

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İ.P., İ.V., S.C. YOLLARLA UYGULANAN
ADRIAMYCİN'İN EHRLİCH ASİT TÜMÖRÜ
(EAT) TAŞIYAN FARELERE ETKİLERİ
ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

121212

Hatice GÜMÜŞHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

2002
ŞANLIURFA


121212



T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


İ.P., İ.V., S.C. YOLLARLA UYGULANAN
ADRIAMYCİN'İN EHRİCH ASİT TÜMÖRÜ
(EAT) TAŞIYAN FARELERE ETKİLERİ
ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

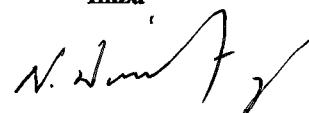
Hatice GÜMÜŞHAN

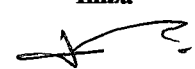

Prof. Dr. Abuzer YÜCEL
Fen Bil. Enst. Müdürü

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 25 / 10 / 2002 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek oybirliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kadri BALCI
Jüri Üyesi
İmza


Doç. Dr. Nihat DİLSİZ
Jüri Üyesi
İmza


Doç. Dr. Davut MUSA
Jüri Üyesi (Danışman)
İmza


TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması sırasında benden değerli yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Davut MUSA'ya, İ. Ü. Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü Öğretim üyeleri Prof. Dr. Gülrüh ULAKOĞLU'na ve Yrd. Doç. Dr. Seyhan ALTUN'a, H. Ü. Tıp Fakóltesi Patoloji ABD Öğretim üyeleri Yrd. Doç. Dr. Muharrem BİTİREN'e ve Yrd. Doç. Dr. İlyas ÖZARDALI'ya, H. Ü. Veteriner Fakóltesi Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet AVCI'ya, ArŐ. Gör. Belkıs TEKGÜLER'e, ArŐ. Gör. Dr. Ali TEKGÜLER'e, ArŐ. Gör. M. Zülfü YILDIZ'a, Serpil ŐAHİN'e ve Zir. Yük. Müh. Yüksel ŐAHİN'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| ÖZET..... | vi |
| ABSTRACT..... | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | viii |
| TABLolar DİZİNİ..... | ix |
| SİMGELER | x |
| 1 GİRİŞ | 1 |
| 2 GENEL BİLGİLER..... | 2 |
| 2.1 Tümör Nedir?..... | 2 |
| 2.2 Tümörlerin İsimlendirilmesi | 3 |
| 2.3 Karsinogenezin Mekanizması | 5 |
| 2.4 Kanser Nedenleri..... | 8 |
| 2.4.1 Kimyasal Etkenler..... | 9 |
| 2.4.2 Fiziksel Etkenler | 10 |
| 2.4.3 Biyolojik Etkenler | 12 |
| 2.5 Kanser Önlenmesi | 12 |
| 2.6 Kemoterapi ve Antineoplastik Ajanlar | 13 |
| 2.7 Antrasiklin Antibiyotikler ve Adriamycin | 17 |
| 2.8 Uygun Tümör Ve Uygun Konut Seçimi | 20 |
| 2.9 Ehrlich Ascites Tümörü (EAT)..... | 21 |
| 2.9.1 Asit Form | 21 |
| 2.9.2 Solid Form | 23 |
| 2.9.3 Alt Formlar | 24 |
| 3 MATERYAL VE METOT | 25 |
| 3.1 Deney Hayvanları..... | 25 |
| 3.2 Ehrlich Ascites Tümörü (EAT) Hücreleri..... | 26 |
| 3.3 Deneysel Uygulamalar | 26 |
| 4 BULGULAR..... | 29 |
| 4.1 Mitotik İndeks..... | 29 |
| 4.2 Hücre Çoğalma Hızı..... | 34 |

| | | |
|---|------------------------|----|
| 5 | TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 37 |
| 6 | KAYNAKLAR..... | 39 |
| 7 | ÖZGEÇMİŞ..... | 43 |
| 8 | ÖZET..... | 44 |
| 9 | SUMMARY | 45 |



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İ.P., İ.V., S.C. YOLLARLA UYGULANAN ADRIAMYCİN'İN EHRİCH ASİT TÜRÖRÜ (EAT) TAŞIYAN FARELERE ETKİLERİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Hatice GÜMÜŞHAN

Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

2002, Sayfa, 45

Bu çalışmada, Adriamycin (ADR), Ehrlich Asit Tumorü (EAT) taşıyan Balb/C ırkı farelere intraperitoneal (i.p.), intravenöz (i.v.) ve subkutanöz (s.c.) yollar ile, hangi yolun tedavide daha etkili olduğunu araştırmak için uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan 72 adet fare; 3 deney (grup I, grup II ve grup III), 3 kontrol (grup IV, grup V ve grup VI) grubu olacak şekilde 6 gruba bölünmüştür. Her grup 12 fare içermektedir. Her bir fareye 300 000 EAT hücresi inoküle edilmiştir. 0.01 mg/g (vücut ağırlığı) ADR tek doz olarak i.p., i.v. ve s.c. yollarla sırasıyla grup I, grup II ve grup III'e enjekte edilmiştir. 0.25 ml serum fizyolojik i.p., i.v. ve s.c. yollarla kontrol grupları grup IV, grup V ve grup VI'ya sırasıyla uygulanmıştır. Uygulamadan sonraki 2., 4., 6. ve 8. günlerde her gruptan rastgele seçilen üç fare dislokasyonla öldürülmüştür. Periton boşluğundan asit sıvısı toplanmış ve asit sıvısı içindeki EAT hücreleri Tripan mavisi kullanılarak Neubauer lamında sayılmıştır. Mitotik indeks için yayma preparatlar hazırlanmıştır. Tüm preparatlar fikse edilmiş, ardından Feulgen ve Giemsa metotları kullanılarak boyanmıştır. Mitoz sayısını belirlemek için her preparattan ortalama 1000 EAT hücresi sayılmıştır.

İstatistiki sonuçlar mitotik indeks, hücre sayısı ve hücre çoğalma hızının i.p. uygulama yapılmış grup I ve i.v. uygulama yapılmış grup II'de kontrol grupları IV (i.p.) ve V (i.v.)'e göre dikkat çekici biçimde azaldığını göstermiştir ($p<0.01$). Grup III (s.c.) ile kontrol grubu VI (s.c.) arasında önemli fark bulunamamıştır ($p>0.01$). Mitotik indeks, hücre sayısı ve hücre çoğalma hızı, grup I (i.p.)'de grup II (i.v.)'ye göre daha fazla azalma göstermiştir ($p<0.01$). Sonuç olarak en fazla etki grup I (i.p.)'de görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELELER: Adriamycin, EAT, i.p. uygulama, i.v. uygulama, s.c. uygulama, Doxorubicin.

ABSTRACT

Master Thesis

A STUDY ON THE EFFECTS OF ADRIAMYCIN ADMINISTERED BY MEANS OF IP, IV, SC TO EHRlich ASCITES TUMOR (EAT) BEARING MICE

Hatice GÜMÜŞHAN

Harran University Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Biology

2002, Page 45

In this study, Adriamycin (ADR) was administered by intraperitoneal (i.p.), intravenous (i.v.) and subcutaneous (s.c.) ways to Balb/C mice bearing Ehrlich ascites tumor (EAT) to investigate which way was more effective in treatment .

72 mice used in this study were divided into 6 groups as 3 experimental (group I, group II and group III) and 3 control (group IV, group V and group VI) groups. Each group contained 12 mice. 300 000 EAT cells were inoculated each mouse. 0.01 mg/g (body weight) ADR was injected as a single dose via i.p., i.v. and s.c. respectively to experimental group I, group II and group III. 0.25 ml normal saline was administered by means of i.p., i.v. and s.c. to group IV, group V and group VI (control groups) respectively. On the 2nd, 4th, 6th and 8th days after administration, 3 mice randomly chosen from each experimental and control groups were killed by dislocation. Ascites fluid was collected from peritoneal cavity and EAT cells in ascites fluid were counted using Trypan blue in Neubauer chamber. Slides for mitotic index were prepared. All the slides were fixed and then stained using Feulgen and Giemsa methods. About 1000 EAT cells were counted from each slide to determine the mitosis number.

Statistical results showed that mitotic index, total cell number and cell proliferation were significantly decreased ($p < 0.01$) in group I (i.p.) and group II (i.v.) regarding to control groups IV (i.p.) and V (i.v.). There was no significant difference ($p > 0.01$) between experimental group III (s.c.) and control group VI. In group I (i.p.) more decrease in mitotic index, total cell number and cell proliferation were seen when compared to group II (i.v.) ($p < 0.01$). Consequently the most efficient was shown in group I in respect of curing properties.

KEYWORDS: Adriamycin, EAT, i.p. administration, i.v. administration, s.c. administration, Doxorubicin.

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.3.1. Kanser oluşum mekanizması (11). | 6 |
| Şekil 2.3.2. Kanser patogenezinin akış şeması (9). | 7 |
| Şekil 2.6.1. Hücre siklusu diyagramı | 14 |
| Şekil 2.7.1. Adriamycin'in kimyasal formülü (20)..... | 19 |
| Şekil 2.9.1.1. Normal (sağlıklı) fare (solda) ve EAT gelişmiş fare (sağda). Karın ileri derecede şişmiş, sağlıklı fareden kolayca ayırt ediliyor. | 22 |
| Şekil 2.9.1.2. Normal (sağlıklı) fare (önde) ve EAT gelişmiş fare (arkada). Karın ileri derecede şişmiş, sağlıklı fareden kolayca ayırt ediliyor. | 22 |
| Şekil 4.1.1. Mitotik indeks. Kontrol (c), i.p., i.v. ve s.c. gruplarında 2., 4., 6. ve 8. günlerdeki mitotik indeks yüzdeleri görülmektedir. | 31 |
| Şekil 4.1.2. Mitotik indeks. Kontrol (c), i.p., i.v. ve s.c. gruplarında 2., 4., 6. ve 8. günlerdeki mitotik indeks yüzdeleri görülmektedir. | 31 |
| Şekil 4.1.3. Kontrol grubuna (4.gün) ait preparat. Ok ile işaretli hücre geç anafaz safhasındadır. | 32 |
| Şekil 4.1.4. Kontrol grubuna (4.gün) ait preparat. Ok ile işaretli hücreler: Sağdaki metafaz, soldaki geç profaz safhasındadır. | 32 |
| Şekil 4.1.5. i.p. grubuna (4. gün) ait preparat. Mitotik indeks, hücre sayısı ve hücre çoğalma hızı azalmıştır. | 33 |
| Şekil 4.1.6. i.v. grubuna (4. gün) ait preparat. Mitotik indeks, hücre sayısı ve hücre çoğalma hızı azalmıştır. | 33 |
| Şekil 4.1.7. s.c. grubuna (4. gün) ait preparat. Ok ile işaretli hücreler profaz safhasındadır. | 34 |
| Şekil 4.2.2. Hücre çoğalma hızı. 300 000 EAT hücresinin enjeksiyonundan sonra 2., 4., 6. ve 8. günlerde her grubun sahip olduğu hücre sayısı belirlenmiştir. | 36 |

TABLolar DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Tablo 2.2.1. Bazı tümörlerin isimlendirilmesi (Erer H., 1998'den (8) özetlenerek) ... | 4 |
| Tablo 2.4.1.1. Ana Kimyasal Karsinojenler (9)..... | 10 |
| Tablo 2.6.1. Bazı antineoplastik ajanlar [Vademecum (Modern İlaç Rehberi) 2001'den (18) özetlenerek]..... | 17 |
| Tablo 2.7.1. Anthracyclinlerin biyolojik etkileri..... | 18 |
| Tablo 3.1.1. Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi | 25 |
| Tablo 3.1.2. Deney hayvanlarına verilen yemdeki besin maddeleri ve enerji düzeyi | 26 |
| Tablo 3.3.1. Kontrol ve Deney Grupları Çalışma Programı | 27 |
| Tablo 3.3.2. HBSS'in bileşimi..... | 28 |
| Tablo 4.1.1 Mitotik indeks yüzdesi. Kontrol (c), i.p., i.v. ve s.c. gruplarında 2., 4., 6. ve 8. günlerdeki mitotik indeks yüzdeleri görülmektedir..... | 30 |
| Tablo 4.2.1. Hücre çoğalma hızı. 300 000 EAT hücresinin enjeksiyonundan sonra 2., 4., 6. ve 8. günlerde her grubun sahip olduğu hücre sayısı görülmektedir..... | 35 |

SİMGELER

ADR: Adriamycin

EAT: Ehrlich ascites (asit) tümörü

c: kontrol

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenöz

s.c.: subkutanöz

i.m.: intramuskular

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution



1 GİRİŞ

Kanser hastalığının tedavisi konusunda çok çeşitli çalışmalar yapılmış ve yapılmaktadır. Kanser ilaçla tedavisi anlamına gelen kemoterapinin ana ilkesi, tümör hücrelerine hastanın normal hücrelerinden daha fazla etki ederek, normal hücrelere zarar vermeden veya minimum düzeyde zararlı etki yaparak tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya onları yok etmektir (1). Bilim adamları kanser ile ilgili çalışmalarda ideal ilacı, yani normal hücreye en az düzeyde etki yapan ilacı bulmak odağında yoğunlaşmışlardır.

