SAĞLIK BİLİMLERİ DERGİSİ
JOURNAL OF HEALTH SCIENCES
Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yayın Organıdır

Derleme **2016; 25: 81-87**

EHRLİCH ASSİT TÜMÖR (EAT) MODELİ

EHRLİCH ASCİTES TUMOR MODEL

Tolga ERTEKİN[1], Dilek CEYLAN[2], Mehtap NİSARİ[1], Harun ÜLGER[1]

[1]*Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kayseri*

[2]*Erciyes Üniversitesi, Betül – Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri*

ÖZ

Neoplastik hastalıkların deneysel hayvan modelleri, insanlarda görülen kanser türlerinin etiyolojik ve patofizyolojik süreçlerini anlamak ve preklinik çalışmalarda etkili tedavilerin geliştirilebilmesi için oldukça önemlidir. Onkolojik süreçlerin değerlendirilmesinde in vitro modeller sıklıkla kullanılmasına rağmen, uygulanan ajana karşı metabolizma cevabında yaşanan eksiklikler hayvan modellerinin kullanımını vazgeçilmez kılmaktadır. Ehrlich Assit Tümörü (EAT) en yaygın deneysel kanser modellerinden biridir. EAT farklılaşmamış bir karsinom olup orjinal olarak hiperdiploiddir. EAT yüksek transplante olma yeteneğine, hızlı çoğalma, daha kısa yaşam süresi, % 100 malignansiye sahiptir. Tümör hücresi içeren assit sıvısı intraperitoneal olarak enjekte edilir ise sıvı form, deri altına enjekte edilirse solid form elde edilir. EAT hücreleri farelerin peritoneal boşluğunda süspansiyon içinde büyür ve in vitro olarak sentetik yüzeylere yapışmazlar. EAT farklılaşmamış olmaları ve hızlı büyüme oranına sahip olmaları nedeniyle kemoterapiye en duyarlı insan tümörlerine benzer. Bu derlemede kanser yönetimi ile ilişkili birçok çalışmada kullanılan EAT modelinin önemi ve bu modelle ilgili son gelişmeler hakkında bilgi verilecektir.

Anahtar kelimeler: Ehrlich Assit Tümörü, Fare, Deneysel Kanser

ABSTRACT

Experimental animal models of the neoplastic diseases are important to understand etiological and pathophysiological processes of cancer types and to develop more effective treatments in preclinical evaluation. Even if, in vitro models are also widely used to study different oncological processes, the response deficiencies of metabolism in case of applied agents cause the cessation of the using animal models. Ehrlich ascites carcinoma (EAC) is one of the commonest experimental tumor models. EAC is referred to as an undifferentiated carcinoma, and is originally hyperdiploid, has high transplantable capability, rapid proliferation, shorter life span, and 100% malignancy. If ascites fluid that contains the tumor cell is injected intraperitoneally, the ascitic form is obtained, but if it is injected subcutaneously, a solid form is obtained. EAC cells grow in suspension in the peritoneal cavity of mice and they do not adhere to the synthetic surface in vitro. EAC resembles human tumors which are the most sensitive to chemotherapy due to the fact that they are undifferentiated and that they have a rapid growth rate. This review highlights the importance and some recent advances of EAC model that was used in a lot of researches related to cancer management.

Keywords: Ehrlich Ascites Tumor, Mouse, Experimental cancer

GİRİŞ

Günümüzde kanserin etyopatogenezi hakkında sahip olduğumuz bilgilerin büyük bir bölümünü deney hayvanlarına borçluyuz. Deney hayvanlarında oluşturulan tümör modelleri kanser biyolojisi (kanser proliferasyonu veya apopitozis) hakkında bilgi edinmek, kanser üzerinde çeşitli ajanların meydana getirdiği etkileri (teratojenik veya iyileştirici) belirlemek, anti kanser ilaçlar geliştirme ve etki mekanizmalarını tespit etmek için kullanılmaktadır [1]. Deneysel kanser modellerinde kullanılan hayvanlar genellikle kemirgenler olup sıklıkla fare ve sıçanlar tercih edilmektedir. Bu hayvanların üretim süreleri kısa, bakımları kolay, ucuz ve bazı özellikleri genetik olarak değiştirilebilir [2].

Makale Geliş Tarihi : 28.03.2016
Makale Kabul Tarihi: 04.05.2016

Son yıllarda hücre kültürü teknikleri ön plana çıkmasına rağmen, uygulanan ajanlara karşı metabolizmanın verebileceği tepkilerdeki eksikliklerden dolayı, in vivo kanser modelleri vazgeçilmez bir öneme sahiptir.

Tümör modelleri;

- Spontan tümörlü hayvanlar
- Mikroorganizma indüksiyonuyla tümör oluşturma
- Radyasyon kullanılarak tümör oluşturma
- Transplantabl tümörler

Corresponding Author: Doç. Dr. Tolga ERTEKİN
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi ABD, Kayseri
Tel: 0352 2076666-23234
e-mail: tolga.ertekin@yahoo.com.tr

- Transplantabl hayvan tümörleri
- İnsan tümörlerinin hayvanlara transferi

- Transgenik teknoloji ile tümör oluşturma
- Doku kültürü
- Kimyasal ve fiziksel karsinojenler kullanılarak tümör oluşturma şeklinde sınıflandırılabilir [1,3,4].

