

1,2-Dimetilhidrazin ile Balb/C Türü Farelerde Deneysel Kolon Kanserinin İndüklenmesi

Experimental Colon Tumorigenesis Induced by 1,2 Dimethylhydrazine in Balb/C Mice

Ömür KARACA,^a
Tolga ERTEKİN,^a
Dr. Özlem CANÖZ,^b
Mehtap HACIALİOĞULLARI,^a
Dr. Nihat EKİNCİ,^a
Ferhan ELMALI,^c
Dr. Harun ÜLGER^a

^aAnatomi AD,

^bPatoloji AD,

^cBiyostatistik AD,

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Kayseri

Geliş Tarihi/Received: 26.12.2008

Kabul Tarihi/Accepted: 02.10.2009

*Bu çalışma, 11. Ulusal Anatomi Kongresi
(26-29 Ekim 2007, Pamukkale Üniversitesi,
Denizli)'nde poster olarak sunulmuştur.*

Yazışma Adresi/Correspondence:

Ömür KARACA

Nevşehir Üniversitesi

Sema ve Vefa Küçük Sağlık Yüksekokulu,

Nevşehir,

TÜRKİYE/TURKEY

insula1976@hotmail.com.tr

ÖZET Amaç: Kolon kanseri dünyada sıklıkla görülen kanser türlerinden biridir. Neoplastik hastalıkların deneysel hayvan modelleri, insanlarda görülen kanser türlerinin etiyolojik ve patofizyolojik süreçleri anlamak için oldukça önemlidir. 1,2 Dimetilhidrazin (DMH) güçlü bir kolon karsinojeni olup, kolon kanseri üzerine diyetin etkileri ile ilgili çalışmalarda çok yaygın olarak kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı, kolonda tümör gelişimi ile DMH arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Araştırmada sekiz haftalık 50 adet Balb/c türü erkek fare kullanıldı. On iki hafta boyunca farelere hafta bir kez, subkutan yoldan DMH (20 mg/kg) enjeksiyonu yapıldı. Deney sonunda fareler, son DMH enjeksiyondan altı hafta sonra (A grubu), 12 hafta sonra (B grubu), 18 hafta sonra (C grubu) ve son olarak 24 hafta sonra (D grubu) sakrifiye edildi. **Bulgular:** A grubundaki farelerde tümör gelişmedi. B grubundaki farelerin %71.4'ünde, C ve D grubundaki farelerin ise hepsinde tümör gelişti. Çalışma sonucunda, grup B'de gelişen toplam 36 lezyonun %33'ünün, grup C'de toplam 59 lezyonun %50'sinin ve grup D'de ise toplam 67 lezyonun %34'ünün adenokarsinom olduğu tespit edildi. Lezyonların kolonda dağılımına bakıldığında ise hem displastik lezyonların hem de adenokarsinomların daha çok distal kolonda geliştiği gözlemlendi. **Sonuç:** Sonuç olarak, DMH'nin tekrarlanan dozları sonucunda, farelerde uzun bir sessizlik döneminden sonra kolonik tümörlerin geliştiğini gözlemledik.

Anahtar Kelimeler: 1,2-Dimetilhidrazin; kolon tümörleri; tümörler, deneysel

ABSTRACT Objective: Colon cancer is one of the most common forms of cancer in the world. Experimental animal models of the neoplastic diseases are important in understanding etiological and pathophysiological processes. 1,2-dimethylhydrazine (DMH) is a potent colon carcinogen and commonly used in the studies investigating the effects of diet on colon cancer. In this study, the relationship between 1,2-dimethylhydrazine and tumor development were investigated. **Material and Methods:** Eight-week old, fifty balb/c male mice were used for our experiments and treated with subcutaneous DMH solution (20 mg/kg) once weekly throughout a period of 12 weeks. After the end of the last DMH injection, they were sacrificed in sixth (group A), twelfth (group B), eighteenth (group C) and twentyfourth (group D) weeks. **Results:** Group A did not develop tumor. Group B, C, D mice showed 71.4% 100% and 100% tumoral lesions, respectively. Eventually, it was found that 33% of the 36 lesions in the group of B, 50% of the 59 lesions in the group of C, 34% of the 67 lesions in the group of D were adenocarcinomas. When we have a looked at the distribution of the lesions in colon, we observed that dysplastic lesions and adenocarcinomas were mostly developed in the distal colon. **Conclusion:** As a result, after the repeated doses of DMH, we observed colonic tumors after a long period of latency in mice.

Key Words: 1,2-Dimethylhydrazine; colonic neoplasms; neoplasms, experimental

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30(3):1015-24

Kolorektal karsinom, gelişmiş ülkelerde ciddi morbidite ve mortaliteye yol açan önemli bir kanser türüdür. Görülme sıklığı diyet ile yakından ilişkili olup bu hastalığın görülme oranı gittikçe

artmaktadır.^{1,2} Dolayısıyla kolon kanseri gelişim mekanizmasını anlamak ve tedaviye yönelik yeni stratejiler geliştirmek oldukça önemlidir. Kanser alanında uygulanan tedavi yöntemleri ile ilgili günümüze kadar çeşitli gelişmeler kaydedilmiştir. Yalnız hangi metot kullanılırsa kullanılsın ilaç geliştirme araştırmalarında hayvan modellerinden yararlanmak bir yerde zorunluluk göstermektedir.³ Deney hayvanlarında intestinal tümör oluşturulması konusunda ilk deneysel çalışma Lorenz ve Stewart (1941) tarafından yapılmış ve oral olarak dibenzantresan veya metilkolantren verilen farelerin ince bağırsaklarında birçok tümörün geliştiği bildirilmiştir.⁴ Bu çalışmayı takiben birçok araştırmacı kanser oluşumunu indükleyen değişik kimyasal maddeler kullanmışlardır.

