yapılan çalışmalar, deney hayvanlarında oluşturulan bu deneysel hayvan tümörleriyle sürdürülmektedir. Birçok araştırmaya konu olan deneysel hayvan tümörlerinden biri olan EAT (Ehrlich Asit Tümörü), ilk olarak dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkmış ve Ehrlich ve Apolant (1905) tarafından tümör parçaları fareden fareye deri altına transplante edilerek deneysel tümör haline getirilmiştir (Aktaş, 1996; Taşkın, 2002).

Ehrlich ascites tümörü; farelerde ascites ya da solid şekillerde, yüksek proliferasyon gösteren ve orjini meme dokusundan alan bir tümördür (Stewartv.d., 1959).

EAT'nin sıvı formunun elde edilmesiyle birlikte, çalışmalarda yoğun bir şekilde sıvı tümör kullanılmıştır. Kullanımdaki yoğunluğun nedeni, sıvı formun serbest tümör hücrelerini içeren süspansiyon şeklinde olması ve bunun sonucunda istenilen sayıdaki hücrenin bir başka hayvana transplante edilebilmesidir (Klein, 1951). Dolayısıyla alışılmış basit sayma yöntemleriyle hem transplante edilen tümör hücre sayısının, hem de oluşan tümör büyüklüğünün kolay bir şekilde saptanabilmesi mümkün olmaktadır (Ekinci, 2000).

EAT amaca göre asit form veya solid form olarak kullanılmaktadır. Eğer tümör hücresi içeren asit sıvısı deney hayvanına i.p. yolla enjekte edilirse asit form, s.c. yolla enjekte edilirse solid form elde edilir (Okay, 1998; Zeybek, 1996).

EAT hücreleri, farelerin peritoneal boşluğunda süspansiyon halinde çoğalırlar ve in vitroda yapay yüzeylere yapışmazlar (Aktaş, 1996; Lazebnik vd., 1991; Song vd., 1993; Vinuela vd., 1991). Pasajdan 4-6 gün sonra asit oluşmaya başladığı anlaşılabilir ve toplam 5-12 cc asit teşekkül eder (Gümüştan, 2002).

EAT hücreleri, farenin peritoneal boşluğuna inokulasyonu takiben 2 fazda çoğalırlar. Bu fazlar, hücre sayısının eksponansiyel olarak arttığı **çoğalma fazı** ve bunu izleyen, hücre sayısının hemen hemen sabit kaldığı **plato fazıdır** (Siems, 1993; Grune vd.,1992; Lazebnik vd., 1991; Skog vd., 1990; Tannock, 1961). Yapılan araştırmalarda,  $3 \times 10^6$  EAT hücresinin intraperitoneal enjeksiyonundan sonra hücre sayısının 9. güne kadar eksponansiyel olarak arttığı, 9. ve 10. günden itibaren de plato fazına girildiği görülmüştür (Bulan, 1990; Altun, 1996; Öner, 1985). Başka bir araştırmada ise EAT hücrelerinin çoğalma hızları 4 faz olarak karakterize edilmiştir. Burada  $10^7$  tümör hücresinin intraperitoneal enjeksiyonunu takiben 4 ile 5 gün süren logaritmik faz, 5.ile 13. günlerde hücre sayısında önemli bir artışın gözlemlenmediği plato fazının takip ettiği ve 13. ile 15. günlerde hücre sayısındaki geçici artışı, 15. ile 18. günlerde 2.plato fazının izlediği bulunmuştur (Sızıkla vd., 1981).

EAT hücrelerinin in vivo ortamda çoğalma periyotları boyunca zamana bağlı olarak hücre kinetiklerinde meydana gelen değişiklikler incelenmiş ve 2 günlük EAT hücrelerinde Td (hücrelerin 2 kat olma zamanı): 12 saat, GF (çoğalan fraksiyon): %91-100, Tc (hücre siklus zamanı): 12 saat, o (hücre kaybı): 0 olan değerlerin, 6. günde Td: 60 saat, GF: %90-100, Tc: 42-44 saat, o: 25-30 ve 10 günlük tümörlerde Td: 6 gün, GF: %60-100, Tc: 83 saat, o: 20-40 olduğunu göstermektedir (Bulan, 1990; Kın, 1971; Tannock, 1969). Tümör hücrelerinin transplantasyonlarından sonraki 2. ve 13. günlerde 3H-timidin kullanılarak yapılan diğer bir araştırmada, 13. günde hücre siklus süresinin arttığı ve DNA sentez fazının da oldukça uzadığı gösterilmiştir (Peel ve Fletcher, 1969).

EAT hücrelerinin çoğalma fazından plato fazına geçişleri boyunca, hücre kinetiklerinde meydana gelen değişikliklerin dışında, yapısal bozulmalar (Schmidt vd., 1991; Schwendel vd., 1994; Senger vd., 1983; Siems vd., 1989; Siems vd., 1993; Subiza vd., 1989; Segura vd., 2001; Latha vd., 2000; Justo vd., 2000; Justo vd., 2003; Aktaş, 1996), mitokondri sayısında azalma (Schmidt vd., 1991; Schwendel vd., 1994; Siems vd., 1989; Siems vd., 1993), DNA ve RNA biyosentezinde azalma (Bulan, 1990; Schmidt vd. 1991; Siems vd., 1993; Aktaş, 1996; Siems vd., 1989), intrasellüler pürin, pirimidin nükleotidleri, nükleosidleri ve bazlarının kaybı (Grune vd., 1992; Schmidt vd., 1991; Schwendel vd., 1994; Siems vd., 1989; Siems vd., 1993), ATP içeriği ve ATP dönüşümünde azalma (Siems vd., 1989; Siems vd., 1993; Skog vd., 1989), protein sentezinde azalma (Burns, 1969; Haris vd., 1970; Schmidt vd., 1991; Siems vd., 1993; Skog vd., 1989), timidin kinaz aktivitesindeki azalmadan dolayı timidin konsantrasyonunda artış (Skog vd., 1990; Sızıkla vd., 1981; Aktaş, 1996), glutatyon (GSH) içeriğinde azalma (Estrela vd., 1992; Marquez vd., 1989; Lobo vd., 2000) ve trigliseritlerin, kolesterol esterlerinin ve serbest yağ asitlerinin artması (Balint ve Holczinger, 1984; Aktaş, 1996) gibi morfolojik ve metabolik değişiklikler meydana gelir (Aktaş, 1996).

EAT hücrelerinin sayıları çoğalma periyodu boyunca hızlı hücre bölünmeleri ile artar ve periton boşluğunu doldururlar. Tümör hücrelerindeki bu çoğalmaya paralel olarak asit sıvısının birikimi de meydana gelir. Belli bir zaman sonra da konak hayvan hem tümör hacminin oluşturduğu basınç hem de tümörün organizmaya verdiği hasar

sonucunda ölür (Öner, 1985; Altun, 1996; Aktaş, 1996). Çoğalma fazından plato fazına geçişleri boyunca EAT hücrelerinin canlılık oranlarında önemli bir azalma ortaya çıkmamaktadır. (Schmidt vd., 1991).

Asit sıvısının birikiminde, tümör hücrelerinin asit sıvısının birikimini ilerleten bir vaskular permeabilite faktörünü salgılaması olayı, tümör asit sıvılarında incelenmiş ve sonuç olarak; bu hayvanların periton boşluğunda bulunan damarların kontrol hayvanlardaki aynı damarlara oranlara önemli derecede fazla permeabilite gösterdiği bulunmuştur. Artan bu permeabilitenin, normal plazma veya serumda bulunmayan etkili bir permeabilite faktörünün asit sıvısındaki mevcudiyetinden dolayı olduğu tespit edilmiştir (Senger vd., 1983).

Ehrlich asit sıvısında tümör çoğalması boyunca timidin kinaz aktivitesinin azalmasına paralel olarak timidin miktarının da yükseldiği görülmüştür (Skog vd., 1990; Aktaş, 1996). Tümör çoğalmasının erken evresinde peritoneal sıvıların zayıf şekilde ya da hiç immün baskılayıcı aktivite göstermemelerine rağmen, terminal safhadaki Ehrlich asit sıvılarının immün baskılayıcı oldukları da tespit edilmiştir (Gabrilovac vd., 1982; Parhar ve Lala, 1988; Subiza vd., 1989; Fecchio vd., 1990a; Fecchio vd., 1990b; Segura vd., 1997; Segura vd., 2000; Justo vd., 2000; Justo vd., 2003; Ruiz De Morales vd., 1999).

EAT hücre çoğalmasının plato fazında azalması ile asit sıvısı birikimindeki artış arasında bir korelasyon bulunmaktadır. Lazebnik ve ark. (1991), yaptıkları çalışmada, in vivo şartlarda tümör çoğalmasının plato fazında hücrelerin geriye dönüşümlü olarak geç G<sub>2</sub> fazında biriktiklerini ve bu dönemde asit sıvısı uzaklaştırıldığı takdirde senkron olarak mitoz fazını geçirip G<sub>1</sub> fazına girdiklerini tespit etmiştir. Yine aynı araştırmacılar in vitro şartlarda ortamın asit sıvısı içermesi durumunda, hücrelerin G<sub>1</sub> ve S fazlarını geçirdikten sonra G<sub>2</sub> fazında biriktiklerini de gözlemlemişlerdir. Bu bulgulara dayalı olarak, Ehrlich asit sıvısının hücre siklusunu G<sub>2</sub> fazında durduran önemli bir faktör veya faktörler içerdiğini ileri sürmüşlerdir (Lazebnik vd., 1991). Bu konudaki diğer bir çalışmada da EAT hücrelerinin G<sub>2</sub> ve geç S fazlarında birikimlerine paralel olarak, aynı zamanda hücre siklusundaki uzamanın da eşlik ettiği gösterilmiştir (Benndorf vd., 1988).

Ehrlich asit tümörü taşıyan farelerde, çoğalmanın plato fazında asit sıvısının çoğunun boşaltılması ile tümörün çoğalmasında yeni bir artış meydana gelir (Burns, 1968; Burns, 1969; Bichel, 1971). Bu artış eğer aynı tümörü plato fazında taşıyan bir diğer fareden alınan hücreler asit sıvısı enjekte edilirse yeniden inhibe edilir (Bichel, 1970; Bichel, 1971; Burns ve Solofy, 1970). Bu bulgular da asit sıvısında çoğalmayı inhibe eden bir faktörün mevcut olduğunu göstermektedir (Bichel, 1971). EAT hücrelerinin inkübasyon şartları altında protein sentezini geriye dönüşümlü olarak inhibe eden bir faktörü ortama saldıklarını ve bu faktörün çoğalan EAT hücrelerini çoğalmayan hücreler haline transforme ettiği gösterilmiştir (Werner vd., 1973).

Altun (1996), EAT'li farelerde tümör yaşına bağlı olarak kemik iliği hücrelerinde çoğalma hızının inhibe olduğunu tespit etmiştir. Bu bulgu, Ehrlich asit sıvısındaki inhibitör faktörlerin konak hayvanın normal hücre popülasyonlarına da etkili olduğunu göstermektedir.

Bu araştırmaların dışında, inhibitör etkinin gözlemlenmediği, hatta büyümeyi teşvik edici nitelikte sonuçların elde edildiği çalışmalar da mevcuttur. Altun, EAT'li farelerde karaciğer rejenerasyonunu da incelemiş ve tümöral büyümenin rejeneratif büyümeyi stimüle edici bir etkiye sahip olduğunu tespit etmiştir (1996). Gabrilovac vd. (1982), EAT transplantasyonundan sonra 4. ve 6. günlerde elde edilen peritoneal sıvıların, *in vitro* ortamda Ehrlich karsinoma hücrelerinin çoğalmaları üzerinde etki göstermemesine karşılık, tümör transplantasyonundan sonraki 15. günde toplanan peritoneal sıvıların hücrelerde DNA sentezini arttırdığını göstermişlerdir (Gabrilovac vd., 1982). Burns vd. (1983), tümörün hücreler sıvısından izole edilen Ehrlich ascites karsinoma faktörü (EACF) etkisi ile, yetişkin farenin karaciğer ve diğer dokularındaki DNA sentezinin başlamasını araştırmışlar ve *in vivo* ortamda bu faktörün mitojenik etkisi sonucunda, yetişkin farenin karaciğer, submandibular bez, eksorbital göz yaşı bezi ve dil epitelinde DNA sentezinin başladığını tespit etmişlerdir (Yeh vd., 1985).

#### **1.3.1.1. Solid Formu:**

Ehrlich ve Apollant tarafından 1907 yılında bir farenin meme bezinden çıkarılmış olan Ehrlich Mouse Carcinoma'dan türetilmiştir. Farelere özgü olan (Mouse Specific

Tumor) ve günümüze kadar diferansiye olmadan gelmiş, yaygın olarak kullanılan bir tümör modelidir. %100 transplante edilebilme oranına sahiptir. Tümöre spesifik Transplantasyon antijenleri (TSTA) yoktur. Hiç regresyon göstermez. Virulan özelliğindedir. Malign ve %100 ölüme götürür. Hızlı büyüme özelliği göstermektedir. Tümör hücreleri eşit büyüklükte değildir ve 20-30 mikron çapındadır (Zeybek, 2003).

### **1.3.1.2. 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 artmaktadır, metastatik özelliğe sahiptir. Tedavi uygulanmadığında tümör enjeksiyonundan 7-8 gün sonra ölümler görülmektedir. Eğer ortalama  $2 \times 10^6$ /ml hücre enjekte edilirse yaklaşık 1 haftada 1 cm çapında tümör oluşmaktadır (Zeybek, 2003).

Ehrlich Asit Tümörü, heterotransplantabilite yeteneğine sahiptir. Yayma preparatlarda asit forma ait hücrelerin solid form hücrelerine benzediği görülmektedir. Ancak solid formun hücrelerinin membranları fark edilemezken, asit formda membran açıkça gözlenir. Viseral ve parietal periton tabakaları kalınlaşıp granüllü bir hal almaktadır (Zeybek, 2003).

EAT sıvısı, gri-beyaz bazen hafif kanlı görünümde koyu bir sıvıdır ve 0.1 cc'de yaklaşık 10 milyon neoplastik hücre içermektedir (Kaleoğlu ve İşli, 1977; Aktaş 1996).

EAT, transplante edilebilme oranı yüksek olan, regresyon göstermeyen, hızlı proliferasyona, kısa yaşama süresine sahip, %100 ölüme götüren immunolojik açıdan tümör spesifik transplantasyon antijenlerine sahip olmayan bir tümör modelidir (Kaleoğlu ve İşli, 1977) ve farelere özgü olmasından dolayı EAT'nin çalışılması tümör değerlendirilmesi ve izlenmesi açısından kolaylık sağlamaktadır.

Günümüzde Ehrlich ascites tümörlerinin sitogenetiği nadir olarak çalışılmıştır.

Buradan hareketle monoklonal olarak transplante edilebilen ve pasajlanarak devamı sağlanan Ehrlich asit tümörü pasajlandıkça virulansın ve metastatik kapasitesinin artması fikrinden yola çıkılarak klasik sitogenetik yöntemle EAT'nin pasajlar arası kromozom aberasyonları, mitotik indeksi ve hücre kinetiklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## BÖLÜM 2

### LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Rejeneratif büyüme ile çeşitli tümörler arasındaki ilişkiler, 1900'lü yılların ortalarından itibaren araştırılmaya başlanmıştır. Fisher ve Fisher (1959) karsino sarkoma tipi Walker 256 tümörünü enjekte ettikten hemen sonra parsiyal hepatektomi yaptıkları sıçanlarda, tümör metastas sayılarının parsiyal hepatektomi yapılması ile arttığını, parsiyal hepatektominin tümör enjeksiyonundan 24 veya 48 saat sonra yapılmasıyla ise, ya metastaslarda azalma görüldüğünü ya da herhangi bir etkinin bulunmadığını saptamışlardır.

Hasholt ve Dano (1974), bir Ehrlich asit tümörün karyotipik profilini ve bu tümörün 4 subline'nı incelenmiştir. Bu 4 subline, sırasıyla daunomycin, adriamisin, vinkristin ve vinblastine olan dirençliliği seçilmiştir. Tüm subline'lar dört ajana da ortak direnç göstermiştir. Diğer mitozlar Giemsa bantlama tekniği ile boyandığı için, mitozların bazısı klasik Giemsa tekniği ile boyanmıştır. Diğer üç subline shyper diploid iken, yabancı tip tümör ve vinkristin direnç tümörü yakın-tetraploidi bulunmuştur. Marker kromozom sayısı tespit edilmiştir. Subline karşılıklı direncin, yabancı tiptümörden aynı klon hücrenin seçimi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Ahmed ve ark. (1988), jacalinin Ehrlich asit tümör hücrelerinin *in vivo* büyüme inhibisyonu ve etkileşimi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Jacalin, yapışkan Ehrlich asit hücreleri tespit edilmiştir. Aglütinasyon, lektin-asit etkileşimin karbonhidrata özgüdür ve D-Gal ve  $\beta$ -D-Gal(1  $\rightarrow$  3)-D-GalNAc glikozitler tarafından inhibe edilmiştir. % 21,8 tümör inhibisyonu (asit) hücrelerinin intraperitoneal enjeksiyonu takip eden 6 gün boyunca enjeksiyon yoluyla jacalinden 50  $\mu$ g uygulanan farelerde *in vivo* hücre büyümesi vardır. 100, 150 ve 200  $\mu$ g jacalin uygulaması, sırasıyla % 40.2, 57.5 ve 83 inhibisyonuyla sonuçlanmıştır. Jacalin tarafından *in vivo* tümör hücrelerinin büyüme inhibisyonu, tümör hücre yüzeyindeki glikoprotein terminal artıkları, öncelikle D-Gal-a - (1 $\rightarrow$ 6)'a bağlanmaktadır.



