



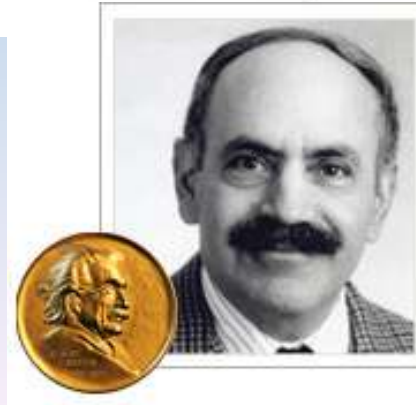
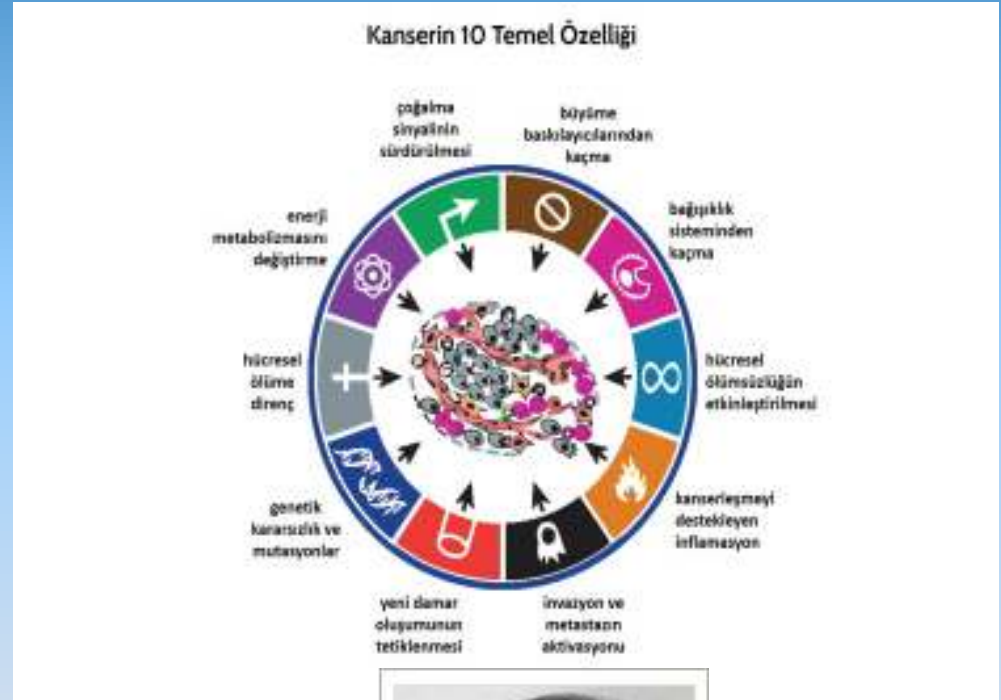
# DENEY HAYVANLARI MODELLERİ I KANSER MODELLERİ

HİLAL KOÇDOR

DEÜ. ONKOLOJİ ENST. TEMEL ONKOLOJİ AD,  
DEÜ. SBE. MOLEKÜLER TIP AD.

# Kanser hücresinin özellikleri

- Kendi büyüme faktörlerine sahip olma,
- Büyüme engelleyici faktörlerden kurtulma,
- Bağışıklık sisteminden kaçma,
- Sürekli bölünme yeteneği,
- Kanserleşmeyi destekleyen enflamasyon,
- Başka doku ve organlara göç etme (İnvazyon veya Metastaz),
- Anjiyogenez (yeni damar oluşturma),
- Gen yapısında mutasyonlar,
- Hücre ölüm mekanizmasını atlatma,
- Enerji metabolizmasını değiştirme.



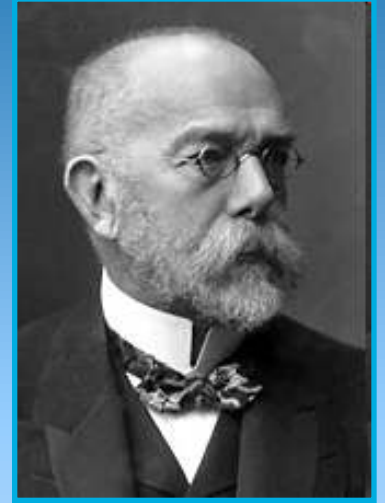
Robert A. Weinberg†

# Koch'un önerileri:

- “Lezyonu **tanımlayın**,
- Lezyonu **izole edin**,
- Lezyonu **tekrarlayın.**”

Koch'un önerilerini kansere adapte edersek;

- (Kanser geni), (belirli kanser alt tipi) etkilemiş tüm organizmalarda bol miktarda bulunmalıdır.
- (Kanser geni) hastalıklı bir organizmadan izole edilmelidir.
- (Kanser geni), sağlıklı bir organizma ile karşılaştığında hastalığa neden olmalı.
- (Kanser geni) inoküle edilmiş, hastalıklı deneysel konakçıdan yeniden izole edilmeli (orijinal spesifik nedensel ajanlarla özdeş olarak tanımlanmalıdır).



# Deney Hayvanlarında Kanser Modellemesi İhtiyacı

- Kanserin etiopatogenezinin aydınlanması,
- Kanserojen maddelerin denenmesi,
- Kanseri önlemeye aday olduğu düşünülen maddelerin denenmesi,
- Kanser tedavisinde faz çalışmaları,
- Metastatik, metastatik olmayan kanser modellerinin oluşturulması.