Antineoplastik etkili olan Adriamycin (Doxorubicin HCl, 14-hydroxydaunorubicin), (ADR), *Streptomyces peucetius*'tan elde edilen mutant *Streptomyces peucetius* var. *caesius* kültüründen izole edilmiş sitotoksik bir antirasiklin antibiyotiktir (2,3,4). Bu antibiyotik, interkalasyonla veya serbest radikal oluşumuyla DNA'da hasar yapar. Ayrıca DNA Topoizomeraz II enzimini de inhibe eder. Sitotoksik aktivitesi hücre siklusunun herhangi bir fazına özgü değildir; ancak en büyük etkisini S fazındaki hücrelere göstermektedir.

Kanser çalışmalarında transplante edilebilir tümörlerin oluşturduğu çeşitli modeller kullanılmaktadır. (Ehrlich Ascites Carcinoma, Krebs 2 Ascites Carcinoma, Sarcoma 180 Ascites Tümör, Crocker Mouse Sarcoma, vb.) (5). Bir farede spontan olarak başlayan meme adenokarsinomundan kökenlenen Ehrlich Ascites Tümörü (EAT) 1932'de Leuwenthal ve Jahn tarafından asit tümör haline getirilmiştir. Transplante edilebilme oranı çok yüksek olup hemen hemen %100'dür. Hiç regresyon göstermeyen EAT çok kısa yaşama sürelidir ve %100 ölüme götürür (6). Fare dışındaki deney hayvanlarında red olayı gözlenmektedir (7).

Bu tez çalışması, ADR'i intraperitoneal (i.p.) (karın içi), intravenöz (i.v.) (damar içi) ve subkutanöz (s.c.) (deri altı) yollarla uygulayarak bu maddenin EAT hücreleri üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı bir şekilde incelemek amacıyla yapılmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Tümör Nedir?

Tümör, organizmadaki hücrelerden herhangi birinin otonomi kazanarak canlının kontrol mekanizmalarının etkisinde kalmadan aşırı çoğalması sonucunda oluşan, gelişmesi normal dokuların aksine hızlı ve tümör oluşturan uyarı ortadan kalktıktan sonra bile büyümesini sürdüren yeni doku oluşumudur. Tümör terimiyle benzer anlam taşıyan başka terimler de kullanılmaktadır: **Neoplasm** (neoplasia, neos=yeni, plasia=oluşum), organizmada yeni gelişen ve kontrol edilemeyen bir doku gelişmesini ifade eder ve tümör terimiyle aynı anlamı taşır (8). Aslında tümör yalnızca bir dokuda ödem, hemoraji ve başka bir şekilde oluşturulan şişlik anlamına gelir. Günümüzde tümör terimi beden yüzeyinde şişliğe yol açan neoplastik kitleleri tanımlamaktadır; bu terimin neoplastik olmayan lezyonları tanımlamak amacıyla kullanılmasına pek rastlanmaz. Bazı kaynaklarda neoplazi “normal dokuları aşan, onlarla koordine olmayan ve değişime yol açan uyarı durduktan sonra bile aynı şekilde aşırı büyümeye devam eden anormal bir doku kütlesi” şeklinde tanımlamıştır.

Tümörler parazit gibi davranış göstererek metabolik gereksinimleri için normal hücre ve dokularla yarışmaya giriyor gibi görünür, böylece geliştikleri hastada enerji savurganlığına neden olurlar. Belirli ölçüde otonomi gösterirler ve lokal çevreleri ile konağın beslenme durumu ne olursa olsun az çok sabit bir şekilde büyürler. Ancak otonomi hiçbir zaman tam değildir. Tüm tümörler beslenme ve kanlanma için konağa kritik şekilde bağımlıdır.

Tıpta, tümörlerle ilgilenen dal **onkoloji** (oncos=tümör, logos=bilim) olarak adlandırılır. Onkolojide tümörlerin potansiyel klinik davranışlarının belirlenmesi için onların benign (=iyi huylu) ve malign (= kötü huylu) kategorilere ayrılması önemlidir (9). Köken aldıkları doku hücrelerine benzeyen, sınırlı, yavaş ve ekspansif büyüyen, kapsüllü, bazal membranı bozmayan mitotik indeksi düşük, metastaz ve invazyon yapmayan hücrelerin oluşturduğu tümörler benigndir (8). Lokal cerrahi operasyonla alınabilir ve hastanın sağ kalımını etkilemez (8,9). Malign tümörler ise az diferansiye, hızlı ve infiltratif büyüyen, mitotik indeksi yüksek hücrelerden oluşur (8). Komşu yapılara invaze olup onları harap edebilir ve uzak bölgelere yayılarak (metastaz yaparak) ölüme yol açabilir. Kanser, genel anlamda habis (malign) tümörlere verilen isimdir (8,9).

2.2 Tümörlerin İsimlendirilmesi

Tümörlerin isimlendirilmesinde tümörün köken aldığı hücre tipi, davranışı (benign ya da malign oluşu) ve morfolojik özellikleri dikkate alınır (Tablo 2.2.1) (8).

Benign tümörler, köken aldıkları dokunun isminin sonuna “-oma” veya “-om” son eki getirilerek isimlendirilir.

Malign tümörler epitelyal orjinli ise “-karsinom”, mezenkimal kökenli ise “-sarkom” son ekini alır (8,9).

Bazı tümörlerde kullanılan “-blastom” son eki, tümörün embriyonal karakterde olduğunu yani tümörün embriyonal gelişme sırasındaki olgun olmayan dokulardan köken aldığını anlatır. Örneğin, *nefroblastom*, *hepatoblastom* gibi. Bu tür tümörler yeni doğan ve yavru canlılarda görülür.

Tek bir embriyonal tabakadan köken almış ancak birden fazla hücre tipinden oluşan tümörler miks tümörlerdir. *Fibromiyolipom*, *fibrokondroosteom* gibi (8).

Birden fazla embriyonal tabakadan oluşan tümörlere teratom, bunların malign olanlarına malign teratom adı verilir (8,9).

Tablo 2.2.1. Bazı tümörlerin isimlendirilmesi (Erer H., 1998'den (8) özetlenerek)

| Köken aldığı doku | Benign | Malign |
|---------------------------------|----------------------------------|--|
| <i>Mezenkimal doku</i> | | |
| Bağ doku | Fibrom | Fibrosarkom |
| Kemik | Osteom | Osteosarkom |
| Kıkırdak | Kondrom | Kondrosarkom |
| Yağ | Lipom | Liposarkom |
| İskelet kası | Rabdomiyom | Rabdomiyosarkom |
| Düz kas | Leiomyom | Leiomyosarkom |
| Kan damarı endoteli | Hemangiom | Hemangiosarkom |
| Lenf damarı endoteli | Lenfangiom | Lenfangiosarkom |
| Mast hücreleri | Mastositom | Malign Mastositom |
| Sinovyal | Sinoviom | Malign Sinoviom |
| Meninksler | Meningiom | Malign Meningiom |
| Mezotelyum | Mezotelyom | Malign Mezotelyom |
| <i>Epitel doku</i> | | |
| Çok katlı yassı epitel | Papillom | Yassı hücreli karsinom Bazal hücreli karsinom |
| Bez epiteli | Adenom | Adenokarsinom |
| Değişici epitel (idrar yolları) | Papillom, polip | Değişici epitel karsinomu |
| Karaciğer | Hepatoma (hepatosellüler adenom) | Hepatosellüler adenokarsinom |
| Endokrin epitel | Adenom | Karsinom |
| Spermatojenik epitel | Seminom | Malign Seminom |
| <i>Hemopoietik doku</i> | | |
| Lenfositler | | Lenfom, Lenfosarkom, Lenfositik lösemi |
| Plazma hücreleri | | Plazmasitom (Multiple miyelom) |
| Granülositler | | Granülositik lösemi (Miyelogenöz lösemi) |
| Eritrositler | | Eritrolösemi |
| Monositler | | Monositik lösemi |
| <i>Nöroendokrin doku</i> | | |
| Adrenal medulla | Feokromositom | Malign Feokromositom |
| Aortik ve Karotid cisimler | Paragangliom | Malign Paragangliom |
| Langerhans adacıkları | İnsülinom β hücreli adenom | Malign İnsülinom β hücre karsinomu |
| <i>Nöroektoderm</i> | | |
| Melanositler | Melanom | Malign Melanom |

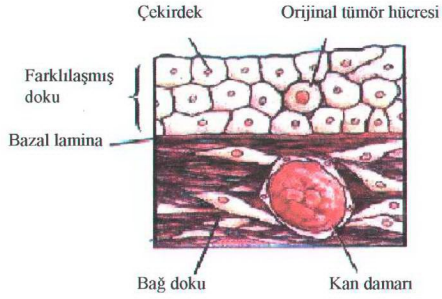
2.3 Karsinogenezin Mekanizması

Kanser birçok faktörün karmaşık biçimde rol aldığı bir hastalıklar grubudur (10). Neoplazinin temelinde normal hücre sel denetimlerin başarısızlığı (11) başka bir deyimle normal büyüme kontrollerine verilen yanıtın kaybolması (9) yatmaktadır.

Kanser hücresi, kendi normal büyüme ve bölünmesini düzenleme mekanizmasını yitirmiş ve yeni yüzey karakterleri kazanmış bir hücredir. Bölünme yetenekleri çok fazladır, hızla çoğalırlar; fakat farklılaşmalarını tamamlayamamış hücrelerdir (11,12). Bu tür hücreler “transforme olmuş hücreler” olarak isimlendirilirler. Transforme olmuş bir hücre popülasyonu, genellikle genlerinde yıkıcı değişimler olan bir tek hücrenin bölünmesi sonucunda meydana gelir. Bu nedenle kanser her zaman için bir hücre ile başlar.

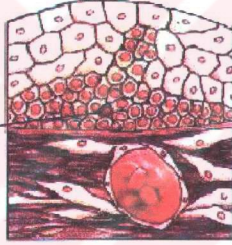
Genellikle hayvansal hücrelerin plazma zarının yüzeyinde bulunan glikoproteinler, glikolipitler ve oligosakkaritler, hücreye biyokimyasal bir kimlik kazandırır ve onlar genetik kontrol altında bulunurlar (12). Bu moleküllerin görevlerinden bir tanesi, hücre reseptörleri olarak iş görmek ve bu arada kontakt inhibisyonu sağlamaktır (11,12). Başka bir deyişle, kontakt inhibisyon hücrenin kalabalıklaşmaya (aşırı bölünmeye) olan tepkisidir. Hücre zarındaki reseptörler, bitişikteki aynı tip hücrelerin zarındaki marker'ları tanıdığı zaman reseptörler çekirdeğe sinyaller gönderir ve hücre bölünmesi baskılanır (11). Bir hücrede kontakt inhibisyon özelliği ortadan kalktığı, daha açık bir ifadeyle hücre yeni hücre yüzeyi karakterleri kazandığında, sürekli olarak çoğalma yeteneği kazanır (12).

Normal dokular bazal lamina aracılığıyla gevşek düzenlenmiş bağ doku ve dolaşım sisteminden ayrılırlar (Şekil 2.3.1.a). Eğer bir hücre değişime uğrar ve denetim mekanizmasını kaybederse çoğalmaya, çekirdeğini büyütmeye, biçimini değiştirmeye ve DNA'sını replike etmeye başlar. Hücre çoğaldıkça oluşturduğu koloni diğer hücreleri iter. Eğer kontakt inhibisyon eksikliği varsa ve bölünmeler de belli bir sayı ile sınırlandırılmamışsa, kolonideki hücreler, besin bitinceye kadar çoğalacaktır. Bu konumda sistem hala bazal lamina ile bağlantıdadır (Şekil 2.3.1.b). Kolonideki bir hücre, bazal laminayı delme yeteneği kazanırsa bir yarık oluşturacak ve oluşturulan oğul kuşaklar bu açıklıktan ilerleyerek çoğalacak ve laminanın delinmesiyle de geniş alana yayılacaktır (Şekil 2.3.1.c) (11).