Kolon kanseri indüklemeye sıklıkla kullanılan karsinojenler 1,2-dimethylhydrazine (DMH) ve onun metabolitleri olan azoksimetan, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidin ve N-metil-N-nitrosourea'dur.⁵ Bu kimyasal ajanlardan DMH, kolon kanserini indüklemeye yaygın olarak kullanılan ve özellikle de distal kolonda tümör oluşumunu indükleyen bir maddedir.⁶⁻⁸ Bir metil hidrazin türevi olan DMH, organizmada metil radikali salıveren bileşiklere dönüşmek sureti ile etkinlik kazanan bir ajandır. DNA moleküllerini metilleyerek mutajenik etki yapan DMH, aynı zamanda RNA ve dolayısıyla protein sentezini de bozarak kolon kanseri oluşumuna neden olur.⁴ Bu çalışmanın amacı, kolon tümör gelişimi ile DMH arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

HAYVANLAR

Bu çalışma, 7 Mart 2006 tarih ve 01/80 sayılı Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul kararı ile onaylanmış olup, çalışma süresince ulusal ve uluslararası yönergelerde belirtilen hayvan haklarına uyulmuştur. Çalışmamızda, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Enstitüsü (DEKAM) Deney Hayvanları Biriminden elde edilen ağırlıkları 25-30 gr arasında değişen, 50 adet, sekiz haftalık erkek Balb-c türü fareler kullanıldı.

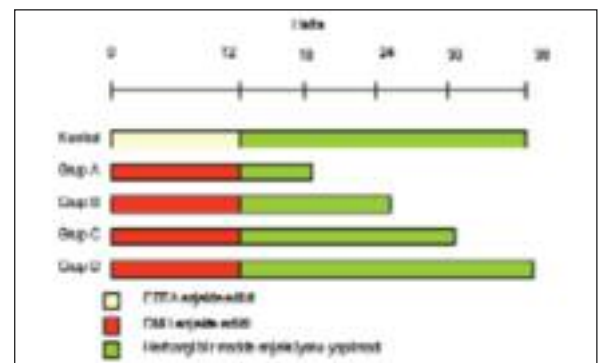
Fareler, araştırma süresince 19-21 °C sabit sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık dönemlerin bulunduğu özel hazırlanmış, otomatik olarak klimatize edilen odalarda korundu ve normal pellet cinsi yem ile beslendi. Deney süresince hayvanlar günlük olarak kontrol edildi ve haftalık kilo takibi yapıldı. Ayrıca genel morfolojik görünümü (tüy dökülmesi, dışkılama bozuklukları ve anal lezyonlar açısından) makroskobik olarak değerlendirildi.

ÇALIŞMA GRUPLARI

Fareler, öncelikle kontrol grubunda 10 fare ve DMH grubunda 40 fare olacak şekilde rastgele iki gruba ayrıldı. Daha sonra DMH grubu dört alt gruba ayrıldı. DMH grubundan 10 fare en son DMH dozundan altı hafta sonra (A grubu), yedi fare 12 hafta sonra (B grubu), yedi fare 18 hafta sonra (C grubu) ve yedi fare ise 24 hafta sonra (D grubu) sakrifiye edildi (Şekil 1).

DMH'İN DOZU VE HAZIRLANMASI

DMH (Fluka) grubundaki farelere, 12 hafta boyunca, haftada bir kez, 20 mg/kg DMH enjekte edildi. DMH, farelere enjekte edilmeden hemen önce taze olarak hazırlandı. Bunun için önce DMH (20 mg/kg), %0.05'lik EDTA (Sigma) içerisinde çözüldü. Daha sonra sodyum bikarbonat (NaHCO₃) solüsyonu kullanılarak DMH solüsyonunun pH'ı 6.5 olacak şekilde ayarlandı. Deney grubundaki farelere, 20 mg/kg DMH (ortalama 0.6 cc) solüsyonu subkutan (s.c) yoldan enjekte edilirken, kontrol grubundaki farelere ise aynı miktarda EDTA s.c



ŞEKİL 1: Deney programı (EDTA: Etilendiamin tetraasetikası, DMH: 1,2-Dimetilhidrazin).

yoldan enjekte edildi. Enjeksiyonlar, farelerin bel omurları seviyesinden sırt bölgesine uygulandı. Enjeksiyona bağlı komplikasyon gelişmemesi için enjeksiyonlar, bir hafta sağ taraftan, diğer hafta sol taraftan olacak şekilde rotasyon uygulanarak yapıldı.

KOLONUN ÇIKARILMASI VE HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Deney sonunda hayvanlar, ketamin-xylosine (50 mg/kg-15 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edildi ve kalın bağırsakları proksimal, orta ve distal kısımları işaretlenerek çıkarıldı. Daha sonra steromikroskop altında, kalın bağırsak, uzunlamasına kesildi ve içeriği serum fizyolojik ile temizlendi. Temizleme işleminden sonra kolonun iç yüzü (mukozal tabaka veya tunica mucosa) dışa gelecek şekilde kolon, steril ince bir ağaç çubuk üzerine proksimalinden distaline doğru Swiss rol tekniği ile sarıldı.⁹ Dokular %10'luk formalin içinde 4°C'de 48 saat tutularak tespit edildi ve rutin histolojik takiplerden sonra parafine gömüldü. Dokulardan 5 µm'lik kalınlığında ve 300 µm'lik aralıklarla seri kesitler alındı ve hematoksil-eo-zin (HE) ile boyandı.

Çalışmamızda, kolon mukozasında görülen lezyonlar adenom ve adenokarsinom olarak iki grupta incelendi.¹⁰⁻¹² Tespit edilen kolonik lezyonlar, değişik displazi ve karsinom evrelerini içermekteydiler. Adenomlarda displaziler hafif ve şiddetli displazi olarak sınıflandırıldı. Buna göre **displazi**, polarite kaybı, hiperkromazi, pleomorfizm ve nükleer kalabalıklaşma ile karakterize düzensiz neoplastik epitel çoğalması şeklinde tanımlandı. **Şiddetli displazi**, lamina propriaya invazyon olmaksızın Lieberkün kriptaları sınırı içinde kalan neoplastik epitel değişiklikler olarak tanımlandı. Bu lezyonlarda, bezlerde de tomurcuklanma ve dallanma ile beraber yapısal bir düzensizlik gözlenmekteydi. Adenokarsinomların değerlendirilmesinde; muskularis mukozaya invazyon yapmaksızın epitel hücrelerini ve bezleri tutan ve lamina propria tabakasına invazyon yapan malign karakterli lezyonlar **intramukozal karsinom** olarak tanımlanırken; muskularis mukozaya, submukozaya ve daha derine invazyon yapan lezyonlar ise **invaziv karsinom** şeklinde tanımlandı. İntramukozal lezyonlar, şiddetli

displazi ile benzer özelliklere ilaveten tümör hücrelerinin, lamina proprianın mukozal stromasına invaze olması ve muskularis mukozaya dayanması ile karakterize idi. Fakat muskularis mukozaya invazyon yoktu.