# Hayvan Modelinizi Nasıl Seçmelisiniz?

## Hayvanları Biyomedikal Araştırma Modelleri Olarak Mı Kullanıyorsunuz?

### "Tüm Modeller Yaklaşıktır"

TÜRLER	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Sinekler	Küçüktür, kısa üretim süresine sahiptir.	Vertebralı değildir.
Balıklar	Kısa üretim süresine ve açık embriyolara sahiptir,	Memeli değildir.
Fare	Memelidir, nispeten küçüktür, birçok genetik "araç" mevcut	Primat değil; 100 milyon yıl önceki son ortak atamızdır.
Ratlar	Farelere benzer.Biraz daha büyüktür.	Daha az genetik "araç". Farelerden daha büyüktür.
Köpekler	Outbred türlerdir. BMT için yararlıdır.	Pahalı, evcil, etik konular??
İnsan olmayan primatlar (Şempanze, maymun, goril gibi)	İnsanlara benzer.	İnsanlara benzer.

# Zebrafish

- Kalp ve damar sistemleri insanlara benzer,
- oğaltımları kolaydır,
- Őeffaftırlar,
- İzlemleri kolaydır, mikroskop altında da değişiklikler izlenebilir, hassas iyon kanallarına sahiptirler,
- İlaç araştırmalarında ilk basamaklardan biri olarak kullanılabilir.
- Ekipman gerekir.



# Kemirgenlerde kanser modellerinin sınıflandırılması

- Doğal (spontan),
- Kimyasal olarak indüklenen,
- Viral indüklenen,
- Genetik olarak tasarlanmış,
- Xenotransplant ile,  
Transplantabl hayvan tm.  
İnsan tümörlerinin hayvanlara transferi
- Doku nakli (çoğunlukla hematopoietik modeller)

# Spontan Tümör Modelleri

Bazı kemirgen soyları doğal olarak kansere yakalanma riskine sahip..

- Örn: AKR soyu fareler 1 yaşında %80 lösemi,
- Yaşa bağlı olabilir (hepatom, akciğer adenomu).
- Fare, sıçan, köpek ve kedilerde benign ve malign meme tümörleri sık.



# KARSİNOJENLERİ AYIRACAK OLURSAK!

- 1- FİZİKSEL KARSİNOJENLER,  
( İyonizan, UV dahil tüm RADYASYON)
- 2- BİYOLOJİK KARSİNOJENLER,  
( HPV, HCV, Bakteriler..)
- 3- KİMYASAL KARSİNOJENLER,

# Karsinojenlere yönelik organizasyonlar

- **IARC (International Agency for Research on Cancer)**

İnsanlarda karsinojen (**Grup 1**)

İnsanlarda muhtemelen karsinojen (**Grup 2A**)

İnsanlarda karsinojen olma olasılığı var. (**Grup 2B**)

İnsanlarda karsinojen olup olmadığı belirsiz. (**Grup 3**)

İnsanlarda muhtemelen karsinojen değil. (**Grup 4**)

- **U.S. EPA (Environmental Protection Agency)**

- **U.S. NTP (National Toxicology Programme)**

IARC MONOGRAPHS WORKING GROUP - VOLUME 77: SOME INDUSTRIAL COMPOUNDS

Agent	Previous evaluation			Current evaluation		
	Degree of evidence in humans	Degree of evidence in animals	Overall evaluation	Degree of evidence in humans	Degree of evidence in animals	Overall evaluation
2,2-Bis(bromomethyl)propan-1,3-diol				I (ND)	S	2B
4-Chloro-ortho-toluidine	L	S	2A	L	S	2A
5-Chloro-ortho-toluidine				I (ND)	L	3
Cinnamyl anthranilate	I (ND)	L	3	I (ND)	L	3
Coumarin	I (ND)	L	3	I (ND)	L	3
2,3-Dibromopropan-1-ol				I (ND)	S	2B
Diethanolamine				I	L	3
Di(2-ethylhexyl) adipate	I (ND)	L	3	I (ND)	L	3
Di(2-ethylhexyl) phthalate	I (ND)	S	2B	I	S	3*
Ethyl benzene				I	S	2B
Glycidol				I (ND)	S	2A*
Nitromethane				I (ND)	S	2B
N-Nitrosodiethanolamine	I (ND)	S	2B	I	S	2B
Pyridine				I	L	3
ortho-Toluidine	I	S	2B	L	S	2A
Triethanolamine				I	I	3

S, sufficient evidence of carcinogenicity; L, limited evidence of carcinogenicity; I, inadequate evidence of carcinogenicity; ND, no data

Group 1: carcinogenicity to humans

Group 2A: probably carcinogenic to humans

Group 2B: possibly carcinogenic to humans

Group 3: cannot be classified as to its carcinogenicity to humans

1970 – 1990 arasında çok sayıda potansiyel kimyasal rodent modellerinde test edildi..



