

## LEVAMİSOL'ÜN 20 mg/kg DOZUNUN İSVİÇRE TÜRÜ ALBİNO FARELERDE KİMYASAL KARSİNOJENEZE ETKİSİ\*

Günay GİRİŞKEN

*İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,  
Patoloji Kürsüsü.*

### Ö Z E T

Bir antihelmintik ilaç olarak bilinen levamisol'ün, son zamanlarda yapılan çalışmalarla, 20 - 25 mg/kg dozunun farelerde geç aşırı duyarlılığı güçlendirdiği, greft reddini hızlandırdığı, belirli tümör transplantatları bazında deney hayvanı türlerinde yüksek dozda levamisol'ün yaşam süresini uzattığı ve bu ilâçın kimyasal karsinojenezdeki etkisinin yeterince araştırılmadığı dikkatimizi çektiğinden; İsviçre türü albino farelerde 20 mg/kg levamisol'ün kimyasal karsinojeneze etkisi gözlenmek üzere bu çalışma yapıldı.

#### Deney Grupları :

*I. Grup :* Ense derisi altına 0.2 ml susam yağında erimiş 4 mg metilkolantron verilmiş 30 fare.

*II. Grup :* Ense derisi altına 0.2 ml susam yağında erimiş 4 mg metilkolantron ve ilki karsinojenin verildiği gün olmak üzere 30 günde bir intraperitoneal 20 mg/kg levamisol verilmiş 30 fare.

*III. Grup :* Ense derisi altına 0.2 ml susam yağı verilmiş 15 fare.

*IV. Grup :* İlki II. grupta aynı günde olmak üzere 30 günde bir intraperitoneal 20 mg/kg levamisol verilmiş 15 fare.

*V. Grup :* Saf kontrol olarak ayrılan 15 fare.

Belli sürelerde grupların kontrolü yapıldı. Gelişen tümörlerin sayı, büyülüklük ve büyümeye hızları gözlandı.

Deney süresi sonunda bütün gruppardaki farelere geç aşırı duyarlılığı ölçümede yararlanılan «Pençe şışme testi» uygulandı.

\* Bu çalışma, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Kürsüsünde yapılmıştır.

Bulgular istatistiksel değerlendirmeye de tâbi tutularak 20 mg/kg levamisol'ün kimyasal karsinojenezin latent süresini kısalttığı ve tümörün büyümeye hızını artırdığı, «Pençe şisme testi»nin karsinojen almış farelerde geç aşırı duyarlılığı saptamada geçerli bir yöntem olmadığı kanısına varıldı. Levamisol'ün aynı zamanda ko-karsinojen etkisinin olabileceği fikri üzerinde de duruldu.

## GİRİŞ

Karsinojenez (kanserleşme), birbirini izleyen bir takım olay zincirlerinin sonucu olarak kabul edilir. Kanserleşmenin aşamalı bir olay olduğu *Gore* ve *ark.*'larının, *Werner* ve *ark.*'larının deneyleri ile kesinleşmiştir. Bu deneylerde, karsinojen maddenin ancak bir hücre değişikliği yaptığı, asıl tümörün meydana gelmesi için ise başka faktörlerin etkisinin gerektiği gösterilmiştir<sup>15,37</sup>.

Karsinojenez olayının aşamaları sırasıyla şunlardır :

1 — *Dönüşme (Initiation) aşaması* : Bu aşamada karsinojen, hücrenin genomunda ve mitokondrialarında kimyasal bir değişiklik meydana getirir. Bu değişikliklerle işleyen enzimler işlemez hale gelir. Genlerin değişmesi «metasyon» denilen olaydır. Hücrenin genomunda meydana gelen bu değişiklik onu, üremeyi kontrol eden etkenlerden bağımsız kılar<sup>23,32,38</sup>.

Üremeyi denetleyen etkenler yönünden bağımsız hale gelen hücre hemen üremez. Bu hücrenin sonu şöyle olabilir :

a — Organizma tarafından yok edilir. Hücreyi yokeden etkenlerden birinin, immun sistem olduğunu biliyoruz. Bundan başka normalden sapmış hücrenin dejenerasyonu ya da nekrozu ile sonlanan iltihap ve ağır dejeneratif olaylar da bu hücreyi ortadan kaldırabilir.

b — Kimyasal yapı değişikliği gösteren bu hücre olduğu gibi kalabilir. Hücre bu sessizlik «latent» halinde uzun bir süre, hattâ hayatın sonuna dek üremeyebilir. Üremesi için bir uyarı gereklidir<sup>23</sup>.