Yapılan bir çalışmada, mikrodensitometrik ölçümler ile DNA miktarları saptanan EAT hücrelerinin sentez yapan nukleusların sayısı günlere bağlı olarak artmakta ve beşinci günde maksimuma ulaştıktan sonra onuncu güne kadar azalmaktadır (Altun, 1993).  $3 \times 10^6$  EAT hücresi enjekte edildikten sonra birinci, ikinci, üçüncü, beşinci ve onuncu günlerde toplanan tümör hücrelerinde; birinci günde 2C DNA miktarına sahip EAT hücre nukleusları populasyonun büyük bir kısmını teşkil ederken, 4C, 6C ve 8C DNA miktarı içeren çok az sayıda nukleus dikkati çekmektedir. İkinci günde 2C DNA miktarı içeren nukleus sayısında bir azalma gözlenirken, 4C DNA miktarı içeren nukleus sayısında bir artış meydana gelmektedir. Üçüncü günde 2C DNA miktarı içeren nukleus sayılarının azalmaya, 4C, 6C, 8C ve 10C DNA miktarı içeren nukleus sayılarının ise artmaya devam ettiği, 12C DNA miktarı içeren çok az sayıda nukleusun bulunduğu gözlenmektedir. Beşinci günde, yaklaşık aynı oranlarda 2C ve 4C DNA miktarı içeren nukleusların yanı sıra, az sayıda 8C ve 4C'den 8C'ye kadar değişen miktarlarda DNA içeren nukleuslara rastlanmaktadır. Son grup 10. günde ise, 4C DNA miktarı içeren nukleusların sayılarında azalma meydana gelirken, 8C ve 10C DNA miktarı içeren nukleusların sayılarının arttıkları ve yine bu grupların ara derecelerini gösteren nukleusların bulunduğu gösterilmiştir (Altun, 1993).

Ayrıca, curcuminin çok etkili sitotoksik bir ajan olarak, Erlich asit tümör modeli oluşturulmuş farelerde, tümör gelişimini anlamlı düzeyde inhibe ederek farelerin yaşam süresini artırdığı bildirilmiştir (Ruby ve ark., 1995).

Yapılan bir çalışmada, fare peritonunda çoğalan Ehrlich ascites tümör hücrelerinde AgNOR sayımları ile 3H-timidin ile damgalanma indeksi karşılaştırılmıştır. Deney sonucunda fare peritonunda üreyen hücrelerin 10. günde AgNOR sayımları ile 3H-timidin ile damgalanma indeksi arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca meme tümörü kökenli olan Ehrlich ascites tümör hücrelerinde hücre proliferasyonu ile östrojen reseptörleri arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır ve östrojen reseptörleri negatif bulunmuştur (İnce ve ark., 1996).

Arıcan ve ark (2005), östrojen-reseptör-pozitif in vivo Ehrlich ascites tümör hücrelerinde epirubisin ve tamoksifen'in  $^3\text{H}$ -timidin işaretlenme indeksi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, östrojen reseptörü pozitif ER (+) hiperdiploid

hücre soyları kullanılmıştır. EPI ve TAM'ın optimum dozları (110 mg ve 20 mg, sırasıyla) kullanılmıştır. Bu dozlar hücrelere 5 ve 9 gün süresince uygulanmıştır. *In vivo* yetişen EAT hücrelerinin çoğalması, EPI ve TAM konsantrasyonları tarafından inhibe edilmiştir. Sonuçlar, TAM ve EPI kombinasyonunun <sup>3</sup>H-timidin işaretleme indeksini, her iki ilacın tek başlarına uygulanmasına göre daha etkili olarak azalttığını göstermiştir (p<0.05). EPI+TAM uygulaması, 5. ve 9. günlerde maksimum sinerjistik etki göstermiştir ve böylece DNA sentezinin inhibisyonu günlere bağlı olarak değişmemiştir. Sonuç olarak, gün faktörünün kombine uygulama ile elimine edilmesi çalışmanın en önemli bulgusu olmuştur.

İnsan meme kanserinin ksenograft modelinde yapılan bir çalışmada diyetle verilen curcumin tedavisinin, NF-kB ve COX2 ekspresyonunu baskılayarak meme kanserinin akciğer metastazları insidansını önemli ölçüde azalttığı öne sürülmüştür (Aggarwal ve ark., 2005).

Gümüştan ve Musa (2008), subkutan, intraperitoneal ve intravenöz yollarla oluşturulmuş Ehrlich asit tümör taşıyan fareler üzerinde adriamisin'in etkinliğini araştırmışlardır. Adriamisin (ADR), *Streptomyces peucetius* var. *caesius*'den izole edilmiş ve sitotoksik özellik gösteren antineoplastik bir ilaçtır. Çalışmada 0. Gün  $3 \times 10^5$  EAT hücresi farelere inoküle edilmiştir. Uygulamadan sonra 2., 4., 6. ve 8. günlerde, farelerin periton boşluğundan asit sıvısının mitoz sayısı ve canlı hücre sayısı sayılmıştır ve istatistiksel olarak değerlendirmişlerdir. En çok tedavi edici özellik gösteren, intraperitoneal yolla oluşturulmuş, ADR uygulanan 1. grupta gözlenmiştir.

Begüm ve ark. (2009), farelerde Ehrlich asit kanseri üzerine *Azima tetracantha* bitkisinin yaprak ekstraktının antikanser aktivitesini çalışmışlardır. Tümör, farelere intraperitoneal yolla ( $1 \times 10^6$  hücre/fare) enjekte edilmiştir. *Azima tetracantha*'nın ethanol ekstratı (EEAT), 100 ve 200 mg/kg gün dozları deney hayvanlarına verilmiştir. Ekstraktın antitümör etkisi, ortalama yaşam süresi, tümör hacmi, canlı tümör sayısı, cansız tümör sayısı kullanılarak değerlendirilmişlerdir. EEAT'nin oral uygulaması, sağkalım sürecini arttırmıştır ve aynı zamanda canlı tümör hücre sayısını

solid tümör hacmini azaltmış, cansız hücre sayısını da arttırmıştır. Bu çalışmanın bulguları, EEAT önemli antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Üstüner (2010), son yıllarda dünyada yaygın olarak kullanılan bir antidepresan preparatın etken maddesi olan fluoksetinin, *in vivo* şartlardaki etkilerini belirlemek amacıyla çalışma düzenlemişlerdir. Sıçan kemik iliği hücrelerinden hazırlanan preparatlar mitotik indeks, sayısal ve yapısal kromozom düzensizliği açısından değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, fluoksetinin farklı doz ve sürelerde hücre bölünmesini önemli derecede baskıladığı, doz zaman artışına bağlı olarak kromozom anomalilerine sebep olabileceği ve mitotik indeksi yani hücre bölünme frekansını azalttığı görülmektedir.

Hanafy (2010), Ehrlich asit tümör hücresi inoküle edilen dişi fareler üzerinde, zencefil özünün *in vivo* olarak sitogenetik etkisini incelemiştir. Çalışmada dişi fareler üzerinde iki grup yapılmıştır. İlk gruba,  $2.5 \times 10^6$  EAT intraperitonel yolla inoküle edilmiştir. İkinci gruba ise EAT inoküle edilmiş hayvanlara iki günde bir, oral yolla zencefil (100 mg/kg vücut ağırlığı) verilmiştir. Ehrlich asit hücrelerindeki kromozomal aberasyonlarının çeşitli tipleri tespit edilmiştir. Bu aberasyonlar ya sayısal ya da yapısal anomalilikler olarak tespit edilmiştir. Ehrlich asit hücreleri, mitotik indeks oranı ve mikronukleus hücrelerinin artışı ile 26 ile 125 arasında değişen farklı kromozom numaraları içermektedir. Ehrlich asit hücrelerindeki mitotik indeks ve mikronukleus hücrelerindeki azalma tespit edilmiş ve EAT'nin kromozomal aberasyonundaki azalma elde edilmiştir. Ekstraktlı tümör hücrelerindeki anomalilerdeki azalma, kromozomal anomaliler ortadan kaldırılmazsa hücreler ya ölmeye (apoptosiz yoluyla) ya da normal olarak bölünmesi için uyarılabilir. Sonuç olarak, zencefil ekstraktı, Ehrlich asit hücreleri üzerinde kemoterapötik etkiye sahiptir. Ekstrakt, tümör hücrelerini diploid normal hücrelere dönüştürmüştür. Çalışmanın sonucunda zencefil gibi diyet ajanların kullanımı, kanser önleyici tedavi gücüne sahip olduğu gözlenmektedir (Hanafy, 2010).

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışı

##### 3.1.1. Kromozom Besi Ortamları

Kromozom besi ortamı A (Biochrom): hücreleri bölünmeye teşvik eden phytohemagglutinin içermemektedir.

Kromozom besi ortamı B (PB-Max –GIBCO)ise: phytohemagglutinin (PHA) içermektedir.

Bu çalışmada her iki medyum da hücre kültürü için kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Kolşisin (Kolkisin) (Sigma)

Kolşisin eriyiği steril kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 mg olacak şekilde (0.06mg/ml) kullanılmıştır.

##### 3.1.3.Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl (Riedel-de Haën) kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içinde stok halinde hazırlanıp ağzı kapalı bir cam kapta buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeterli miktarda alınıp, 37°C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

##### 3.1.4. Fiksatif

1/3: glisial asetikasit/metanol

Fiksatif kullanılmadan ikisaat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp, soğuk

olarak kullanılmıştır.

**Metanol** (CH<sub>3</sub>OH) (Aksın Kimya)

**Glasiyal asetik asit** (CH<sub>3</sub>COOH) (Merck)

### **3.1.5. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)**

Sorensen tamponu, tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır. Bu tampon %5'lik Giemsa boyasının hazırlanmasında kullanılmıştır.

#### **Hazırlanışı:**

Tampon A: 11.34 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B: 14.83 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=9.3).

### **3.1.6. Giemsa (Merck) (%5)**

### **3.1.7. Entellan (Merck)**

## **3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları**

Hassas terazi (Precisa XB 220A), santrifüj (Hettich Universal -320R- marka), inkübatör (Nüve, EN 500), steril kabin (Bilser, Ankara), otoklav (Nüve), -80°C buzdolabı (Hettich), -20°C buzdolabı (Arçelik), +4°C Buzdolabı (Uğur), vorteks (Velp), pH metre (Hanna), ışık mikroskobu (Micros MC 300 A), fotoğraf makinesi (Nicon- coolpix T5100), Cedex XS Cell Analyzer cihazı (Roche), Cedex smart slide (Roche), steril kültür tüpleri, ependorf tüpleri, enjektör, lam, lamel, Pasteur pipeti, erlen mayer, beher, piset, mikropipet (Gilson), mikropipet uçları, filtre kağıdı, şale.

## **3.3. Araştırmada Kullanılan Deney Hayvanları**

Çalışmada deney hayvanı olarak 8-10 haftalık, yaklaşık 30 gr, *Mus musculus* Balb/C türü erkek fareler kullanılmıştır. Bu fareler Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü Fizyoloji Deney Hayvanları laboratuvarından (Şekil 3.1.) temin edilmiştir. Farelere

asit tümör sıvısı oluşturmak amacıyla,  $1 \times 10^6$  EAT hücresi içecek şekilde periton kısmına intraperitoneal (i.p.) yolla enjekte edilmiştir. Bu çalışmada peritondan alınan EAT sıvısı 20 defa pasajlanarak, seri halde 20 EAT pasaj örneği elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan deney hayvanları plastik kafesler içinde (Şekil 3.2.) hazır pellet fare yemi ve musluk suyu ile *ad libitum* şeklinde beslenerek yetiştirilmişlerdir. Yemin içerisinde bulunan maddeler Tablo 3.1.'de ve enerji düzeyleri de Tablo 3.2.'de verilmiştir.



**Şekil 3.1.** Fizyoloji Deney Hayvanları Laboratuvarı



**Şekil 3.2.** Deney Hayvanlarının Yetiştirildiği Kafesler

**Tablo 3.1.** Deney Hayvanlarına Verilen Yemin İçeriği

<b>Yem Maddeleri</b>	<b>Yüzdeleri (%)</b>
Mısır	34
Arpa	5.4
Buğday	13
Kepek	2
Soya Küspesi	25
Balık Unu	8.5
Et- Kemik Unu	4
Kireç Taşı	0.5
DCP	1
Tuz	0.6
Vitamin Karması	1
Mineral Karması	1
Melas	4

**Tablo 3.2.** Deney Hayvanlarına Verilen Yemdeki Besin Maddeleri ve Enerji Düzeyi

Besin maddeleri ve enerji düzeyleri	Yüzdeleri (%)
Kuru Madde	86.32
Ham Protein	23.99
Kalsiyum	1.17
Fosfor	0.9
Met + Sis	0.77
Lizin	1.48
Ham Yağ	3
Ham Selüloz	3.18
Metabolik Enerji (kcal/kg)	2658.31

#### **3.4. *Mus musculus* Balb/C Türü Farelerde Ehrlich Ascites Tümör (EAT) Oluşturulması**

Çalışmamızda sıvı tümör oluşturulmasında Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarından temin edilen, yaklaşık 30 gr ağırlıkta olan 8-10 haftalık *Mus musculus* Balb/C farelerin peritonuna bu hücreler rutin olarak 7-10 günde bir fareden fareye transplante edilerek üretilmiştir. Tümör hücrelerinin transplantasyon işlemi için steril enjektörlerle verici farenin periton boşluğundan, içinde tümör hücrelerinin bulunduğu asit sıvısı alınmakta ve 0.1 ml PBS (Fosfat tamponu) içinde sulandırılarak yaklaşık  $1 \times 10^6$  EAT hücre/ml konsantrasyonu elde edilmiştir. Bu süspansiyondan her bir alıcı fareye i.p. (intraperitoneal) yolla 0.2 ml enjekte edilmiştir. EAT sıvısının her pasajı steril ependorf tüplere alınarak  $-80^{\circ}\text{C}$  dolapta muhafaza edilmiş olup, tüm pasajların sitogenetik çalışması yapılmıştır.

#### **3.5. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması**

Preston ve ark. (1987)'nin standart prosedürü modifiye edilerek Ehrlich asit tümör hücreleri preparatları hazırlanmıştır.



Öncelikle, kromozom besi ortamları, steril kabinde, hazır olarak temin edilen vida kapaklı steril kültür tüplerinin her birine 2.5 ml konmuştur. Steril enjektör ile -80°C 'den çıkarılıp eritilen EAT sıvısından 0.5 ml, 2.5 ml'lik steril enjektörlerle alınarak, tümör sıvısı kromozom medyumuna içerisine ekilmiştir.

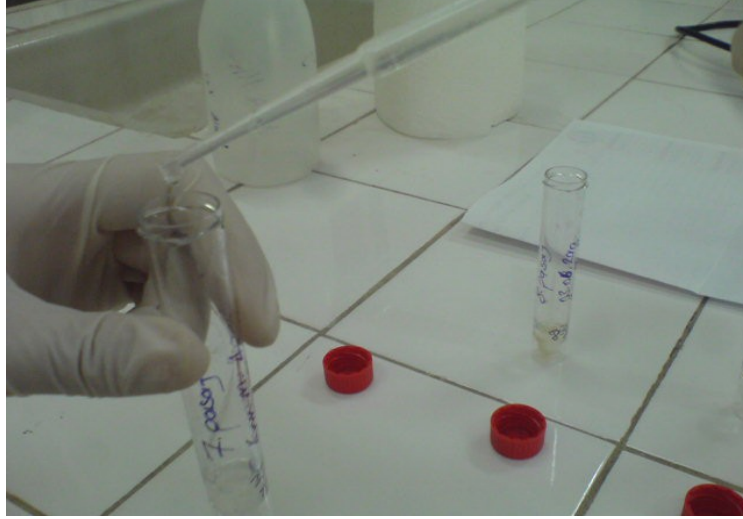
Hücre kültürü, etüvde 37°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi çalışmalarımızda deneme yöntemiyle sabitlenmiştir. İnkübasyonun son 2. saatinde iğ iplikçikleri inhibitörü olan kolşisinden, her bir tüp için 20 µl olacak şekilde kolşisin eklenmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda, tüplerin kapağı açık şekilde 2000 devir/dakikada tüpler 5 dakika santrifüj edilmiştir (Şekil 3.3.a.). Santrifüj sonunda tüplerin dibinde yaklaşık 1 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant kısmı atılmıştır (Şekil 3.3.b.). Süpernatant alınırken sıvının yüzeyinde asılı duran yağ damlacıklarının da süpernatantla beraber atılmasına dikkat edilmesi gerekmektedir.