- Maksimum tolere edilebilir doz (**MTD**) kullanıldı.
- Düşük dozlarda en az **2 yıl**, en fazla **8 yıl** uygulandı.
- Rodent kanserlerinin **% 60** ı **genotoksik** bulundu.
- Rodent kanserlerinin **% 40** ı **non-genotoksik** bulundu.
- Bazı kimyasalların tek bir türde ve tek bir organda kanser geliştirdiği gözlemlendi.
- **İnsanda kanserojen olanların tamamının rodentlerde de kanserojen olduğu;**
- **ANCAK rodentlerdeki kanserojen olanların az bir bölümünün insanlarda kanserojen olduğu gözlemlendi.**

DOKU	SON NOKTA	TÜR	İNİSİYATÖR	PROMOTER
Mesane	Papillom, Ca	Köpek	2-Naftilamin	D,L-Triptofan
Mesane	Papillom	Rat	MNU, FANFT	Sakarın
	Karsinom	Rat	BBN	Ürolityaz
Kolon	Adenom	Rat	MNNG	Litokolat
Kolon	Adenokarsinom	Rat	DMH	Barbitürat
Dermis	Fibrosarkom	Fare	3-MC	TPA
Epidermis	Melanom	Hamster	DMBA	TPA
Ösefagus	Karsinom	Rat	NNP	NaCl
Karaciğer	Adenom, HCC	Rat	AAF, DMH, DEN DAB, NNM	Fenobarbital Wy-14,643 Nafenopin
Karaciğer	Hepatoma	Alabalık	Aflatoksin	TCDD, östradiol
Akciğer	Adenom	Fare	Üretan	Sterkulat
Meme	Adenom/ Karsinom	Rat	DMBA MNU	BHT prolaktin, yağlı diyet yağlı diyet

Kimyasal indüklenmiş karsinogenez

# Biyolojik karsinojenler ( Virüsler)

- MMTV (fare meme tümörü virüsü)
- MULV (fare lösemi virüsü)
- Dikey Geçirilmiş Hastalık (Ana Sütünden)
- Retroviral Eklenmiş Mutagenез

# Retroviral “Insertional” Mutagenez

Genom içersine retrovirus entegrasyonu,  
Hücrelerde; onkojen aktivasyonu veya tümör süpresör gen  
inaktivasyonu

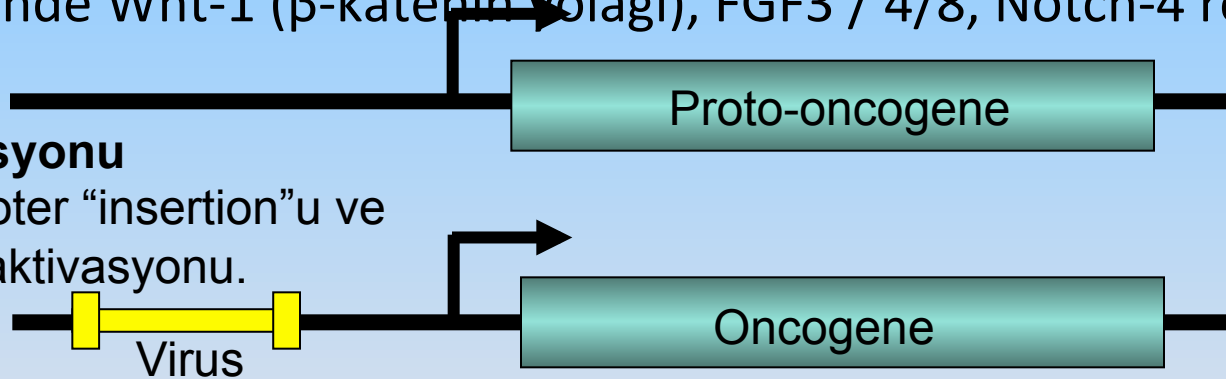
Fayda:

Lösemide Hoxa9, Meis1, Evi1, ETV6 rolünün keşfi

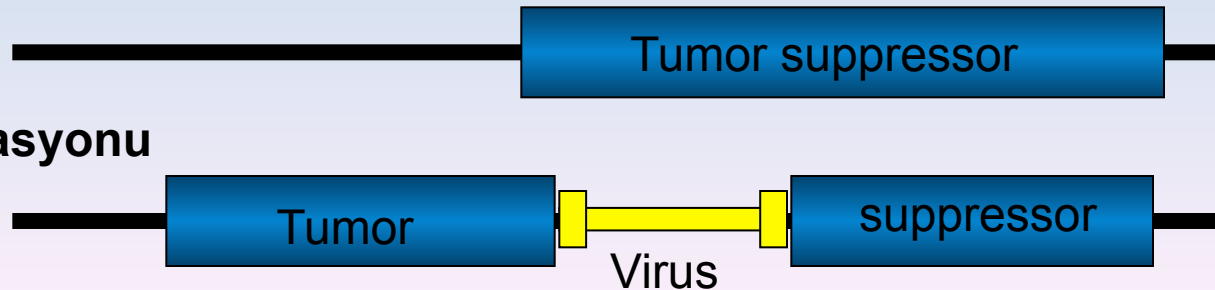
Meme kanserinde Wnt-1 ( $\beta$ -katenin yolağı), FGF3 / 4/8, Notch-4 rolü keşfi

## Gen aktivasyonu

Viral promoter “insertion”u ve  
enhancer aktivasyonu.