Deneysel kanser araştırmalarında özellikle kimyasal karsinojenler ile oluşturulan tümör modelleri ile transplante ve spontan tümör modelleri ön plana çıkmaktadır. Spontan veya indüklenen tümör modelleri çok sayıda hayvan ve fazla miktarda maddi olanak ile uzun zaman gerektirdiğinden araştırmacılar tarafından fazla tercih edilmemektedir. Bunun yanında transplante edilebilen tümörler, söz konusu dezavantajları avantaja çevirdiği için daha çok tercih edilmektedir [4-6]. Transplante edilebilen tümörlerin sıklıkla kullanılmasının nedeni diğer modellerden daha kolay uygulanabilir olup özelliklerinin daha iyi tanımlanmış ve saklanabilir olması, en önemlisi ise araştırma merkezlerinde kolayca üretilebilir olmalarıdır [4,7].

Transplante edilebilen tümör modellerinde spontan oluşan tümörlerden elde edilen suspansiyonların bir fareden diğer bir fareye tranplantasyonu söz konusudur. Spontan tümörler insan kanser tiplerine kinetik özellik bakımından benzerlik gösterir. Transplante edilen tümörler kökenlendikleri spontan tümörlere erken oluşum fazları açısından oldukça benzerlik gösterir [4]. Tümör hücrelerinin enjeksiyon şekline göre solid ve assit formları bulunmaktadır [8,9]. Transplantasyon için kullanılan fareler %99 homozigot olmalıdır. Yaygın kullanılan inbred fareler Balb/c, C3h/He, C57BI/6, DBA/2'dir. Transplantasyonun başarı derecesinde enfeksiyon, düşük malignitede erken pasaj tümörlerin kullanılması, teknik yetersizlik ve tümör-konak uyumsuzluğu etkilidir [10].

Doğrudan insan tümör hücrelerinin farelere inokülasyonuna göre kültür hücrelerinin inokülasyonu daha başarılıdır. Örneğin doğrudan insan meme karsinomunun Swiss nude farelere aktarılması % 6 kabul oranına sahipken, insan meme karsinomundan elde edilen kültür hücrelerinin aktarılması %50 kabul oranına sahiptir. İnoküle edilecek malign insan kültür hücresi en az $1x10^3$ olmalıdır [11]. Bu derlemenin amacı günümüzde en yaygın kullanılan transplantabl tümör modellerinde biri olan Ehrlich assit tümör modeli hakkında son literatür bilgilerini sunmaktır.

Ehrlich Assit Tümör (EAT) Modeli

Son 20-30 yıl içinde transplante edilebilen tümörler üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu modeller içerisinde Ehrlich assit (karın bölgesinde sıvı toplanması) tümörü (EAT) en yaygın olanıdır. Fare adenokarsinomundan kökenlenen EAT hücreleri, 1905 yılında dişi bir farede spontan olarak ortaya çıkmıştır. Daha sonra Ehrlich ve Apolant tarafından bir fareden bir fareye eş zamanlı olarak transplante edilerek deneysel tümör modeli haline getirilmiştir [12-14]. 1932 yılında Loewental ve Jahn, farenin periton boşluğu içerisindeki sıvıyı kanser hücreleri ile birlikte likit formundan dolayı Ehrlich assit karsinomu olarak adlandırmıştır [15]. Lettre ve ark. 2. Dünya Savaşı boyunca bu kanser hücre hattını nitel ve nicel kanser araştırmaları için uygun bir test sistemi haline getirmeye çalışmıştır [16]. 1948'den sonra EAT hücrelerini kullanan araştırmalar dünya çapında hızlı bir şekilde artmıştır. EAT hücrelerinin araştırmacılar tarafından yüksek oranda tercih edilme sebepleri arasında; tümör spesifik antijenlere ihtiyaç duymaması, %100 kötü huylu olması, çok kısa ömürlü olması, regresyon göstermemesi, hızlı çoğalması, yüksek transplante özelliğinin olması, hiperdiploid yapıda olması ve farklılaşmamış kanser olması sayılabilir [13]. Orijinal olarak hiperdiploid olan EAT hücrelerinin, daha sonraki çalışmalarda kromozom sayısı tetraploid, diploid, hipertetraploid, hipotetraploid altsoyları elde edilmiştir [16-18].

Ehrlich Assit Tümörü

Tümör hücrelerinin peritoneal boşluk içerisine enjekte edilmesinden sonra çoğalan neoplastik hücreleri içeren efüzyonun oluşması assit terimi ile ifade edilir. Genellikle bu tür tümör modellerinde dereceli olarak çoğalma gözlenirken, tekrarlanan pasajlarla beraber tümör virülansı artar, differansiyasyon gitgide kaybolur, gelişmeyi kontrol eden başlıca mekanizmalardan serbest kalır ve sonunda heterotransplantabilite kabiliyeti kazanarak assit formuna dönüşür. Assit sıvısı gri-beyaz renkli veya bazen de hafif kanlı viskoz halinde olup 1cc içerisinde 10 milyon neoplastik hücre içermektedir [19].

Ehrlich assit formunun elde edilmesiyle birlikte, assit sıvısı araştırmalarda sıklıkla kullanılmıştır. Çok fazla tercih edilmesinin nedeni EAT hücrelerini içeren süspansiyonun homojen şeklinde olması ve bunun sonucunda kantitatif olarak belirli sayıda hücrenin bir başka fareye transplante edilmesidir. Ehrlich assit tümöründe hem transplante edilen hücrenin sayısı hem de tümör büyüklüğü temel hücre kültürü tekniklerinde kullanılan sayaç sistemleri ile belirlenebilir [20]. Farenin peritoneal boşluğu içerisindeki süspansiyonda çoğalan hücreler *in vitro* koşullarda sentetik yüzeylere tutunamazlar [14].