**Şekil 3.3.a.** Tüplerin Santrifüje Yerleştirilişi **b.** Tüplerin Süpernatant Kısmının Atılışı

Tüplerin dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden sıvı içerisinde hücreler, pastör pipetiyle pipetaj yapılarak dağıtılmıştır, sonra üzerine damla damla ve karıştırılarak 37°C' de ısıtılmış ve bidistile su içerisinde hazırlanmış hipotonik eriyik (%0.4 KCl) ilave edilmiştir (Şekil 3.4.). Her tüpe 5-6 ml %0.4 KCl ilave edildikten sonra kültür tüpleri 37°C'lik etüvde 10 dakika muamele edilerek hücrelerin şişmesi sağlanmıştır.



**Şekil 3.4.** Tüplere Hipotonik Solüsyonun (KCl) Damlatılışı

Hipotonik eriyik ile muamele süresi sona erdiğinde, tüpler tekrar 1200 devir/dak. 10 dakika santrifüj edilmiş, yine süpernatant kısım atılmıştır.

Tüplerin dibinde kalan hücre süspansiyonu hafifçe karıştırıldıktan sonra 1-2 saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmış olan soğuk fiksatif ile muamele edilmiştir. Fiksatif (1/3: glacial asetik asit/metanol) ilavesi hipotonik eriyikte olduğu gibi damla damla ve karıştırılarak yapılmalıdır. Hücreler oda ısısında 15 dakika fiksatif ile muamele edilmiştir.

Süre sonunda tüpler 1000 devir/dak. 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Fiksatif ile muamele 2 veya 3 defa tekrarlanmıştır (tüpteki sıvı tamamen berrak bir durum alınca kadar fiksatif ile muameleye devam edilmiştir). Son fiksatif ilavesinden sonra tüplerin dibinde yaklaşık 1 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmış ve preparat yapma işlemine geçilmiştir. Tüplerin dibinde bırakılacak sıvı hücrelerin yoğunluğuna göre 1ml' den daha az veya daha fazla olacak şekilde ayarlanabilmektedir.

Preparat yayma işleminde, daha önceden kimyasal olarak temizlenmiş ve saf su içeren şale içerisinde buzdolabında saklanmış olan soğuk lamalar kullanılmıştır. Tüplerin dibinde toplanan hücreler pastör pipetiyle karıştırılarak homojen hale

getirilmiştir. Pasteur pipetinde 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Pasteur pipetinden soğuk lam üzerine 45 cm yükseklikten farklı alanlara hücre süspansiyonundan damlatılarak (her lama 3 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerine yayılması sağlanmıştır (Şekil 3.5.).



**Şekil 3.5.** Preparatların Pasteur Pipetinden Soğuk Lam Üzerine 45 cm Yükseklikten Farklı Alanlara Damlatılışı

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce lamlar şaleyeye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N Nitrik asit konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. 3-4 defa saf sudan geçirdikten sonra şaleyi saf su ile doldurarak lamlar buzdolabında saklanmıştır.

İlk hazırlanan preparat, ışık mikroskopunda incelenerek hücrelerin patlayıp, kromozomların dağılıp dağılmadığı kontrol edilmiştir. Eğer kromozomların dağıtılması istenen düzeyde değilse damlatma yüksekliği biraz daha arttırılabilir veya bir sonraki çalışmada Ehrlich asit sıvı hücreleri hipotonik eriyikle biraz daha fazla muamele edilerek kromozomların amaca uygun olarak iyice dağılması sağlanmıştır.

Hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletilmiştir. Bu esnada preparatlar üzerine toz konmasını engellemek amacıyla preparatların üzerleri örtülmüştür.

### **3.6. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması**

Bir günlük preparatlar şaleye dizilerek (Şekil 3.6.) Sorensen tamponu içerisinde hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası içinde 10-15 dakika boyanmıştır (Şekil 3.7., Şekil. 3.8.). Bu sürenin sonunda boyadan çıkarılan preparatlar 3 ayrı kaptaki saf sudan geçirildikten sonra (Şekil. 3.9.) 1 gün kurumaya (Şekil.3.10.) bırakılmıştır.

#### **3.6.1. %5'lik Giemsa'nın Hazırlanışı:**

5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak, üzeri saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır (pH: 6,8). Sonra bu boya filtre kâğıdı ile şale içine süzölmüştür.

Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Yapıştırıcı kuruduktan sonra (1 gün sonra) bu daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır.



**Şekil 3.6.** Bir Günlük Preparatların Şaleye Dizilişi



**Şekil 3.7.** Şaleye Dizilen Preparat Örneklerinin Boyanışı



**Şekil 3.8.** Preparatların Giemsa Boyasında Bekleyişi



**Şekil 3.9.** Boyama Sonrası Preparatların 3 Ayrı Kaptaki Saf Sudan Geçirilişi



**Şekil 3.10.** Preparatların Etiketlendirilip 1 Günlük Kurumaya Bırakılışı

### 3.7. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Micros MC 300 A marka ışık mikroskopunda immersiyon yağı damlatılarak 100X objektifte incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede).Nicon-coolpix T5100 fotoğraf makinesi yardımıyla preparatların görüntüleri alınmıştır. Mitoz bölünme geçiren hücrelerin metafaz ve interfaz

devresindeki hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

Ayrıca her pasajın kromozom sayısının tespiti için, her bir pasaj için toplam 30 metafaz hücresinde kromozomlar sayılarak, bunların ortalaması alıp her pasaja ait kromozomlar sayılmıştır.

### **3.8. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması**

Mitotik indeksi saptamak amacıyla, her bir pasaja ait preparatlarda toplam 1000 hücre incelenmiş ve bunlar arasında metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. Metafaz devresindeki hücrelerin sayısının toplam hücre sayısına oranlanması ile MI yüzde cinsinden hesaplanmıştır.

$MI = M \times 100 / T$  (M: Metafaz hücre sayısı, T: Toplam hücre sayısı) formülüne göre hesaplanmıştır.

### **3.9. Ehrlich Asit Tümör Sıvı Pasajlarının Hücre Kinetiği**

Çalışmamızda Cedex XS Cell Analyzer cihazı (Roche) kullanılarak, Ehrlich asit tümör sıvı pasajlarının hücre kinetiğine bakılmıştır. Bu cihaz, Tripan Mavisı boyama yöntemi ile yarı-otomatik olarak hücre konsantrasyonu ve canlılığı hakkında bilgi sağlayan hücre analiz sistemidir. Yüksek çözünürlüklü kamerası sayesinde yüksek doğrulukla ölü canlı ayırımı yapılabilmektedir. Çalışmamızda, her bir pasaj için ayrı ayrı; Tripan Mavisinden 10µl, her EAT sıvısından 1µl, PBS tamponundan 20 µl olacak şekilde elde edilen karışım steril endorfa eklenip, karışıma pipetaj yapılmış ve hücre sayım preparatlarına karışımdan 10µl konularak, ölçümleri yapılmıştır.

## BÖLÜM 4

### BULGULAR

Tümör hücrelerinde metafaz kromozomu eldesi zorluğu bilinen bir gerçektir. Elde edilen bu metafaz kromozomlarının morfolojileri çoğunlukla klasik sitogenetik yöntemlerle özellikle yapısal anomalileri ortaya koyabilmede yetersiz kalabilmektedir. Ehrlich asit hücrelerinin mitotik indeksi hesaplanmıştır.

Ehrlich asit tümör sıvısı pasajlandıkça virulans özelliği artmaktadır. Buradan yola çıkarak, bu çalışmada *Mus musculus* Balb/C türü farelerde oluşturulan Ehrlich asit tümörü fareye inoküle edildiği ilk günden itibaren, ardı ardına, toplamda 20 adet pasaj yapılmıştır, her bir pasaj için kromozom sayılarak, kromozomlardaki sayısal artış, bölünen hücreler sayılarak mitotik indeks ve hücre kinetikleri değerlendirilmiş ve ardından kromozom görüntüleri fotoğraflandırılmıştır.

Çalışmada hücre ekimi için kullanılan kromozom medyum B, hücreleri bölünmeye teşvik eden phytohemagglutinin içermektedir. Kromozom medyum A'da ise phytohemagglutinin içermemektedir. Çalışmamızda EAT hücrelerinin bölünmeye teşviki için, her iki medyumda (Kromozom medyum A ve kromozom medyum B) kullanılmıştır, her iki medyumda da aynı sonuç gözlenmiştir (Tablo 4.1.).

Tez çalışmamızda, fareden taze bir şekilde alınarak çalışılan EAT sıvı örneği ile -80°C'de muhafaza edilerek çalışılan EAT sıvı örneği çalışmaları farklılık göstermemiştir.

Ayrıca bu çalışmada, Ehrlich asit tümör sıvısının hücre ekimi yapıldıktan sonraki deney aşamalarındaki muamele süreleri çalışmalarımızda deneme yanılma yöntemiyle sabitlenmiştir. İnkübasyon süresi 4 gün, KCl muamele süresi 15 dk, Giemsa boyama süresi ise 15-20 dk olarak ideal görülmüştür. Her pasajda kullanılan kimyasalların muamele süreleri, inkübasyon süreleri Tablo 4.1'de verilmiştir.



Ayrıca, çalışmamızdaki her pasajın mitotik indeksi hesaplanmış ve hücre kinetiğine bakılmıştır. Mitotik indeks hesaplamaları sonucunda; pasaj sayısı arttıkça, pasaj tarihine paralel olarak artışlar olduğu gibi azalmalar da görülmektedir. Mitotik indeksin sayılarının % olarak fazla olması, pasajlama tarihi ilerledikçe mitotik aktivitesini kaybetmediğini, bazı pasajlarda arttığını, bazılarında azalma görülse bile %'lik olarak bile yüksek bir sayıya tekabül ettiği görülmektedir. 1. pasajdan 4. pasaja kadar mitotik indekslerde sırasıyla % 0.5, % 9.0, % 6.3 artış gözleendiği gibi, 5. pasajda %1.1 azalış, 6. pasajda % 6.7 azalış, 7. pasaja bakıldığında % 3.6 artış, 8. pasajda % 2.6 azalış, 9. pasajda % 12.0 artış, 10. pasajda % 1.5 artış, 11. pasajda % 2.5 artış, 12. pasajda % 3.0 artış, 13. pasajda % 6.2 azalış, 14. pasajda % 20.3 azalış, 15. pasajda % 8.7 artış, 16. pasajda % 2.3 artış, 17. pasajda % 10.1 azalış, 18. pasajda % 12.5 artış, 19. pasajda % 19.9 artış, 20. pasajda ise % 7.2 azalış görülmektedir (Tablo 4.2.).

Cedex XS cihazında sayılan EAT hücrelerinin hücre kinetiği sayılarında, mitotik indeks oranları paralel artış ya da paralel azalış gösterdiği gibi, zıt oranlar da görülmektedir. 2. pasajda % 21.6 azalış, 3. pasajda % 1.6 azalış, 4. pasajda % 17.6 artış, 5. pasajda % 1.3 artış, 6. pasajda % 18.3 azalış, 7. pasaja bakıldığında % 34.1 artış, 8. pasajda % 25.4 azalış, 9. pasajda % 30.0 artış, 10. pasajda % 14.7 azalış, 11. pasajda % 13.9 azalış, 12. pasajda % 4.2 artış, 13. pasajda % 10.2 artış, 14. pasajda % 1.5 artış, 15. pasajda % 0.5 artış, 16. pasajda % 5.3 artış, 17. pasajda % 13.6 artış, 18. pasajda % 37.7 azalış, 19. pasajda % 14.0 artış, 20. pasajda ise % 18.4 artış görülmektedir (Tablo 4.3.).

**Tablo 4.1.** Çalışmada kullanılan EAT sıvı pasajları

<b>Pasaj Sayısı</b>	<b>Pasajlama Tarihi</b>	<b>Krm. Medyum A</b>	<b>Krm. Medyum B</b>	<b>Etiv Süresi</b>	<b>KCl süresi (dk)</b>	<b>Giemsa süresi (dk)</b>
1. pasaj	05.05.2010	X	X	5 gün	10	15
2. pasaj	21.05.2010 21.05.2010	X X	- -	5 gün 4 gün	15 6	15
3. pasaj	03.06.2010	-	X	5 gün	15	15
4. pasaj	14.06.2010	-	X	2 saat	15	15
5. pasaj	24.06.2010	X	X	4 gün	15	15
6. pasaj	08.07.2010	X	-	4 gün	20	15
7. pasaj	21.07.2010	X	X	4 gün	20	15
8. pasaj	03.08.2010	X	X	4 gün	30	15
9. pasaj	16.08.2010	X	X	A: 5 gün B: 6 gün	A: 15 B: 20	15
10. pasaj	06.09.2010	X	-	6 gün	20	15
11. pasaj	17.09.2010	X	-	6 gün	20	15
12. pasaj	<b>28.09.2010</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>4 gün</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
13. psj	11.10.2010	-	X	4 gün	10	15
14. psj	17.10.2010	-	X	4 gün	10	15
15. pasaj	14.11.2010	X	X	3 gün	7	15
16. pasaj	03.12.2010	X	X	4 gün	10	15
17. pasaj	09.12.2010	-	X	4 gün	10	15
18. pasaj	15.12.2010	-	X	4 gün	10	15
19. pasaj	21.12.2010	X	-	4 gün	10	15
20. pasaj	31.12.2010	-	X	4 gün	10	15

#### 4.1. Ehrlich Asit Tümör Hücrelerinin Mitotik Aktivitesi

Çalışmamızda 20 adet Ehrlich asit tümör pasajları mitotik aktivite açısından değerlendirilmiştir. Mitotik indeksi saptamak amacıyla, her bir pasaj için toplam 1000 hücre incelenmiş ve bunlar arasında metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. Her pasaj için mitoza giren hücre sayısı ve mitotik indeksi Tablo 4.2’de verilmiştir.

**Tablo 4.2.** Ehrlich Asit Tümör Hücrelerinin %MI değerleri

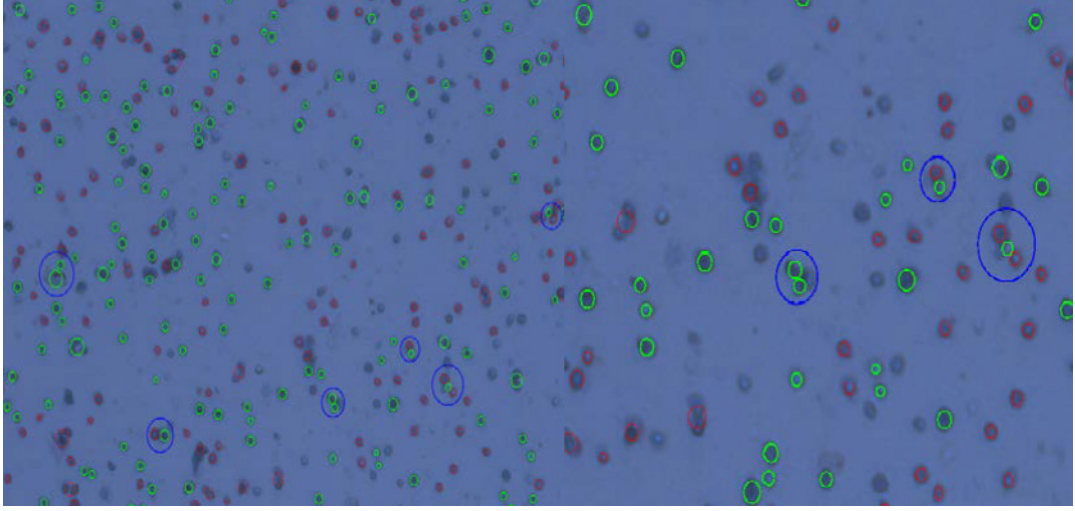
<b>Pasaj Sayısı</b>	<b>n</b>	<b>Mitoza Giren Hücre Sayısı</b>	<b>% MI</b>
1.pasaj	1	720	72.0
2.pasaj	1	725	72.5
3.pasaj	1	815	81.5
4.pasaj	1	878	87.8
5.pasaj	1	867	86.7
6.pasaj	1	800	80.0
7.pasaj	1	836	83.6
8.pasaj	1	810	81.0
9.pasaj	1	930	93.0
10.pasaj	1	945	94.5
11.pasaj	1	960	96.0
12.pasaj	1	990	99.0
13.pasaj	1	928	92.8
14.pasaj	1	725	72.5
15.pasaj	1	812	81.2
16.pasaj	1	835	83.5
17.pasaj	1	734	73.4
18.pasaj	1	659	65.9
19.pasaj	1	858	85.8
20.pasaj	1	786	78.6