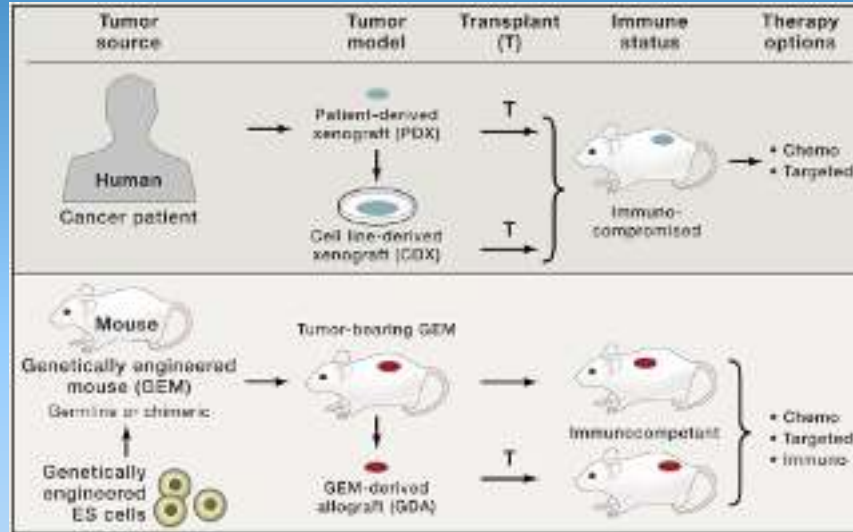


## Gen inaktivasyonu



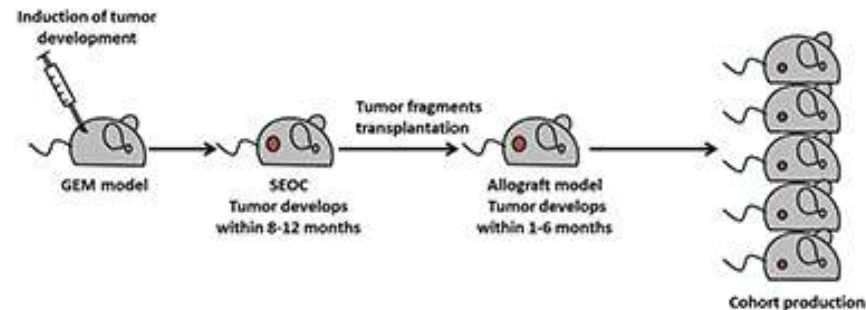
# Xeno (yabancı) -grafts

- Doğrudan insan kanser hücrelerinin enjeksiyonu,



- Aynı soydaki inbred hayvanlar arasında spontan oluşan bir kanserin transplantasyonu (**Allograft**). Akc Ca. Metastaz modeli

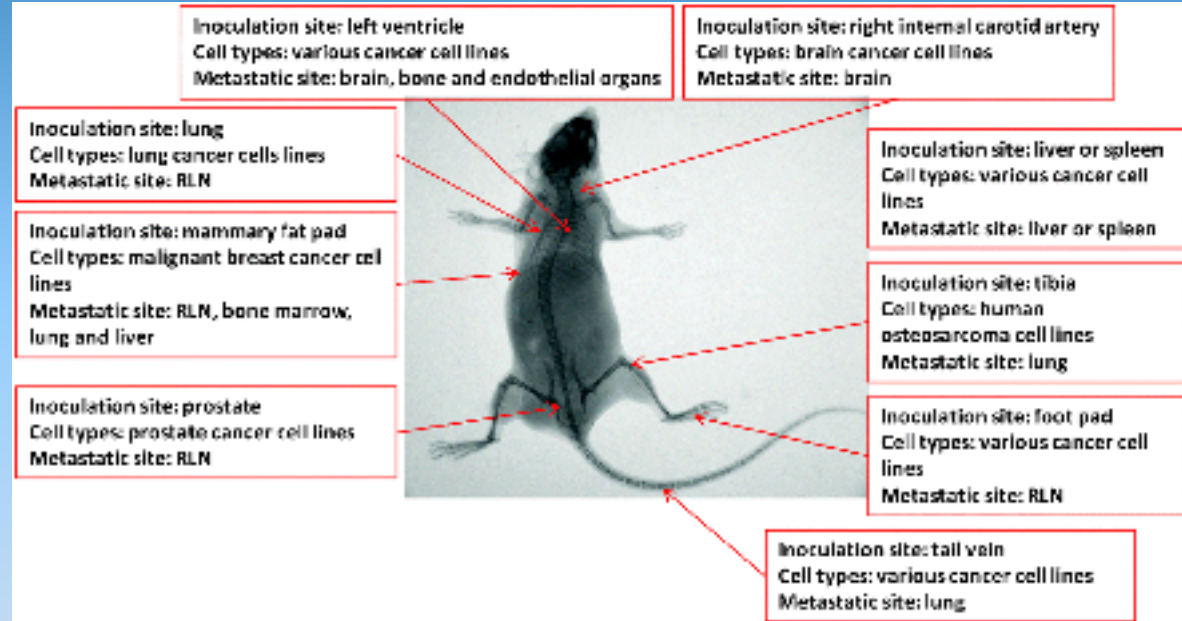
## Development of murine allograft models for serous epithelial ovarian cancer