Çalışmamızda lezyonların patolojik sınıflandırılması yukarıda belirtildiği gibi dört grup altında incelendi ve deneyimli bir patoloji uzmanının kontrolünde gruplardaki lezyon sayısı ve yerleşimi araştırıldı. Lezyonlar belirlenirken kolonun hangi bölgesinde olduğuna dikkat edildi ve bu işlem için kolon proksimal, orta ve distal olmak üzere üç bölgeye ayrıldı. Bu işlemde ağaç çubuk etrafındaki tur sayısı dikkate alındı. Genelde toplam tur sayısı 6-7 olarak belirlendi. 2.5-3 tur kolonun proksimali, devam eden 1.5-2 tur orta, son 1-1.5 tur ise kolonun distal kısmı olarak belirlendi.

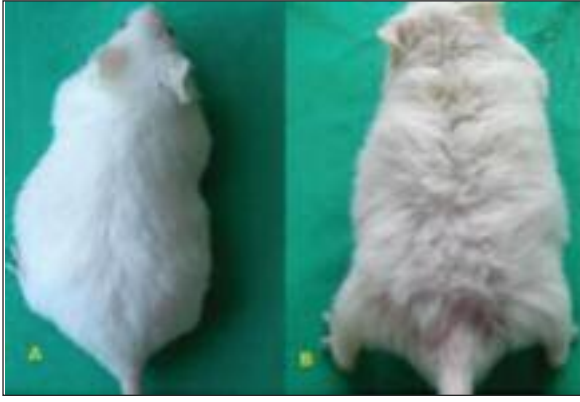
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizi için, SPSS 15.0 ve SigmaStat 3.5 istatistik paket programları kullanıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine Kolmogorov Smirnov testi ile bakıldı. Üç veya dört grubun bulunduğu karşılaştırmalarda normal dağılım göstermeyen değişkenler için Kruskal-Wallis testi, normal dağılım gösteren değişkenler için tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Fark çıkan gruplarda Dunn ve Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. İki grubun bulunduğu karşılaştırmalarda normal dağılım gösteren değişkenler için bağımsız iki örnek t testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

FİZİK MUAYENE BULGULARI

Çalışmamızda, 36 haftalık deney süresince, DMH'nin enjekte edildiği ilk 12 hafta içinde altı hayvan, daha sonraki süreçte ise değişik zamanlarda üç hayvan olmak üzere toplam dokuz hayvan öldü. Ölen hayvanlarda gelişen postmortem otoliz nedeniyle dokuların histopatolojik incelemesi yapılamadı. Deney süresince yapılan günlük takiplerde, kontrol grubundaki hayvanların genel görünümünde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, herhangi bir anormal bulguya da rastlanmadı. DMH gruplarında ise, özellikle 12 haftalık DMH enjeksiyonundan



RESİM 1: Deneyin 18. haftasında farelerin genel görünümü A: Kontrol grubu farelerin genel görünümü, B: DMH grubu farelerin genel görünümü.

sonraki dönemde, farelerin anal ve sırt bölgelerindeki tüylerde döküntü ve tüylerin genel görüntüsünde bozukluk (Resim 1), nadir olarak kanlı dışkı ve genel olarak hayvanlarda uyuşukluk gözlemlendi. Ayrıca grup C'de bulunan iki hayvanda, anal bölgede kist geliştiği tespit edildi. Patolojik incelemede bu lezyonların epidermoid karsinom olduğu görüldü. Haftalık yapılan ağırlık ölçümlerinde ise tüm gruplarda ağırlığın zamana bağlı artış gösterdiği fakat gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılığın olmadığı gözlemlendi.

MAKROSKOPİK BULGULAR

Çalışmamızda, tespit edilen kolonik lezyonların genelde polip tarzında ve birden fazla olduğu görüldü (Resim 2). Bir farede görülen ortalama lezyon sayısına bakıldığında; A grubunda adenokarsinom görülmez iken, B grubunda 1.7 ± 2.0 lezyon, C grubunda 4.2 ± 1.7 lezyon ve D grubunda ise 3.2 ± 1.2 lezyon tespit edildi. Bir hayvanda görülen ortalama kolonik lezyon sayısı sayıları Tablo 1'de verilmiştir.

tir (Tablo 1).

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Çalışmamızda kolon tümör insidansına bakıldığında, kontrol grubunda herhangi bir lezyona rastlanmadı (Resim 3). Deney grubunda ise Grup A'da, %100 oranında adenom (hafif displazi) gözlenirken, adenokarsinom (intramukozal-invaziv karsinom) gözlenmedi. Grup B'de farelerin %71.4'ünde, grup C ve D'de farelerin ise hepsinde (%100) adenokarsinom geliştiği tespit edildi (Tablo 2).