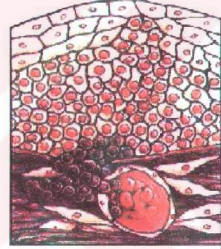


(a)

Bir tümör hücresi laminaya penetre oluncaya kadar gelişen tümör



(b)

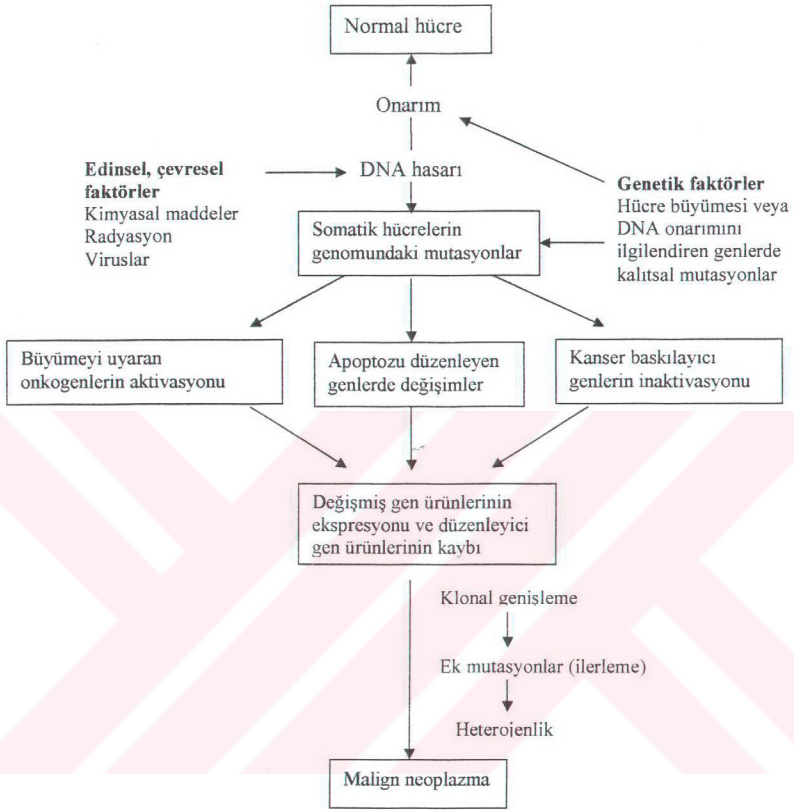


Dolaşım sistemi ile malignansi sıçradıkça yayılır.

(c)

Şekil 2.3.1. Kanser oluşum mekanizması (11).

Karsinogenezin merkezinde ölümcül olmayan genetik hasar yatar. Bu tip genetik hasar (mutasyon) çeşitli çevresel (kimyasal, fiziksel ve biyolojik) etkenlerle meydana gelir ya da kalıtsal olarak genetik dizisinde bulunabilir. Bir tümör kitlesi, genetik hasara uğrayan tek bir hücrenin bölünmesi sonucu meydana gelebilir. Bu bakımdan kanser her zaman tek bir hücre ile başlar, yani tümörler monoklonaldır (9,12). Şekil 2.3.2’de kanser patogenezinin akış şeması görülmektedir.



Şekil 2.3.2. Kanser patogenezinin akış şeması (9).

Genetik hasarın asıl hedefi protoonkogenler ve antionkogenlerdir.

Protoonkogenler: Hücre bölünmesini teşvik eden genlerdir. Bazı protoonkogenler büyüme faktörleri ve bunlara ait reseptörler olarak hücre zarı üzerinde etki gösteren proteinleri şifrelerken, bazıları sitoplazmadan nükleusa geçerek hücrenin çoğalmasını başlatan sinyalleri taşıyan molekülleri şifrelemektedir. Diğer bazıları ise nükleusta hücre bölünmesinden önce DNA sentezinin başlatılmasında rol alan proteinleri şifrelemektedir.

Protoonkogenlerin çeşitli yollarla [transdüksiyon, insersiyon (12), translokasyon, nokta mutasyonu, gen amplifikasyonu (9,12)] mutasyonu sonucu aktif formlarına **onkogen** adı verilmektedir (12). Yani protoonkogenler retroviral transdüksiyonla (transformasyon yapan retrovirusların etkisiyle) (9), Papovavirus, Poxvirus, Herpes virus ve Adenovirusların (11,13) genetik materyalinin insersiyonu ile ya da in situ davranışlarını değiştiren ve böylece onları hücresele onkogenlere çeviren etkiyle onkogenik hale gelebilirler (9). Bugüne kadar yaklaşık 60 protoonkogen keşfedilmiştir. Bunların her biri bir onkogene çevrilebilir (12).

Antionkogenler (Tümör Baskılayıcı Genler): Ekspresyonları kanser fenotipini inhibe etme özelliği olan (12), başka bir deyişle hücre proliferasyonunu frenleyen (9), bir diğer ifadeyle onkogen ürünlerinin aktivasyonunu engelleyen genlerdir. Bu tip bir inhibitör genin başarısızlığı bir protoonkogenin aktivasyonu ile eş anlamlıdır (11).

Bunlardan başka apoptozu (programlı hücre ölümü) düzenleyen genler (9,11,14) ile DNA onarım genleri de karsinogenezde önemli yer tutar (11,14). Apoptozu düzenleyen genler protoonkogenler gibi dominant olabilir veya kanser baskılayıcı gen gibi davranabilir. *bcl-2*, *bcl-x*, *bax*, *bag*, *bad* genleri apoptozu düzenlemede rol oynayan genlerdir. Bir antionkogen olan *p53* geninin görevlerinden biri, mutajenik ajana maruz kalan hücrede DNA hasarı onarılmadığı zaman apoptozun uyarılmasıdır. Bu sebeple *p53* geni apoptozu neden olan gen olarak da düşünülebilir. DNA onarım genleri de protoonkogen, antionkogen ve apoptozu düzenleyen gen gibi diğer genlere bağlı ölümcül olmayan hasarı onarmak için organizmanın yeteneğini etkileyerek indirekt olarak hücrenin çoğalmasını veya yaşamasını düzenler. DNA onarım genlerindeki bir yeteneksizlik, genomda yaygın mutasyona zemin hazırlar ve bu nedenle neoplastik değişim ortaya çıkabilir (9).

2.4 Kanser Nedenleri

Son yirmi yılda elde edilen çok sayıda veri kanserin ana nedenlerinin yaşam tarzı ile ilgili olduğunu göstermektedir. Epidemiyolojik çalışmalar dünyanın farklı yerlerinde farklı kanser tiplerinin görülme sıklığının farklı olduğunu ortaya koymuştur (5). Değişik coğrafi bölgelerde yaşayanlarda görülen kanser türleri ve dağılımı da değişiktir; fakat göçmenlerde bir süre sonra kanser sıklığı ve çeşitleri göç

ettikleri ülkeninkine benzer duruma gelmektedir (10). Örneğin, Nisei'lerin (ABD'nde yaşayan ikinci nesil Japonlar) belirli kanser tipleri için sahip oldukları mortalite oranları Japonya'da yaşayan Japonlarla Amerikalıların sahip oldukları oranlar arasında yer almaktadır (9).

Kansere neden olan faktörlerin büyük kısmının çevrede kaçınılmaz şekilde maruz kalınan etkenler olmaktan ziyade sigara, alkol, hayvansal yağ, şişmanlık, UV (ultraviyole) ışınlarına maruz kalmak gibi yaşam tarzı ile ilgili vazgeçilebilir - kaçınılmaz faktörler olduğu belirlenmiştir (5). Bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesini başlatan dış etkenlerin hepsi bunu o hücrenin içindeki kanser genlerini aktive ederek yaparlar (10).

Üç karsinogenik etken sınıfı tanımlanabilir:

- 1) Kimyasal etkenler: DNA'nın nükleotit dizilişinde bazı lokal değişimlere sebep olur.
- 2) Fiziksel etkenler: Radyasyon ve UV ışınları
- 3) Biyolojik etkenler: Bazı viruslar, hormonlar ve parazitler (9,12).

2.4.1 Kimyasal Etkenler

Sanayinin sentetik ürünleri olan ve gıda maddelerine katkı maddesi olarak ilave edilen veya besinlerimizde doğal olarak bulunan, mutajenik, çok sayıda kimyasal madde vardır (9,12). Bunların bazıları direkt etkilidir, karsinogen olmak için herhangi bir kimyasal dönüşüme ihtiyaç duymazlar. Bazıları ise metabolik dönüşümden sonra aktifleşirler ki bunlar **prokarsinojenler** olarak adlandırılır. Birçok kimyasal karsinogen, neoplazi oluşturmak üzere birlikte veya diğer karsinogen etkilerle beraber (örneğin viruslar veya radyasyon) etki edebilirler (9).

Mutajenik kimyasallara sigarada bulunan mutajenik katran, kozmetikler, birçok saç boyası, hegzaklorofen sabunlar, kızartılan etlerdeki yanmış proteinler, bazı sebzelelerdeki herbisit, fungusit, insektisit gibi kimyasal kalıntıları, baharatlar, kömür katranı componentleri, benz(a)pyrene örnek verilebilir (11).

Tablo 2.4.1.1'de ana kimyasal karsinogenler verilmiştir (9).

Tablo 2.4.1.1. Ana Kimyasal Karsinojenler (9)

| |
|---|
| Doğrudan etkili karsinojenler |
| Alkile edici ajanlar Antikanser ilaçlar (siklofosfamid, klorambosil, nitrozurea ve diğerleri) Asile edici ajanlar 1-asetil-imidazol Dimetil korbamil klorid |
| Metabolik aktivasyon isteyen prokarsinojenler |
| Polisiklik ve heterosiklik aromatik hidrokarbonlar Benzopiren Dibenzantrasen 3-Metilkolantren 7,12-Dimetilbenzantrasen |
| Aromatik aminler, amidler, azo boyaları |
| 2-Naphtylamin (β -naphtylamin) 2-Acetylamino fluorene Dimetillaminoazobenzen |
| Doğal bitkisel ve mikrobiyal ürünler |
| Aflatoksin Griseofulvin Betel nuts |
| Diğerleri |
| Nitrosamin ve amid Klorid, nikel, kromyum Poliklorinad bipenil Arsenik Asbestos |

2.4.2 Fiziksel Etkenler

İyonlaştırıcı radyasyon ve kısa dalgaboylu UV (ultraviyole) akla ilk gelen fiziksel etkenlerdendir. (9). Görülen ışığınkinden daha kısa dalga boylu herhangi bir radyasyon formu hücrenin çekirdeğine girdiğinde büyük bir olasılıkla kansere neden olabilmektedir (12). Güneşten yeryüzüne gelen veya yapay olarak üretilen UV ışınları, X ışınları, nükleer füzyon veya radyonüklidler kaynak olabilir (9).

Radyasyon ile kanser oluşumu arasındaki ilk gözlemler, X ışınları ile çalışan radyoloji öncülerinin birçoğunun ellerinde ortaya çıkan deri tümörleridir. Bu konudaki bir diğer örnek de Pierre ve Marie Curie ile kızları Irene'dir. Marie Curie ve kızı Irene, her ikisi de lösemiden ölmüşlerdir ve bunun sebebinin radyoaktiviteyle ilgili deneyleri sırasında maruz kaldıkları radyasyon olduğu kabul edilmektedir. İlk zamanlarda kanser vakalarının bu kadar yüksek oluşunun sebebi, radyasyon

etkilerinin bilinmemesine bağlı olarak, çalışmaların radyasyondan korunma ile ilgili hiçbir nlem alınmaksızın yürütülmüş olmasındır (14).

İkinci Dünya Savaşı sırasında, Hiroşima ve Nagasaki'ye atom bombalarının atılmasından sonraki 8-10 yıl içerisinde, buralarda yaşayan insanlarda maksimum düzeyde görülen kanser vakaları da radyasyonun bir sonucudur (12).

Bu gözlemlerden sonra yapılan hayvan deneyleri ve buna ek olarak çeşitli şekillerde radyasyona maruz kalmış insan gruplarında yapılan incelemeler, radyasyonun spontan olarak meydana gelen tüm kanser tiplerinin oluşma oranını (insidans) arttırdığını göstermiştir.

Radyasyon hemen hemen bütün dokularda tümör oluşumuna yol açabilir. Ancak bazı tip tümörler diğerlerine oranla daha yaygın grlrliler. Genellikle sık bölünen hücrelerden oluşan doku ve organlar, bölünme hızı düşük olan hücrelerden oluşan doku ve organlara göre tümör oluşumuna daha elverişlidir.

Tümörler genellikle radyasyona doğrudan maruz kalan organlarda ortaya çıkarlar. Ancak kanser oluşumunun dolaylı olarak meydana geldiğini gösteren veriler de vardır. Örneğin, tiroit bezi ¹³¹I ile ışınlandırılmış farelerde, hipofiz tümörlerinin oluştuğu saptanmıştır.