# Tümör hücrelerinin veriliş yolu

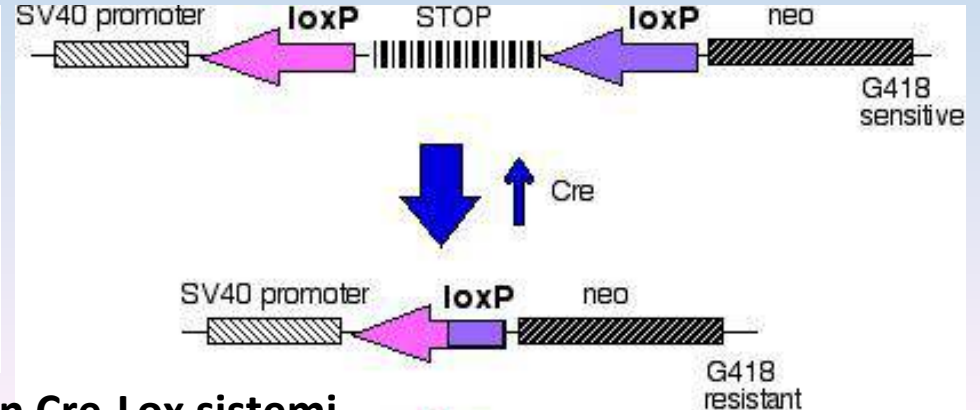
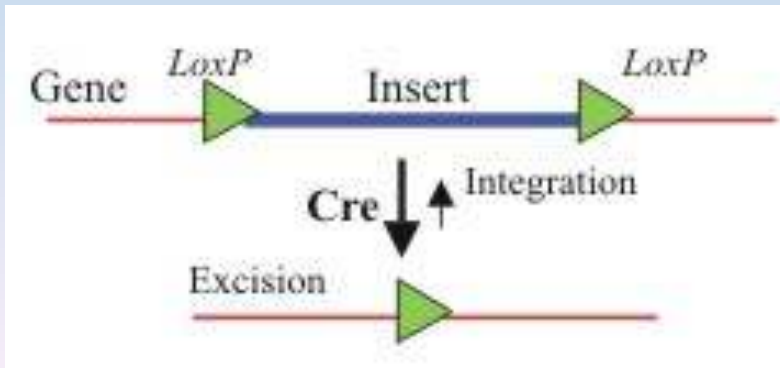
- İntraperitoneal,
- Subkutan,
- İntravenöz,
- İntratekal,
- Doku İçi,



- Tümörün köken aldığı dokuya enjeksiyon,
- İZLEM ÇOK SIK YAPILMALI, ( Tm. Belirteçleri, subkutan ölçüm, özel görüntüleme yöntemleri ile)

# Genetically Engineered Mice -Genetik Mühendislikli Fareler- (GEM)

- Değiştirilmiş fare germline;  
Mutasyonlar hep aynıdır ve yavrulara iletilir.
- Transgenik
- Dokuya özgü
- Hedeflenen gen
- "Knock out" KO-geninin silinmesi /inaktivasyonu
- Belirli hedef lokusunda KI-gen yerleştirilmesi



Lamda fajından Cre-Lox sistemi



# Xeno (yabancı) -grafts

- Atimik Rat (rnu/rnu)/ Mice (nu/nu):

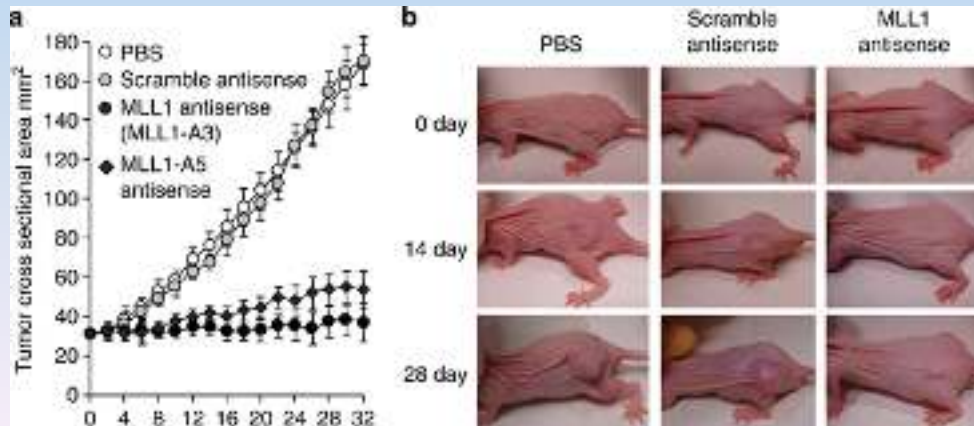
Genellikle insan kanseri hücreleri immün yetersiz kemirgenlere yerleştirilir.



- Bazı araştırmacılar, bunları "doku kültüründen bir adım" yukarıda "**hayvan kültürü**" olarak tanımlar.

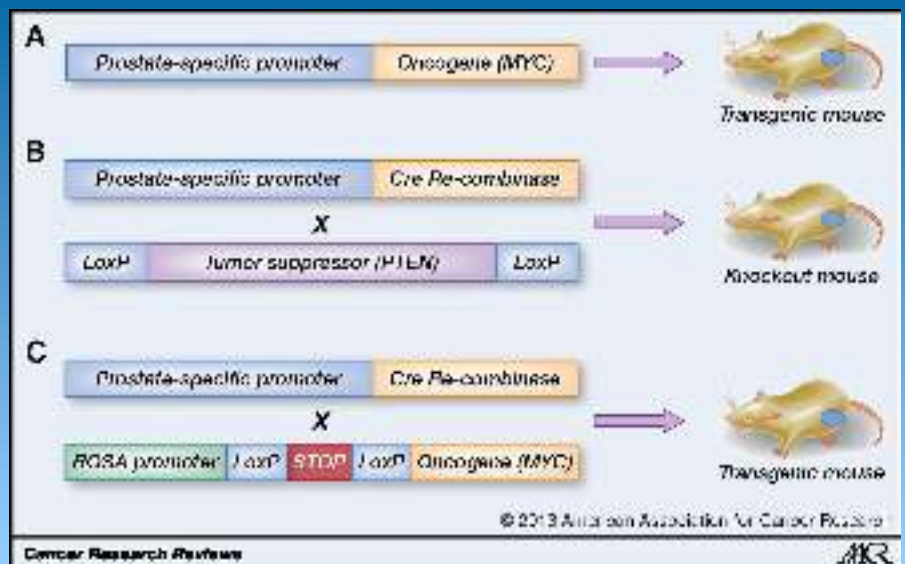
# Xeno (yabancı) -grafts

- Çıplak (nu / nu) fareler.
- Bozulmuş timik epitel hücreleri, normal sayıda fonksiyonel T / B hücrelerinden yoksundur.
- Tüysüz oldukları için, cilt altı tümörlerini görselleştirmek, ölçmek kolaydır.