% MI: %Mitotik İndeks, n: Fare Sayısı

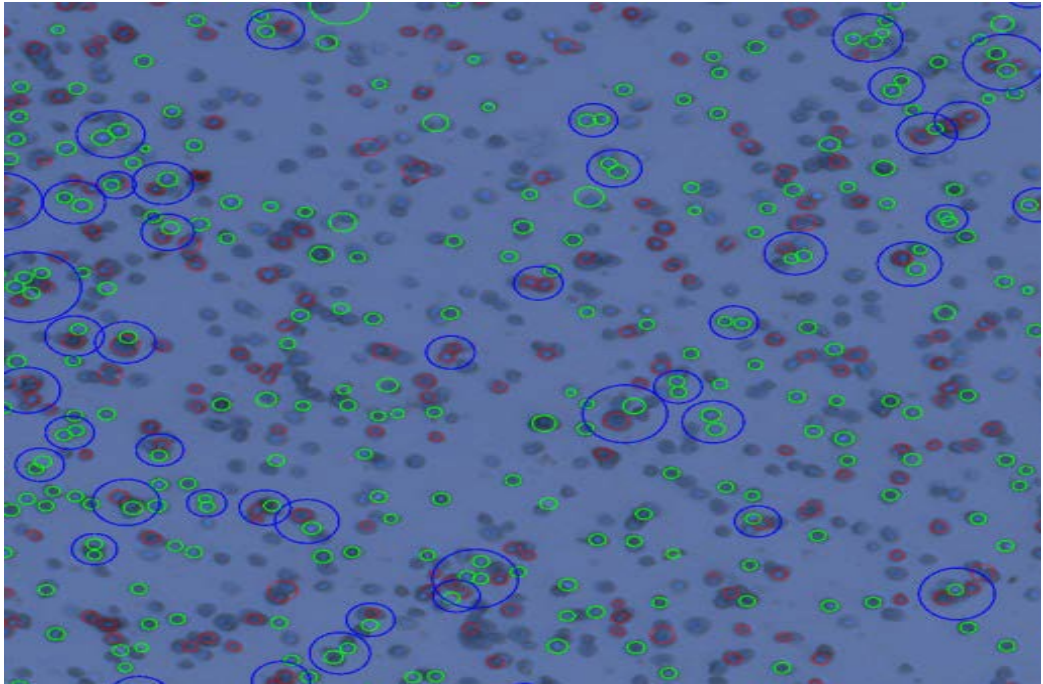
**Tablo 4.3.** Ehrlich Asit Tümör Hücrelerinin Kromozom Sayısı, Mitotik İndeks Ve Hücre Kinetiği

Pasaj Sayısı	Pasajlama Tarihi	Kromozom Sayısı	Mitotik İndeks (%)	Canlı Hücre Sayısı	Ölü Hücre Sayısı	Hücre Kinetiği (%)
<b>1. pasaj</b>	05.05.2010	27	72.0	674	566	54.4
<b>2. pasaj</b>	21.05.2010	21	72.5	64	131	32.8
<b>3. pasaj</b>	03.06.2010	24	81.5	15	33	31.2
<b>4. pasaj</b>	14.06.2010	-	87.8	540	566	48.8
<b>5. pasaj</b>	24.06.2010	19	86.7	752	750	50.1
<b>6. pasaj</b>	08.07.2010	21	80.0	101	217	31.8
<b>7. pasaj</b>	21.07.2010	19	83.6	1218	629	65.9
<b>8. pasaj</b>	03.08.2010	19	81.0	32	47	40.5
<b>9. pasaj</b>	16.08.2010	27	93.0	1241	519	70.5
<b>10. pasaj</b>	06.09.2010	24	94.5	1030	817	55.8
<b>11. pasaj</b>	17.09.2010	24	96.0	658	912	41.9
<b>12. pasaj</b>	28.09.2010	29	99.0	728	852	46.1
<b>13. pasaj</b>	11.10.2010	29	92.8	924	717	56.3
<b>14. pasaj</b>	17.10.2010	19	72.5	1478	1077	57.8
<b>15. pasaj</b>	14.11.2010	21	81.2	14	10	58.3
<b>16. pasaj</b>	03.12.2010	31	83.5	965	855	53.0
<b>17. pasaj</b>	09.12.2010	19	73.4	1390	698	66.6
<b>18. pasaj</b>	15.12.2010	27	65.9	368	907	28.9
<b>19. pasaj</b>	21.12.2010	-	85.8	548	729	42.9
<b>20. pasaj</b>	31.12.2010	21	78.6	513	324	61.3

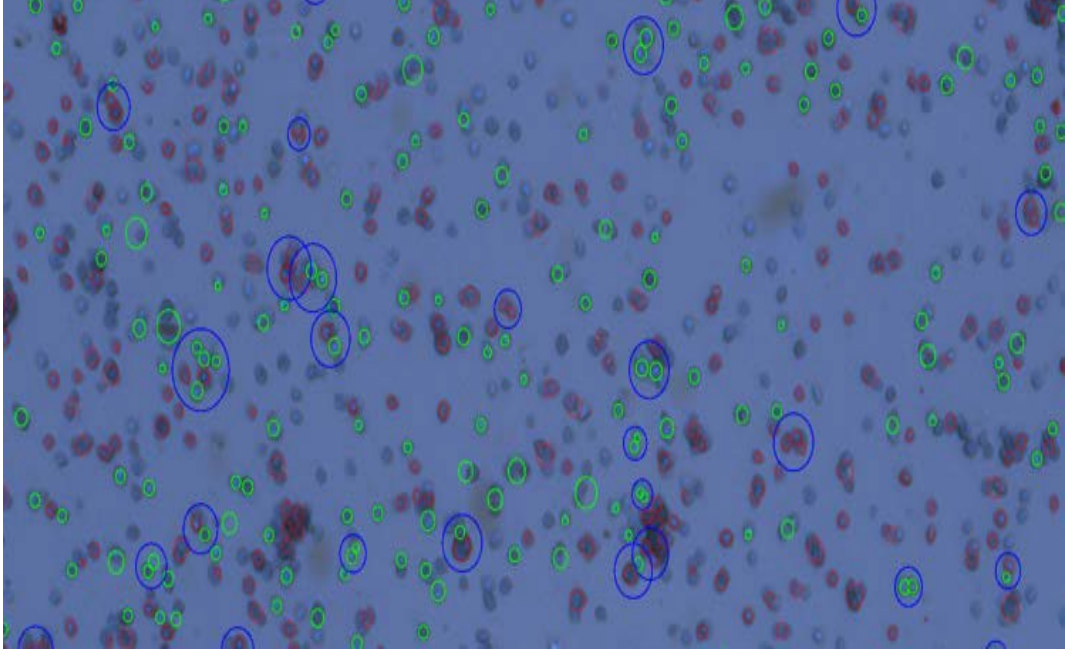
Çalışmadaki her bir pasajdan alınan Ehrlich asit sıvısı içinde yer alan canlı ve ölü hücre görüntülerinden, 1. pasaj,10. pasaj, 12. pasaj ve 20. pasajların görüntüleri verilmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4.).



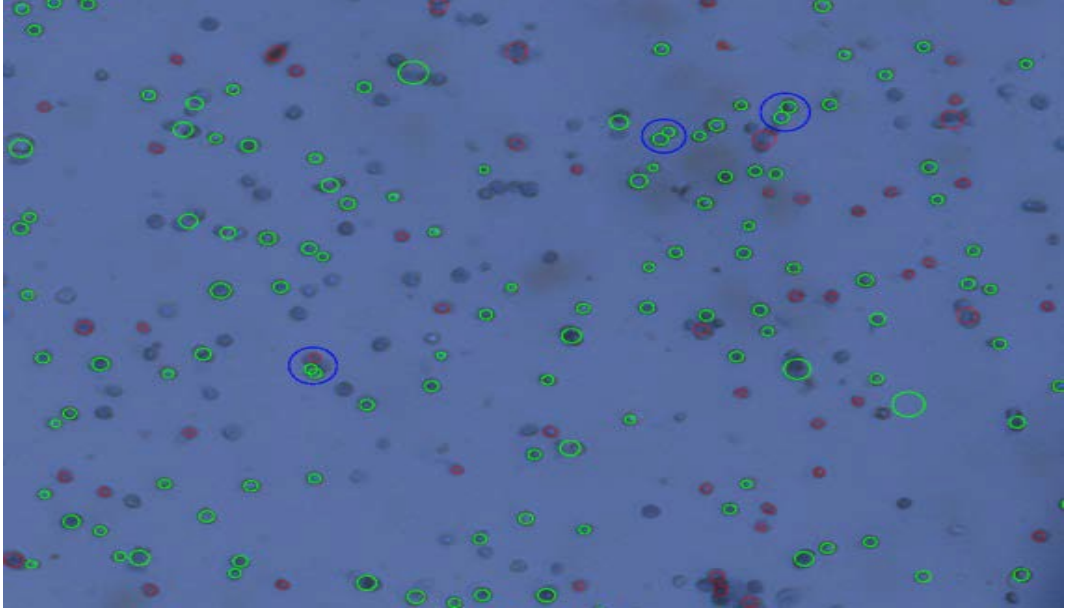
**Şekil 4.1.** 1. Pasajdan Alınan Ehrlich Asit Sıvısı İçinde Yer Alan Canlı ve Ölü Hücre Görüntüsü (Yeşil renkte olanlar: canlı hücreler, kırmızı renkte olanlar: ölü hücreler, mavi renkte olanlar ise: agregasyonu göstermektedir.)



**Şekil 4.2.** 10. Pasajdan Alınan Ehrlich Asit Sıvısı İçinde Yer Alan Canlı ve Ölü Hücre Görüntüsü (Yeşil renkte olanlar: canlı hücreler, kırmızı renkte olanlar: ölü hücreler, mavi renkte olanlar ise: agregasyonu göstermektedir.)



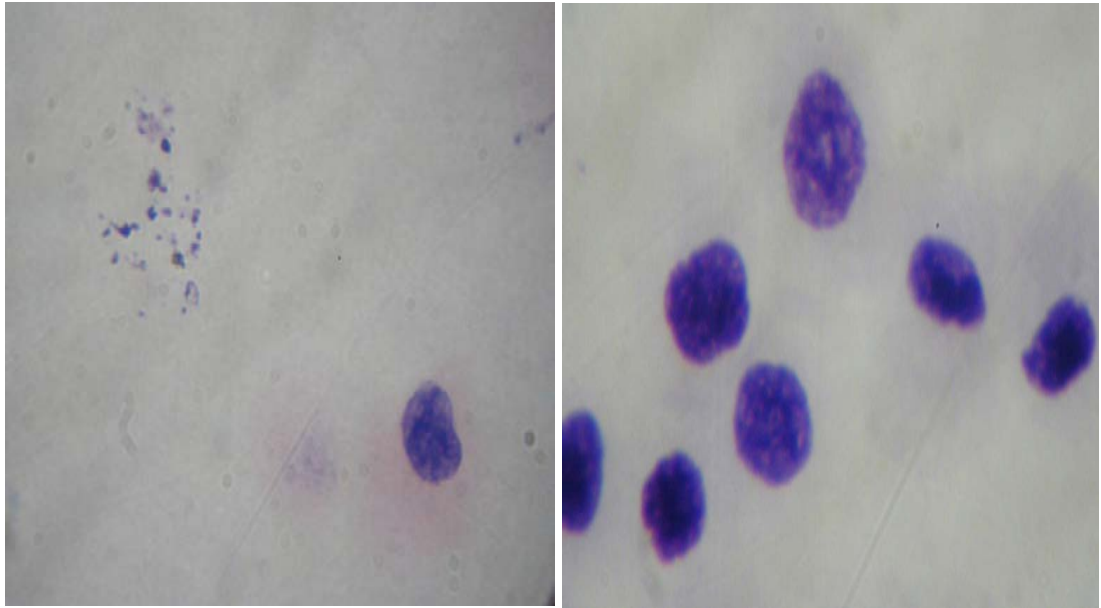
**Şekil 4.3.** 12. Pasajdan Alınan Ehrlich Asit Sıvısı İçinde Yer Alan Canlı ve Ölü Hücre Görüntüsü (Yeşil renkte olanlar: canlı hücreler, kırmızı renkte olanlar: ölü hücreler, mavi renkte olanlar ise: agregasyonu göstermektedir.)



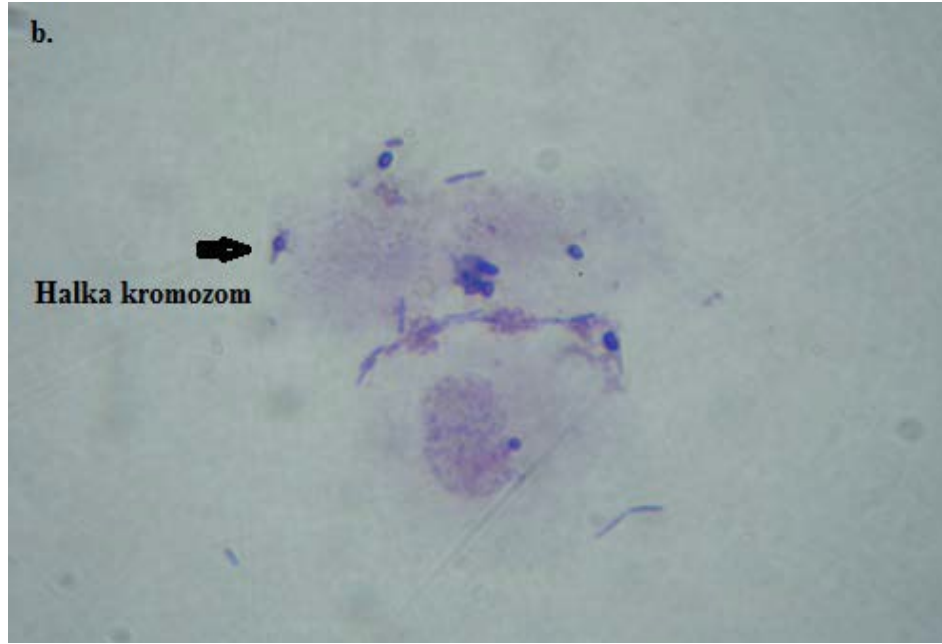
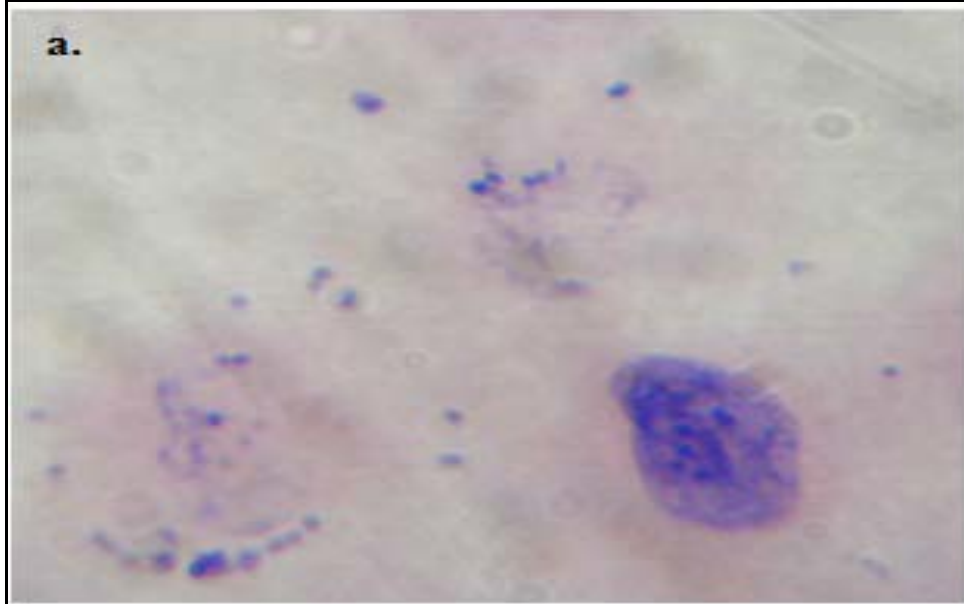
**Şekil 4.4.** 20. Pasajdan Alınan Ehrlich Asit Sıvısı İçinde Yer Alan Canlı ve Ölü Hücre Görüntüsü (Yeşil renkte olanlar: canlı hücreler, kırmızı renkte olanlar: ölü hücreler, mavi renkte olanlar ise: agregasyonu göstermektedir.)

Klasik sitogenetik uygulamasından sonra sayılan EAT sıvı hücrelerinin kromozom sayıları Tablo 4.3'te görüldüğü gibidir. 5., 7., 8., 14. ve 17. pasajlardaki EAT hücrelerinin kromozom sayıları **19**; 2., 6., 15. ve 20. pasajlarda kromozom sayısı **21**; 3., 10. ve 11. Pasajlardaki EAT hücrelerinin kromozom sayıları **24**; 1., 9. ve 18. pasajlarda kromozom sayıları **27**; 12. ve 13. pasajlardaki kromozom sayıları **29**; 16. pasajdaki EAT hücresinin kromozom sayısı ise **31** olarak sayılmıştır. 4. pasajda, 2 saatlik inkübasyon yeterli olmadığı için hücreler interfaz aşamasında kalmıştır, dolayısıyla kromozomları sayılamamıştır. 19. pasaj ise laboratuvar aşamasında kromozomlar iyi boyanmadığından dolayı 19. pasajın kromozomları sayılamamıştır.