Radyasyonun karsinojen etkisinin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. İyonlaştırıcı radyasyonların karsinojen özelliğe sahip olmaları sebebi ile, kanserleşmenin normal hücrelerde radyasyon etkisi ile ortaya çıkan somatik mutasyonlar sonunda meydana geldiği ileri srlmştir. Bu görüş tek başına tüm mekanizmayı açıklamak için yeterli değildir. Ancak radyasyon etkisi ile oluşan bir somatik mutasyonun, tümör oluşturan olaylar zincirinin bir halkası olduğu söylenebilir. Radyasyon etkisi ile kromozomlarda meydana gelen değişiklikler, protoonkogenlerin onkogene dönüşümüne, onkogenlerin aktivasyonuna sebep olabilir (mutasyonlar). Onkogenlerin aktivasyonu yolu ile oluşan ve radyasyona özgü olan bir kanser ile ilgili direkt bir kanıt bugüne kadar elde edilememiştir. Ancak onkogenlerin aktivasyonunun radyasyon etkisi ile oluşabileceği, bu konuda indirekt de olsa, bir bağlantının varlığını düşündürmektedir. Bunun yanında onkogen aktivasyonu modeli, radyasyon, viruslar ve kimyasal maddeler gibi birbirlerinden çok farklı etkenlerin tümünün benzer şekilde kanser oluşturmasını da büyük lde açıklamaktadır. Bunların tümü DNA moleküllerinde hasarlara ve kromozom

aberasyonlarına yol açmaktadırlar. Bunun sonucu olarak da bir onkogeni aktive ederek birbirlerine benzer şekilde malignansiye sebep olmaktadır (14).

2.4.3 Biyolojik Etkenler

a) Viruslar: Çok sayıda DNA ve RNA virusunun kurbağalardan primatlara dek birbirinden çok ayrı hayvanda onkojenik olduğu kanıtlanmıştır. Ancak yoğun araştırmalara rağmen, sadece birkaç virüsle insanlardaki kanser arasında ilişki kurulmuştur (9).

Retroviruslar transdüksiyonla (9), Papova virus, Pox virus, Herpes virus ve Adenoviruslar (11,13) genetik materyallerinin insersiyonu ile protoonkogenleri onkogene çevirerek kansere neden olabilmektedir.

Bir RNA virüsü olan insan T hücreli lösemi virüsü Tip1 (HTLV-1) ve DNA virüsleri insan Papilloma virüsü (HPV), Epstein-Barr virüsü (EBV) ve Hepatit B virüsü (HBV)nun insanlarda kansere neden oldukları iddia edilmektedir (9,12).

b) Parazitler: Helminthlerin Trematoda sınıfına dahil, insanlarda parazitlik yapan, *Schistosoma*'larla infestasyona uğramış kişilerde karaciğer ve mesane kanserleri riskinin fazla olduğu bildirilmiştir (10). *S. haematobium*, Afrika'daki insanlarda yumurtaların irritasyonu ile mesane kanserleri ve *S. japonicum*, Doğu Asya'daki insanlarda rektum kanserleri oluşturabilmektedir (8).

c) Hormonlar: Eskiden menopoz semptomlarının ortadan kaldırılması için kullanılan östrojen, şimdi postmenopozal kadınlarda osteoporozun gidişini yavaşlatmak ve durdurmak için progesteronla birlikte veya tek başına yaygın olarak kullanılmaktadır. Östrojenler uzun süre kullanıldıklarında karaciğer kanseri ve eğer progesteron ile birlikte kullanılmazlarsa endometriyum ve meme kanseri riskini artırırlar. Oral kontraseptiflerin de dozaj ve kullanım süresi ile ilgili olarak uterus serviks kanseri ve karaciğer kanseri riskini artırıcı rol oynadıkları bildirilmiştir (1,8,9).

2.5 Kanserinin Önlenmesi

Kanserden korunmak, "birinci derece önleme"dir. Asemptomatik kişilerde yapılan taramalarla kanseri erken evrede, daha iyisi prekanseröz evrede yakalamak ise "ikinci derece önleme"dir.

Birinci derece önleme, beslenme biçiminde dikkatli olunması, sigara ve kanserojen maddelerden uzak durma gibi kanserin vazgeçilebilir - kaçınılabilir nedenlerinden uzak durmakla sağlanabilir. Epidemiyolojik çalışmalar, A vitamini ya da beta karotene zengin yiyeceklerle beslenenlerde kanser insidansının daha az olduğunu göstermektedir. Selenyum, E vitamini (α -tocopherol), C vitamini (L-ascorbic acid), yeşil ve sarı sebzelerin koruyucu etkileri bildirilmiştir. Hayvan deneylerinde farmakolojik miktarlarda C vitamini, E vitamini, A vitamini ve bunun analogları (retinoidler) ve beta karotenin önemli derecede koruyucu etkisi görülmektedir (10).

2.6 Kemoterapi ve Antineoplastik Ajanlar

Antineoplastik kemoterapi, kanserin ilaçla tedavisi demektir (10). Antineoplastik kemoterapinin ana ilkesi, hastanın normal hücrelerine zarar vermeden veya çok az toksik etki yaparak tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya onları yok etmektir (1,15,16).

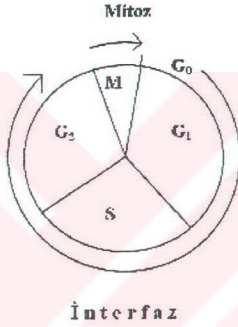
Kanser tedavisinde kemoterapi, lenfoma hücrelerine karşı hardal gazının (nitrogen mustard) uygulanmasıyla, 1940'ta ilk kez kullanılmıştır (2). Bugün bilinen çok sayıda antineoplastik ajandan 50 kadarı kanser kemoterapisi için kullanılmakta (10,15) ve kanserin cinsine göre bu 50 kadar ilaçtan biri tek başına, birkaçı birlikte veya birkaçı birbiri ardından uygulanmaktadır (10).

Antineoplastik ilaçlar, kanser hücrelerine de ağız mukoza epiteli, barsak mukoza epiteli, kemik iliği hematopoietik hücreler, saç folikülleri gibi hızlı biçimde çoğalan normal hücrelere de aynı etkiyi yapabilirler (10,15). Ancak kanser hücreleri normal dokulardan daha hızlı çoğaldıkları için daha fazla zarar görürler. Ayrıca hızlı çoğalan normal hücreler kanser hücrelerinden daha çabuk iyileşmektedirler (10).

Kanserli bir hücre ile normal bir hücreyi birbirinden ayıran spesifik bir karakter olmamasına karşın genetik, metabolik, kinetik ve membran farklılıkları ayırt edilebilmektedir. Ancak tam anlamıyla selektif şekilde kanser hücrelerini öldüren bir antineoplastik ilaç bulunamamıştır. Normal hücreye en az düzeyde etki yapan ilaç kanser kemoterapisinde ideal ilaçtır (15,16).

Kanser kemoterapisi son yıllardaki hücre kinetiği ile ilgili gelişmelerden büyük ölçüde yararlanmışır. Çeşitli sitotoksik ilaçlar, kanser hücrelerinin çoğalma sikluslarının farklı fazlarında etki yapmaktadırlar (10,15).

Bölünen bir hücrenin ikinci kez bölününceye kadar geçirdiği devreye **hücre siklusu** denir. Hücre siklusu dört belirgin safhaya ayrılır: G_1 (sentez öncesi), S (sentez), G_2 (mitoz öncesi), M (mitoz). Bu safhalar hem normal hücrelerde hem de kanser hücrelerinde aynıdır, sadece safhaların süreleri kanser hücrelerinde normal hücrelere nazaran daha kısadır.(Şekil 2.6.1).



Şekil 2.6.1. Hücre siklusu diyagramı

G_1 Safhası: Hücre bölünmesinden hemen sonra başlar (12). Senteze hazırlık dönemidir (15). Hücre bölünmesi için gerekli proteinler, enzimler, diğer yardımcı maddeler ve ATP sentezlenir (17). Süresi hücrenin çoğalma hızına göre değişir (11,15,17).

S Safhası: DNA sentezlenir ve kromatin replike olur (12,15,17). RNA sentezi devam eder,protein sentezi en yüksek düzeye ulaşmıştır (16). Hücre metabolizması en aktif döneminde olup antimetabolik ilaçlara çok duyarlıdır (15).

G_2 Safhası: Mitoza hazırlık dönemidir. DNA sentezinin tamamlanmasından mitozun başlamasına kadar geçen evredir (12,15). DNA sentezi bitmiştir. RNA ve protein sentezi G_1 safhasında olduğu kadardır. Bu süreç tamir olaylarının olduğu en önemli dönemdir. Bundan sonra mitoz başlar (16).

G_1 , S, G_2 safhaları interfaşı oluşturur.

M Safhası: Mitoz bölünmenin meydana geldiği evredir (11,12,15,17). Sonuçta iki yavru hücre meydana gelir. S safhasında sentezlenmiş olan DNA iki yavru hücreye geçmiştir (16).

Organizmanın tüm hücreleri, aynı zamanda aynı fazda değillerdir (asinkronize). Bazı hücrelerin aktiviteleri hücre siklusu sırasında geçici veya sürekli olarak durur. Bu tip hücreler bir anlamda döngüden çekilerek metabolizmalarını

değiştirmekte ve büyümelerini durdurmaktadır. Bu hücreler G_0 'daki hücreler olarak tanımlanır (12,15). G_0 'da yer alan, yani bölünme potansiyeline sahip ancak bir süre için bölünmeyen hücreler tümör kitlesinin kaynak hücre havuzunu oluştururlar. G_0 'daki hücreler stabil hücreler olarak adlandırılır. Bu hücreler aktif olarak bölünen hücreler (=labil hücreler) ile denge halindedir. Ayrıca bazı hücreler farklılaşma sonucu veya hücrenin ölümü sonucu sıklıktan irreversibl olarak ayrılırlar. Tamamen farklılaşmış hücreler mitoz geçirmezler. Bu hücreler permanant (bölünmeyen) hücreler adını alırlar (9,15). Bu bilgiler doğru kemoterapötüğün doğru uygulanması açısından önemlidir.

Günümüzde kullanılan antineoplastik ajanların hemen tamamı, en büyük etkisini sıklıdaki hücreler üzerine gösterir. Bu nedenle yüksek büyüme fraksiyonlu tümörler, örneğin lenfomalar, antineoplastik ajanlara çok duyarlıdır. Ancak kolon kanseri gibi düşük büyüme hızına sahip tümörler nispeten rezistandır. Böyle vakalarda öncelikle tümör hücreleri G_0 'dan hücre siklusuna kaydırılmalıdır. Bu, cerrahi yolla veya radyasyonla tümör kütesinin küçültülmesiyle sağlanabilir. Yaşayan tümör hücreleri yeniden hücre siklusuna girer ve böylece ilaç tedavisine daha duyarlı hale gelir (9).

Kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar nükleik asit biyosentezini, protein sentezini ve mitozu inhibe ederek, nükleik asit yapısını bozarak veya enzimatik çevreyi değiştirerek etkili olmaktadır (15,16).

Antineoplastik ajanlar genel etki mekanizmalarına ve kaynaklarına göre şu şekilde sınıflandırılırlar:

1. **Alkilleyci ilaçlar:** Hücre siklusunun herhangi bir fazına özgü değildirler. Hücreleri, hangi fazda olurlarsa olsunlar etkileyebilirler. Ancak hücreler G_1 ve S fazlarında bu ilaçlara daha fazla duyarlıdır. DNA çift zincirinde bir veya birden fazla noktaya kovalent bağla (irreversibl) bağlanarak DNA molekülünü alkilleler. Böylelikle DNA'nın transkripsiyonu ve replikasyonu engellenir. DNA'dan başka enzimleri ve diğer hücre proteinlerini de alkilleyerek sitotoksik etki yaparlar. Cyclophosphamide, chlorambucil, nitrosourearlar bu gruba örnektir.

2. **Antimetabolitler:** DNA, RNA ve diğer temel hücre komponentlerinin sentez zincirinin değişik basamaklarında substrat veya koenzim olarak rol oynayan çeşitli doğal metabolitlerin analoglarıdır. Bu nedenle enzim üzerinde kendilerine

özgü noktalara karşı onlarla yarışır ve bağlanmalarını inhibe ederler. Faza özgü ilaçlardır. Hızlı çoğalma dönemindeki çoğalma fraksiyonu yüksek tipteki tümörlere daha fazla etkilidirler. Örneğin; methotrexate, fluorouracil, gemcitabin.

3. **Bitkisel kaynaklı ilaçlar (Bitki alkaloidleri):** Hücre siklusunun M fazına özgü, sitotoksik ilaçlardır. Vinka alkaloidleri (vincristine, vinblastin) bunlara örnek verilebilir.

