

Fare Meme Tümörü Üzerine 4 Haftalık Wundesil Tedavisi Etkisiyle İlgili Ön Çalışma Raporu

1- Çalışmanın Amacı:

Wundesil 'in kanser tedavisinde etkili olduğu hipotezinin in vivo ortamda çalışıla bilmesi için ön gözlemlerin yapılarak, hipotezi doğrular yönde bulgulara rastlanması durumunda konunun araştırma projesi haline getirilmesi.

2- Yöntem:

2.1: Denek: BalbC dişi fare

2.2: Ön çalışma Gruplar

Grup I- Kontrol grubu : 3 adet fare

Grup II- Tümör grubu : 3 adet fare

Grup III- Tedavili Tümör grubu : 3 adet fare

2.3: 4T1 Hücrelerinin Hayvanlara (Balb-C Fare) Enjekte Edilmesi ve Grupların Oluşturulması

- 4T1 hücreleri %10'luk FBS (Corning; CG-35-011-CV) ve %1'lik Penisilin/Streptomisin (Thermo Fisher; 15140122) ile desteklenmiş RPMI (Thermo Fisher; A1049101) medyumunda büyütüldü.
- Ardından hücreler her hayvanda 1cc içerisinde 1×10^5 hücre olacak şekilde sayılıp HBSS (Sigma; H9269) medyumunda içerisinde hazırlandı.
- Hayvanlar ketamin/ksilazin anestetikleri hafif sedatize edildi.
- Sağ üst ikinci memesi traşlandı. Traşlanan memenin altına ortotopik olarak 1cc hücre süspansiyonu verildi.
- Hayvanlar gün içinde takip edilerek anesteziyenin etkilerinin kalkması beklenildi.
- Tedavi grubu hayvanlarına hücre enjeksiyonunun 3 günü gavaj yoluyla 0,125ml Wundesil tedavisi başlandı.
- Tedavi 28. güne kadar sürdürülüp, 29 . gün denekler ötenaziye alındı

2.4: Tümör Enjekte Edilen Hayvanlarda Tümör Ölçümü

1. Hayvanlardan bir hafta sonra kontrol edildi tümörlerin ölçülemeyecek kadar küçük olduğu gözlemlendi.
2. 11 günde tümörler ölçülebilecek düzeye gelince 2 günde 1 olmak üzere tümör büyüklükleri ölçüm aleti ile ölçülüp sonuçlar kaydedildi.

2.5 : Tümör Enjekte Edilen Hayvanlardan Dokuların Toplanması

1. 29. günde hayvanlar kurban edıldı. Hayvan ağırlıkları ölçüldü.
2. Primer tümörleri, karaciğer, akciğer ve dalakları çıkarıldı ve tartıldı.
3. Primer tümörler, karaciğer ve dalakları %10'luk formaline, akciğerleri ise olası tümör nodüllerini belirgin hale gelmesi için Bouin's fiksatifine alındı.

3-Bulgular

3.1: Vücut ağırlığı

Tedavi grubu deneklerin vücut ağırlıkları tedavi edilmemiş (2 no'lu hayvan hariç) daha ağır bulundu (Tablo 1).

Tablo1: Deneklerin vücut ağırlıkları

Hayvan No	Denek Vücut Ağırlıkları (gr)		
	Kontrol	4T1	4T1+Tedavi (T)
1	29,0	24,40	26,50
2	22,04	28,15	25,10
3	27,20	26,30	27.20

3.2 : Meme Tümör Ağırlıkları

Üç tümör, üç tedavi deneğinde yapılan tartımda tedavili grupta bir hayvan da tümör ağırlığı oldukça farklı şekilde büyük (**1,91gr**) çıkmıştır. Tedavili grubun diğer iki hayvanında tedavisiz gruba göre daha küçük tümör ağırlığı tespit edildi (Tablo 2).

Tablo 2: Meme tümörü ağırlıkları

Hayvan No	Tümör ağırlıkları (gr)	
	4T1	4T1+Tedavi(T)
1	0,41	0,03
2	1,12	1,91
3	0,13	0.11

3.3: Karaciğer Ağırlıkları

Karaciğer ağırlıklarında Büyük tümörlü tedavi edilmiş ve tedavi edilmemiş deneklerin karaciğeri ağırlıkları ölçüldüğünde tedavi edilmemiş grupta bir hayvan tedavili grup deneklerini karaciğer ağırlıklarından daha düşük değer gösterdi (Tablo 3)

Tablo 3: Gruplara ait karaciğer ağırlıkları

Hayvan No	Karaciğer ağırlıkları (gr)		
	Kontrol	4T1	4T1+Tedavi (T)
1	1.9	1,29	1,34
2	1.48	1,83	1,79
3	1.24	1,36	1.32

3.4: Dalak Ağırlıkları

Deneklerde dalak ağırlıkları; tedavili grubun 2. denegi hariç diğer deneklerde daha düşük çıkmıştır.