Literatürde Ehrlich assit formunun elde edilmesinde $5x10^5$ ile $5x10^7$ arasında değişen sayıda EAT hücresi kullanılmaktadır [21-23]. EAT hücrelerinin farenin peritonu içerisine enjekte edilmesinden yaklaşık 4-6 gün sonra 5-12 ml arasında assit oluşumu gözlenir [13,24]. Assit sıvısının inokülasyonundan sonra hücreler iki fazda gelişim gösterir. İlk faz çoğalmanın katlanarak olduğu proliferasyon fazı, ikinci faz ise hücre sayısının sabit kaldığı plato fazıdır [25-28]. $3x10^6$ EAT hücresinin peritoneal boşluğa enjekte edildiği bir çalışmada hücrelerin ilk 9 gün sürekli artış sergilediği, 9. ve 10. günden sonra ise proliferasyon fazından plato fazına geçmeye başladıkları belirlenmiştir [24,27]. Başka bir çalışmada ise $1x10^7$ EAT hücresinin peritoneal boşluğa enjekte edilmesinden sonra hücreler 4 faz sergilemiştir. Hücreler ilk 4-5 gün boyunca logaritmik artış göstermiş ve 5. ile 13. günler arasındaki plato fazında ise hücre sayısının hemen hemen sabit kaldığı tespit edilmiştir. 13. ve 15. günler arasında hücreler geçici proliferasyon fazına girmiş ve 15. ile 18. günler arasında ise ikinci plato fazına geçerek hücre sayısı tekrardan sabit hale gelmiştir. [29]. Proliferasyon fazından plato fazına kadar, yapısal

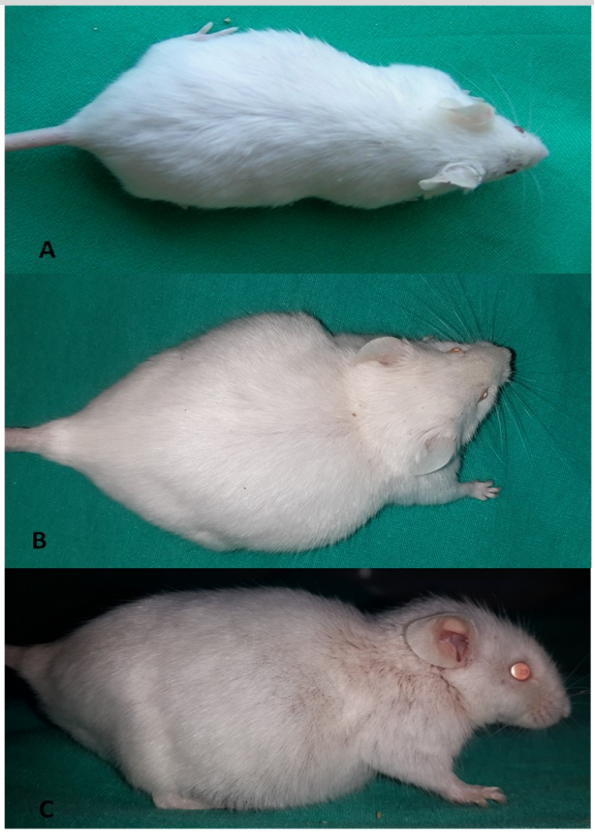
bozulma [30-32] mitokondri sayısının azalması, DNA ve RNA sentezinin azalması, purin ve pirimidin nükleotidlerinin hücre içerisinde kaybolması, Adenozin trifosfat (ATP) konsantrasyonunun düşmesi, protein sentezinin azalması [32-35], timidin kinaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak timidin konsantrasyonunun artması [36], glutatyon (GSH) konsantrasyonunun azalması [37], trigliseridler kolesterol ve serbest yağ asitlerinin artması gibi morfolojik ve metabolik değişiklikler meydana gelmektedir [26,38].

EAT hücrelerinin in vivo ortamda çoğalma periyotları süresince zamana bağlı olarak hücre kinetiklerinde meydana gelen değişiklikler incelenmiş ve 2 günlük EAT'de; hücrelerin 2 kat olma zamanının (Td): 12 saat, hücre siklus zamanının (Tc) ise: 12 saat olduğu, bu değerlerin; 6. günde Td: 60 saat, Tc: 42-44 saat ve 10 günde ise Td: 6 gün, Tc: 83 saat olduğu tespit edilmiştir [26,39,40]. Başka bir çalışmada, 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 gözlenmiştir. Her pasajın mitotik indeksinin %50 oranından fazla oluşu, kromozom sayısı ve hücre kinetiği ne olursa olsun Ehrlich asit tümör hücrelerinin yüksek bölünme özelliğine sahip olduğunu göstermiştir [41].

Plato fazında EAT hücre çoğalma hızının azalması ile asit sıvısı birikimindeki artış arasında bir korelasyon bulunmaktadır. *In vivo* şartlarda tümör gelişiminin plato fazında hücrelerin geriye dönüşümlü olarak geç G2 fazında biriktikleri ve bu dönemde asit sıvısı uzaklaştırıldığı taktirde hücrelerin mitoz fazını geçirip G1 fazına girdikleri tespit edilmiştir [14]. EAT taşıyan farelerde, çoğalmanın plato fazında assit sıvısının büyük bir oranının boşaltılması ile tümörün çoğalmasında tekrar artış meydana gelir [42-43]. Bu artış aynı tümörü plato fazında taşıyan başka bir fareden alınan hücresiz asit sıvısının enjeksiyonu ile yeniden inhibe edilebilir [14,43]. EAT hücreleri çoğalma periyodu boyunca hızlı hücre bölünmeleriyle sayısal bir artış sergiler ve periton boşluğunu doldururlar. Tümör hücrelerindeki bu artışa paralel olarak assit sıvısı birikir. Bir süre sonra konak hayvan hem tümör hacminin oluşturduğu basınç hem de tümörün organizmaya verdiği hasar sonucunda ölür [14,26].