4. **Antibiyotikler:** Çeşitli mikroorganizmaların kültürlerinden elde edilen antibiyotik niteliğinde antineoplastik ilaçlardır. Replikasyon ve transkripsiyonu engelleyerek, hücrede serbest radikal oluşturup DNA zincirinde kırıklara neden olarak etki gösterirler. Bleomycin, Daunorubicin, Adriamycin, vb.

5. **Platin kompleksleri:** DNA çift zincirine çapraz bağlanırlar. Faza özgü değillerdır. Cisplatin, carboplatin örnektir.

6. **Enzimler:** Bakteri kültürlerinden hazırlanan L-asparaginaz enzimidir. Asparagin aminoasitinin yıkılmasını kataliz ederek vücut sıvılarında asparagin stoğunu azaltır. Böylece tümör hücreleri asparagin alamaz, protein sentezi bozulur (1).

7. **Hormonlar ve hormon antagonistleri:** Bazı tümör hücrelerinin hormonal mikroçevresini bozarak bunların çoğalmasını engellerler (16). Androjenler, progesteronlar, antiöstrojenler.

Bu sınıflara örnek ilaçlar Tablo 2.6.1'de özetlenmiştir (18).

Tablo 2.6.1. Bazı antineoplastik ajanlar [Vademecum (Modern İlaç Rehberi) 2001'den (18) özetlenerek]

| |
|---|
| ALKİLEYİCİLER |
| <i>Alkyl sulfonatlar</i> |
| Busulfan, Improsulfan, Piposulfan |
| <i>Aziridinler</i> |
| Benzodepa, Carboquone, Meturedopa, Uredopa |
| <i>Ethyleniminler ve Methylmelaminler</i> |
| <i>Nitrogen mustardlar</i> |
| Chlorambucil, Cyclophosphamide, Ifosfamide |
| <i>Nitrosurealar</i> |
| <i>Diğer</i> |
| Dacarbazine, Mannomustine, Mitobronitol, Pipobroman, Temozolomide |
| ANTİMETABOLİTLER |
| <i>Folic acid analogları</i> |
| Denopterin, Edatrexate, Methotrexate |
| <i>Purine analogları</i> |
| Cladribine, 6-Mercaptopurine |
| <i>Pyrimidine analogları</i> |
| Fluorouracil, Gemcitabine, Cytarabine |
| ALKALOİDLER |
| Docetaxel, Etoposide, Irinotecan, Paclitaxel, Teniposide, Topotecan, Vinblastin, Vincristin, Vindesine |
| ANTİBİYOTİKLER |
| Aclacinomycins, Actinomycin F ₁ , Adriamycin (Doxorubicin HCl), Anthramycin, Bleomycins, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitomycins, Plicamycin, Pirarubicin, Streptozocin, Zorubicin |
| PLATİN KOMPLEKSLERİ |
| Carboplatin, Cisplatin |
| HORMONLAR |
| Androjenler, Antiandrojenler, Antiadrenaller, Antiestrojenler (Tamoxifen), Aromatas inhibitörleri, Estrojenler, LH-RH analogları, Progesteronlar (18) |
| ENZİMLER |
| L-Asparaginase (1) |

2.7 Antrasiklin Antibiyotikler ve Adriamycin

Antrasiklin antibiyotikler 1960'ların başlarından beri çeşitli farmasötik laboratuvarlarda izole edilmiş ve üzerinde hâlâ çalışılmaktadır (19). Kemoterapide kullanılan antrasiklin antibiyotiklerin antineoplastik aktiviteleri ilk kez 30 yıl önce gösterildi (3). Antineoplastik antibiyotikler çok geniş spektrumludur ve 1000'den fazla analoğa sahiptirler. Orijinal antrasiklinler kanser tiplerinin çoğuna karşı etkindir (2,3). Geçtiğimiz 20 yıl içinde antrasiklinlerin bazı biyolojik etkileri açıklanmıştır.

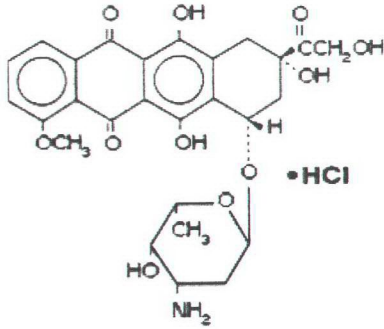
(Tablo 2.7.1). Bu etkiler kısaca; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu, DNA polimeraz, RNA polimeraz ve DNA tamir enzimlerinin, topoizomeraz I ve topoizomeraz II'nin inhibisyonu ve hücre membran yapılarında değişikliklere neden olan serbest radikallerin üretilmesi şeklinde açıklanabilir (2, 3,19).

Tablo 2.7.1. Anthracyclinlerin biyolojik etkileri

| | |
|--|---------------------------------------|
| i n h i b i s y o n | Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon |
| | DNA polimerazlar |
| | RNA polimerazlar |
| | DNA tamir enzimleri |
| | Metallothionein sentezi |
| | Topoizomeraz I |
| | Topoizomeraz II |
| | Helikazlar |
| Serbest radikal üretimi | |
| Membran modülasyonu | |
| Endonükleolitik ayrılma | |

ADR (Doxorubicin, 14-hydroxydaunorubicin), *Streptomyces peucetius* 'tan elde edilen mutant *Streptomyces peucetius* var. *caesius* kültüründen izole edilmiş sitotoksik bir antrasiklin antibiyotiktir (2,3,4,20).

Kimyasal yapısı kromoforik 4 halkalı bir aglikon kısmı (substitüe antrasiklin halkası) ile ona glikozid bağı ile eklenmiş nadir bir aminoşeker (daunozamin)den oluşur (Şekil 2.7.1) (16,20).



$C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$
M.W. - 579.99

Şekil 2.7.1. Adriamycin'in kimyasal formülü (20).

ADR, DNA'ya bağlanma ve nükleik asit sentezini inhibe etme yeteneğine sahiptir (2,4). İnterkalasyon ile DNA'ya bağlanarak replikasyon ve transkripsiyonu bozar. Topoizomerez II inhibisyonunun sonucu olarak DNA'da kırıklar (DNA cleavage) meydana getirir (4,21). Serbest radikal oluşturarak DNA'da hasar yapar (21). Hücre siklusunun herhangi bir fazına özgü değildir (16,21); fakat S fazındaki hücrelerde etkinliği en fazladır (16).

ADR mide-barsak kanalından absorbe edilmez (16,22). Dokulara fazla bağlanıp oradan yavaş salınır. İlaç, karaciğer, kalp, akciğer ve böbreklere hızla varır ve bu organlarda bazı değişimlere yol açabilir (16). Karaciğerde hızlı metabolize edilmesine karşın vücutta kalışı ve etkisi uzun sürer. Büyük kısmı safra yolu ile atılırken bir kısmı da böbreklerden atılır (22). İdrarın rengini kırmızıya boyar (16,18). Kan-beyin bariyerini aşmaz (20). Plasental geçiş vardır (21). Anne sütüne geçmektedir (20,21).

ADR, i.v. veya intravezikal yollarla uygulanmaktadır (18). İ.v. yolla ADR uygulaması sırasında, ilacın damar dışına sızması dokularda ekstrasvazyona sebep olabilir (23). Topikal ADR uygulamasının mesane mukozası tarafından iyi tolere edildiği bildirilmiştir (24). Araştırmacılar, ovaryum kanserli 15 hastadan oluşan bir grupta yaptıkları bir çalışmada, i.p. olarak lipozomal ADR uygulamasıyla, sınırlanmış toksisite ve ümit verici klinik cevap bulmuşlardır (3).

Çok geniş spektrumlu olmasına karşın yan etkilerinin fazla oluşu ADR için bir dezavantajdır. En büyük yan etkileri kemik iliği depresyonu (16,18) ile akut ve kronik kardiyotoksitesitesidir (2,3,10,15,16,18,20,21,22,24,25,26,28,29,30,31,32,33). Ayrıca bulantı, kusma, alopesi (saç dökülmesi) (18,21,25,34,35), diyare, ağızda ülserasyon (18,21,25) ve ekstrasvazasyon (23) da ADR'in toksik etkileridir.

ADR, lipit peroksit radikalleri şeklinde kardiyotoksitesiteye neden olmaktadır. ADR'in antioksidant etkiye sahip vitamin A ile birlikte uygulandığı zaman bu yan etkilerin azaldığı deneysel olarak gösterilmiştir (2). Yine farelerde yapılan çalışmalarda vitamin E'nin miyokardı ADR toksisitesinden koruduğu bulunmuştur. Sprague-Dawley türü sıçanlarla yapılan bir başka çalışmada ise vitamin C kullanımının, ADR ekstrasvazasyonunda, nekrozu belirgin olarak azalttığı tespit edilmiştir (23).

2.8 Uygun Tümör Ve Uygun Konut Seçimi

Neoplastik çalışma yapacak kişi öncelikle üzerinde çalışacağı tümör ve onun konutunu seçmelidir. Araştırmanın niteliğine, amacına en uygun tümör-konut sistemini seçmek zorunludur (6).

1950'li yıllardan sonra transplante edilebilen tümörlerin oluşturduğu modeller tercih edilmeye başlanmıştır. Günümüzde kullanılan bu tür modellere örnek olarak Krebs 2 Ascites Carcinoma, Ehrlich Ascites Carsinoma, Sarcoma 180 Ascites tümör ve Crocker Mouse Sarcoma gibi tümörler verilebilir (5).

Yapılacak deneysel çalışmada tümör modelinin belirlenmesi kadar, deney hayvanı türü ve soyu ile uygun yaş ve cinsiyetin belirlenmesi de önemlidir.

Çalışmalarda tümör tutma başarısının yükselmesi için genç erişkin olarak nitelenen yaştaki (yaklaşık 2 aylık) hayvanların seçilmesi uygundur. Fareler için 18-22 g, sıçanlar ve hamsterler için 100-110 g ağırlığındaki bireyler tercih edilmelidir (5,7).

Transplante edilebilme oranı çok yüksek hemen hemen %100 olan Ehrlich Ascites Tümörü (EAT) hiç regresyon göstermez, çok kısa yaşama sürelidir ve %100 ölüme götürür. İmmünolojik açıdan TATA (=Tumor Associated Transplantation Antigens)'lara sahip değildir (6). Biz bu özellikleri nedeniyle, EAT'nin kendi amaçlarımıza en uygun olduğunu düşündük. Konut olarak Balb/C ırkı, ortalama 25 g

ağırlığında, inbred erkek fareleri kullandık. Çünkü EAT farelere özgüdür. Fare dışındaki sıçan, tavşan, kobay gibi deney hayvanlarında red olayı gözlenmektedir (5,7).

2.9 Ehrlich Ascites Tümörü (EAT)

EAT hücreleri 1905'te, bir farede spontan olarak başlayan meme adenokarsinomundan kökenlenmiş, 1932 yılında Leuwenthal ve Jahn tarafından asit tümör haline getirilene kadar katı form halinde üretilmiştir. Üretimlerinden sonra heterojen karyotipli çok sayıda altsoyuları geliştirilmiştir (36,37).

2.9.1 Asit Form

Tümör hücrelerinin herhangi bir vücut boşluğuna enjekte edilmesinden sonra orada çoğalmaları ile neoplastik hücreler ihtiva eden bir efüzyon meydana gelmesi, asit (=ascites) terimi ile ifade edilir. 1932'de Loewenthal ve Jahn Ehrlich tümörünün asit şekli elde ettiler (6,38). Genellikle tümörler, tekrarlayan pasajlarla virulanslarını artırırlar. Bu gibi tümörlerin büyüme hızı artar. Diferansiyasyon gittikçe kaybolur, gelişmeyi kontrol eden başlıca mekanizmalardan sıyrılır, heterotransplantabilite kabiliyeti kazanır ve nihayet asit formuna dönüşebilirler (6).

Asit, gri-beyaz bazen hafif kanlı görünümde koyu bir sıvıdır ve 0.1 cc'de yaklaşık 10.000.000 neoplastik hücre ihtiva eder (6,36).

Asit formlar tümörün pasaj yoluyla devam ettirilmesine kolaylık sağlamasının yanı sıra tümör hücrelerinin yapısı ve biyokimyasının incelenmesine de avantaj getirmiştir. 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 formda elde edilmiş olacaktır (5,7).

Bu hücreler, farelerin peritoneal boşluğunda süspansiyon halinde çoğalır ve in vitro'da yapay yüzeylere yapışmazlar (36). EAT hücreleri farenin peritoneal boşluğuna inokulasyonu takiben iki fazda çoğalır. Bu fazlar hücre sayısının eksponansiyel olarak arttığı çoğalma fazı ve bunu izleyen, hücre sayısının hemen hemen sabit kaldığı plato fazıdır (37). EAT hücrelerinin sayıları çoğalma periyodu boyunca hızlı hücre bölünmeleri ile artar ve periton boşluğunu doldururlar. Tümör hücrelerindeki bu çoğalmaya paralel olarak asit sıvısı birikimi de meydana gelir (36).