Lezyonlar histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, adenomlarda displastik lezyonların nükleuslarının genişlemiş ve hiperkromatik olduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna göre deney gruplarında, lezyon bölgelerindeki hücrelerde sayı olarak artış ve artmış nükleus stoplazma oranı tespit edildi. Bezlerde de yapısal düzensizlik ve şekilsizlik mevcuttu (Resim 4, 5). Adenokarsinomlarda ise neoplastik hücrelerde pleomorfizm ve hücre çekirdek-

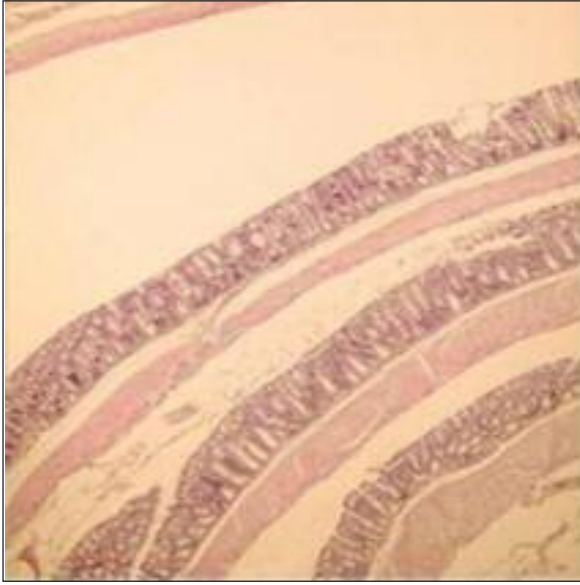


RESİM 2: DMH grubu farelerde, stereomikroskop altında görüntülenen polip şeklindeki lezyonlar.

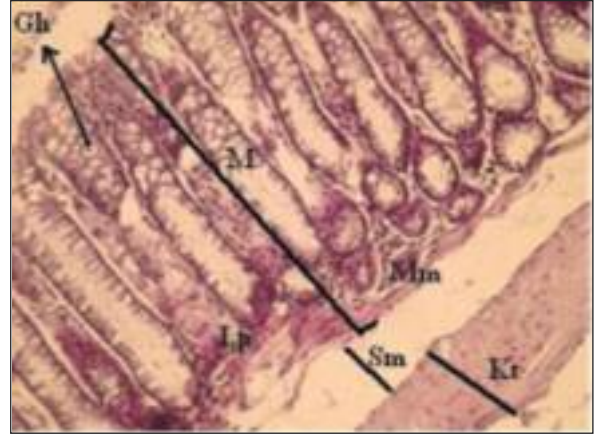
TABLO 1: Ortalama lezyon sayısı/ fare.

Deney Grupları	Ort. Lezyon (n)	Hafif Displazi		Md	Şiddetli Displazi		Md	Adeno Karsinom		Md
		Min.	Max.		Min.	Max.		Min.	Max.	
Grup A	34 (10)	3.0 ± 1.3 (Ort ± SD)		3	0.4 ± 0.6 (Ort ± SD)		0	0 (Ort ± SD)		0
Grup B	36 (7)	1.0 ± 0.5		1	2.4 ± 1.7		2	1.7 ± 2.0		1
Grup C	59 (7)	2.2 ± 0.9		3	1.8 ± 1.3		2	4.2 ± 1.7		5
Grup D	67 (7)	2.1 ± 1.2		2	4.1 ± 1.6		4	3.2 ± 1.2		3

n: Fare sayısı, Min: Bir farede görülen minimum lezyon sayısı, Max: Bir farede görülen maksimum lezyon sayısı, Md: Medyan.



A



B

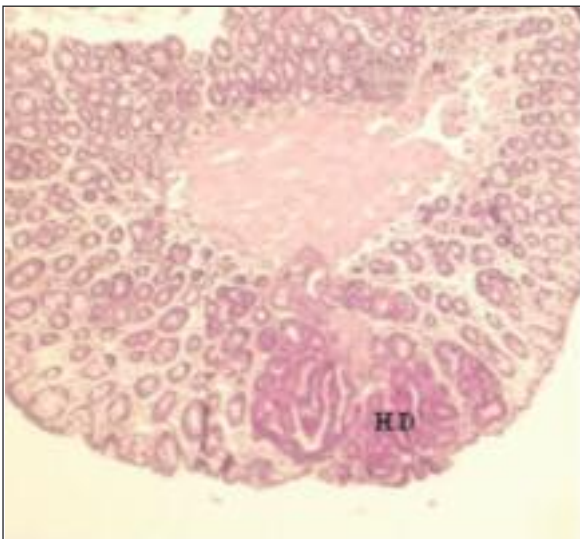
RESİM 3: Kontrol grubu farelerde kolonun normal histolojik yapısı A: Swiss rol tekniğine göre sarılmış normal kolon mukozası HEX4, B: Normal kolon mukozası HEX40.

GB: Goblet hücresi, Lp: Lamina propria, M: mukoza, Mm: Muskülaris mukoza, SM: submukoza, Kt: Kas tabakası.

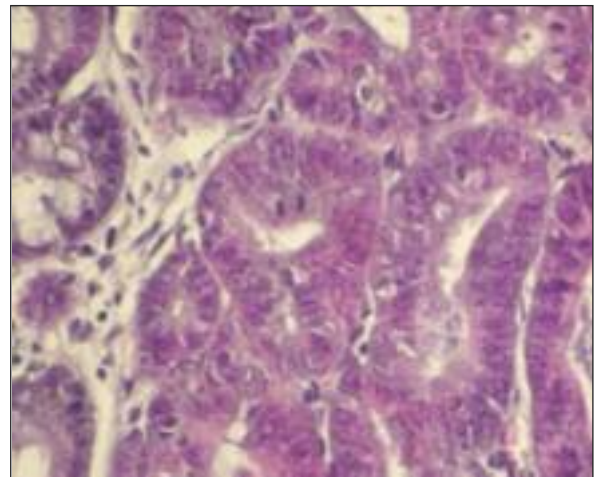
TABLO 2: DMH enjeksiyonundan sonra değişik dönemlerde hayvanlarda görülen tümör insidansı.

Deney grupları	Adenomlar N (%)		Adenokarsinomlar N (%)	
	Hafif displazi	Şiddetli displazi	İntramukozal karsinom	İnvaziv karsinom
Grup A (10 fare)	10 (100)	3 (30)	0	0
Grup B (7 fare)	6 (85)	6 (85)	5 (71)	1 (14)
Grup C (7 fare)	7 (100)	6 (85)	7 (100)	6 (85)
Grup D (7 fare)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	6 (85)

(N: Fare Sayısı).