Bu çalışmadaki 1., 3., 10., 12., 13., 14. ve 18. pasajların, interfaz ve metafazdaki kromozom görüntüleri verilmiştir ( Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.).

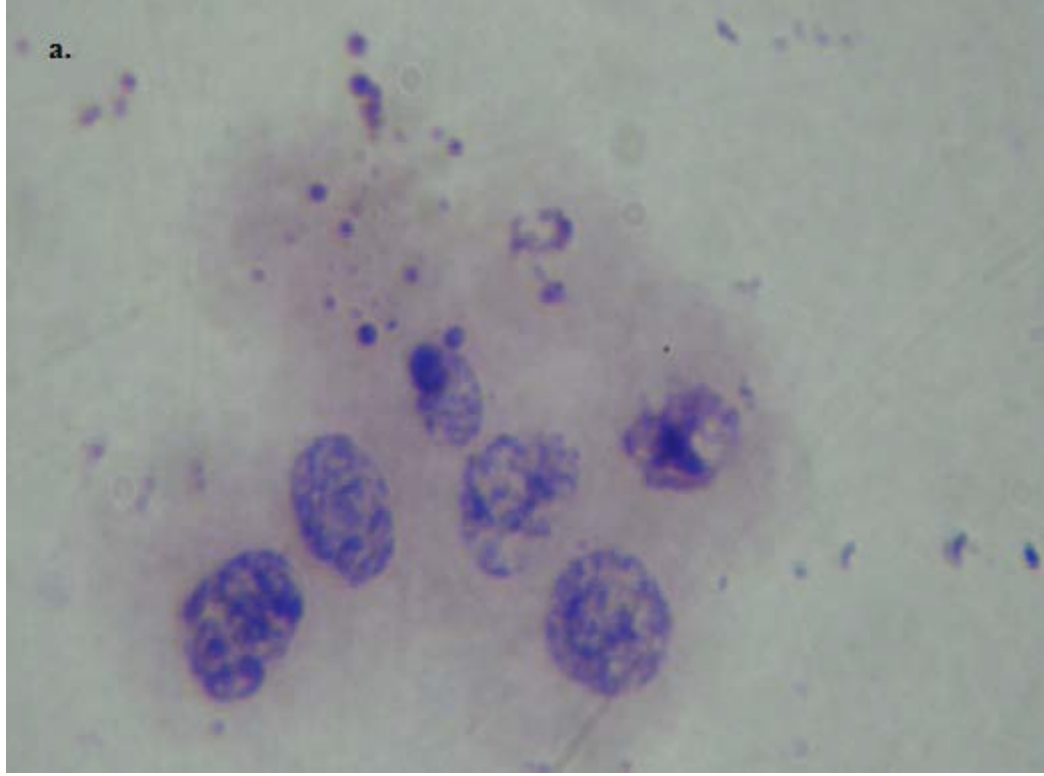


**Şekil 4.5.** 1. Pasajdaki Metafazdaki Kromozom Dağılımı (solda) ve İnterfaz Hücreleri (sağda)

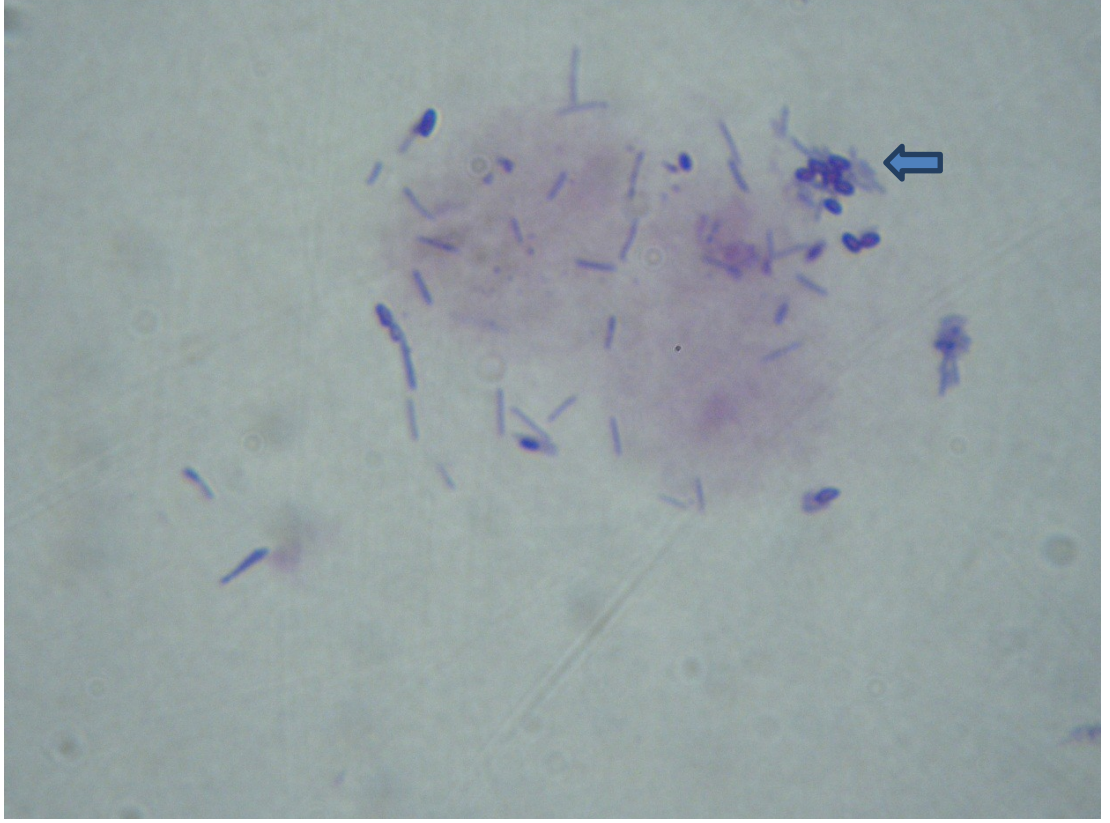


**Şekil 4.6. 3. Pasajdaki Hücre Büyüme Evreleri a. İnterfaz b. Metafaz Hücresi**



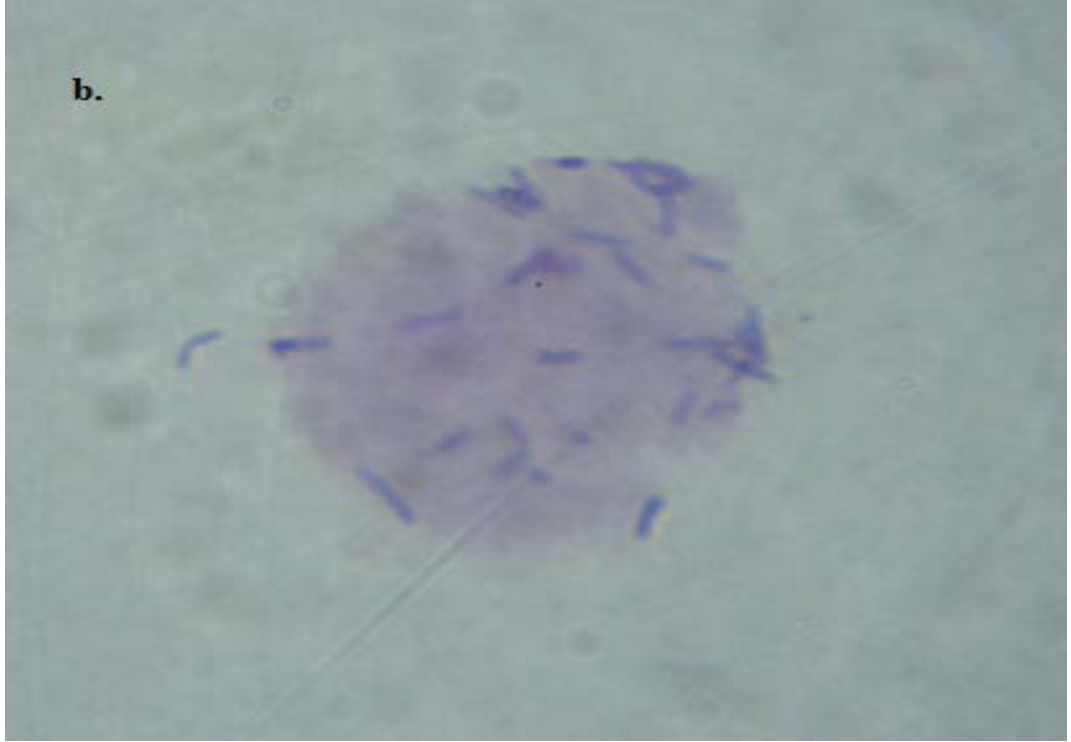
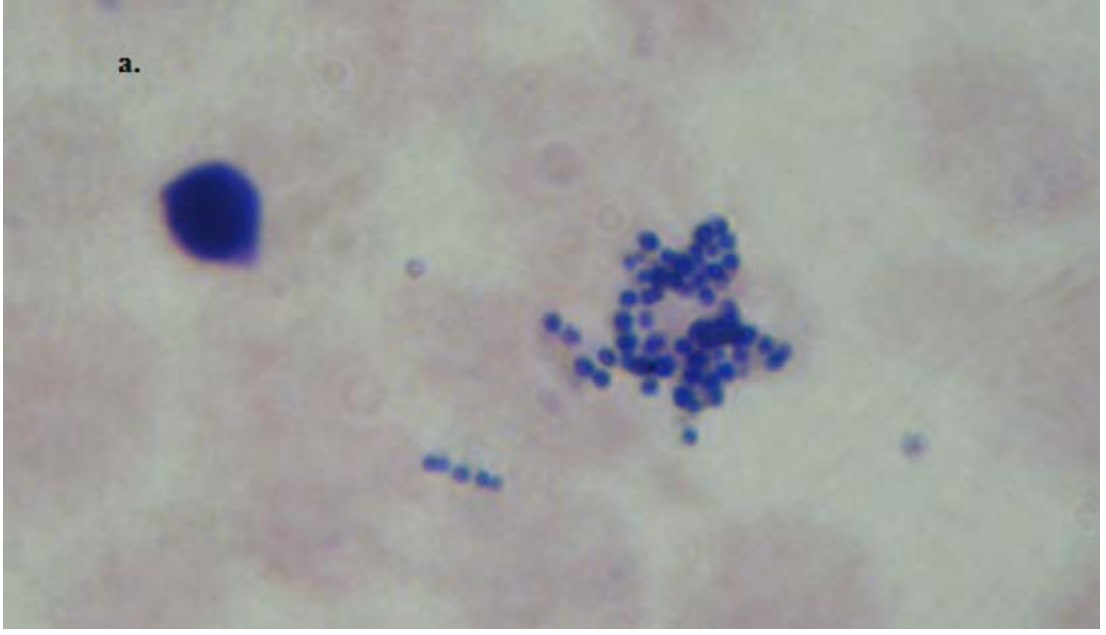


Şekil 4.7. 10. Pasajdaki Hücre Büyüme Evreleri **a.** **b.** Metafaz **b.** İnterfaz Hücresi

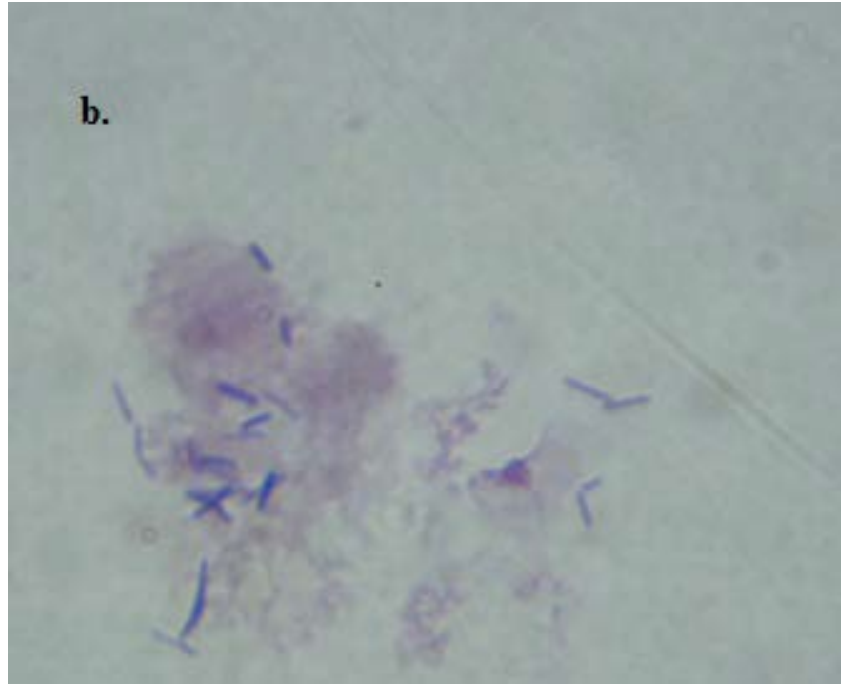
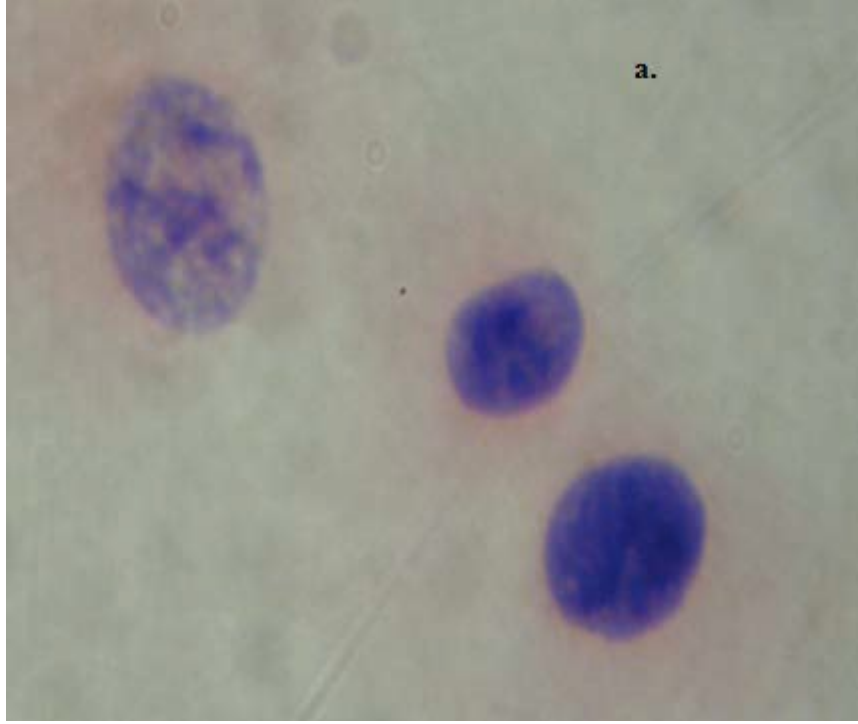