Pasajdan 4-6 gün sonra asit teşekkül etmekte olduğu anlaşılabilir (Şekil 2.9.1.1 ve Şekil 2.9.1.2). Toplam 5-12 cc asit teşekkül eder (6,36).



Şekil 2.9.1.1. Normal (sağlıklı) fare (solda) ve EAT gelişmiş fare (sağda). Karın ileri derecede şişmiş, sağlıklı fareden kolayca ayırt ediliyor.



Şekil 2.9.1.2. Normal (sağlıklı) fare (önde) ve EAT gelişmiş fare (arkada). Karın ileri derecede şişmiş, sağlıklı fareden kolayca ayırt ediliyor.

Yapılan araştırmalarda, 3×10^6 EAT hücresinin i.p. enjeksiyonundan sonra hücre sayısının dokuzuncu güne kadar eksponansiyel olarak arttığı, dokuz ve onuncu gündən itibaren de plato fazına girildiği görölmüştür (36). Hücre siklusunun tüm fazları tümörün yaşıyla artar. DNA sentez periyodu 10 günlük tümörde 48 saattir. Aynı zamanda hücre kayıp oranı da yaşı tümörlerde artar; fakat çoğalan fraksiyon (GF) değişmez (39).

EAT hücrelerinin çoğalma fazından plato fazına geçişleri boyunca, mitokondri sayısında, protein sentezinde, ATP içeriği ve ATP dönüşümünde azalma (40), DNA ve RNA biyosentezinde azalma (36,40), intraselöler pürin, pirimidin nükleotidleri, nükleosidleri ve bazlarının kaybı (40,41), glutatyon (GSH) içeriğinde azalma (42), yapısal bozulmalar, timidin kinaz aktivitesindeki azalmadan dolayı timidin konsantrasyonunda artış, trigliseritlerin, kolesterol esterlerinin ve serbest yağ asitlerinin artması gibi bir takım morfolojik ve metabolik değişiklikler meydana gelmektedir (36).

EAT hücrelerinin sayıları çoğalma periyodu boyunca hızlı hücre bölünmeleri ile artar ve periton boşluğunu doldururlar. Tümör hücrelerindeki bu çoğalmaya paralel olarak asit sıvısı da birikir. Belli bir zaman sonra da konak hayvan hem tümör hacminin oluşturduğu basınç, hem de tümörün organizmaya verdiği hasar sonucunda ölüş (36).

2.9.2 Solid Form

Ehrlich tümörü bir farede meme tümörü olarak başlamış, Ehrlich ve Apolant tarafından bundan transplante edilebilir solid tümör elde edilmiştir (38). Ehrlich tümörü hücrelerinin deri altı verilmesi ile 1 haftada yaklaşık 1 cm çapında tümör elde edilir. Bu büyüklüğe ulaştığında tümörün ortasında bir miktar nekrotik saha vardır. Az miktarda konnektif doku ihtiva eder. Tümör hücreleri eşit büyüklükte değillerdir, çapları 20-30 μ m (6).

Solid Ehrlich tümörleri 0.4-1.8 g ağırlık aralığında yaklaşık 10 günlük iki kat olma zamanına (T_d :doubling time) sahiptir. Solid tümörün oldukça yavaş büyümesi yüksek oranda hücre ölüminden kaynaklanır (39).

Tümörün tutma oranının yüksek oluşu, hızlı gelişmesi ve infiltratif büyüme göstermesi yüksek derecede malign olduğunu gösterir. Regresyon meydana gelmez ve hayvan 40-50 günde ölür (6).

2.9.3 Alt Formlar

H. Lettré yaptığı çalışmalarla Ehrlich tümörünü kalitatif ve kantitatif açıdan temel araştırma vasıtası haline getirmeyi ve İkinci Dünya Savaşı sırasında tümörü devam ettirmeyi başarmıştır. Uygun bir test sistemi olarak aranın kullanılır hale geldiğinden 1948'den sonra hızla bütün dünya enstitülerine yayılmıştır (34).

Orijinal tümör hiperdiploiddir. Çeşitli bilim adamları yaptıkları çalışmalarla bu tümörün çok sayıda alt formunu elde etmişlerdir: *Hauschka* tetraploit, *Eve Kramer* kolşisin rezistans ve *Scholz* ise Glikojen+ ve GlikojenØ alt formlarını elde etmeyi başarmışlardır (38).

Çalışmamızda uzun yıllardır İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Radyobiyojoloji Anabilim Dalı'nda pasajlarla devamı sağlanan hiperdiploid tümörü kullandık.

Bu tez çalışmasında amacımız ADR'i i.p., i.v. ve s.c. yollarla uygulayarak bu maddenin EAT hücreleri üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı bir şekilde incelemektir.

3 MATERYAL VE METOT

3.1 DeneY Hayvanları

Kullanılan deneY hayvanları İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırmaları Merkezi'nden (DETAM) temin edildi. Uygun koşullarda özel plastik kafeslere kondu. Beslenmelerinde kullanılan yem Gaziantep Yem Fabrikasından getirildi. Yemin bileşiminde bulunan maddeler Tablo 3.1.1 ve Tablo 3.1.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1.1. DeneY hayvanlarına verilen yemin bileşimi

| Yem Maddeleri | Yüzdesi (%) |
|-----------------|-------------|
| Mısır | 34,00 |
| Arpa | 5,40 |
| Buğday | 13,00 |
| Kepek | 2,00 |
| Soya Küspesi | 25,00 |
| Balık Unu | 8,50 |
| Et-Kemik Unu | 4,00 |
| Kireç Taşı | 0,50 |
| DCP | 1,00 |
| Tuz | 0,60 |
| Vitamin Karması | 1,00 |
| Mineral Karması | 1,00 |
| Melas | 4,00 |

Tablo 3.1.2. Deney hayvanlarına verilen yemdeki besin maddeleri ve enerji düzeyi

| Besin Maddeleri ve Enerji Düzeyi | Yüzdesi (%) |
|---|--------------------|
| Kuru Madde | 86,32 |
| Ham Protein | 23,99 |
| Ca | 1,17 |
| P | 0,90 |
| Met+Sis | 0,77 |
| Lizin | 1,48 |
| Ham Yağ | 3,00 |
| Ham Seliöz | 3,18 |
| Metabolik Enerji (kcal/kg) | 2658,31 |

3.2 Ehrlich Ascites Tümörü (EAT) Hücreleri

Deneyde kullanılan EAT hücreleri, hiperdiploid EAT hücreleridir. Bu hücreler 1977 yılında Köln Radyobioloji Bölümü'nden temin edilerek İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Radyobioloji Anabilim Dalı'nda devamı sağlanmıştır. Buradan 2001 yılında Üniversitemize gönderilmiş ve o tarihten bu yana pasajlarla devam ettirilmektedir. Rutin olarak her 13 günde bir, bir farede diğerine transplantasyonları yapılmaktadır. Transplantasyon için deney hayvanı olarak 2.5 aylık (20-28 g) Balb/C ırkı inbred erkek fareler kullanılmaktadır. Steril enjektör yardımıyla 13 günlük donör farenin periton boşluğundan içinde tümör hücrelerinin bulunduğu asit sıvısı alınmakta ve alıcı fareye i.p. yolla 0.1 ml enjekte edilerek bir fareye 3×10^6 tümör hücresi transplante edilmektedir.

3.3 Deneysel Uygulamalar

Deney hayvanı olarak ortalama ağırlığı 25 gr olan Balb/C ırkı erişkin inbred erkek fareler kullanıldı.

Her birinde 12 adet fare bulunan 6 grup (3 kontrol+3 deney) oluşturuldu. Bu fareler 12 saat aydınlıkta (06:00-18:00), 12 saat karanlıkta (18:00-06:00) tutularak

standardize edildi. Kontrol ve deney gruplarının çalışma programı Tablo 3.3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.3.1. Kontrol ve Deney Grupları Çalışma Programı

| Grup no | Denek Sayısı (n) | Uygulanacak Madde | Uygulama Yolu | |
|---------|------------------|----------------------|---------------|---------|
| I | 12 | EAT+ADR | i.p. | Deney |
| II | 12 | EAT+ADR | i.v. | |
| III | 12 | EAT+ADR | s.c. | |
| IV | 12 | EAT+Serum Fizyolojik | i.p. | Kontrol |
| V | 12 | EAT+Serum Fizyolojik | i.v. | |
| VI | 12 | EAT+Serum Fizyolojik | s.c. | |

Donör farelerden alınan tümör hücresi ihtiva eden asit sıvısındaki tümör hücresi sayısı Neubauer lamı kullanılarak tespit edildi. Fare başına toplam 300.000 tümör hücresi olacak şekilde, kontrol ve deney gruplarındaki tüm farelere, i.p. yolla transplantasyon yapıldı. 10 mg ADR (Doxorubicin HCl) ihtiva eden flakondan (Ticari ismi Adriblastina, Carlo Erba, İstanbul) bidistile su kullanılarak 1 mg/ml konsantrasyonlu çözelti hazırlandı. Transplantasyon yapılmış olan hayvanlara sırasıyla:

Grup I (Deney): i.p. yoldan 0.01mg/g (vücut ağırlığı) ADR uygulandı.

Grup II (Deney): i.v. yoldan 0.01mg/g (vücut ağırlığı) ADR uygulandı.

Grup III (Deney): s.c. yoldan 0.01mg/g (vücut ağırlığı) ADR uygulandı.

Grup IV (Kontrol): i.p. yoldan 0.25 ml serum fizyolojik uygulandı.

Grup V (Kontrol): i.v. yoldan 0.25 ml serum fizyolojik uygulandı.

Grup VI (Kontrol): s.c. yoldan 0.25 ml serum fizyolojik uygulandı.

Uygulamanın yapıldığı gün, 0. gün olarak kabul edildi. 2., 4., 6. ve 8. günlerde her gruptan rasgele 3'er fare seçilerek dislokasyonla öldürüldü. Periton açılarak periton içi 50 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ile yıkandı. HBSS bileşimi Tablo 3.3.2'de verilmiştir. Tümör hücresi içeren asit sıvısı + HBSS (50 ml)

beherde toplandı. Hücre çoğalma hızını belirlemek için Tripan mavisi kullanılarak Neubauer lamında sayım yapıldı. Mitotik indeks için yayma preparatlar hazırlandı. Yaymalar fikse edildikten sonra Feulgen Stain yöntemiyle ve ardından Giemsa boyası ile boyandı. Bütün fareler için aynı işlem tekrarlandı. Yayma preparatlar Olympus CH30 ışık mikroskobunda 100'lük objektifte sayıldı.

Tablo 3.3.2. HBSS'in bileşimi

| Bileşen | Miktar (g) |
|---|-------------------|
| NaCl | 8.00 |
| KCl | 0.40 |
| CaCl ₂ | 0.14 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.10 |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 0.10 |
| Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O | 0.06 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.06 |
| Glukoz | 1.00 |
| Fenol kırmızısı | 0.02 |
| NaHCO ₃ | 0.35 |
| Distile su (L) | 1.00 |

4 BULGULAR

4.1 Mitotik İndeks

Kontrol (c) ve deney (i.p., i.v., s.c.) gruplarında 2., 4., 6. ve 8. günler için farelerden asit sıvısı alındı ve her fare için üçer adet preparat hazırlandı. Fikse edildi ve Feulgen boyasından sonra Giemsa ile boyandı. Her preparatta 1000 adet hücrede mitoz yapan (yani profaz, metafaz, anafaz ve telofaz safhasında olan) hücrelerin sayısı belirlendi. Her hayvan için ortalama mitoz sayısı tespit edildi ve % ortalama değerleri ile standart sapmaları hesaplandı. Varyans analizi yapıldı. Sonuçlar Tablo 4.1.1, Şekil 4.1.1 ve Şekil 4.1.2'de görülmektedir. Preparatların fotoğrafları çekildi. (Şekil 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7).

Varyans analizi sonucunda kontrol grupları ile deney grupları arasında çok ileri düzeyde ($p<0.0001$) anlamlı fark bulundu.

Deney gruplarının kontrol grupları ile ve kendi aralarında günlere göre ikili karşılaştırmaları SPSS 10.0 programı kullanılarak Student's T testi ile yapıldı.

T testi sonuçlarına göre kontrol grubu ile i.p. grubu arasında tüm günler (2., 4., 6., 8.) için ileri düzeyde anlamlı fark bulundu ($p<0.0001$).