2 — *Üreme (Promotion) aşaması* : Bu aşamada hücre üremeye başlamıştır. Üreme, bir taraftan sessizlik devresinde etkisini sürdürerek baskı etkenlerinin ortadan kalkmasına, diğer taraftan «Promotor» denilen ve DNA sentezini artıran bir etkiye bağlıdır<sup>12</sup>.

3 — *İlerleme (Progression) aşaması* : Bu aşama, tümöre özgü özelliklerde bir ilerlemedir. Hücrenin zarında, mitokondrialarında, endoplazmik

retikulumunda, çekirdek zarında, çekirdek kromozom içerisinde ve boyanmasında değişiklikler görülür. Hücrelerin şekli de değişir. Hücrelerdeki bu şekil, büyülük ve boyama değişikliğine «Pleomorfizm» denir. Bundan sonra oluşan mutasyonlar hücrenin polarite yeteneğini, yani kendi cinsinden hücre ile birleşerek o organ ve doku için özel olan sıra, asinüs, kitle, trabekül gibi yapı topluluklarını yapma yeteneğini ve «koordinasyon yeteneğini» yeni bir hücrenin kendi cinsinden olmayan en az bir tür hücre ile beraber üreme yeteneğini de ortadan kaldırır. Böylece, üreme alanında ya tek bir tip hücre ya da iki tip hücre oransız bir şekilde üremiş olarak görülür<sup>33</sup>.

4 — *Sarta bağlı (Conditional) aşama* : Tümör hücresinin üremesi, önceden kendisini meydana getiren anormal şartlara bağlıdır. Örneğin, böyle bir tümörü oluştugu organizmadan alırsak, ancak kendi genomunu taşıyan organizmalarda, yani genomu eşleştirilmiş saf hayvan sülâlerinde, ya da bu tümörün kendilindenoluştugu hayvanlarda, ya da aynı hormonal dengesizliği gösteren hayvanlarda üredigini görürüz<sup>16</sup>.

5 — *Tam Otonomi (absolute autonomy) aşaması* : Bu aşamada tümör, kendisinin gelişmesine neden olan bütün koşullardan bağımsız bir hale gelir. Bu, organizmadan tam olarak uzaklaştırılmamış olan bütün tümörlerin kaçınılmaz son dönemidir.

Canlılar yaşamları boyunca, sürekli olarak, çevrelerindeki onkojenik etkilere (iyicecekler, hava, güneş ışınları ve ionize edici radyasyon gibi) maruz kalırlar. Bu etkenler organizmada, günde oluşan yaklaşık  $10^{12}$  mitoz olayında etkilidirler ve hücrelerde mutasyonlara neden olurlar. Mutasyona uğrayan hücreler malign potansiyel kazanır ve zaman zaman bu yönde gelişme gösterirler<sup>18</sup>.

Bu gün yaygın olan kaniya göre, tümöral değişikliğe uğrayan hücreler konak için yabancı olan, yeni antijenler kazanırlar (*Tumor-specific antigens*)<sup>10,19</sup>.

İmmun sistem, daha başlangıçta, bu antijenleri tanır ve bu malign hücrelerin gelişmesini kısıtlamaya ya da tamamen ortadan kaldırmaya yönelik reaksiyonların ortaya çıkmasına neden olur<sup>26</sup>. Immunolojik denetim adını alan bu fonksiyon bireylerin ömrü boyunca lenfositikler sistem tarafından yönetilir.

Kanser gelişmesi immun denetimin en zayıf olduğu iki dönemde en çok görülür. Birinci dönem, immun sistemin henüz olgunlaşmadığı çocukluğunu; ikinci dönem ise, immun sistemin gücünü yitirdiği yaşılığın<sup>13</sup>.

Bütün hücreler yüzeylerinde bireysel özelliklerini yansıtan ve transplante edilmiş dokuların reddine sebep olan normal transplantasyon antijenlerine sahiptirler. Bununla birlikte, normal bir hücre malign karakter kazanmaya başlayınca bir takım biokimyasal değişiklikler geçirir ve yeni antijenler kazanır. Bu antijenler konakta bir immun cevabı başlatmasına neden olur. Son yıllarda kimyasal maddeler ve viruslarla oluşan tümörlerin, kendi konak dokularından farklı antijenlere sahip oldukları saptanmıştır. İlk kez 1953 de Foley, metilkolantron (MC) ile oluşan tümör çıkarıldıkten sonra, konağın aynı tümöre maruz bırakılmasından sonra direncin olduğunu saptamıştır<sup>10</sup>. 1957 de Prehn ve daha sonra öteki bazı araştırmacılar aromatik hidrokarbonların etkisi ile oluşan tümörlerin izolog antijenlere sahip oldukları ve bu antijenlerin spontan tümörlerde bulunmadığı gibi farenin normal dokularında da bulunmadığı kanısına varmışlardır<sup>26</sup>. Immunite, tümör için spesifik olup, kullanılan saf tür hayvanların genetik yapısı ile ilgili değildir<sup>17</sup>. Son yıllarda, Forbes ve ark.ları, çok sayıda singeneik tümörlerin hücre membranlarını eritmişlerdir; elde edilen antijenlerin bir kısmının, in vitro olarak lemfosit proliferasyonu yaptığı ve bu eriyen antijenlerin bazı tümörlerle karşı direnç oluşturduğunu göstermiştir<sup>11</sup>.