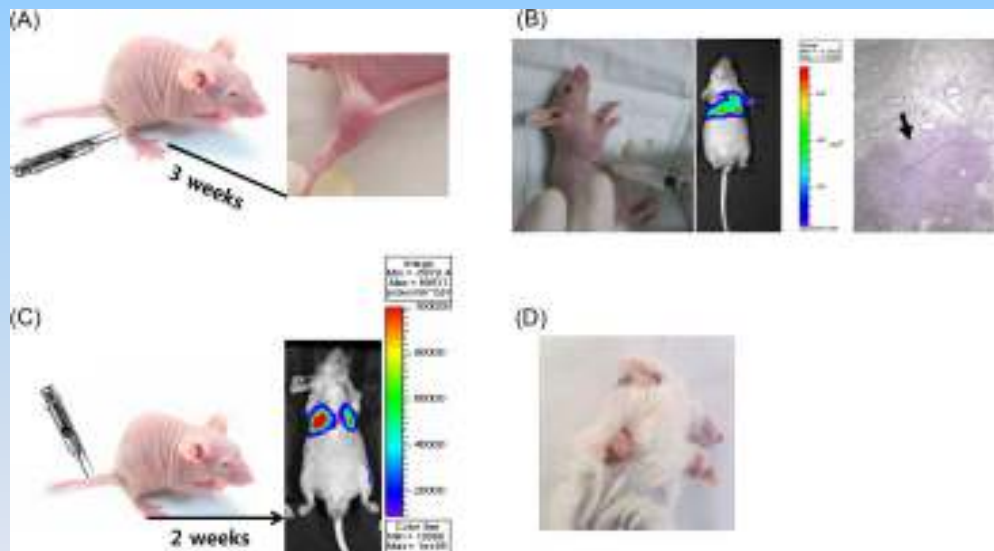
# Xeno (yabancı) -grafts

- Genellikle *in vivo* hasta ilaç tepkisini tahmin etmek için kullanılır.
- Mikroçevre ile test etmede önemlidir.
- Farelerde de immün sistem, in utero dönem, genetik imprintlenme, alternatif splicing var.

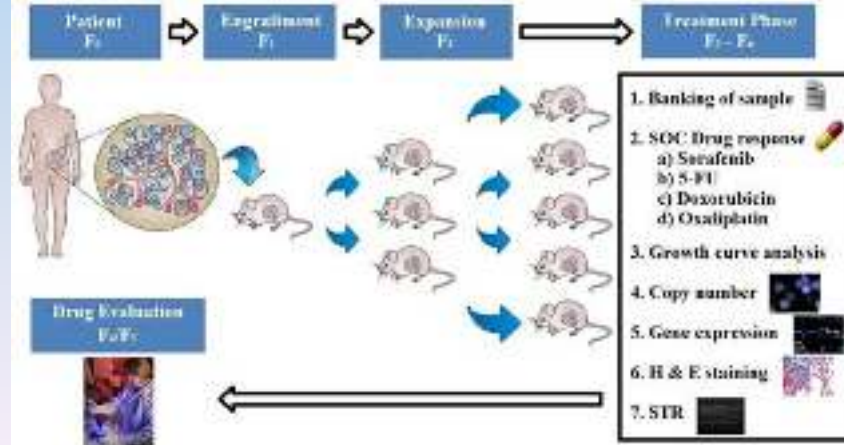


Cancer Research Reviews

ACR



## Liver Cancer PDX model for Drug Screening



Model	Artıları	Eksileri
GEM	Doğal mikro çevre Hasar görmemiş bağışıklık sistemi Genetik olarak homojen Aktarılabılır ve tekrarlanabilir	İnsan kanseri değil İnsan farmakokinetiği değil Çok sayıda hayvan üretmek zor olabilir
Xeno	İnsan kanseri Çok sayıda hayvan üretmek kolaydır Aktarılabılır ve tekrarlanabilir	Yabancı mikro çevre Bağışıklık sistemi eksikliği İnsan farmakokinetiği değil
PDX (Patient-derived xenograft)	İnsan kanseri Primer kanser Çok sayıda hayvanda üretmek kolaydır.	Pahalı Kolayca devredilebilir değil Yabancı mikro çevre Bağışıklık sistemi eksikliği İnsan farmakokinetiği değil



TABLE 2.—Endpoints to evaluate preclinical efficacy of tumor models in mice.