Tablo 4: Gruplara ait dalak ağırlıkları

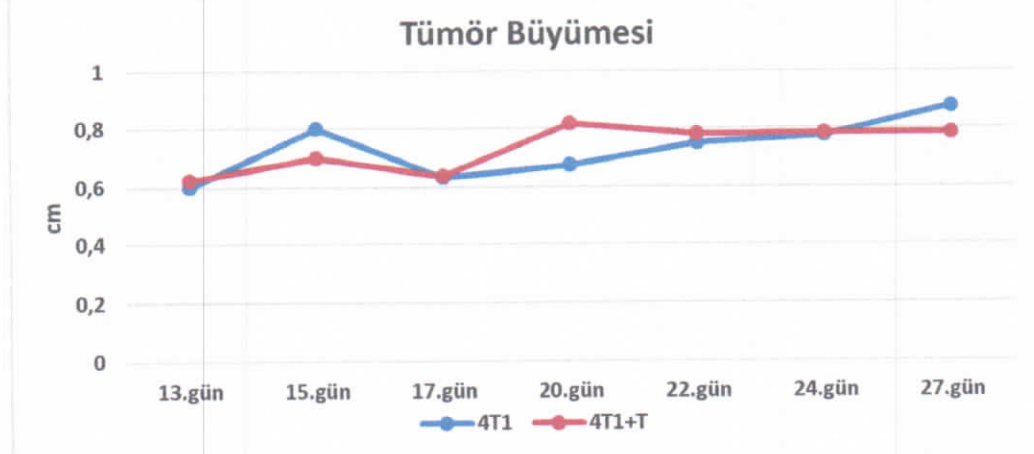
Hayvan No	Dalak Ağırlıkları (gr)		
	Kontrol	4T1	4T1+Tedavi (T)
1	0,15	0,22	0,16
2	0,37	0,49	0,61
3	0,15	0,27	0,20

3.5: Tümör Büyüklükleri

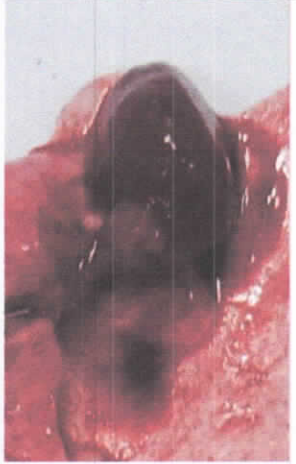
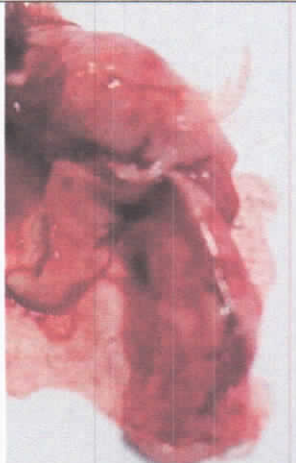
Deneklerde tümör büyüklüğü ortalama değerleri üçüncü haftadan itibaren tedavili grupta yaklaşık aynı kalırken tedavisiz grupta büyüme devam etmekteydi.

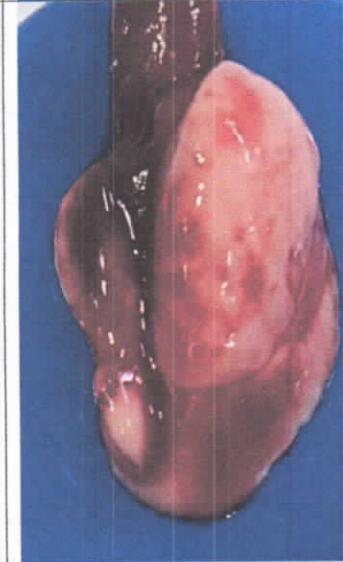
Tablo 5: Deneklerde Tümör büyüklüğü ortalama değerleri ve büyüme eğrisi grafiği

	13.gün	15.gün	17.gün	20.gün	22.gün	24.gün	27.gün
4T1	0,6	0,8	0,633	0,675	0,75	0,775	0,875
4T1+T	0,625	0,7	0,6375	0,816	0,78	0,783	0,783



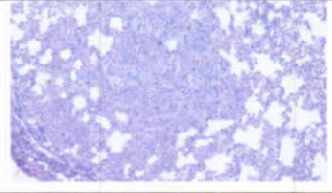
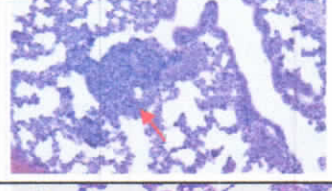
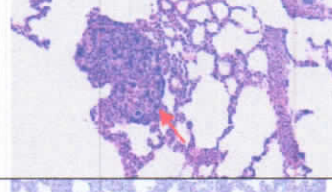
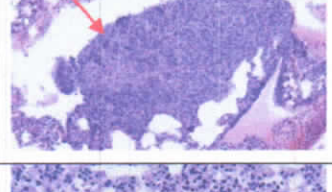
(Handwritten signature)

	Karaciğer	Dalak	Akciğer
Tümör 1			
Tümör 2			
Tümör 3			

Tedavi 1			
Tedavi 2			
Tedavi 3			

Şekil 1: Tümör ve Tedavi grupları deneklerine ait organların makroskopik görünümü.