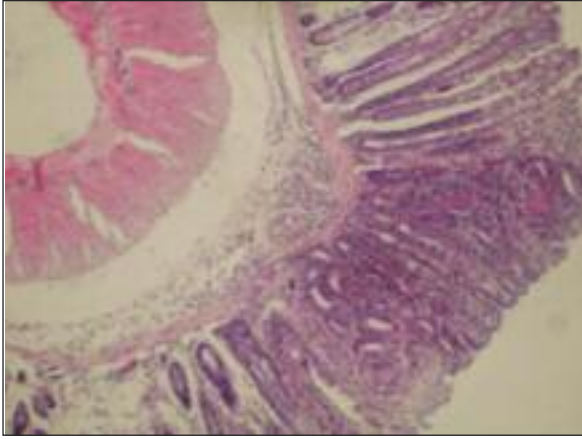


A

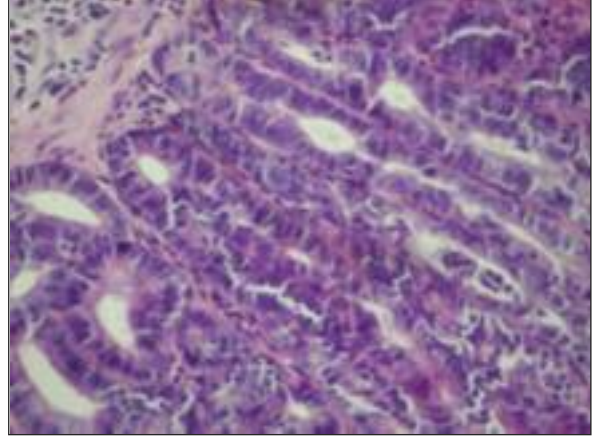


B

RESİM 4: DMH grubu farelerde kolonda görülen hafif displazi. A: HE, x4, B: HE, x40.

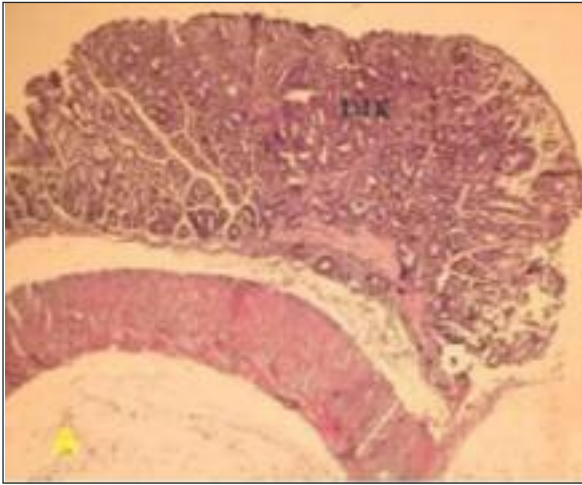


A

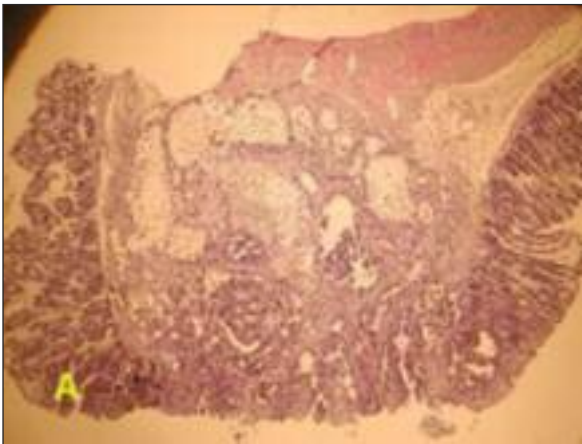
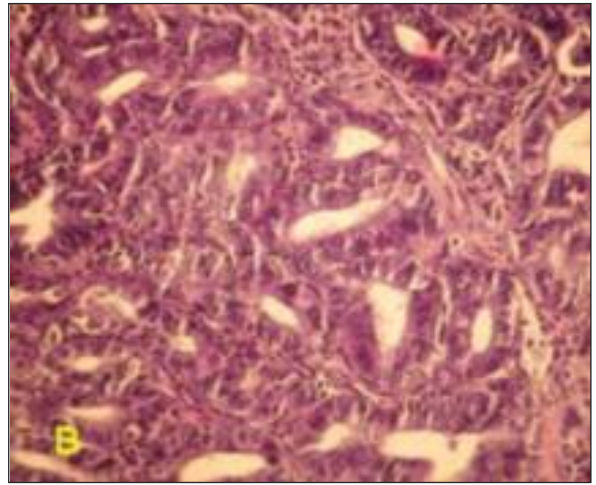


B

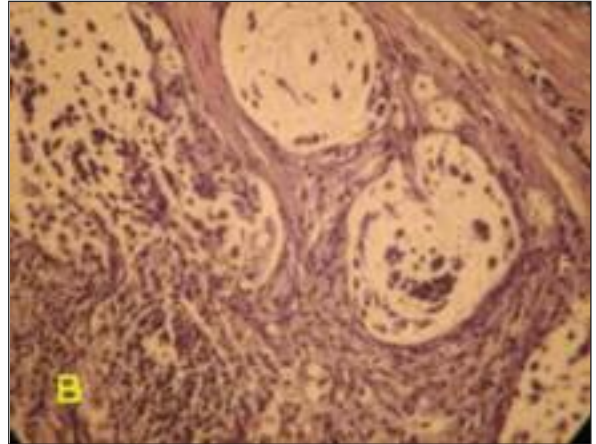
RESİM 5: DMH grubu farelerde kolonda görülen şiddetli displazi. A: HE, x10, B: HE, x40.



RESİM 6: DMH grubu farelerde kolonda görülen intramukozal karsinom. A: HE, x4, B: HE, x40.