Endpoint	Comment	Formula <sup>a</sup>
<b>In vivo</b>		
Tumor onset	Day of palpable tumor mass of preselected size	
Tumor progression	Daily plot of tumor burden	
Number of tumor-bearing animals	Tumor free assumes cure	
Tumor burden—in vivo	Measured (mm <sup>2</sup> ) Volume estimated (mm <sup>3</sup> )—2-dimensional measurement	Length × width Length × (width × 2) <sup>b</sup> Length × (width <sup>2</sup> ) × 0.5
Tumor growth delay	Delay to reach specific volume	T - C in days
Tumor cell kill	1) Log <sub>10</sub> total tumor cell kill 2) Net Log <sub>10</sub> tumor cell kill	1) (T - C in days)/3.32 × T <sub>d</sub> 2) (T - C) (duration of treatment in days)/3.32 × T <sub>d</sub>
Survival – life span or long-term	Increase in mean or median lifespan or long-term survivors	T/C (%)
<b>Ex Vivo</b>		
Survival—number alive	1) Treatment termination 2) Posttreatment	
Tumor burden—gross pathology	1) Volume estimated (mm <sup>3</sup> )—2- or 3-dimensional measurements 2) Absolute weight (mass in mg as water displacement or wet weight) 3) Tumor weight relative to body weight 4) Ulceration 5) Invasion or tissue distribution and gross lesions (e.g., infarction)	Length × width × depth Tumor weight/body weight
Hematology	1) Complete blood count 2) Differential blood count 3) Bone marrow differential	
Histopathology	1) Hematoxylin and eosin a. Confirm histogenesis and differentiation b. Identify invasion and metastases c. Confirm expected therapeutic activity d. Necrosis—characteristics and estimate percentage e. Evaluate angiogenesis, hemorrhage, edema, and immune and stromal responses 2) Morphometrics 3) Immunohistochemistry and in situ hybridization 4) Molecular pathology	

<sup>a</sup>T = test; C = control; T<sub>d</sub> = doubling time; 3.32 = doublings to increase 1 log<sub>10</sub> unit.

<sup>b</sup>Formulas used for volume estimates vary.

# Öneriler

Deney Hayvanı Tümör Modeli Oluşturmak;

- **Gereklidir,**
- **Zordur,**
- ***in vitro* kanıtlar gereklidir.**
  
- Hedeflerinizi açıkça belirleyin.
- Literatürü iyi değerlendirin.
- Kıdemli araştırmacılarla görüşün.
- Çalışmalarınıza başlayın.

Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 98(10), 761-769  
Copyright © Taylor & Francis Inc.  
ISSN: 1052-7084 print / 1367-2024 online  
DOI: 10.1080/10527084.2020.1815188



# TOXICITY INDICED BY THE CHEMICAL CARCINOGEN 7,12-DIMETHYLBENZ[*a*]ANTHRACENE AND THE PROTECTIVE EFFECTS OF SELENIUM IN WISTAR RATS

Hilal Koçtürk,<sup>1</sup> Ruksan Cebiralli,<sup>1</sup> Mehmet Ali Koculu,<sup>2</sup> Banu Sığ,<sup>3</sup> Osman Yılmaz,<sup>2</sup> Talay Camcı,<sup>2</sup> Binnaz Demirkıran,<sup>3</sup> Halil Resmî,<sup>3</sup> Mehmet Alakavuklar,<sup>3</sup> Ömer Harmançoğlu<sup>3</sup>



Chemical Toxicology and Carcinogenesis Studies  
RESEARCH ARTICLES

# Chemopreventive efficacies of resveratrol, fenretinide and their combination against rat mammary carcinogenesis

Hilal Koçtürk,<sup>1</sup> Mehmet Ali Koculu,<sup>2</sup> Talay Camcı,<sup>2</sup> Duygu Güvel,<sup>3</sup> Ruksan Cebiralli,<sup>3</sup> Osman Yılmaz,<sup>2</sup> Mehmet Alakavuklar,<sup>3</sup> Halil Resmî,<sup>3</sup> Ömer Harmançoğlu<sup>3</sup>

**Abstract**  
Mammary carcinogenesis is a complex process involving multiple genetic and environmental factors. Resveratrol (RESV), fenretinide (FEN), and their combination (RESV+FEN) have been suggested for their chemopreventive effects against rat mammary carcinogenesis. In this study, we investigated the chemopreventive effects of RESV, FEN, and their combination (RESV+FEN) against rat mammary carcinogenesis. The results showed that RESV, FEN, and their combination (RESV+FEN) significantly reduced the incidence of mammary carcinogenesis in rats. The combination of RESV and FEN showed the most potent chemopreventive effect. These findings suggest that the combination of RESV and FEN may be a promising chemopreventive strategy against rat mammary carcinogenesis.







# Gen Hedefleme (KO / KI)

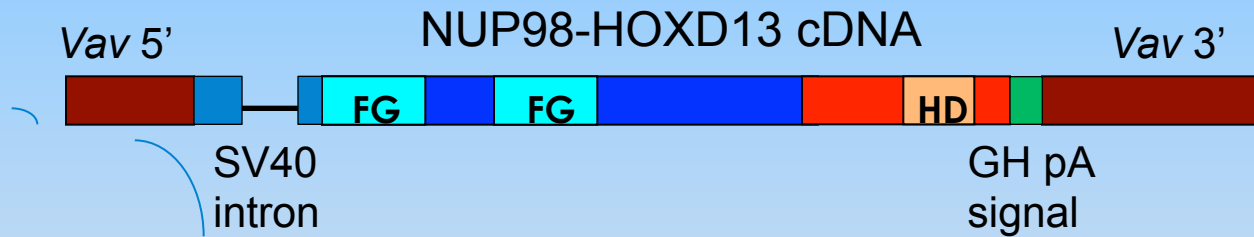
- Kimerik fareler (kat rengi ile)
- Germline gidin! (germ hücrelerinin aynı zamanda kimerik olduğunu düşünelim)
- Ekran hameni çizgili yavruları (kat rengi ve DNA ile).
- Stabil alel artık yetiştirilebilir.
- Gerçekçi olarak, 1 yıllık zaman çizelgesi.
- CRISPR artık in vitro ES hücrelerinde lokusların daha basit hedeflenmesine izin verir