**Şekil 4.8.** 12. Pasajdaki Metafazdaki Kromozom Dağılımı (Ok işaretiyle gösterilen kromozomlar halka kromozomları)

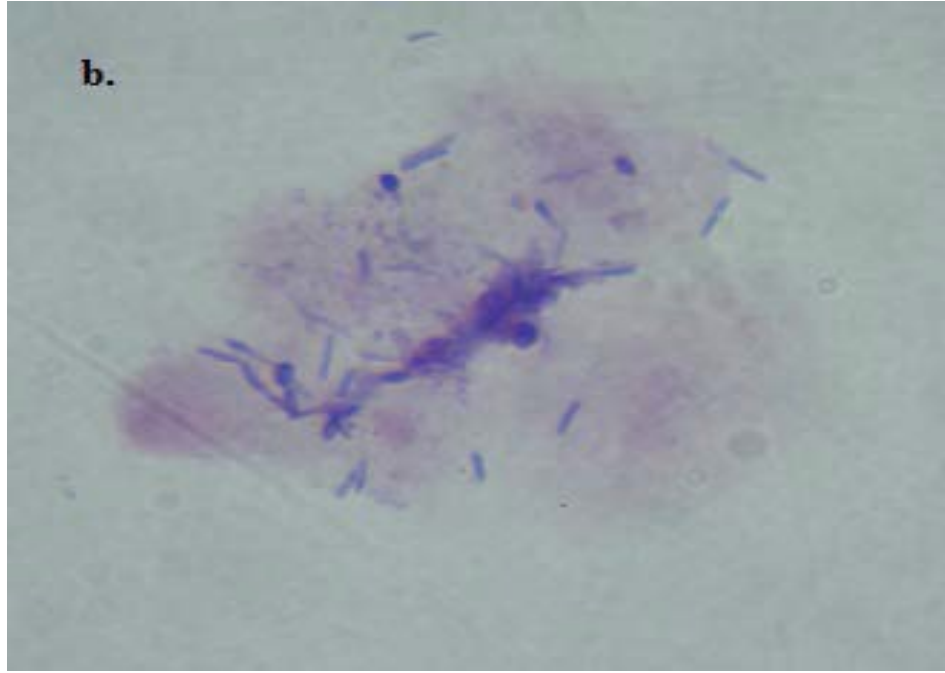
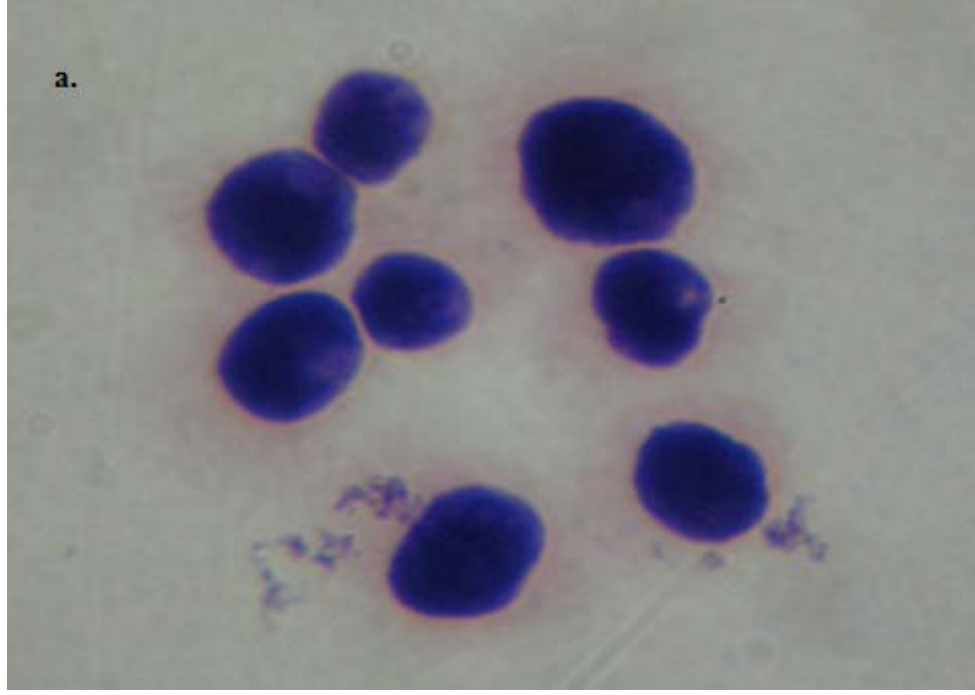
Bu çalışmada her pasaj geçişlerinde kromozom sayısında artma ya da azalma, pasaj ilerlemesine paralellik göstermemektedir. Ayrıca çalışmamızda kromozom aberasyonu olarak gözle görülür bir şekilde halka (ring) kromozomlara sıklıkla rastlanmaktadır.



**Şekil 4.9. 13. Pasajdaki Hücre Büyüme Evreleri a. b. Metafaz b. İnterfaz Hücresi**



**Şekil 4.10.** 14. Pasajdaki Hücre Büyüme Evreleri **a.** İnterfaz **b.** Metafaz Hücresi



**Şekil 4.11.** 18. Pasajdaki Hücre Büyüme Evreleri **a.** İnterfaz **b.** Metafaz Hücresi

21 kromozom sayısına sahip olan **2. pasaj**; 64 canlı hücre sayısına, 131 ölü hücre sayısına sahip olup, hücre kinetiği % 32.8 iken, 24 kromozom sayısına sahip olan **3. pasaj**; 15 canlı hücre sayısına, 33 ölü hücre sayısına sahip olup, hücre kinetiği % 31.2'dir. Buradan 3. pasajın sahip olduğu canlı ve ölü hücre sayıları az olmasına karşın, 2. pasajla kıyaslandığında hücre kinetiklerinde pek bir farklılık görülmemiştir (Tablo 4.4.).

**Tablo 4.4.** 2. Pasaj ve 3. Pasajın Ölü ve Canlı Hücre Sayılarının ve Hücre Kinetiklerinin Kıyaslanması

Pasaj Sayısı	Ölü Hücre Sayısı	Canlı Hücre Sayısı	Hücre Kinetiği
2. Pasaj	131	64	% 32.8
3. Pasaj	33	15	% 31.2

İçerdikleri farklı sayılardaki canlı hücre sayılarına sahip olan, yakın hücre kinetiği oranına sahip diğer pasajlar da sırasıyla; 1. pasaj, 10. pasaj, 13. pasaj, 14. pasaj, 15. pasaj ve 16. pasaj'dır. 1. pasaj 674 canlı hücre sayısına sahip, 10. pasaj 1030, 13. pasaj 924, 14. pasaj 1478, 15. pasaj 14 ve 16. pasaj 965 canlı hücrelerine sahip iken; hücre kinetik oranları sırasıyla şöyledir: 1.pasaj % 54.4, 10. pasaj % 55.8, 13.pasaj % 56.3, 14.pasaj % 57.8, 15.pasaj % 58.3, 16.pasaj % 53.0'dir (Tablo 4.5.).

**Tablo 4.5.** 1., 10., 13., 14., 15. ve 16. Pasajların Canlı Hücre Sayılarının ve Hücre Kinetiklerinin Kıyaslanması

Pasaj Sayısı	Canlı Hücre Sayısı	Hücre Kinetiği
1. Pasaj	674	% 54.4
10. Pasaj	1030	% 55.8
13. Pasaj	924	% 56.3
14. Pasaj	1478	% 57.8
15. Pasaj	14	% 58.3
16. Pasaj	965	% 53.0

29 kromozom sayısına sahip olan **13. pasaj**; 924 canlı hücre sayısına, 717 ölü hücre sayısına sahip olup, hücre kinetiği % 56.3 ve mitotik indeksi % 92.8'tir. 19 kromozom sayısına sahip olan **14. pasaj**; 1478 canlı hücre sayısına, 1077 ölü hücre sayısına sahip olup, hücre kinetiği % 57.8 ve mitotik indeksi % 72.5'tir. En yüksek canlı sayısına sahip olan 14. pasaj örneğinin mitotik indeksi, daha düşük canlı sayısına sahip olan 13. pasajın mitotik indeksine göre daha düşük oranda olduğu görülmektedir. Ayrıca hücre kinetiklerinde belirgin bir farklılık görülmemektedir.

**14. pasajın** 1478 canlı hücresiyle %72.5 mitotik indeks ve % 57.8 hücre kinetiğine sahip iken; **8. pasajın** 32 canlı hücre sayısı ile % 81.0 mitotik indeks ve % 40.5 hücre kinetiğine sahip olduğu gözlenmektedir. Ehrlich asit tümör hücreleri yüksek canlı sayısına sahip olsa da düşük canlı sayısına sahip olsa da, aynı mitotik aktivite veya daha düşük mitotik aktivite görülmekteyken; canlı hücre sayısı ve hücre kinetikleri kıyaslandığında oranlarda paralellik olduğu görülmektedir.

Böylelikle, Ehrlich asit tümör hücresi düşük canlı sayısına sahip olsa bile yüksek mitotik aktiviteye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Aynı yorumla yola çıkılarak, yüksek canlı hücre sayısına sahip olan pasajın yüksek mitotik aktivite göstermediği görülmüştür.

**3. pasaj** 15 canlı hücresine ve % 31.2 hücre kinetiğine sahip iken mitotik indeksi % 81.5 iken; **8. pasaj** 32 canlı hücre sayısına ve % 40.5 hücre kinetiğine sahipken mitotik indeksi % 81.0; **15. pasaj** 14 canlı hücre sayısına ve % 58.3 hücre kinetiğine sahipken mitotik indeksi % 81.2'dir (Tablo 4.6.). Buradan düşük oranlarda ve farklı canlı hücre sayılarına sahip ve hücre kinetikleri tamamen farklı olan üç pasajın da mitotik indekslerinin birbirlerine çok yakın oldukları gözlenmektedir. Aynı olay, 7. ve 16. pasajlarda da görülmektedir. 1218 canlı hücresine sahip olan **7. pasajın** hücre kinetiği % 65.9 ve mitotik indeksi % 83.6'dır. 965 canlı hücre sayısına sahip olan **16. pasajın** hücre kinetiği % 53.0 ve mitotik indeksi % 83.5'tir. Farklı canlı hücre sayılarına ve hücre kinetiğine sahip 7. ve 16. pasajın mitotik indekslerinin aynı olduğu görülmektedir.

**Tablo 4.6.** 3., 8. ve 15. Pasajların Canlı Hücre Sayılarının, Hücre Kinetiklerinin ve Mitotik İndekslerinin Kıyaslanması

Pasaj Sayısı	Canlı Hücre Sayısı	Hücre Kinetiği	Mitotik İndeks (MI)
3. Pasaj	15	% 31.2	% 81.5
8. Pasaj	32	% 40.5	% 81.0
15. Pasaj	14	% 58.3	% 81.2

**1. pasaj, 2. pasaj ve 14. pasajların** farklı canlı hücre sayısı (sırasıyla; 674, 64, 1478) ve hücre kinetik oranları (sırasıyla; % 54.4, % 32.8, % 57.8) olmasına rağmen, aynı mitotik indeks oranlarına (sırasıyla; %72.0, % 72.5, % 72.5) sahip oldukları görülmektedir (Tablo 4.7.).

**Tablo 4.7.** 1., 2. ve 14. Pasajların Canlı Hücre Sayılarının, Hücre Kinetiklerinin ve Mitotik İndekslerinin Kıyaslanması

Pasaj Sayısı	Canlı Hücre Sayısı	Hücre Kinetiği	Mitotik İndeks (MI)
1. Pasaj	674	% 54.4	% 72.0
2. Pasaj	64	% 32.8	% 72.5
14. Pasaj	1478	% 57.8	% 72.5

Özetle; mitotik indeks oranı 12. pasaja kadar olan pasajlara bakıldığında, pasajlar arası canlı hücre sayılarında artma ya da azalma görülse bile, 12. pasaja kadar olan pasajların mitotik indeks oranının arttığı görülmektedir. Bu da, Ehrlich asit tümör hücrelerinin canlı hücrelerinin az sayıda olsa bile mitotik aktivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Canlı hücre sayısı az olsa bile pasajlamanın devam edilebilirliği anlaşılmaktadır.

Kromozom sayıları 19 olan 5. pasaj, 7.pasaj, 8. pasaj, 14. pasaj, 17. pasajın Mitotik indeks (MI) oranları ve hücre kinetiği oranlarını kıyaslarsak; MI oranları pasaj sırasına göre: % 86.7, % 83.6, % 81.0, 72.5 ve % 73.4'tür. Hücre kinetikleri pasaj sırasına göre: % 50.1, % 65.9, % 40.5, % 57.8 ve % 66.6'dır (Tablo 4.8.).



**Tablo 4.8.** 5., 7., 8., 14. ve 17. Pasajların Kromozom Sayıları, Mitotik İndekslerinin ve Hücre Kinetiklerinin Kıyaslanması

Pasaj Sayısı	Kromozom Sayısı	Hücre Kinetiği	Mitotik İndeks (MI)
5. pasaj	19	% 50.1	% 86.7
7. Pasaj	19	% 65.9	% 83.6
8. Pasaj	19	% 40.5	% 81.0
14. Pasaj	19	% 57.8	% 72.5
17. Pasaj	19	% 66.6	% 73.4

Aynı şekilde, kromozom sayıları 21 olan 2. pasaj, 6.pasaj, 15. pasaj ve 20. pasajın mitotik indeks ve hücre kinetikleri kıyaslanırsa; 2. pasajın MI: % 72.5, 6. pasajın MI: % 80.0, 15. pasajın MI: % 81.2, 20. pasajın MI: % 78.6'dır. 2. pasajın hücre kinetik oranı % 32.8, 6. pasajın hücre kinetik oranı % 31.8, 15. pasajın hücre kinetik oranı % 58.3, 20. pasajın hücre kinetik oranı % 61.3'tür (Tablo 4.9.).

**Tablo 4.9.** 2., 6., 15. ve 20. Pasajların Kromozom Sayıları, Mitotik İndekslerinin ve Hücre Kinetiklerinin Kıyaslanması

Pasaj Sayısı	Kromozom Sayısı	Hücre Kinetiği	Mitotik İndeks (MI)
2. Pasaj	21	% 32.8	% 72.5
6. Pasaj	21	% 31.8	% 80.0
15. Pasaj	21	% 58.3	% 81.2
20. Pasaj	21	% 61.3	% 78.6

Kromozom sayıları 24 olan pasajlara bakıldığında; 3. pasajın MI: % 81.5, hücre kinetiği ise % 31.2, 10. pasajın MI: % 94.5, hücre kinetiği % 55.8, 11. pasajın MI: % 96.0, hücre kinetiği % 41.9'dur.

Kromozom sayıları 27 olan 1. pasajın MI: % 72.0, hücre kinetiği % 54.4; 9. pasajın MI: % 93.0, hücre kinetiği % 70.5, 18. pasajın MI: % 65.9, hücre kinetiği % 42.9'dur.

12. ve 13. pasajlar 29 kromozom sayısına sahipken, MI ve hücre kinetik değerleri şöyledir: 12. pasajın MI: % 99.0 ve hücre kinetiği: % 46.1, 13. pasajın MI: % 92.8 ve hücre kinetiği: % 56.3'tür.

En yüksek kromozom sayısına (31) sahip olan 16. pasajın mitotik indeksi (MI) % 83.5 iken hücre kinetiği % 53.0'dır. En yüksek MI oranı 12. pasajda % 99.0 olarak, en yüksek hücre kinetiği % 70.5 olarak 9. pasajda görülmektedir. En büyük kromozom sayısına sahip olan pasajın, aynı paralellikte mitotik indeks ve hücre kinetiği oranı gözlenmemektedir.

## **BÖLÜM 5**

### **TARTIŞMA VE SONUÇ**

Günümüzün en önemli ölüm nedenlerinden biri olması sebebiyle kanser oluşumunun önlenmesi, üzerinde en çok çalışılan konulardan biridir (Kumar ve ark, 1995).

Sitogenetik uygulamalar günümüzde başta klinik tanı, gen haritalaması, kanser sitogenetiği ve prenatal tanı gibi pek çok alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Bir kromozom raporunu yorumlamak, metodoloji ile ilgili bazı bilgilere sahip olmak, kromozom çalışmaları ve onların sınırları hakkında görüşü olmak (Karüzüm, 2006) araştırmacılar için avantaj sağlamaktadır.

Transplante edilebilen tümörler, en çok tercih edilen modellerdendir. Dolayısıyla, özellikle 1950'li yıllardan sonra transplante edilebilen tümörlerin oluşturduğu modellerin tercih edildiği kanser araştırmaları ön plana çıkmaktadır (Zeybek, 1996).

Uzun yıllardan bu yana klinik ve deneysel amaçlı karsinojenik araştırmalarda pek çok metot ve model kullanılmaktadır. Özellikle deneysel çalışmalarda üç ayrı model (spontan, indüklenen ve transplante) içinde transplante edilebilen tümör çeşitlerinin daha çok tercih edildiği gözlenmektedir. Bununla beraber, uygulama kolaylığına sahip transplante edilebilen tümörler açısından da çok çeşitlilik söz konusudur. Çalışmamızda tümör modeli olarak EAT'nin asit formu kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullandığımız tümör modeli olan EAT (Ehrlich Ascites Tumor, Ehrlich Asit Tümörü), transplante edilebilen bir tümör modelidir ve farelere özgü (Kaleoğlu ve İşli, 1997; Zeybek, 1996) olmasından dolayı EAT'nin çalışılması tümör değerlendirilmesi ve izlenmesi açısından kolaylık sağlamaktadır.

EAT'nin sıvı formunun elde edilmesiyle birlikte, çalışmalarda yoğun bir şekilde sıvı tümör kullanılmıştır. Kullanımdaki yoğunluğun nedeni, sıvı formun serbest tümör hücrelerini içeren süspansiyon şeklinde olması ve bunun sonucunda istenilen sayıdaki hücrenin bir başka hayvana transplante edilebilmesidir (Klein, 1951).

Ehrlich asit tümörünün her bir pasajında kromozom sayıları, hücre kinetiği ve mitotik indeks oranlarının elde edilmesiyle, bu çalışma orijinallik taşımaktadır.

Çalışmamızda ilk olarak, sıvı tümör oluşturulmasında Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarından temin edilen, yaklaşık 30 gr ağırlıkta olan 8-10 haftalık *Mus musculus* Balb/C farelerin peritonuna bu hücreler rutin olarak 7-10 günde bir fareden fareye transplante edilerek üretilmiştir. Tümör hücrelerinin transplantasyon işlemi için steril enjektörlerle verici farenin periton boşluğundan, içinde tümör hücrelerinin bulunduğu asit sıvısı alınmakta ve 0.1 ml PBS içinde sulandırılarak yaklaşık  $1 \times 10^6$  EAT hücre/ml konsantrasyonu elde edilmiştir. Bu süspansiyondan her bir alıcı fareye i.p. (intraperitoneal) yolla 0.2 ml enjekte edilmiştir.