RESİM 7: DMH grubu farelerde kolonda görülen invaziv karsinom. A: HE, x4, B: HE, x40.



lerinin büyük ve hiperkromatik olduğu gözlemlendi. Çekirdek stoplazma oranı artmıştı. Mitotik hücreler çok sayıda ve atipik özellik göstermekteydi. Neoplastik bezlerde uzama, şekilsizlik ve dallanma mevcuttu (Resim 6, 7). Çalışma sonucunda, grup B'de gelişen toplam 36 lezyonun %33'ünün, grup C'de toplam 59 lezyonun %50'sinin ve grup D'de ise toplam 67 lezyonun %34'ünün adenokarsinom olduğu tespit edildi. Yapılan çalışmada şiddetli displazi ve adenokarsinoma görülme sıklığı zamana bağlı olarak artış gösterirken hafif displazide bu durum gözlenmedi ($p < 0.05$) (Tablo 3). Tüm deney süresince 24. haftada (Grup B) yedi hafif displazi, 17 şiddetli displazi ve 12 adenokarsinom olacak şekilde toplam 36 lezyon gözlemlendi. Otuzuncu haftada (Grup C), 16 hafif displazi, 13 şiddetli displazi ve 30 adenokarsinom olmak üzere toplam 59 lezyon tespit edilirken, 36. haftada (Grup D) 15 hafif displazi, 29 şiddetli displazi ve 23 adenokarsinom olmak üzere toplam 67 lezyon belirlendi.

Lezyonların kolonda dağılımına bakıldığında, proksimal kolonda sadece hafif displazinin gözlemlendiği, hem displastik lezyonların hem de adenokarsinomların daha çok distal kolonda geliştiği belirlendi (Şekil 2).

TARTIŞMA

Neoplastik hastalıkların deneysel hayvan modelleri, insanlardaki etiyolojik ve patofizyolojik süreçleri anlamak için oldukça önemlidir. DMH güçlü bir kolon karsinojenidir ve indüklenen tümörler, epitel orjinli olup histolojik, morfolojik ve anatomik olarak insan kolonik neoplazmalarına benze-

mektedir.^{1,13} Hayvan modellerinde kolorektal kanser gelişme oranı, kullanılan karsinojenin dozuna, uygulama yoluna, uygulama sıklığı ve süresine bağlıdır. Bunlara ilaveten farelerin cinsiyeti, yaşı ve genetik geçmişi de kolorektal kanser gelişme oranını etkileyebilmektedir.¹⁴ Genetik farklılıklar ile ilgili farelerde yapılan bir çalışmada, iki farklı karsinojen farklı tür farelere enjekte edilmiş ve fare ırkları arasında Balb/C farelerinin DMH'ye karşı cevapta en duyarlı ırk olduğu belirtilmiştir.¹⁵ DMH uygulamalarında kolon kanseri indüklemeye farklı deney hayvanları kullanıldığı gibi farklı veriliş yolları da tercih edilmiş ve en çok kullanılan yöntem s.c yol olmuştur. Çünkü DMH'nin oral yoldan ratlara verilmesi sonucu düşük tümör insidansı görülürken (%30), kas içi (i.m) uygulamalarda %80 oranında, s.c uygulamalarda ise %100 oranında tümör geliştiği gözlemlenmiştir.⁵ Çalışmamızda da Balb/C türü erkek fareler kullanıldı ve DMH s.c yoldan enjekte edilerek %100 oranında adenokarsinom oluşturuldu. Yapılan çalışmalarda, kolon kanseri gelişimine ek olarak DMH'nin, hayvanlar üzerinde bazı toksik etkiler gösterdiği de ifade edilmiştir. DMH'nin 20 mg/kg olarak verildiği bir çalışmada, ilk 16 hafta boyunca, hayvanların %53'ünün öldüğü rapor edilirken¹⁶ aynı doz verilen başka bir çalışmada, DMH enjeksiyonundan sonra farklı zamanlarda 210 farenin 13 tanesinin öldüğü belirtilmiştir.¹⁷ Tümör oluşumuna bağlı olarak ve DMH'nin tüm bu toksik etkilerinden dolayı DMH enjekte edilen hayvanlarda kilo kaybı da gözlemlenmiştir.¹⁸ Fakat kontrol grubuna göre DMH verilen hayvanların ağırlığında önemli bir değişiklik olmadığını ifade

TABLO 3: Toplam lezyon sayısı ve bu lezyonların sınıflandırılması.

Gruplar	Lezyon sayısı	Lezyonların Sınıflandırılması n (%)			
		Adenomlar		Adenokarsinomlar	
		Hafif displazi	Şiddetli displazi	İntramukozal karsinom	İnvaziv karsinom
Grup A	34	30 (88.0)	4 (11.7)	0	0
Grup B	36	7 (19.4)*	17 (47.2)	10 (83.3)	2 (16.6)
Grup C	59	16 (27.1)	13 (22.0)	18 (60.0)†	12 (40.0)‡
Grup D	67	15 (22.3)	29 (43.2)*	10 (43.4)†	13 (56.5)‡

*Grup A ile B arasında, #grup A ile D arasında, †grup C ve D ile grup A arasında, ‡grup C ve D ile grup A arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın ($p < 0.05$) olduğu görülmektedir.



ŞEKİL 2: Lezyonların kolon bölgelerine göre dağılımı.

eden çalışmalar da bulunmaktadır.^{17,19,20}

Ayrıca DMH dozunun artırılmasıyla anal kist sıklığının arttığı, hayvanların genel görüntüsünün bozulduğu, rektal prolapsus ve kanlı gaita gözleendiğini gösterir çalışmalar da bulunmaktadır.^{6,17} Çalışmamızda DMH'nin toksik etkisine bağlı olarak DMH dozundan sonra 40 hayvanın dokuz tanesi (%22) öldü. Geriye kalan hayvanlarda ise anal ve sırt bölgelerindeki tüylerde döküntü, tüylerin genel görüntüsünde bozukluk ve kanlı gaita ve iki farede anal kist geliştiği gözleendi. Ayrıca kontrol ve deney grubunda bulunan farelerin ağırlıkları değerlendirildiğinde gruplar arasında bir farklılık tespit edilmedi.