Literatürde Ehrlich Assit Tümörü üzerinde yapılan çalışmalar

Ehrlich tümör hücreleri intraperitoneal olarak enjekte edilirse farelerin karın boşluğunda sıvı tümör oluşumu görülmektedir. Enjekte edilen tümör hücreleri karın boşluğunda sayısal artış gösterdikleri ve ayrıca assit birikimi meydana geldiği için farelerin karın bölgesinde bir şişlik oluşmakta ve farelerin ağırlığı artmaktadır. Araştırma yapılan antikanserojen ajanının etkinliği öncelikle farelerin karın çevreleri ve ağırlıkları ölçülerek, gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma yapılarak değerlendirilebilir [44,45], (Resim I). Ayrıca antikanserojen ajanın kanser üzerindeki koruyucu veya tedavi edici etkisi her grupta (kontrol ve tedavi) kullanılan deney hayvanların ortalama yaşam süreleri (OYS) hesaplanarak değerlendirilebilir [23,44,46,47].



Resim I: Ehrlich Assit Tümörü; A: Normal fare, B: Ehrlich Assit Tümörü taşıyan farenin üstten görünüşü, C: Ehrlich Assit Tümörü taşıyan farenin yandan görünüşü

$$\text{OYS} = \frac{\text{Gruptaki her bir farenin toplam yaşam süresi}}{\text{Gruptaki toplam fare sayısı}}$$

formülü ile hesaplanabilir.

Yaşam süresindeki yüzde artışı (YSYA) ise;

$$\text{YSYA} = \left(\frac{\text{Tedavi grubunun OYS'si}}{\text{Kontrol grubunun OYS'si}} - 1\right) \times 100$$

formülü ile hesaplanabilir

Hayvanların sakrifiye edilmeden önce karın içindeki sıvının tamamının bir enjektör yardımı ile çekilmesi değerlendirme kriterlerini mikroskobik düzeye indirger. Öncelikle karın boşluğundan çekilen total sıvı miktarı [44,48,49], daha sonrasında ise bu sıvının santrifüj edilmesi sonunda geriye kalan packed (çökelti) hacimleri gruplar arasında karşılaştırılabilir [47,49]. Ayrıca bu sıvıda canlı ve ölü kanser hücrelerinin sayımı yapılarak antikanserojen ajanın hücre çoğalması üzerine etkisi değerlendirilebilir [22,44,47,49,50]. Bu sıvı içeriği antikanserojenin ajanın etki yapması düşünülen bazı kriterler bakımından incelenebilir. Son yapılan çalışmalarda sıvı içindeki total protein, prostaglandin E2, tümör nekrozu faktörü alpha (TNF-α), nitrik oksit düzeyleri çalışılan belirteçler arasındadır [22].

Karsinogenezis veya tedavi amaçlı kullanılan ajanların oluşturdukları negatif veya iyileştirici yöndeki etkiler deney hayvanlarından alınan kan ve serum örneklerin-

de değerlendirilebilir. EAT ile yapılan çalışmalarda **kan parametrelerinde;** Hematokrit (HCT), Ortalama Eritrosit Hacmi, **eritrosit sayısı**, **trombosit sayısı**, Plateletcrit, **lökosit sayısı**, lenfosit, granülosit düzeyleri çalışılmıştır. Serumda ise karaciğer enzim düzeylerine bakılmıştır [23,47-50].

Hayvanların sakrifiye edilmesinden sonra karın boşluğu dikkatli bir şekilde açılırsa EAT'ye bağlı olarak oluşan peritonel anjiogenezis resimleri çekilerek gruplar arasında karşılaştırma yapılabilir, ayrıca deri ve peritonda anjiogenezis markırları değerlendirilebilir [21,48,50,51]. Ayrıca abdominal ve torakal bölgedeki organlar üzerinde EAT oluşumunun ve antikanserojenin etkisi biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirilebilir. Son yapılan çalışmalarda karaciğer dokusunda antioksidan enzimler biyokimyasal testlerle [47- 50,52] ve DNA fragmentasyonu ise genetiksel testlerle değerlendirilmiştir [53]. Sıvı tümörde karın boşluğundaki organlara (mide, karaciğer, böbrek, ince ve aklın bağırsaklar) EAT hücrelerinin invazyon gösterip göstermediği araştırmalarda ayrıca incelenen konular arasındadır [5].

Ehrlich Solid Tümörü (EST)

Literatürde EST'nin elde edilmesinde $5x10^5$ ile $15x10^6$ arasında değişen sayıda EAT hücresi kullanılmaktadır. Solid formun elde edilmesinde hücre vücudun değişik bölgelerine inoküle edilebilmekte olup en fazla tercih edilen bölgeler, hayvanın sırt, kalça, bacak ve ayak tabanı bölgeleridir [22,54-59].

EAT hücrelerinin deri altına verilmesiyle bir haftada yaklaşık 1cm çapında solid tümör elde edilir. Bu büyüklüğe ulaştığında tümörün ortasında bir miktar nekrotik saha vardır. Tümör hücreleri eşit büyüklükte değildir ve çapları 20- 30 mikrondur [19]. Tümörün en dış kısmında ise fibröz bir kapsül bulunduğu belirtilmektedir [14]. Solid tümörün oldukça yavaş büyümesi yüksek oranda hücre ölümünden kaynaklanmaktadır [26]. Tümörün tutma oranının yüksek oluşu, hızlı gelişmesi ve infiltratif büyüme göstermesi yüksek derecede maling olduğunu göstermektedir [19]. Hipotetraploid Ehrlich hücreleriyle yapılan çalışmalarda katı ve sıvı formların mitoz oranları ile iki kat olma sürelerini incelemiş ve katı tümör hücrelerinde iki kat olma zamanının uzadığı, mitoz oranının ise azaldığı belirlenmiştir [14]. Solid tümör elde etmek için $1x10^6$ EAT hücresi subkutan olarak enjekte edildiğinde, bir haftalık bir süre sonunda ölçülebilecek düzeyde solid tümör saptandığı ve hiçbir tedavi yapılmazsa 35-40 gün içinde farelerde ölüm gözlendiği tespit edilmiştir [4].