Deneysel bir tümör olan Ehrlich asit tümörü farelere pasajlanarak aktarılabilen bir tümördür. Her pasaj sonrası bu tümörün agresifliğinin arttığı yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Ancak bu durumun moleküler mekanizması hakkında herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu konuda yapılacak sitogenetik çalışmalarla Ehrlich asit tümör hücrelerinin geçirdiği kromozomal değişiklikler izlenebilecek ve dolayısıyla transplante edildiği canlının normal hücrelerine kazandırdığı tümörojenik kapasite hakkında bilgi sahibi olunabilecektir. Spontan adenokarsinomu olan ve asit sıvısı biriktirmesinden dolayı, insanlarda over kanserine denk görülen bu tümörün sitogenetik alt yapısının açığa çıkarılmasıyla dolaylı yoldan insan kanserleri genetik çalışmalarına katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

Konvansiyonel sitogenetik yöntem halen altın standart olarak yerini korumaktadır. Moleküler sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerle yalnızca hedefe yönelik bilginin alınıyor olması, konvansiyonel sitogenetik yöntemin ise tüm genom hakkında bilgi verici olması bu yöntemi vazgeçilmez kılmakta ve yetersiz kalması konumunda mutlaka diğer yöntemlerle kombinasyonu gerekmektedir (Karaüzüm, 2006).

Ayrıca yöntemin ucuz ve uygulanabilir olması da avantaj sağlamaktadır. Çalışmamızda mitotik indeks oranlarının %50'den yüksek oluşu, EAT hücresinin her pasajda yüksek mitotik aktivite özelliği gösterdiğini ortaya koymaktadır. Her pasaj

geçişlerinde mitotik indeks oranlarının % olarak azalış ve artış oranlarının EAT hücrelerinin yüksek proliferasyon özelliği göstermesine engel olmadığı gözlemlenmiştir.

Hanafy (2010), Ehrlich asit hücreleri fareye inoküle edildikten sonraki 7. ve 14. günlerde, mitotik indeks oranı ve mikronukleus hücrelerinin artışı ile 26 ile 125 arasında değişen farklı kromozom numaraları içerdiği çalışmalarında bildirmiştir. Bizim çalışmamızda ise, her pasajda Ehrlich asit sıvısının kromozom sayısının sabit olmadığı ve pasajlandıkça kromozom sayısında logaritmik bir artış olmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda en düşük Ehrlich asit hücrelerinin kromozom sayısı 5., 7., 8., 14. ve 17. pasajlarda 19 olarak, en yüksek kromozom sayısı 16. pasajda 31 olarak sayılmıştır.

Ayrıca Hanafy'nin aynı çalışmasında (2010), 7 günlük EAT ve 14 günlük Ehrlich asit tümör hücrelerinin kromozom sayısı 26, 32, 34, 36, 40, 42, 44, 46, 86, 92 ve 125 olarak görülmekte, ama en çok 46 kromozom sayısına sahip hücrelere rastlanmaktadır. Bizim çalışmamız da ise her pasaj farklılık göstererek 9, 21, 27, 24, 29 ve 31 olarak kromozom sayısı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, her pasaj geçişlerinde kromozom sayısının logaritmik olarak bir artış ya da azalış göstermemesi, pasaj ilerlemesine paralellik göstermemektedir. Yani pasaj sayısı ilerledikçe kromozom sayısında logaritmik bir artış veya azalış gözlemlenmemiştir.

Tez çalışmamızda, en yüksek mitotik indeks (MI) 12. pasajda % 99.0 oranında, en düşük mitotik indeks ise 18. pasajda % 65.9 oranı olarak görülmektedir. En düşük MI % 65.9 oranda görülmesine karşın, oranın % 50'den fazla oluşu Ehrlich asit hücrelerinin düşük mitotik indeks özelliği göstermesine karşın, EAT hücrelerinin proliferasyon olmasını engellemekte olduğu anlaşılmaktadır.

Tümörler ister benign, ister malign olsun, kontrolsüz büyüme genetik instabiliteye yol açmaktadır. Bunun sonucunda da karyotipik olarak sayısal ve yapısal düzensizlikler ortaya çıkmaktadır (Durmaz ve ark., 1998; Lekanne-Deprez ve ark., 1995). Özellikle kanserlerde her kromozoma ait ring kromozom görülebilmektedir (Karaoğuz, 2011).

Kromozom yapısındaki değişmelerden halka (ring, yüzük) kromozomları, X ışınlarında, tümörlerde ve gonodal disgenesis'te sık görülmektedir.

Hanafy (2010)'nin EAT zerine zencefil uygulaması çalışmasında, Ehrlich asit hücrelerindeki kromozomal aberasyonlarının sayısal ve yapısal anomaliliklerini tespit etmiştir. Kromozom kırıklıkları, delesyon, halka kromozomu, sentrik füzyon, fragment gibi kromozom anomalileri görülmektedir. Bizim alışmamızda kromozom yapısal aberasyonu olarak, net bir şekilde halka (ring) kromozomlara sıklıkla rastlanmıştır. Ehrlich asit tümör hücreleri kontrolsüz oğaldıklarından dolayı, telomerlerin kısalmasına neden olarak veya endojen veya ekzojen etkilerden dolayı telomerlerin kısalmasına neden olarak, kromozomların u kısımlarının koparak ve halka şeklinde birleşmesi sonucu halka kromozomlarının meydana geldiği görülmektedir.

Hanafy (2010) aynı çalışmasında, Ehrlich asit hücrelerinde, mitotik indeks ve mikronukleus hücrelerinde azalma tespit edilmiştir. Bizim alışmamızda ise, mitotik indekste 12. pasaja kadar artış meydana gelirken, 13. pasaj ve sonrasında kromozom sayısında artış ve azalış değişiklik göstermektedir.

Çalışmada kromozom besi ortamı olarak kullanılan, kromozom medyum A ve medyum B, Ehrlich asit tümör hücrelerinin bölünmeye teşviki için kullanılmıştır. Hücre ekimi için kullanılan kromozom medyum B, hücreleri bölünmeye teşvik eden phytohemagglutinin içermektedir. Kromozom medyum A ise hücreleri bölünmeye teşvik eden phytohemagglutinin (PHA) içermemektedir. Çalışmamızda EAT hücrelerinin bölünmeye teşviki için, her iki medyumda (Kromozom medyum A ve kromozom medyum B) kullanılmıştır. Kromozom medyum A'nın PHA içermemesine rağmen EAT hücrelerinin bölündüğü gözlenmiştir, buradan EAT hücrelerinin bölünmeye teşviki için PHA'ya ihtiyaç duymadığı anlaşılmaktadır.

Bu alışmamızda, kromozom sayıları aynı olmasına karşın mitotik indeks (MI) değerleri ve hücre kinetikleri arasında korelasyon olmadığı görülmektedir.

Hasholt ve Danq (1974), yaptıkları çalışmada, Ehrlich asit tümörünün daunomisin, adriamisin, vinblastin ve vinkristine karşı direnci ve Ehrlich asit tümörü klasik Giemsa boyama tekniği yapılarak, karyotipi yapılmıştır. Sadece Ehrlich asit için analiz edilen 160 hücreden, 100 Ehrlich asit hücre sayısından 94 tane büyük metasentrik, 6 tane de hem büyük metasentrik hem de daha küçük metasentrik kromozomlar tespit edilmiştir. Tetraploid olan tümörlerin kromozom sayısı 77 civarında olmakla beraber, çeşitlilik de göstermektedir. Bizim tez çalışmamızda, Ehrlich asit tümör hücrelerinin kromozom sayıları her pasajda 19'dan 31'e kadar değişik kromozom sayıları tespit edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen kromozom sayıları, daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında, araştırmacıların elde etmiş oldukları sonuçlarla farklı olduğu saptanmıştır.

Ehrlich asit tümör hücrelerin farklı sayıda kromozom sayılarına sahip olması, poliploid hücrelerin meydana gelmesi, bazı örneklerde metafaz alanlarının çok iyi elde edilememesi neden olabilir. Tümör sitogenetiğinde poliploidik hücrelere sık olarak rastlanmaktadır (Veltman ve ark, 1997).

Ehrlich asit tümörü üzerine çalışılan benzer çalışmalarda, fareye enjekte edildikten en fazla 15. günden sonra laboratuvar çalışmaları yapılırken, bizim çalışmamızda Ehrlich asit tümör sıvısı pasajlanarak, bu tümörün pasajlandıkça virulans özelliğinin neye göre arttığını gözlemlemek amaçlanmıştır.

Bu çalışma sonucunda; Ehrlich asit tümörü pasajlanarak her bir pasaj için klasik sitogenetik uygulayarak, kromozom sayıları sayılmış ve her bir pasaj için farklı kromozom sayıları bulunmuştur. Ayrıca interfaz ve metafaz safhalarındaki Ehrlich asit tümör hücreleri tespit edilerek, mitotik indeks hesaplanmış ve Ehrlich asit tümör hücrelerinin hücre kinetiğine bakılmıştır. Her pasajın mitotik indeksinin %50 oranından fazla oluşu, kromozom sayısı ve hücre kinetiği ne olursa olsun Ehrlich asit tümör hücrelerinin yüksek bölünme özelliği gösterdiğini ortaya koymaktadır.

ileriki 9ahşmalarla, Ehrlich asit tiimiir hiicrelerinin klasik sitogenetik yiintemle beraber bantlama yiintemleri ve FISH (Fluoresan *in situ* hibridizasyon) teknigi ile birlikte 9ahşllmas!yla, Ehrlich asit tiimiir hiicresinin kromozomlannda meydana gelen gerek sayısal, gerekse yapısal kromozom anomalilerinin daha iyi anlaş!lacagl diişiiniilmektedir.



## KAYNAKLAR

- Ahmed, H., Chatterjee, B. P., Debnath, A. K. (1988). Interaction and *in vivo* Growth Inhibition of Ehrlich Ascites Tumor Cells by Jacalin. *Journal of Bioscience.*, Vol. 13, Number 4, pp. 419–424, India.
- Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Takada, Y., Banerjee, S., Newman, R.A., Bueso-Ramos. C.E. (2005). Curcumin Suppresses the Paclitaxel-induced Nuclear Factor-KappaB Pathway in Breast Cancer Cells and Inhibits Lung Metastasis of Human Breast Cancer in Nude Mice. *Clinical Cancer Research*, **11**, 7490-8.
- Ah-See, K.W., Cooke T.G., Pickford I.R., Soutar D., Balmain (1994). A. An Allelotype of Squamous Carcinoma of the Head and Neck Using Microsatellite Markers. *Cancer Research*, **54**, 1617-1621.
- Aktaş, E. (1996). Ehrlich Asit Sıvısının L- Hücrelerinin Çoğalma Hızına Etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Akyol, H. (2004). Kemoterapinin Temel İlkeleri. *XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi*, Hemşire Programı. Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı, İzmir.
- Altun, S. (1993). Normal, Tümöral ve Rejeneratif Büyümler Arasındaki İlişkiler. *Doktora Tezi*. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Altun, S. (1996). Normal, Tümöral ve Rejeneratif Büyümler Arasındaki Kinetik İlişkiler. *Traditional Journal of Biology*, Tübitak, **20(3)**, 153-173.

- Arıcan, G.Ö., Topçul, M., Özalpan, A. (2005). The Effects of Epirubicin and Tamoxifen on 3H- Thymidine Labelling Index in Estrogen-Receptor-Positive Ehrlich Ascites Tumor Cells Growing *in vivo*. *Journal of Cell and Molecular Biology*, **4**: 87-91.
- Atıcı, E. (2007). Tıp Tarihinde Kanser ve Lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi*, **22 (4)**, 197-204.
- Balint, Z., Holczinger, L. (1984). Changes in Lipoprotein Lipase Activity (LPLA) in Tumor Cells and Tissues in Mice Bearing Ehrlich Ascites Tumor, *Bulletin du Cancer*, **71(5)**, 412-8.
- Baylav, N. (1953). Fatih Sultan Mehmet Devri'nde (te'lif, terceme ve istinsah edilen) Tıp Eserleri ile İlaçlar. Türkiye Tıbbi Müstahzarat Lab Derneği Yayınları, İstanbul. No: 1; p. 21-2.
- Begüm, N.T., Ilyas M.M.H., Kalavathy, S., Anand, V.A., Kumar, S.P., Senthil, R. (2009). Effects of Ethanolic Leaf Extract of *Azima tetraantha* Lam. On Ehrlich Ascites Carcinoma Tumour Bearing Mice. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, **4(2)**, 351-354.
- Benndorf, R., Nurnberg, P., Bielka, H. (1988). Growth Phase-Dependent Proteins of the Ehrlich Ascites Tumor Analyzed by One-and-Two-Dimensional Electrophoresis. *Experimental Cell Research*, **174**, 130-138.
- Bichel, P. (1970). Tumor Growth Inhibiting Effect of JB-1 Ascitis Fluid-1, An *in vivo* Investigation, *European Journal of Cancer*, **6**, 291.
- Bichel, P. (1971). Autoregulation of Ascites Tumour Growth by Inhibition of the G-1 and the G-2 Phase. *European Journal of Cancer*, **7**, 349-355.
- Bulan, Ö. (1990). Ehrlich Ascites Tümör Hücrelerinde Yaşlanma ile Hücre Kinetiği Arasındaki İlişkiler. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Bettman, O. (1956). 17th Century Surgeons Operate for Cancer, a Pictorial History of Medicine. Springfield; Thomas CC, *Publisher*, p. 175.
- Burns, E.R. (1968). Initiation of DNA Synthesis in Ehrlich Ascites Tumor Cells in Their Plateau Phase of Growth. *Cancer Research*, **28**, 1191-96.
- Burns, E.R. (1969). On the Failure of Self-Inhibition of Growth in Tumors. *Growth* **33**, 25.
- Burns, E.R., Solofy, B.L. (1970). Further Studies on the Recurrent Growth of the Ehrlich Ascites Tumor. *The Anatomical Record*, **166**, 285.
- Burns, E.R., Yeh, H., Yeh, Y. (1983). Initiations of DNA Synthesis in the Parotid Salivary Gland of Adult Mice by a Factor Isolated From Acellular Fluid of Ehrlich Ascites. *Carcinoma Bioscience Reports*, **3(2)**, 113-125.
- Chan, D.W., Sell, S. (1994). Tumor Markers. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2th Edition. Ed. Burtis C.A. and Ashwood E.R. W.B. Soundes Company, Philadelphia, 897-927.
- Chase, A., Huntly, B.J., Cross, N.C. (2001). Cytogenetics of Chronic Myeloid Leukemia. *Best Practice Research Clinical Haematology*, **14(3)**, 553-557.
- Das, A., Mukherje, A. (2004). Genotoxicity Testing of the Food Colours Amaranth and. Tartrazine. *The International Journal of Human Genetics*, **4(4)**, 277-280.
- Deviren, A. (2005). Hematolojik Malinitelerde Sitogenetik İnceleme. Hematolog Olmayanlar için Hematolojik Maliniteler *Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi*, **45**, s.75-81, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul.
- Durak, B. (2005). Hematoloji’de FISH. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi, 15. *Temel Moleküler Hematoloji Kursu*, Mersin.

- Durmaz, R., Arslantaş, A., Artan, S., Özon, Y.H., Işıksoy, S., Başaran, N., Tel, E. (1998). The Deletion of 22q13 Region in Both Intracranial and Spinal Meningiomas in a Patient. *Clinical Neuroogyl and Neurosurgery*, **100**, 219-223.
- Ekinci, G. (2000). Katı Ehrlich Ascites Tümörünün Büyüme Kinetiği, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Elleman, C.J., Eidinger, D. (1977). Suppressive Factors in Ascitic Fluids and Sera of Mice Bearing Ascites Tumors. *Journal of the National Cancer Instute*, **59**, 925-31.
- Estrela, M.J., Hernandez, R., Terradez, P., Asensi, M., Puertes, R., Vina, J. (1992). Regulation of Glutathione Metabolism in Ehrlich Ascites Tumour Cells. *Biochemistry Journal*, **286**, 257-262.
- Fecchio, D., Russo, M., Sirois, P., Braquet, P., Jancar, S. (1990a). Inhibition of Ehrlich Ascites Tumor *in vivo* by PAF Antagonists. *International Journal of Immunopharmacology*, **12**, 57-65.
- Fecchio, D., Sirois, P., Russo, M., Jancar, S. (1990b). Studies on İnflamatory Response İnduced by Ehrlich Tumor in Mice Peritoneal Cavity. *Inflammation*, **14**, 125-132.
- Fırat, D. (1975). Kanser Kemoterapisinde Prensipiler. *Türk Patoloji Dergisi*, **2**, 016-029, s,1-2.
- Fıratlı, T. (2003). Akut Lösemi Etyopatogenezi. Demek sitogenetik önemli! *XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi III. Hematoloji ilk Basamak Kursu*. 10-14 Ekim 2003. İstanbul: Bilimsel Tıp Evi. S,119-26.
- Fisher, B., Fisher, E.R. (1959). Experimental Studies of Factors Influencing Hepatic Metastas. II. Effect of Partial Hepatectomy. *Cancer*, **12**, 929-32.