Yapılan çalışmalarda DMH, tekli ve çoklu dozlarda hayvanlara enjekte edilmiş ve çoklu dozlarda kanser gelişme oranının daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Çoklu doz uygulamalarında, 5-6 haftalık ve 24-30 gr arası ağırlığındaki farelere, 5-20 hafta aralığında haftada bir kez değişik dozlarda (6.8-20 mg/kg) DMH verilmiş ve son DMH enjeksiyonundan sonra değişik sürelerde (10 hafta-2 yıl) bekletilen deney hayvanlarında farklı oranlarda (%26-100) kolon tümörlerinin geliştiği, bunların çoğunlukla (%86-98) distal kolona yerleştiği tespit edilmiştir.^{6,19,21-25} Başka bir çalışmada ise dişi ve erkek fareler arasında kanser oluşması açısından farklılıklar gözlemediği ifade edilmiştir.²⁶

Thulusen ve ark. yaptıkları çalışmada, kolon kanserini indüklemek için 20 mg/kg DMH'yi, 12 hafta boyunca, sekiz haftalık dişi Balb/C türü farelere haftada bir kez s.c yoldan enjekte etmişler ve son DMH dozundan 12 hafta sonra farelerde

%100 kolon kanseri geliştiğini bildirmişlerdir. Gelişen tüm lezyonların iyi huylu tübüler adenom şeklinde olduğu ve histolojik ve klinik açıdan insanlarda görülenlere benzediğini ifade etmişlerdir. Hayvanların tamamında küçük tümör, %96'sında orta büyüklükte tümör ve %76'sında ise büyük tümör gözlelenmiş ve lezyonların genelde distal kolonda geliştiğini belirtmişlerdir.¹⁷ Başka bir çalışmada toplam 34, 68 ve 136 mg/kg DMH alan hayvanlarda sırasıyla %26, %76 ve %87 oranında kolon tümörlerinin geliştiği ve tümörlerin %79'unun distal kolona yerleştiği tespit edilmiştir.⁶ Bizim çalışmamızda, 20 mg/kg DMH dozundan sonra farelerde %100 kolon kanseri geliştiği ve bu lezyonların makroskopik olarak birden fazla polip tarzında olduğu belirlendi. Tüm deney süresince 24. haftada gelişen lezyonların %33'ünün, 30. haftada %50'sinin ve 36. haftada ise %34'ünün adenokarsinom olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar, DMH'nin tekrarlanan dozlarının farelerde uzun bir sessizlik döneminden sonra kolonik tümörlerin geliştiğini gösterdi.

DMH ile kolon kanseri indüklenmesi sonucu gelişen lezyonların histopatolojik olarak değerlendirildiği bir çalışmada, 40 mg/kg DMH, sıçanlara enjekte edilmiş ve 40 haftalık süreçte displazi hariç tüm lezyonlarda, zamanla sayı olarak artış ve benign lezyonların zaman içinde malign lezyonlara dönüştüğü gözlelenmiştir. Çalışma sonucunda 10 adet sıçanda, 30. haftada 18 hafif displazi, yedi şiddetli displazi, 28 karsinom (dört intramukozal, 24 invaziv karsinom) olmak üzere toplam 53 lezyon tespit edilmiştir. 35. haftada ise hafif displazi sayısının azaldığı, şiddetli displazinin ve intramukozal karsinomun arttığı ve tümör gelişiminde bir adenom-karsinom zinciri olduğu ifade edilmiştir.¹⁰ Çalışmamızda ise 20 mg/kg DMH verilen yedi hayvanda, 24. haftada yedi hafif displazi, 17 şiddetli displazi ve 12 karsinom gözleendi. Otuzuncu haftada, 16 hafif displazi, 13 şiddetli displazi ve 30 karsinom olmak üzere toplam 59 lezyon tespit edilirken, 36. haftada 15 hafif displazi, 29 şiddetli displazi ve 23 karsinom olmak üzere toplam 67 lezyon belirlendi. Çalışmamızda dikkat çeken bulgu, 30. haftada şiddetli displazinin diğer lezyonlara göre daha az olmasıdır. Çünkü karsinom sayısı arttıkça şiddetli

displazi sayısı azalmakta ve lezyonlar karsinoma dönüşmektedir. Otuzuncu hafta sonrasında ise hafif displazi sayısında bir azalma, şiddetli displazi ve karsinom sayısında artış olması dikkat çekmektedir. Displastik lezyonların zamanla karsinoma dönüşmesi açısından elde edilen bulgular, kolon kanseri gelişim aşamalarında adenom-karsinom zincirini göstermesi yönünden önemlidir.

Yapılan çalışmalarda lezyonların kolonda yerleşimine bakıldığında ise intramukozal lezyonların daha çok orta kolonda, şiddetli displazi ve invaziv karsinomların ise daha çok distal kolonda görüldüğü tespit edilmiştir. Proksimal kolonda ise sadece hafif displazi gözlenmiştir. Distal kolonda gelişen lezyonların prognozu daha iyi iken kolonun diğer bölgelerde gelişen lezyonların prognozunun daha kötü olduğu ifade edilmiştir.^{20,26} Çalışmamızda lezyonların daha çok distal kolona yerleştiği ve lezyonların karsinoma dönüştükçe distal kolonda görülme sıklığının arttığı, proksimal kolonda ise daha çok displastik lezyonların görüldüğü tespit edildi.

Tümörlerin neden daha çok distal kolonda görüldüğüne yönelik çalışmalarda, kök hücrelerinin lokalizasyonunun ve kolonosit hücre göçünün, proksimal ve distal kolonda farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Thurnherr ve ark. yaptıkları çalışmada distal bölümün kolonun diğer bölümlerine göre daha fazla kök hücre popülasyonuna sahip olduğunu rapor etmişler ve distal kolonda kök hücrelerinin direk malign hücrelere dönüşmesi ile kanser

gelişmesinde etkili olduklarını belirtmişlerdir. Dolayısıyla bu bölge tümörlerin en büyük yerleşim yeridir.^{8,19,26} Başka bir çalışmada ise DMH'nin indüklediği lezyonların kolonda dağılımının, dışkı akışı ile bir bağlantısı olabileceği belirtilmiştir. Yapılan çalışmada transvers kolona yapılan kolostomi ameliyatı sonrasında kolostominin proksimal tarafında tümör sayısının arttığı fakat distal kolonda da tümör oluştuğu gözlenmiştir.¹⁹