Kontrol grubu ile i.v. grubu arasındaki fark 4. ve 8. günler için %1 düzeyinde ($p<0.01$) anlamlı, 6. gün için %5 düzeyinde ($p<0.05$) anlamlı bulundu.

Kontrol grubu ile s.c. grubu arasında 2., 6. ve 8. günler için %1 düzeyinde anlamlı fark bulunamadı ($p>0.01$).

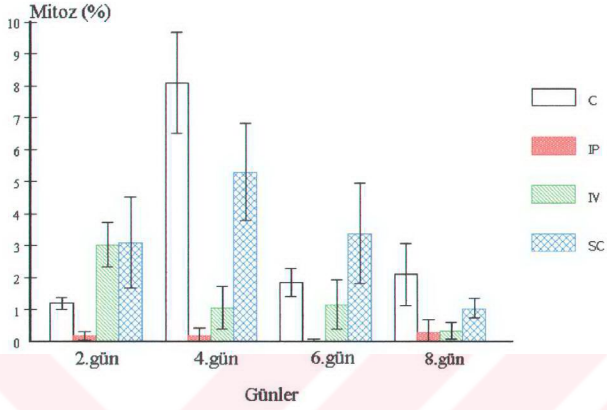
İ.p. grubu ile i.v. grubu arasında yapılan ikili karşılaştırmada 2., 4. ve 6. gün değerleri bakımından %1 düzeyinde anlamlı fark ($p<0.01$) bulunurken, 8. gün değerleri bakımından anlamlı fark bulunamadı ($p>0.01$).

İ.p. grubu ile s.c. grubu arasında tüm gün değerleri bakımından ileri düzeyde ($p<0.0001$) anlamlı fark bulundu.

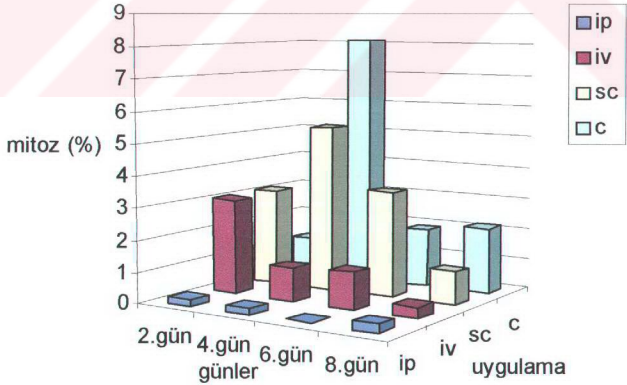
İ.v. grubu ile s.c. grubu arasında 2. gün değerleri bakımından anlamlı fark bulunamazken ($p>0.01$), 4., 6. ve 8. gün değerleri bakımından %1 düzeyinde anlamlı fark bulundu ($p<0.01$).

Tablo 4.1.1 Mitotik indeks yüzdesi. Kontrol (c), i.p., i.v. ve s.c. gruplarında 2., 4., 6. ve 8. günlerdeki mitotik indeks yüzdeleri görülmektedir.

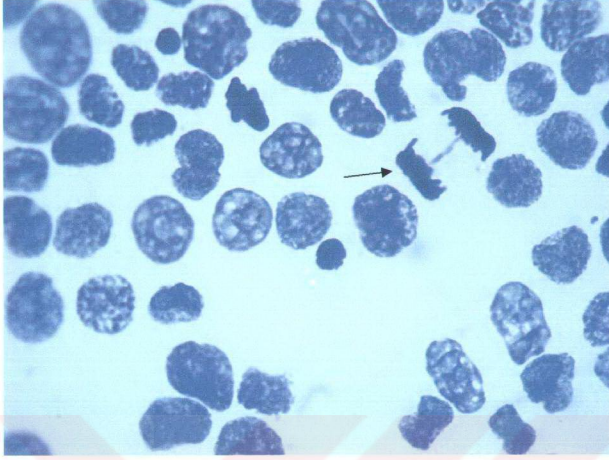
| | | Mitotik İndeks Yüzdesi | | | |
|------------------|------|------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | | 2.gün | 4.gün | 6.gün | 8.gün |
| Uygulama Yöntemi | c. | 1.197±0.1802 | 8.092±1.5863 | 1.852±0.4381 | 2.100±0.9633 |
| | i.p. | 0.182±0.1406 | 0.200±0.2398 | 0.028±0.0441 | 0.278±0.4206 |
| | i.v. | 3.039±0.6995 | 1.070±0.6748 | 1.167±0.7697 | 0.339±0.2690 |
| | s.c. | 3.095±1.4259 | 5.311±1.5136 | 3.383±1.5714 | 1.052±0.3175 |



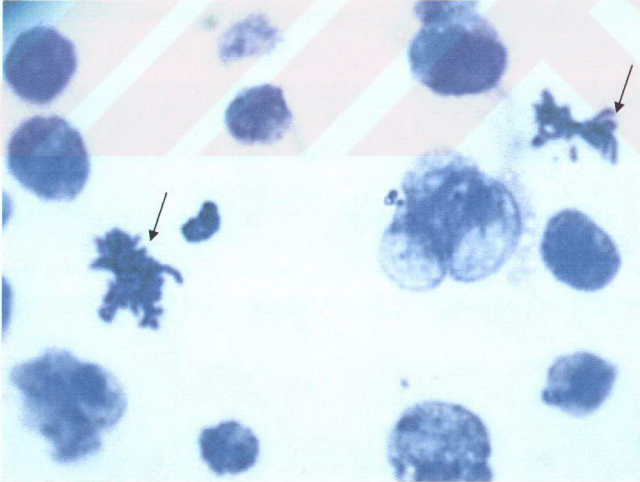
Şekil 4.1.1. Mitotik indeks. Kontrol (c), i.p., i.v. ve s.c. gruplarında 2., 4., 6. ve 8. günlerdeki mitotik indeks yüzdeleri görülmektedir.



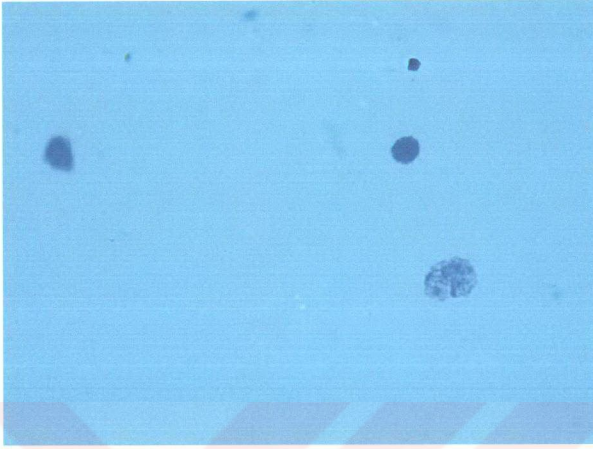
Şekil 4.1.2. Mitotik indeks. Kontrol (c), i.p., i.v. ve s.c. gruplarında 2., 4., 6. ve 8. günlerdeki mitotik indeks yüzdeleri görülmektedir.



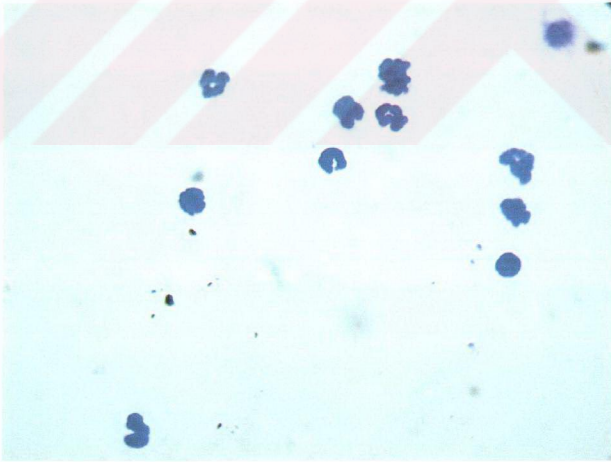
Şekil 4.1.3. Kontrol grubuna (4.gün) ait preparat. Ok ile işaretli hücre geç anafaz safhasındadır.



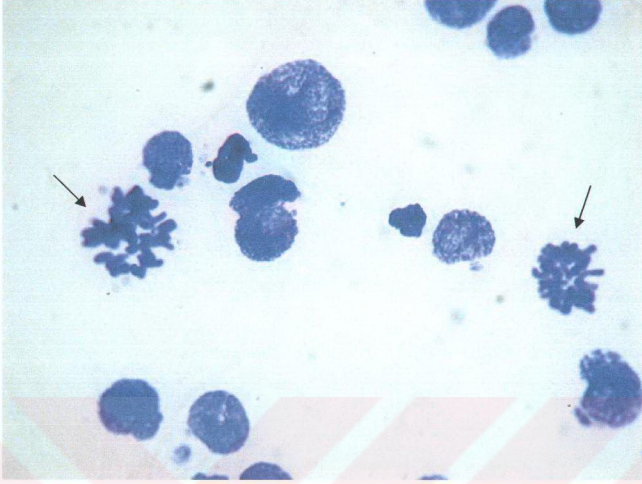
Şekil 4.1.4. Kontrol grubuna (4.gün) ait preparat. Ok ile işaretli hücreler: Sağdaki metafaz, soldaki geç profaz safhasındadır.



Şekil 4.1.5. i.p. grubuna (4. gün) ait preparat. Mitotik indeks, hücre sayısı ve hücre çoğalma hızı azalmıştır.



Şekil 4.1.6. i.v. grubuna (4. gün) ait preparat. Mitotik indeks, hücre sayısı ve hücre çoğalma hızı azalmıştır.



Şekil 4.1.7. s.c. grubuna (4. gün) ait preparat. Ok ile işaretli hücreler profaz safhasındadır.

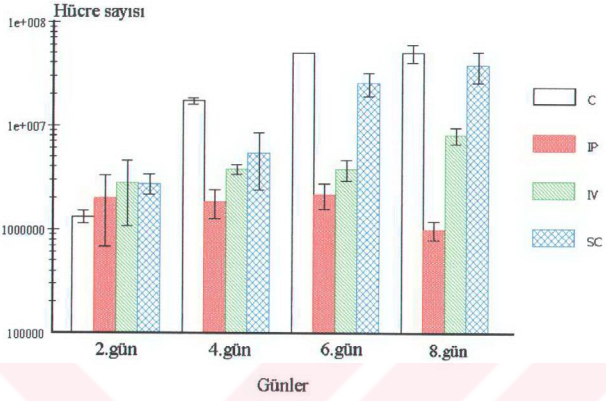
4.2 Hücre Çoğalma Hızı

Kontrol ve deney gruplarında 2., 4., 6. ve 8. günlerde, farelerin periton içi 50 ml HBSS ile yıkandı. Ölü ve canlı hücreleri ayırt etmek için tripan mavisi kullanılarak Neubauer lamında sayım yapıldı. Ortalama değerleri ve standart sapmaları hesaplandı. (Tablo 4.2.1, Şekil 4.2.1, Şekil 4.2.2).

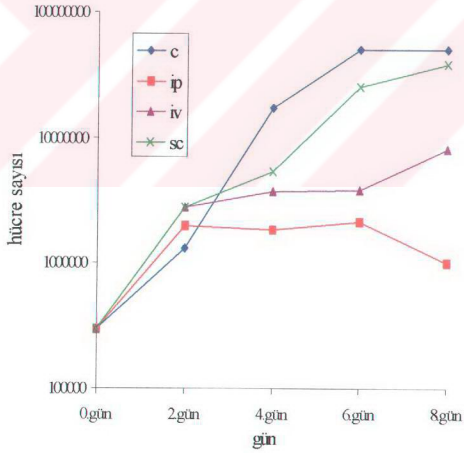
Varyans analizi yapıldı. $p < 0.0001$ düzeyinde ileri derecede anlamlı fark bulundu.

Tablo 4.2.1. Hücre çoğalma hızı. 300 000 EAT hücresinin enjeksiyonundan sonra 2., 4., 6. ve 8. günlerde her grubun sahip olduğu hücre sayısı görülmektedir.

| | | Hücre Çoğalma Hızı | | | |
|-------------------------|-------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | 2.gün | 4.gün | 6.gün | 8.gün |
| Uygulama Yöntemi | c. | 1 325 000 ± 175 000 | 17 275 000 ± 1 225 000 | 50 200 000 ± 200 000 | 50 500 000 ± 9 780 000 |
| | i.p. | 2 000 000 ± 1 322 876 | 1 833 333 ± 577 350 | 2 166 667 ± 577 350 | 1 000 000 ± 200 000 |
| | i.v. | 2 800 000 ± 1 732 051 | 3 766 667 ± 404 145 | 3 800 000 ± 888 819 | 8 066 667 ± 1 401 190 |
| | s.c. | 2 783 333 ± 621 155 | 5 433 333 ± 3 023 795 | 25 726 667 ± 6 301 439 | 38 586 667 ± 12 569 190 |



Şekil 4.2.1. Hücre çoğalma hızı



Şekil 4.2.2. Hücre çoğalma hızı. 300 000 EAT hücrelerinin enjeksiyonundan sonra 2., 4., 6. ve 8. günlerde her grubun sahip olduğu hücre sayısı belirlenmiştir.