# Şartlı transgenik

- Östrojen reseptör füzyon proteini (yani, Myc-ER füzyonu).
- Bağlayıcıya (östrojen, Tamoksifen) kadar aktif olmayan konformasyonda füzyon proteini eklendi.
- Tet-açık / kapalı.
- Tet operonun kontrolü altındaki hızlı transgeni.
- Dokuya spesifik promotörün kontrolü altındaki rTA veya tTA'yı ifade edin.
- Tet (Dox) döngüsü ile açıp kapatın.
- NB-bunlar dişler için kötü
- İki transgen.

# Transgenik

- Plazmid yapısı: Promoter, Gen, İntron, PolyA sinyali
- Destekleyici: Yapısal, İndüklenebilir, Doku özel
- Temel Tesisi; Ticari Tesis (3-20 K USD)





# Xeno (yabancı) -grafts

- Scid / Scid - Pkrdc genini içeren spontan resesif geçişli mutant.
- Pmldc geni, homolog olmayan uç birleşmesi için gereklidir (NHEJ, DNA çift sarmal kırılmalarında önemli tamir yolu).
- Normal VDJ rekombinasyonu için NHEJ gerekli; VDJ rekombinasyonu yok, T / B hücresi yok.
- Sızdıran. Fonksiyonel VDJ kodlama derzleri üretmek için düşük ancak sonlu yetenek (% 0.1 normal).
- Leakiness ve spontan lenfoma yaşla birlikte artar.
- Bu deneylerden kaynaklanan AML engraftman, kanserli kök hücre kavramı (SLIC, diğer bir deyişle, Scid Lösemi Başlatan Hücreler) için yaygın olarak kullanılır.

# Gene Targeting (KO/KI)

- ES hücrelerinde in vitro homolog rekombinasyon
- Hedefleme vektörü yapısı:
- Hedefleme silahları
- Seçilebilir işaretleyici
- Karşı seçim

# Xeno (yabancı) -grafts

- “Improved” *Scid* models.
- Non-obese diabetic (*NOD*)/*Scid*.
- *NOD* developed to model *IDDM*; immunodeficiency incompletely characterized, polygenic.
- Defective NK, complement, IL-1 (macrophage activator).
- *NOG/Scid*—*NOD/IL2rg* deficient/*Scid*. *IL2rg* (“common gamma chain”) forms *IL2/4/7/15/21* receptor.
- Less leaky, less spontaneous lymphoma than *Scid*.
- (“Geliştirilmiş” *Scid* modelleri.
- Obez olmayan diyabetik (*NOD*) / *Scid*.
- *NOD*, *IDDM*'yi modellemek için geliştirildi; bağışıklık yetersizliği tam olarak karakterize edilmemiş, poligenik.
- Arızalı NK, tamamlayıcı, IL-1 (makrofaj aktivatörü).
- *NOG / Scid-NOD / IL2rg* eksikliği / *Scid*. *IL2rg* (“ortak gam zinciri”) *IL2 / 4/7/15/21* reseptörünü oluşturur.
- *Scid*'den daha az sızıntılı, spontan olmayan lenfoma)

# Transgenik Fare Üretimi

Vektör üretin, artıracak şekilde arındırın.

Mikro enjekte döllenen yumurta (50-100).

Yalancı kadınlara implante edin.

Transgen entegrasyonunu değerlendirmek için kuyruk biyopsisi (Southern veya PCR).

Tipik (iyi) sonuçlar - ~ 80 yavru% 5-10 transgeniktir.

Olumlu bir şey yoksa: kötü DNA, kötü embriyolar, kötü enjeksiyonlar, kötü şans, ölümcül transgen (doğumdan önce ötenazi gerekebilir).

Zaman (iyimser olarak) - 3 ay

# Transgenik Farenin Deęerlendirilmesi

- Potansiyel kurucuları ithal etmek
- Irk potansiyelinin kurucuları (kaç tane? Hangileri?)
- Eęer tüm olumsuzluk olumsuzlarsa: şanssızlık (kimerik kurucu), yanlış genotiplendirilmiş, germ hücresi / embriyonik öldürücü.
- İletim oranı > % 75 olmalıdır.
- F1 pozitif fare euthanize, dokular toplamak, RNA ifade değerlendirmek.
- Mutasyon olmadığını doğrulamak için dizi RNA.
- > 1 kurucuyu, fenotipin entegrasyon etkisinden kaynaklandığını düşündüğünü söyle.
- Zaman (iyimser) - 3 ay

# En iyi model nedir? Soru ne?

- Gen / yol keşfi: Belki RIM.
- Kimyasal mutajenezde eksik olan "etiketi" inşa ettiniz. Fakat NGS maliyetleri yeniden değerlendirmeyi önermektedir.
- Sebep kanıtı: Muhtemelen GEM- birincil hücrelerle başlayabilir. Hücre çizgileri ile ilgili problem, tanımlanmamış birçok anormalliklere sahip olmalarıdır. İnsan IPS hücreleri?
- Hastalık ilerlemişse: Muhtemelen GEM-izleme hastalığı, yerinde-normal doku mikro ortamında gelişir.
- Klinik öncesi tedavi: GEM veya ksenograft.