Literatürde Ehrlich Solid Tümörü üzerinde yapılan çalışmalar

EST ile ilgili literatürdeki son çalışmalar tarandığında üzerinde araştırma yapılan antikanserojen ajanın etkinliği deney süresince solid tümör kitlesinin hacmi ve hayvan ağırlıkları ölçülerek değerlendirilebilir. Hacim ölçme işlemini günlük veya 2 günde bir kumpas yardımı ile aşağıdaki formüller kullanılarak yapılmaktadır (Resim II).

$$\text{Tümör hacmi (mm3)} = \frac{\text{Uzunluk x Genişlik}^2}{2}$$

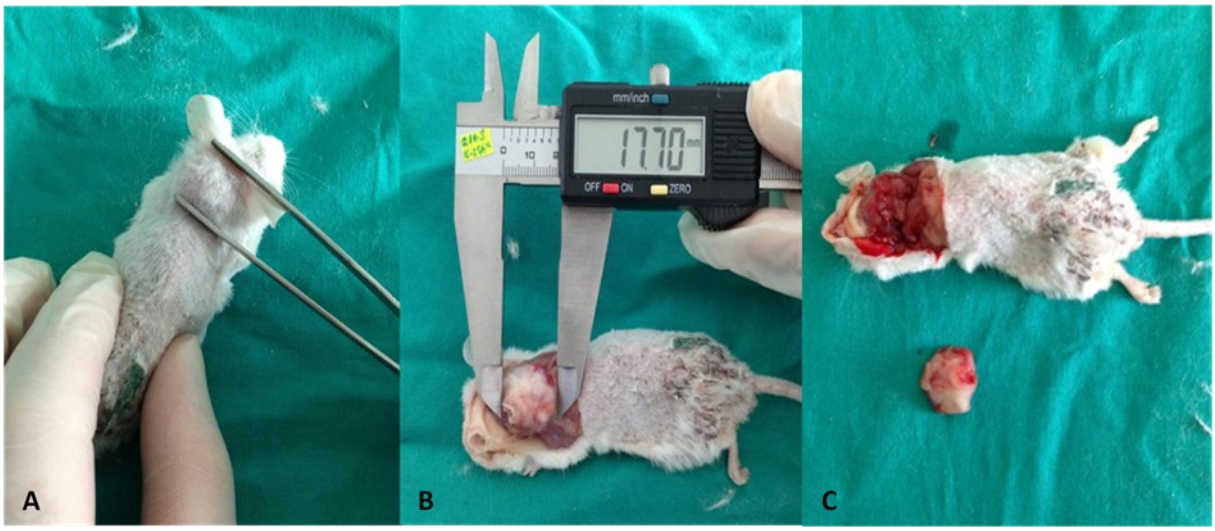
formülü ile

veya

$$\text{Tümör boyutu (mm3)} = 4\pi \left(\frac{A}{2}\right)^2 x \left(\frac{B}{2}\right)$$

formülü ile hesaplanabilir. Bu formülde A tümörün en kısa, B ise en büyük uzunluğudur. π 3.14 eşittir. Ayrıca anttikanserojen maddenin etkinliği tümör inhibisyon oranı (TİO) hesaplanarak da değerlendirilebilir [55,57,60-62].

$$\text{TİO} = \frac{\text{Kontrol grubunun ortalama tümör hacmi} - \text{Tedavi grubunun ortalama tümör hacmi}}{\text{Kontrol grubunun ortalama tümör hacmi}} \times 100$$



Resim II: Ense bölgesinde Ehrlich Solid Tümörü. **A:** Canlı hayvanda deri altında Ehrlich Solid Tümörünün görünüşü, **B:** Deri kaldırıldığında Ehrlich Solid Tümörü, **C:** Çıkarılmış Ehrlich Solid Tümör kitlesi

Ayrıca deney süresince farelerin ortalama yaşam süreleri ve kullanılan antikanserojen ajanın ortalama yaşam süresi üzerindeki pozitif etkisi aynı assit tümörde olduğu gibi solid tümörde de tespit edilebilir [58,63].

Solid tümör çalışmalarında elimizde bir doku kitlesi olduğu için çalışma yaptığımız ajanın hangi hücresel yolaklar üzerinden antikanserojen etki gösterdiği genetiksel ve biyokimyasal analizlerle belirlenebilir. Literatürde EST üzerinde DNA fragmentasyonu [62], epidermal büyüme faktörü (EGF) ve reseptörü [9], CD31, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörleri (VEGFR1, VEGFR2), neural/glial antijen 2 (NG2) and β-Actin gen ekspresyonları [64] genetiksel testlerle ile yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Biyokimyasal çalışmalarda ise tümör kitlesinde çoğunlukla katalaz, malondialdehid, superoxid dismutaz, interleukin-6 [61], kaspaz-3, sfingozin kinaz-1, GSH, TNF-α [65], nitrik oksit [55] parametreleri değerlendirilmiştir.