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Antineoplastik kemoterapi kanserin ilaçla tedavisi demektir (10). Kanser kemoterapisi, ilk kez 1940'ta, lenfoma hücrelerine karşı hardal gazının (nitrojen mustard) uygulanmasıyla başladı (2). Bugün bilinen çok sayıda antineoplastik ajandan 50 kadarı kanser kemoterapisinde kullanılmaktadır (10,15). Kanserinin cinsine göre bu 50 kadar ilaçtan biri tek başına, birkaçı birlikte veya birkaçı birbiri ardından uygulanır (10). Yine kanserinin cinsine ve ilacın doğasına göre de ilaçların uygulama yolları değişmektedir: i.v., intravezikal, i.p., i.m. (intramuskular), s.c., intrapleural, vb.

Bu tez çalışmasında kullandığımız ADR, antineoplastik etkili bir antrasiklin antibiyotiktir. ADR, interkalasyonla DNA'ya bağlanarak veya topoizomeras II'yi inhibe edip DNA'da kırıklar (DNA cleavage) meydana getirerek ya da serbest radikal oluşturarak etki gösterir (2,4,21). Yapılan çalışmalarda mitotik indekste azalma meydana getirdiği gösterilmiştir (16). Akut ve kronik lösemi, meme kanseri, yumuşak doku sarkomu (18, 21, 20), lenfoma, neuroblastoma (18, 20), ovaryum kanseri, Hodgkin's hastalığı, osteojenik sarkoma (20, 21) ve akciğer kanserine (18, 21) karşı yaygın şekilde; mesane kanseri, endometrium kanseri, mide kanseri, karaciğer kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri, testis kanseri, retinoblastoma, tiroid kanseri, Wilm's tümörü ve benzerlerine karşı daha az sıklıkla kullanılmaktadır.

ADR klinikte i.v. (18,20,21) ve intravezikal (18) olarak kullanılmaktadır. Tahriş edici doğası nedeniyle s.c., i.m. yollarla verilmemektedir (20,21). Malviya ve arkadaşlarının (43) yaptıkları bir çalışmada ovaryum kanserli hastalara i.p. yolla ADR uygulanmış, bu uygulama sonucunda terapötik avantaj sağlandığı, ancak lokal toksisitenin ilacın kullanımını sınırlandırdığı bildirilmiştir (43). Yine başka bir kaynakta kimyasal peritonit riskinden dolayı ADR'in i.p. uygulanması tavsiye edilmemektedir (21). Ancak araştırmacılar ovaryum kanserli 15 hastadan oluşan bir grupta yaptıkları bir çalışmada, i.p. olarak lipozomal ADR uygulamasıyla sınırlanmış toksisite ve ümit verici klinik cevap bulmuşlardır (3). Bir başka grup araştırmacı, yağda çözünmüş ADR emülsiyonunu Ehrlich solid tümörü taşıyan farelere i.p. olarak uygulamışlar, ADR emülsiyonunun serbest ADR'den daha fazla etkili ve toksisitesinin daha az olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca ADR emülsiyonu

uygulanan gruptaki farelerin serbest ADR uygulanan gruptaki farelerden daha uzun süre yaşadıkları bildirilmektedir (44).

Bulgularımıza göre s.c. yol ile ADR uygulaması EAT'ne karşı etkili değildir. İ.p. yol ve i.v. yol ile uygulamalarda mitotik indeks, hücre sayısı ve hücre çoğalma hızı azalmıştır. Mitotik indeks bakımından i.p. grubu ile kontrol grubu arasında tüm günler için önemli fark bulunurken, i.v. grubu ile kontrol grubu arasında 4., 6. ve 8. günler için önemli fark gözlenmiştir. Buna göre ADR'in i.p. yol ile verildiği zaman i.v. yol ile uygulanmasından daha çok ve daha hızlı etki gösterdiğini söyleyebiliriz. EAT periton içinde gelişen bir tümördür. İ.p. yol ile ADR uygulandığı zaman ilaç direkt olarak tümör hücreleri ile karşılaştığından, i.v. yol ile ADR uygulamasına göre daha etkili olmuş olabilir.

Yine çalışmamızın sonuçlarına göre, i.p. ve i.v. gruplarında hücre sayısı ve hücre çoğalma hızı kontrol gruplarına göre azalma göstermiştir. S.c. grubunda, kontrol grubuna göre istatistiki bakımdan önemli bir fark bulunamamıştır. İ.p. yol ile ADR uygulamasının i.v. yol ile ADR uygulamasından daha etkili olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak ADR'in i.p. yol ile uygulanmasının EAT'ne karşı en etkili uygulama biçimi olduğunu söyleyebiliriz.

Antineoplastik kemoterapide tümörün özelliğine ve geliştiği yere göre bir ilaç ve özellikle de uygulama yolu seçmek esas olmalıdır. Bu arada ilacın toksik etkilerini en aza indirecek şekilde uygulanması da önemlidir. ADR için çeşitli literatürlerde lipozomal ADR'in serbest ADR'den daha az toksik olduğu bildirilmektedir (3, 44). Yine başka bazı literatürlerde ADR'in en büyük yan etkisi olan kardiyotoksitesinin, ilaç çeşitli antioksidantlarla (Vit A, Vit C, Vit E) birlikte uygulandığı zaman azaldığının tespit edildiği bildirilmektedir (2, 23).

Çalışmamızın sonuçlarına göre ADR'in EAT'ne karşı en etkili uygulama biçimi i.p. yoldur. Ancak serbest ADR'in doğrudan periton içine uygulanması ilacın tahriş edici özelliği ve toksisitesi nedeniyle riskli olabilir. Dolayısıyla bundan sonraki çalışmalarda EAT'ne karşı lipozomal ADR veya çeşitli antioksidantlarla (Vit A, Vit C, Vit E) birlikte ADR uygulanmasının denemesi konusunda yoğunlaşılması uygun olacaktır.

6 KAYNAKLAR

1. KAYAALP O., Tıbbi Farmakoloji (Gözden geçirme kitabı), Hacettepe Taş Kitapçılık, ISBN: 975-7731-23-4, 79-322, Ankara, 1996.
2. ÇERÇİ B., ULAKOĞLU G., The Effects of Adriamycin on L-strain Cells. *Chimica Acta Turcica*, 28(1), 25-27, 2001.
3. BOOSER D.J., HORTOBAGYI G.N., Anthracycline Antibiotics in Cancer Therapy. *Drugs*, 47(2), 223-258, 1994.
4. LEE T.K.-W., LAU T.C.-M., NG I.O.-L., Doxorubicin-Induced Apoptosis and Chemosensitivity in Hepatoma Cell Lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, 49, 78-86, 2002.
5. OKAY H.G., Deneysel EAT Oluşturulan Fare Karaciğer Plazmasında Nitrik Oksit Metabolizmasının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Sağ. Bil. Enst. Biyokimya ABD., İstanbul, 1998.
6. KALEOĞLU Ö., İŞLİ N., Ehrlich-Lettrè Asit Tümörü. İ.Ü. Tıp Fak. Mecmuası, 401, 978-984, 1977.
7. ZEYBEK Ş.Ü., En Uygun EAT Modellerinin Farklı Soy ve Cinsiyetteki Farelerde Gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Sağ. Bil.Enst., Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri ABD., İstanbul, 1996.
8. ERER H., KIRAN M.M., Veteriner Onkoloji. S.Ü. Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, 9-61, Konya, 1998.
9. KUMAR V., COTRAN R.S., ROBBINS S.L., Temel Patoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 6. Baskı, 47-174, İstanbul, 2000.
10. ALİCAN F., Kanser, Afa Matbaacılık, 1-58, İstanbul, 1993.
11. KEETON W.T., GOULD J.L., Genel Biyoloji, Cilt I, Palme Yayıncılık, 5. Baskı, 299-317, Ankara, 2000.
12. BAHÇECİ Z., Moleküler Biyoloji, Öğrenci Kitabevi Yayınları, ISBN: 975-94084-0-6, 1. Baskı, 139-208, Kırşehir, 1999.

8 ÖZET

Bir antineoplastik antibiyotik olan Adriamycin (ADR), çeşitli kanser tiplerinin tedavisi için yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, ADR, Ehrlich Asit Tümörü (EAT) taşıyan Balb/C ırkı farelere intraperitoneal (i.p.), intravenöz (i.v.) ve subkutanöz (s.c.) yollar ile, hangi yolun tedavide daha etkili olduğunu araştırmak için uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan 72 adet fare; 3 deney, 3 kontrol grubu olacak şekilde 6 gruba bölünmüştür. Deney grupları grup I, grup II ve grup III, kontrol grupları grup IV, grup V ve grup VI'dır. Her grup 12 fare içermektedir. Her bir fareye 300 000 EAT hücresi inoküle edilmiştir. 0.01 mg/g (vücut ağırlığı) ADR tek doz olarak i.p., i.v. ve s.c. yollarla sırasıyla grup I, grup II ve grup III'e enjekte edilmiştir. 0.25 ml serum fizyolojik i.p., i.v. ve s.c. yollarla kontrol grupları grup IV, grup V ve grup VI'ya sırasıyla uygulanmıştır. Uygulamadan sonraki 2., 4., 6. ve 8. günlerde her gruptan rastgele seçilen üç fare dislokasyonla öldürülmüştür. Periton boşluğundan asit sıvısı toplanmış ve asit sıvısı içindeki EAT hücreleri Tripan mavisi kullanılarak Neubauer lamında sayılmıştır. Her hayvandan 3 preparat olacak şekilde mitotik indeks için yayma preparatlar hazırlanmıştır. Tüm preparatlar fikse edilmiş, ardından Feulgen ve Giemsa metotları kullanılarak boyanmıştır. Mitoz sayısını belirlemek için her preparattan ortalama 1000 EAT hücresi sayılmıştır.

İstatistikî sonuçlar mitotik indeks, hücre sayısı ve hücre çoğalma hızının i.p. uygulama yapılmış grup I ve i.v. uygulama yapılmış grup II'de kontrol grupları IV (i.p.) ve V (i.v.)'e göre dikkat çekici biçimde azaldığını göstermiştir ($p<0.01$). Grup III (s.c.) ile kontrol grubu VI (s.c.) arasında önemli fark bulunamamıştır ($p>0.01$). Mitotik indeks, hücre sayısı ve hücre çoğalma hızı, grup I (i.p.)'de grup II (i.v.)'ye göre daha fazla azalma göstermiştir ($p<0.01$). Sonuç olarak en fazla etki grup I (i.p.)'de görülmüştür.

9 SUMMARY

The antineoplastic antibiotic Adriamycin (ADR) is used widely for treatment of various cancer types. In this study, ADR was administered by intraperitoneal (i.p.), intravenous (i.v.) and subcutaneous (s.c.) ways to Balb/C mice bearing Ehrlich ascites tumor (EAT) to investigate which way was more effective in treatment .

72 mice used in this study were divided into 6 groups as 3 experimental and 3 control groups. Experimental groups were group I, group II and group III, and control groups were group IV, group V and group VI. Each group contained 12 mice. 300 000 EAT cells were inoculated each mouse. 0.01 mg/g (body weight) ADR was injected as a single dose via i.p., i.v. and s.c. respectively to experimental group I, group II and group III. 0.25 ml normal saline was administered by means of i.p., i.v. and s.c. to group IV, group V and group VI (control groups) respectively. On the 2nd, 4th, 6th and 8th days after administration, 3 mice randomly chosen from each experimental and control groups were killed by dislocation. Ascites fluid was collected from peritoneal cavity and EAT cells in ascites fluid were counted using Trypan blue in Neubauer chamber. Three slides from each mouse were prepared for mitotic index. All the slides were fixed and then stained using Feulgen and Giemsa methods. About 1000 EAT cells were counted from each slide to determine the mitosis number.

Statistical results showed that mitotic index, total cell number and cell proliferation were significantly decreased ($p < 0.01$) in group I (i.p.) and group II (i.v.) regarding to control groups IV (i.p.) and V (i.v.). There was no significant difference ($p > 0.01$) between experimental group III (s.c.) and control group VI (s.c.). In group I (i.p.) more decrease in mitotic index, total cell number and cell proliferation were seen when compared to group II (i.v.) ($p < 0.01$). Consequently the most efficient was shown in group I in respect of curing properties.