SONUÇ

Çalışmamızda karsinom gelişim aşamaları bakımından elde edilen bulgular, deneysel kolon kanseri modelini oluşturma açısından önemlidir. Daha önce yapılan çalışmalar ve bizim elde ettiğimiz sonuçlar, deneysel çalışmalarda DMH'nin güçlü bir kolon karsinojeni olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda, farelere 12 hafta boyunca s.c. yoldan verilen 20 mg/kg DMH'nin, son DMH dozundan altı hafta sonra tüm hayvanlarda adenom, 18 hafta sonra ise adenokarsinom (intramukozal-invaziv karsinom) gelişmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Deneysel kanser çalışmalarında, diyet ve farmakolojik ajanların kolon kanseri üzerinde önleyici ve tedavi edici özelliklerinin araştırılmasında, deney gruplarının ve tedavi uygulama zamanlarının belirlenmesinde, elde ettiğimiz bulguların faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Teşekkür

Bu çalışmanın laboratuvar aşamasında verdiği katkılardan dolayı Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi

KAYNAKLAR

1. Newell LE, Heddle JA. The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutat Res* 2004;564(1):1-7.
2. Terzi C, Ünek T. [Surgical Treatment of Colon Cancer]. *Turkiye Klinikleri J Surgery* 2004; 9(1):71-80.
3. Yuspa SH, Poirier MC. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. *Adv Cancer Res* 1988;50(1):25-70.
4. Lorenz E, Stewart HL. Intestinal carcinoma and other lesion in mice following oral administration of 1,2,5,6- dibenzathracene and 2-Omethylcholanthrene. *J Natl Cancer Inst* 1941;1(1):17-40.
5. Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 2005;22(1-2):16-25.
6. Jackson PE, Cooper DP, Connor PJ, Povey AC. The relationship between 1,2 dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumours: tumor development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event. *Carcinogenesis* 1999;20(3):509-13.
7. Kozoni V, Tsioulas G, Shiff S, Rigas B. The effect of lithocholic acid on proliferation and apoptosis during the early stages of colon carcinogenesis: differential effect on apoptosis in the presence of a colon carcinogen. *Carcinogenesis* 2000;21(5):999-1005.
8. Ma QY, Williamson KE, Rowlands BJ. Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats and rats with DMH induced carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2002;8(5):847-52.
9. Moolenbeek C, Ruitenberg EJ. The "Swiss roll": a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab Anim* 1981; 15(1):57-9.

10. Rowlatt C, Cruse JP, Barton T, Sadrudin AA, Lewin MR. Comparison of the significance of three histopathological thresholds of malignancy in experimental colorectal tumours. *Gut* 1989;30(6):845-53.
11. Greenson KJ, Odze RD. Inflammatory Disorders of the Large Intestine. In: Odze RD, Goldblum JR, Crawford JM. *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2004. p.345-59.
12. Crawford JM. The Gastrointestinal Tract. In: Cotran RC, Kumar V, Robbins S. *Pathologic Basis of Disease*, 5th ed. Philadelphia: Saunders; 1994. p.809-22.
13. Tucker E, Buda A, Janghra B, Cpoad J, Moorghan M, Havler M, et al. Abnormalities of the cadherin-catenin complex in chemically-induced colo-rectal carcinogenesis. *Proc Nutr Soc* 2003;62(1):229-36.
14. Harris CC, Autrup H, Stoner GD, McDowell EM, Trump BF, Schafer P. Metabolism of dimethylnitrosamine and 1,2-dimethylhydrazine in cultured human bronchi. *Cancer Res* 1977;37(7 Pt 1):2309-11.
15. Kuraguchi M, Cook H, Williams ED, Thomas GA. Differences in susceptibility to colonic stem cell somatic mutation in three strains of mice. *J Pathol* 2001;193(4):517-21.
16. Coca S, Enrech S, Moreno García V, Sáez MA, Gutiérrez C, Colmenarejo A, et al. Evaluation of the antitumor activity of interleukin-12 in an experimental murine model of colorectal cancer induced by 1,2 dimethyl-hydrazine (DMH). *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97(9):619-28.
17. Thulesen J, Hartmann B, Hare KJ, Kissow H, Ørskov C, Holst JJ, et al. Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut* 2004;53(8): 1145-50.
18. Li W, Li CB. Effect of oral *Lactococcus lactis* containing endostatin on 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon tumor in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11(46):7242-7.
19. Thurnherr N, Deschner EE, Stonehill EH, Lipkin M. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1973;33(5):940-5.
20. Wang JG, Wang DF, Lv BJ, Si JM. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium. *World J Gastroenterol* 2004;10(20):2958-62.
21. Wu RY, Chiang H, Shao BJ, Li NG, Fu YD. Effects of 2.45-GHz microwave radiation and phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice. *Bioelectromagnetics* 1994; 15(6):531-8.
22. Boffa LC, Diwan BA, Gruss R, Allfrey VG. Differences in colonic nuclear proteins of two mouse strains with different susceptibilities to 1, 2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis. *Cancer Res* 1980;40(6):1774-80.
23. de Moreno de Leblanc A, Perdigon G. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Med Sci Monit* 2004;10(4):BR96-104.
24. Sun BC, Zhao XL, Zhang SW, Liu YX, Wang L, Wang X. Sulindac induces apoptosis and protects against colon carcinoma in mice. *World J Gastroenterol* 2005;11(18): 2822-6.
25. Carter JW, Lancaster HK, Hardman WE, Cameron IL. Distribution of intestine-associated lymphoid tissue, aberrant crypt foci, and tumors in the large bowel of 1,2-dimethylhydrazine-treated mice. *Cancer Res* 1994; 54(16):4304-7.
26. Barthold SW, Jonas AM. Morphogenesis of early 1, 2-dimethylhydrazine-induced lesions and latent period reduction of colon carcinogenesis in mice by a variant of *Citrobacter freundii*. *Cancer Res* 1977;37(12):4352-60.