Ayrıca farelerden kan alınarak assit tümörde bahsedildiği gibi kan parametrelerine bakılabilir [66]. Serumda ise 8-Hidroksi-deoksiguanozin, ATP, VEGF, TNF-α [9, 62, 67], kreatin kinaz ve laktat dehidrogenaz [61] ve alanin transaminaz [66] düzeyleri biyokimyasal testler ile değerlendirilen parametrelerdir.

Tümör dokusunun büyümesinde hücre çoğalma ve ölüm oranlarındaki dengesizlik önemli bir faktör olduğundan apoptozis ve hücre çoğalmasını belirleyen immünohistokimyasal belirteçler ön plana çıkmaktadır. Çalışmalarda hücre çoğalmasında prolifere *hücre* çekirdek *antijeni* (PCNA) [9,21,68], apoptozis de ise bcl2 [61], kaspaz-3 ve Bax [48,50,69], p53 [55] ekspresyon düzeyleri en çok çalışılan belirteçlerdir. Tümör büyümesinde diğer önemli bir etkende anjiogenezisdir [70]. Literatürde Ehrlich solid tümör çalışmalarında immünohistokimyasal olarak anjiogenezis'i belirlemede en çok kullanılan belirteçler arasında CD31, NG2, VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 [48,50,64] , trombosit endotel adezyon molekülü- 1 (PECAM/CD31) [69], CD 34 [67] sayılabilir. Ayrıca tümör kitlesi dışında karsinogenezis'in diğer organlarda oluşturduğu negatif etkilerde incelenebilir [58].

SONUÇ

Hayvan modelleri üzerinde yürütülen kanser çalışmaları kanser etyopatogezinin anlaşılmasına tedaviye yönelik yeni antikanserojen ajanların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu modellerden biri olan EAT'nin araştırma merkezlerinde kolayca üretilebilir ve saklanabilir olması diğer modellere göre EAT'yi avantajlı kılmaktadır. EAT modelinin uygulanmasında araştırmacı yeterli bilgi ve deneyime sahip olursa, araştırması sırasında hayvan haklarına dikkat eder yersiz hayvan kullanımından kaçınırsa ve EAT modeline uygun araştırmalar yaparsa bu modelin doğru sonuçlar vereceğine inanmaktayız.

KAYNAKLAR

1. Yıldırım E. Deneysel kanser çalışmalarında kinetik özellikler ve tümör modelleri. Acta Oncologica Turcica 2006; 39:63-71.
2. Eijan AM, Lodillinsky C, Sandes EO. Animal models for basic and preclinical research in bladder cancer. In: Canda AE (eds), Bladder Cancer- From Basic Science to Robotic Surgery. Intech Publisher, Croatia 2012; pp 383-404.
3. Koşan M, Mungan A. Deney hayvanında mesane kanseri modelleri. Üroonkoloji Bülteni 2015; 14:29-32.
4. Zeybek Ü. Kanser araştırmaları ve deneysel modeller. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi 2002; 2:1-12.
5. Ozaslan M, Karagöz ID, Kalender MEI, et al. In vivo Antitumoral effect of Plantago major L. extract on Balb/C mouse with Ehrlich Ascites Tumor. The American Journal of Chinese Medicine 2007; 35:841–851.
6. Karayel İ. Ehrlich Asit Tümörü İmplante Edilen Deneklerde Oksidan Stresin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2009; ss 3-8.
7. Yuspa SH, Poirier MC. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. Adv Cancer Research 1988; 50:25-70.
8. Beydogan AB, Bolkent S. The effects of silibin administration for different time periods on mouse liver with Ehrlich ascites carcinoma. Pharmacol Rep 2015; 68:543-549.
9. Bahr HI, Toraih EA, Mohammed EA, et al. Chemopreventive effect of leflunomide against Ehrlich's solid tumor grown in mice: Effect on EGF and EGFR expression and tumor proliferation. Life Sci 2015; 141:193-201.
10. Corbett TH, Polin L, Roberts BJ, et al. Transplantable Syngeneic Rodent Tumors. In: Teicher BA (eds), Tumor Models in Cancer Research. Humana Press, New Jersey 2002; pp 41-71.
11. Giovanella B. Xenotransplantation of Human Cell Cultures in Nude Mice. In: Teicher BA (eds), Tumor Models in Cancer Research. Humana Press, New Jersey 2002; pp 93-97.
12. Ehrlich P, Apolant H. Beobachtungen Über Maligne Mäusentumoren. Wiener Klinische Wochenschrift 1905; 28:871-874.
13. Ozaslan M, Karagöz ID, Kılıç İH, Güldür ME. Ehrlich ascites carcinoma. African Journal of Biotechnology 2011; 10: 2375-2378.
14. Lazebnik YA, Medvedeva DN, Zenin VV. Reversible G2 block in the cell cycle of ehrlich ascites carcinoma cells. Experimental Cell Research 1991; 195:247-254.
15. Loewenthal H, Jahn G. Übertragung-Suersuche mit carcinomatöser mause-asciteslussigleit und ihr verhalten gegen physikalische und chemische einwirkungen. Z Krebsforsch Journal 1932; 37:439-447.
16. Lettre R, Paweletz N, Werner D, Granzow C. Sublines of the Ehrlich-Lettre Mouse Ascites Tumor. A New Tool for Experimental Cell Research 1972; 59: 59-63.
17. Lennartz KJ, Maurer W, Eder M. Autoradiographic Analysis of the Cell Cycle of Ascites Tumors (Mouse) of Various Chromosome Stemlines and Different Origin. Z Krebsforsch 1968; 71:267-282.
18. Burns ER. Initation of DNA Synthesis in Ehrlich Ascites Tumor Cells in Their Plateau Phase of