3.6: Histopatoloji

	Karaciğer	Dalak	Akciğer
Tümör 1			
Tümör 2			
Tümör 3			
Tedavi 1			
Tedavi 2			
Tedavi 3			

Şekil 2: Deneklerden alınan karaciğer, dalak ve akciğer örneklerinin histolojik görünüşleri (Hematoksile-Eozin boyaması)

4-Değerlendirme ve Sonuç

Gruplara ait deneklerden elde edilen vücut ağırlıkları, organ ağırlıkları ve tümör ağırlıkları değerlendirildiğinde Wundesil tedavisi alan grubun değerleri bir hayvan haricinde genellikle tedavisiz gruba göre daha iyi durumdaydı. Tümörlü deneklerin vücut ağırlığı tümörün büyümesine rağmen daha düşük olur. Burada yaptığımız ön çalışmada tedavili gruba ait iki denekte tedavisizlere göre 1-2 gr lık daha yüksek vücut ağırlığı belirlendi. Karaciğer ağırlıkları değerlendirilecek kadar belirgin bir farklılık göstermemekle birlikte yine de tedavisiz grup deneklerine göre düşük ağırlığa sahip tedavili grup karaciğer değerleri tespit edildi. Dalak ağırlıkları da tedavili grupta bir denek dışında belirgin olarak daha düşüktü. Tümör ağırlıkları değerlendirildiğinde, tedavili grubun bir deneği hariç diğer ikisinin tedavisiz gruba göre daha düşük ağırlığa sahip olduğu belirlendi.

Tümör boyutu ortalamaları 27. Günün sonunda bir hayvandaki sapmaya rağmen tedavili grupta daha küçük olduğu belirlendi.

Histopatolojik incelemede karaciğer örneklerinde tedavisiz gruplarda yaygın olarak vena sentralis çevresinde ve lobul içerisinde yaygın şekilde tümör hücresi grupları (kırmızı oklar) izlenmiştir. Tedavi grubunda 2. Denek dışında tümör hücreleri grupları daha küçük ve daha az sayıda izlenmekteydi (Şekil 2).

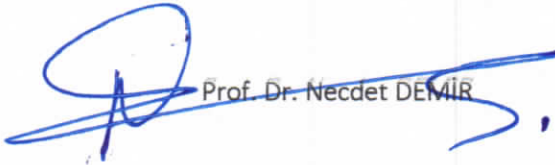
Dalak örneklerinde histopatolojik inceleme yapıldığında tedavisiz gruplarda dalak morfolojisi bozulmuş, arteria sentralis çevresinde izlenmesi gereken beyaz pulpa yapısı kapbolmuş, kırmızı pulpa alanları kaybolmuş, bütün alanlar diffuz şekilde lenfositlerce doldurulmuş. Tedavi gruplarında beyaz pulpa yapıları bozulmakla birlikte kırmızı pulpa alanları mevcudiyetlerini sürdürmekteydi (Şekil 2).

Akciğerlerde tedavisiz gruplarda yaygın ve çok sayıda farklı büyüklüklerde alanları kaplayan metastatik tümör yapıları (kırmızı oklar) izlendi. Tedavili grupta ikinci örnek hariç çok az sayıda genellikle periferik olarak yerleşmiş dar alanları kapsayan tümör yapıları izlendi (Şekil 2).

SONUÇ (Histopatolojik veriler geldiğinde Revize edilecek) :

Ön çalışma olarak gerçekleştirilen makroskobik ve mikroskobik çalışmamızda Wundesil'in meme tümörü gelişimini yavaşlatabileceği yönünde bulgular elde edilmekle birlikte tedavi grubunda bir hayvanda etkisiz olduğu görülmüştür. Çalışmanın bu bulgularının istatistiksel olarak anlamlı olabilmesi için denek sayısının istatistiksel değerlendirme yapılabilecek sayıya yükseltilerek morfolojik, morfometrik ve histopatolojik değerlendirmelerin gerçekleştirileceği detayla araştırmaya ihtiyaç vardır.

11.04.2020

 Prof. Dr. Necdet DEMİR