- Gabrilovac, J., Benkovic, B., Burek, B., Cepelak, I., Boranic, M. (1982). Immünoregulatory Activity of Cell-Free Peritoneal Washings of Mice with Ehrlich Ascitic Carcinoma. *Research of Experimental Medicine*, **180**, 147-154.
- Gilbert, C.W., Lajtha, L.G. (1965). The Importance of Cell Population Kinetics in Determining Response to Irradiation of Normal and Malignant Tissues, in Cellular radiation biology (*Proc 18th Ann Symp Fundamental Cancer Research*, Houston, 1964). Williams and Wilkins, Baltimore.
- Grune, T., Siems, W., Uhlig, R., Jakstadt, M. (1992). Adenine Metabolism of Ehrlich Mouse Ascites Cells in Proliferating and Resting Phases of Tumor Growth *Biochemical International*, **26(2)**, 199-209.
- Gümüşhan, H. (2002). i.p., i.v., s.c., Yollarla Uygulanan Adriamycin'in Ehrlich Asit Tümöru (EAT) Taşıyan Farelere Etkileri Üzerine Bir Çalışma, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, *Yüksek Lisans Tezi*, şanlıurfa.
- Gümüşhan, H., Musa,D. (2008).Effect of Adriamycin Administered via Different Routes on Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Istanbul University Faculty of Science The Journal of Biology*, **67(1)**, 49-54.
- Hamblin, T. (2001). Historical Aspects of Chronic Lymphocytic Leukaemia. *British Journal of Haematology*, **111 (4)**, 1023-34.
- Hanafy, E.Z. (2010). Cytogenetics on Cancer Cells as Affected by Ginger Extracts. *Journal of American Science*, **6 (8)**, 525-539.
- Handerson B.E., Ross R.K., Pike M.C. (1991).Toward the Primery Preventionof Cancer. *Science*, **24**, 1131-1138.
- Haris, W.J., Meyskens, F., Patt, M.H. (1970). Biochemical Studies of Cytokinetic Changes During Tumor Growth. *Cancer Research*, **30**, 1937-1946.

- Hasholt, L., Denq,K. (1974).Cytogenetic Investigations on an Ehrlich Ascites Tumor, and Four Sublines Resistant To Daunomycin, Adriamycin, Vincristine and Vinblastine. *Hereditas*, **77**, 303-310.
- Holyoake, D.T. (2001). Recent Advances in the Molecular and Cellular Biology of Chronic Myeloid Leukaemia: Lessons to be Learned from the Laboratory. *British Journal of Haematology*,**113(1)**, 11-13.
- İnce S., (1996). Doğan Ö., Rıdvanoğulları M., Dişçi R., Nurten R.,Özalp M., Solakoğlu S., Anıl Y.D.Çoğalan Ehrlich Ascites Tümör Hücrelerinde Timidin Damgalanma İndeksi ve AgNOR Değerleri. *Türk Patoloji Dergisi*,**12-1**, 11-13.
- Justo, G.Z., Duran, N., Queiroz, M.L.S. (2000). Myelopoietic Response in Tumour-Bearing Mice by an Aggregated Polymer Isolated from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Pharmacology*, **388**, 219-226.
- Justo, G.Z., Duran, N., Queiroz, M.L.S. (2003). Natural Killer Cell Activity, Lymphocyte Proliferation and Cytokine Profile in Tumour-Bearing Mice Treated with MAPA, a Magnesium Aggregated Polymer from *Aspergillus oryzae*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*,**25**, 305-319.
- Kaleoğlu, Ö., İşli, N. (1977). Ehrlich-Lette Asit Tümörü, *Tıp Fakültesi Mecmuası*,**40**,978-984.
- Karaüzüm, S. B. (2006). Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Klinik Hematoloji için Pratik Genetik Yaklaşım Kursu. *Bilimsel Program*, Antalya.
- Karaoğuz Yirmibeş, M. (2011). İnsandaki Genetik Hastalıklar. Hastalık ve Gen Tedavisi. *Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*, 5-15.
- Kın, T. (1971). The Effects of Carcinostatic Agents on the Cell Cycle of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. *Nagoya Journal of Medicine Science*,**33**, 307-314.

- Korkmaz, M., Çolak, A. (2000). N- N-Nitrosopirolidin (NPYR)'in Farelerde Sitogenetik Etkileri. *Turkish Journal of Biology*, **24**,1-12.
- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. (2003). Robbins Temel Patoloji, 7'inci baskı. *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul.
- Kumar, V., Cotran R.S., Robbins S.L. (1995). Neoplasia Ln: Robbins SI (ed), *Basic Pathology*, WB Saunders. Philadelphia, 171-216.
- Latha, P.G., Evans, D.A., Panikkar, K.R., Jayavardhanan, K.K. (2000). Immunomodulatory and Antitumor Properties of *Psoralea corylifolia* Seeds. *Fitoterapia*,**71**, 223-231.
- Lazebnik, Y.A., Medveda, D.N., Zenin, V.V. (1991). Reversible G2 Block in the Cell Cycle of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. *Experimental Cell Research*, **195**, 247-254.
- Lekanne-Deprez, R.H., Riegman, P.H., Groen, N.A., Warringo, U.L., Van-Biezen, N.A., Molijn, A.C. (1995). Cloning and Characterization of MN1, a Gene from Chromosome 22q11, Which is Disrupted by a Balanced Translocation in a Meningioma. *Oncogene*, **10**, 1521- 1528.
- Levin, E., Chernovsky, A. (1989).Effect of Antineoplastic Drugs and Estradiol on Leucine Uptake and Proliferation of Ehrlich Tumor Cells. *Biomed and Pharmacother*, **43**: 215-17.
- Lobo, C., Ruiz-Bellido, M.A., Aledo, J.C., Marquez, J., De Castro, I.N., Alonso, F.J. (2000). Inhibition of Glutaminase Expression by Antisense mRNA Decreases Growth and Tumourigenicity of Tumour Cells. *Biochemistry Journal*, **348**, 257-261.
- Loizidou, M.C., Lawrance, R.J., Holt, S., Carty, N.J., Cooper, A.J., Alexander, P., Taylor, I. (1991). Facilitation by Partial Hepatectomy of Tumor Growth within the Rat Liver Following Intraportal Injection of Syngeneic Tumor Cells. *Clinical Experimental Metastasis*, **9 (4)**, 335-49.

- Lowitz, B.B., Casciato, D.A. (2000). *Manual of Clinical Oncology*. Chapter 1 Principles of Medical Oncology and Cancer Biology.
- Manson, M.M., Gecher, A., Hudson, E.A. (2000). Blocking and Supressing Mechanisms of Chemoprevention by Dietary Constituents *Toxiology Letters*, 112-113: 449-505.
- Marquez, J., Sanchez-Jimenez, F., Medina, M.A., Quesada, A.R., De Castro, I.N. (1989). Nitrogen-Metabolism in Tumor-Bearing Mice. *Archives Biochemical Biophysics*, **268**, 667-675.
- Nussbaum, R.L., Mcinnes, R..R., Willard, H. F. (2005). Thompson& Thompson Tıbbi Genetik, *Güneş Kitabevi*.
- Okay, H.G. (1998). Deneysel EAT Oluşturulan Fare Karaciğer Plazmasında Nitrik Oksit Metabolizmasının İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ABD, İstanbul.
- Öner, D. (1985). Ehrlich Ascites Tümör Hücrelerinde Vincristin'e Karşı Duyarlılığın Tümör Yaşı ile İlişkisi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Radyoloji ve Sağlık Fizyolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi, İstanbul.
- Paietta, E. (2003). Comments on the 2001 WHO Proposal for The Classification of Haematopoietic Neoplasms. *Best Practice Research Clinical Haematology*, **16**,547-59.
- Parhar, R.S., Lala, P.K. (1988). Prostaglandin E<sub>2</sub>-Mediated İnactivation of Various Killer Lineage Cells by Tumour-Bearing Host Macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, **44**, 185-190.
- Peel, S., Fletcher, P.A. (1969). Changes Occuring During the Growth of Ehrlich Ascites Cells In vivo. *European Journal of Cancer*, **5**, 581-589.
- Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., Mc Fee, A.F., Shelby, M. (1987). Mammalian *in vivo* Cytogenetic Assays. *Mutation Research*, **189**, 157-165.



- Rasgele, G.P. (2008). Delvosid'in *Mus musculus* Üzerine Toksik Etkisi. *Doktora Tezi*. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trakya Üniversitesi, Edirne.
- Rosene, G.L. (1968). Alteration of Tumor Cell and Hepatic Parenchymal Cell Mitotic Rates in Tumor-injected Partially Hepatectomized mice. *Cancer Research*, **28**, 1469-77.
- Rotbarth, K., Maier, G., Schöpf, E., Werner, D. (1977). Inhibition of DNA Synthesis by a Factor from Ascites Tumor Cells. *European Journal Cancer*, **13**, 1195-96.
- Rowley, H. (1998). The Molecular Genetics of Head and Neck Cancer. *Laryngol Otolaryngology*, **112**, 607-612.
- Ruby, A.J., Kuttan, G., Babu, K.D., Rajasekharan, K.N., Kuttan, R. (1995). Antitumour and Antioxidant Activity of Natural Curcuminoids. *Cancer Letters*, **94**, 79-83.
- Ruiz De Morales, J., Velez, D., Subiza, J.L. (1999). Ehrlich Tumor Stimulates Extramedullar Hematopoiesis in Mice Without Secreting Identifiable Colony- Stimulating Factors and Without Engagement of Host T Cells. *Experimental Hematology*, **27**, 1757-1767.
- Schmidt, H., Siems, W., Müller, M., Dumdey, R., Rapoport, S.M. (1991). ATP Producing and Consuming Processes of Ehrlich Mouse Ascites Tumor Cells in Proliferating and Resting Phases. *Experimental Cell Research*, **194**, 122-127.
- Schwendel, A., Siems, W.G., Grune, T., Holzhütter, G.H. (1994). Transitions of Hepatic Purine Metabolism of Ehrlich Ascites Tumor Bearing Mice in Different Phases of Tumor Growth. *Biochemistry and Molecular Biology International*, **34(3)**, 457-463.

- Segura, J.A., Barbero, L.G., Marquez, J. (1997). Early Tumor Effect on Splenic the Lymphocytes in Mice. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **414**, 1-6.
- Segura, J.A., Ruiz-Bellido, M.A., Arenas, M., Lobo, C., Marquez, J., Alonso, F.J. (2001). Ehrlich Ascites Tumor Cells Expressing Anti-Sense Glutaminase RNA Lose Their Capacity to Evade the Mouse Immune System. *International Journal of Cancer*, **91**, 379-384.
- Segura, J.A., Barbero, L.G., Marquez, J. (2000). Ehrlich Ascites Tumour Unbalances Splenic Cell Populations and Reduces Responsiveness of T Cells to *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B Stimulation. *Immunology Letters*, **74**, 111-115.
- Senger, D.R., Gali, S.J., Dvorak, M.A., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F. (1983). Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites Fluid. *Science*, **219**, 983-985.
- Siems, W., et al. (1989). Changes in the Nucleotid Metabolism of Ehrlich Ascites Tumor Cells During Their Growth In vivo. *Cellular and Molecular Biology*, **35(3)**, 255-262.
- Siems, W.G., Grune, T., Schmidt, H., Tikhonov, Y.V., Pimenov, M.A. (1993). Purine Nucleotide Levels in Host Tissues of Ehrlich Ascites Tumor Bearing Mice in Different Growth Phases of the Tumor. *Cancer Research*, **53**, 5143-5147.
- Sigerist, H.E. (1960). The Historical Development of the Pathology and Therapy of Cancer. In: Marti-Ibanez F, editor. On the History of Medicine. New York: MD Publications Inc;. P. 59-65.

- Skog, S., Ericsson, A., Nordell, B., Nishida, T., Tribukait, B. (1989). 31P-NMR Spectroscopy Measurements of Energy Metabolism of *in vivo* Growing Ascites Tumours Following Addition of Glucose. *Acta Oncologica*, **28**, 277-281.
- Skog, S., He, Q., Tribukait, B. (1990). Lack of Correlation Between Thymidine Kinase Activity and Changes of DNA Synthesis With Tumour Age: an *in vivo* Study in Ehrlich Ascites Tumour. *Cell Tissue Kinetics*, **23**, 603-617.
- Song, Z., Varani, J., Goldstein, I.J. (1993). Differences in Cell Surface Carbohydrates and in Laminin and Fibronectin Synthesis Between Adherent and Non-adherent Ehrlich Ascites Tumor Cells. *International Journal of Cancer*, **55**, 1029-1035.
- Stewart H.L., Snell KC, Dunham LC. (1959). Transplanted and Transmissible Tumors of Animals. *National Academy of Sciences*, Washington DC, F40-373.
- Subiza, J.L., Vinuela, J.E., Rodriguez, R., Gil, J., Figueiredo, M.A., De La Concha, E.G. (1989). Development of Splenic Natural Suppressor (NS) Cells in Ehrlich Tumour-Bearing Mice. *International Journal of Cancer*, **44**, 307-313.
- Surh Y.J. (1999). Molecular Mechanisms of Chemopreventive Effects of Selected Dietary and Medicinal Phenolic Substances. *Mutation Research*, **428**, 305-327.
- Székla, K., Pokorny, E., Hullan, L., Holczinger, L. (1981). Variations of Thymidine Kinase Activity and DNA Content in Ehrlich and L1210 Ascites Tumor Cells During Tumor Growth. *Cancer Biochemistry and Biophysics*, **5**, 259-264.
- Tannock, I.F. (1969). A Comparison of Cell Proliferation Parameters in Solid and Ascites Ehrlich Tumors. *Cancer Research*, **29**, 1527-34.

- Taşkın, E.İ. (2002). Ehrlich Ascites Tümörü ile Balb/c ırkı Farelerde Oluşturulmuş Solid Tümör Modelinde Curcuminin Apoptoz Üzerine Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E. (2010). Sitogenetik. *Nobel Yayınları*, 2. baskı, syf: 146, 147.
- Ulukaya, E. (2001). Akciğer Kanseri. *Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar Kitabı*. Avrupa Tıp Kitapevi, İstanbul.
- Ulutin O.N. (1988). Hematoloji. In: Unat EK, editor. Dünya’da ve Türkiye’de 1850 Yılından Sonra Tıp Dallarındaki İlerlemelerin Tarihi. İstanbul: *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları*, 4, 191-7.
- Ünver, S. A. (1938). Türk Tıp Tarihinde Kanser ve Tedavisine Dair. *İst Tıp Mecmuası*, 1 (5), 673-8.
- Üstüner, D. (2010). Fluoksetin’in Sitogenetik Olarak Analizi. *Tubav Bilim Dergisi*, 3(3), 276-281.
- Veltman, J.A., Hopman, A.H.N., Bot, F.J., Ramaekers, F.C.S., Manni, J.J. (1997). Detection of Chromosomal Aberrations in Cytologic Brush Specimens from Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer*, 81, 309-314.
- Vinuela, J.E., Rodriguez, R., Gil, J., Coll, J., Concha, E., Subiza, J.L. (1991). Antigen Shedding vs. Development of Natural Suppressor Cells as Mechanism of Tumor Escape in Mice Bearing Ehrlich Tumor. *International Journal of Cancer*, 47, 86-91.
- Weaver, R.F., Hedrick, P.W. (1997). Genes and Cancer. In; eds. Genetics. 3rd ed. Wm. Dubuque C: Brown Publishers; 482-503.
- Werner, D., Maier, G., Lommel, R. (1973). A Factor Reducing Protein Synthesis From Ehrlich Ascites Cells. *European Journal of Cancer*, 9, 819-824.

- Yeh, H.W., Burns, E. R., Yeh, L. C. (1985). Initiation of DNA Synthesis in the Liver and other Tissues of Adult Mice by a Growth Factor (EACF) Isolated from Acellular Fluid of the Ehrlich Ascites Carcinoma. *Bioscience Reports*, **5**, 205-14.
- Yener, N. (1973). Meme kanseri. *Ankara Hastanesi Dergisi*, **8 (1)**, 5-13.
- Yuspa, S.H., Poirier, M.C. (1988). Chemical Carcinogenesis: from Animal Models to Molecular Models in One Decade. *Adv. Cancer Research*, **50**, 25-70.
- Zeybek, Ş.Ü. (1996). En Uygun Ehrlich Ascites Tümör Modellerinin Farklı Soy ve Cinsiyetteki Farelerde Gösterilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul.
- Zeybek, Ü. (2003). Deneysel Kanser Modelleri. *Kalıtsal Hastalıklarda Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu*, s.283-310.