Growth. The Journal of Cancer Research 1968; 28:1191-96.
19. Kaleoğlu Ö, Dişli N. Ehrlich-Lettre Assit Tümörü. DÜ Tıp Fakültesi Mecmuası 1977; 401:978-984.
20. Klein G. Comparative studies of mouse tumors with respect to their capacity for growth as "ascites tumors" and their average nucleic acid content per cell. Experimental Cell Research 1951; 2:518-573.
21. Abdel-Aziz AK, Shouman S, El-Demerdash E, Elgendy M, Abdel-Naim AB. Chloroquine synergizes sunitinib cytotoxicity via modulating autophagic, apoptotic and angiogenic machineries. Chem Biol Interact 2014; 217:28-40.
22. Gomes Nde M, Rezende Cde M, Fontes SP, Hovell AM, Landgraf RG, Matheus ME, Pinto Ada C, Fernandes PD. Antineoplasic activity of Copaifera multijuga oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. J Ethnopharmacol 2008;119:179-84.
23. Patel MS, Antala BV, Dowerah E, Senthilkumar R, Lahkar M. Antitumor activity of Pogostemon benghalensis Linn. on ehrlich ascites carcinoma tumor bearing mice. J Cancer Res Ther 2014;10:1071-1075.
24. Altun S, Özalpan A. Interactive regeneration of Liver and Growth of Ehrlich Ascites Tumour in Mice. Biologia Bratislava 2004; 59:375-382.
25. Song Z, Varani J, Goldstein IJ. Differences in cell surface carbohydrates and in laminin and fibronectin synthesis between adherent and non-adherent ehrlich ascites tumor cells. International Journal of Cancer1993; 55:1029-1035.
26. Tannock IF. A Comparison of cell proliferation parameters in solid and ascites ehrlich tumors. Cancer Research 1969; 29: 1527-1534.
27. Altun S. Normal, tümöral ve rejeneratif büyümeler arasındaki kinetik ilişkiler. Traditional Journal Biology Tübitak 1996; 20:153-173.
28. Grune T, Siems W, Uhlig R, Jakstadt M. adenine metabolism of ehrlich mouse ascites cells in proliferating and resting phases of tumor growth. Biochemical Int 1992; 26: 199-209.
29. Szıkla K, Pokorny E, Hullan L, Holczinger L. Variations of thymidine kinase activity and DNA content in ehrlich and l121o ascites tumor cells during tumor growth. Cancer Biochemistry Biophysics 1981; 5:259-264.
30. Segur JA, Ruiz-Bellido MA, Arenas M, et al. Ehrlich ascites tumor cells expressing anti-sense glutaminase rna lose their capacity to evade the mouse immune system. International Journal of Cancer 2001; 91:379-384.
31. Senger DR, Gali SJ, Dvorak MA, et al. tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 1983; 219:983-985.
32. Siems W, Schmidt H, Werner A, Uerlings I, David H, Gerber G. Changes in the Nucleotid Metabolism of Ehrlich Ascites Tumor Cells During Their Growth In vivo. Cellular and Molecular Biology 1989; 35:255-262.
33. Siems WG, Grune T, Schmidt H, Tikhonov YV, Pimenov MA. Purine nucleotide levels in host tissues of ehrlich ascites tumor bearing mice in different growth phases of the tumor. Cancer Research 1993; 53:5143-5147.
34. Schmidt H, Siems W, Müler M, Dumdey R, Rapoport SM. ATP Producing and Consuming Processes of Ehrlich Mouse Ascites Tumor Cells in Proliferating and Resting Phases. Exp Cell Res 1991; 194:122-127.
35. Schwendel A, Siems WG, Grune T, Holzhütter GH. Transitions of hepatic purine metabolism of ehrlich ascites tumor bearing mice in different phases of tumor growth. Biochem Mol Biol Int 1994; 34: 457-463.
36. Skog S, He Q, Tribukait B. Lack of correlation between thymidine kinase activity and changes of dna synthesis with tumour age: an ın vivo study in ehrlich ascites tumour. Cell Tissue Kinetics 1990; 23:603-617.
37. Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, et al. Inhibition of glutaminase expression by antisense mrna decreases growth and tumourigenicity of tumour cells. Biochemical Journal 2000; 348: 257-261.
38. Balint Z, Holczinger L. Changes in Lipoprotein Lipase Activity (LPLA) in Tumor Cells and Tissues in Mice Bearing Ehrlich Ascites Tumor. Bull Cancer 1984;71:412-418.
39. Bulan, Ö. Ehrlich Ascites Tümör Hücrelerinde Yaşlanma ile Hücre Kinetigi Arasındaki İlişkiler. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 1990; ss 1-25.
40. Kın, T. The Effects of Carcinostatic Agents on the Cell Cycle of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. Nagoya Journal of Medicine Science 1971; 33:307-314.
41. Ergül L. Ehrlıch Asit Tümörlerinin Sitogenetik Açıdan İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep 2011; ss36-55
42. Burns ER. On the Failure of Self-Inhibition of Growth in Tumors. Growth 1969; 33, 24-48.
43. Burns ER, Soloff BL. Further Studies on the Recurrent Growth of the Ehrlich Ascites Tumor. The Anatomical Record 1970; 166: 285.
44. Batista AP, da Silva TG, Teixeira AA, et al. Melatonin effect on the ultrastructure of Ehrlich ascites tumor cells, lifetime and histopathology in Swiss mice. Life Sci 2013; 93:882-8.
45. Ourique F, Kviecinski MR, Felipe KB, et al. DNA damage and inhibition of akt pathway in mcf-7 cells and ehrlich tumor in mice treated with 1,4-naphthoquinones in combination with ascorbate. Oxid Med Cell Longev 2015; 2015:495305.
46. Joseph MM, Aravind SR, George SK, et al. Antitumor activity of galactoxyloglucan-gold nanoparticles against murine ascites and solid carcinoma. Colloids Surf B Biointerfaces 2014; 116:219-27.
47. Patra S, Muthuraman MS, Prabhu AR, Priyadharshini RR, Parthiban S. Evaluation of antitumor and antioxidant activity of Sargassum tenerrimum against Ehrlich ascites carcinoma in mice. Asian Pac J Cancer Prev 2015; 16:915-21.
48. Agrawal SS, Saraswati S, Mathur R, Pandey M. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on

Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. Life Sci 2011;89:147-158.
49. Alam B, Majumder R, Akter S, Lee SH. Piper betle extracts exhibit antitumor activity by augmenting antioxidant potential. Oncol Lett 2015; 9:863-868.
50. Agrawal SS, Saraswati S, Mathur R, Pandey M. Antitumor properties of Boswellic acid against Ehrlich ascites cells bearing mouse. Food Chem Toxicol 2011; 49:1924-34.
51. Vijay Avin BR, Thirusangu P, Lakshmi Ranganatha V, Firdouse A, Prabhakar BT, Khanum SA.Synthesis and tumor inhibitory activity of novel coumarin analogs targeting angiogenesis and apoptosis. Eur J Med Chem 2014; 75:211-21.
52. Ozaslan M, Zumrutdal M E, Daglioglu K, et al. Antitumoral Effect of L. inermis in Mice with EAC . Internatıonal Journal of Pharmacology
53. Hanafy ZE Ginger extract Antimutagens as Cancer Chemopreventive Agent Against Ehrlich Ascites Carcinoma. Academic Journal of Cancer Research 2009; 2:61-67.
54. Nikhil K, Sharan S, Chakraborty A, Bodipati N, Krishna Peddinti R, Roy P. Role of isothiocyanate conjugate of pterostilbene on the inhibition of MCF-7 cell proliferation and tumor growth in Ehrlich ascitic cell induced tumor bearing mice. Exp Cell Res. 2014;320:311-28.
55. Khedr NF, Khalil RM.Effect of hesperidin on mice bearing Ehrlich solid carcinoma maintained on doxorubicin. Tumour Biol. 2015;36:9267-75.
56. Facchini JM, Alves EP, Aguilera C, Gern RM, Silveira ML, Wisbeck E, Furlan SA. Antitumor activity of Pleurotus ostreatus polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. Int J Biol Macromol 2014;68:72-7.
57. De Oliveira JF, da Silva AL, Vendramini-Costa DB, et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. Eur J Med Chem 2015;104:148-56.
58. Zumrutdal ME, Ozaslan M, Tuzcu M. Effect of lawsonia inermis treatment on mice with sarcoma. African Journal of Biotechnology 2008; 7: 2781-2786.
59. Ertekin T, Nisari M, Sarıca ZS, et al. Formation of solid tumor by using low number tumor cells in Ehrlich ascites tumor model, International Journal of Experimental and Clinical Anatomy, İnönü Üniversitesi, Malatya 11-14 Ekim 2014;ss 16.
60. Bhushan S, Kakkar V, Pal HC, Mondhe DM, Kaur IP. The augmented anticancer potential of AP9-cd loaded solid lipid nanoparticles in human leukemia Molt-4 cells and experimental tumor. Chem Biol Interact 2016; 244:84-93.
61. Adwas AA, Elkhoely AA, Kabel AM, Abdel-Rahman MN, Eissa AA. Anti-cancer and cardioprotective effects of indol-3-carbinol in doxorubicin-treated mice. J Infect Chemother 2016;22:36-43.
62. Abdel-Gawad EI, Hassan AI, Awwad SA. Efficiency of calcium phosphate composite nanoparticles in targeting Ehrlich carcinoma cells transplanted in mice. J Adv Res 2016; 7:143-54.
63. Hossain IA, Khanam JA, Jesmin M, Ali MM.Antineoplastic activity of N-(2-hydroxybenzylidene)2'-hydroxyphenylimine aqua nickel(II) complex [NI(H2O)HHP] on ehrlich ascites carcinoma (EAC) in Swiss albino mice. Exp Toxicol Pathol 2016; 68:15-25.
64. Banerjee S, Ghosh T, Barik S, et al. Neem leaf glycoprotein prophylaxis transduces immune dependent stop signal for tumor angiogenic switch within tumor microenvironment. PLoS One 2014; 9:e110040.
65. Kabel AM, Omar MS, Balaha MF, Borg HM. Effect of metformin and adriamycin on transplantable tumor model. Tissue Cell 2015; 47:498-505.
66. Barakat W, Elshazly SM, Mahmoud AA. Spirulina platensis Lacks Antitumor Effect against Solid Ehrlich Carcinoma in Female Mice. Adv Pharmacol Sci 2015; 2015:132873.
67. El-Azab M, Hishe H, Moustafa Y, El-Awadyel S. Anti -angiogenic effect of resveratrol or curcumin in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. Eur J Pharmacol 2011; 652:7-14.
68. Oloris SCS, Dagli MLZ, Guerra JL. Effect of h-carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice Life Sciences 2002; 71: 717–724
69. Saraswati S, Agrawal SS, Alhaider AA Ursolic acid inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in Ehrlich ascites carcinoma tumor. Chem Biol Interact 2013;206:153-65.
70. Folkman J. Antiangiogenesis: New concept for therapy of solid tumors. Annals of Surgery 1972; 175:409-416.