Diğer taraftan, konağa az miktarda<sup>24</sup> ve ısrınlanmış, fakat çoğalma yeteneği olmayan hücrelerin verilmesiyle de<sup>22</sup> deneysel tümörlerin antijenik özellikleri gösterilmiştir.

1966 da sentetik bir antihelmintik ilaç olarak Thienpont ve ark.ları tarafından oluşturululan Levamisol<sup>38</sup>, tetramisol'ün levoisomeridir.

Renoux ve Renoux 1971 de başlayan çalışmaları ile farelerde levamisol'ün Brucella aşısının koruyucu etkisini belirgin bir şekilde artttığını<sup>30</sup>, antikor yapan hücrelerin gelişmesini hızlandırdığını<sup>29</sup>, yaşılı farelerde bozulmuş immunolojik sistemi tamir ettiğini<sup>31</sup>, ana-babaya ait donör hücrelerin inokulasyonunu takiben F<sub>1</sub> melez alicılarda graft versus host reaksiyonunun şiddetini artttığını<sup>28</sup> ortaya koymuşlardır. Fischer ve ark.ları ise levamisol'ün «Immunolojik olarak olgunlaşmamış» yeni doğmuş sıçanları piyojenik bakterilerin ya da herpes virusunun neden olduğu ilk enfeksiyona belirgin olarak daha dirençli kıldığını<sup>9</sup>, bununla beraber diğer bir çok çalışma, yetişkin hayvanların «immunolojik olarak olgun» levamisol verildikten sonra virulan bakterilerle, viruslarla, ya da protozoalarla bu tür infeksiyona dahi dirençli olmadığını göstermiştir<sup>34</sup>.

Levamisol'ün malignite üzerine etkisi de hayvan deneyleri ile araştırılmıştır. Tümör hücrelerinin konağa transplantasyonu ile oluşan tümör trans-

plantatının ve onun metastazları ile ilgili çalışmalarla bir kısım araştırmacılar levamisol'ün tümör transplantatının gelişmesini ve metastazlarını engelleyici yönde etkisini ileri sürerken<sup>27</sup>, bir kısım araştırmacılar ise olumlu ya da olumsuz yönde etkisinin görülmeyeğini<sup>7</sup>, bir grup araştırmacı ise tümör transplantatının gelişmesini ve metastazlarını hızlandırdığını gösterdiler.

Ibrahim ve ark.'larının yaptığı çalışmada, hamster ve sıçanlarda allogenik hamster melanom hücrelerini ve singeneik sıçan hepatom hücrelerini kullanarak oluşturdukları tümör transplantatına ve metastazlarına çeşitli dozlarda levamisol'ün etkisi şöyle özetlenebilir: Melanom transplantatlı hamstere 2.5, 10 ve 50 mg/kg'lık levamisol dozları verilmiştir; yalnız su verilen kontrol hayvanlarının tamamı 9 hafta içinde ölüürken her üç dozdada hayvanların bazıları 12 hafta süresince canlı kalmışlardır. Bu hayvanların otoskopide, her iki grup hayvanlarda da çeşitli organ metastazları saptanmıştır. Hepatom transplantatlı sıçanlara 1.25, 2.5 ve 5 mg/kg'lık levamisol dozları gün aşarı ya da haftada üç gün olmak üzere verildiğinde bunların levamisol verilmeyen tümörlü kontrol hayvanları ile hemen hemen aynı günlerde ölükleri gözlenmiştir. Hamsterlerde melanom transplantatı çıkarıldıkten sonra nüksler için 2.5, 10 ve 50 mg/kg'lık levamisol dozları haftada üç kez verilerek denendiğinde, 50 ve 10 mg/kg levamisol verilen grupta kontrol grubuna benzer bir davranış görüldürken 2.5 mg/kg levamisol verilen grupta ümit verici bir durum ortaya çıktıgı gözlenmiştir. 17 hayvanı kapsayan bu grupta 5 hayvanda altı haftanın sonunda tümörün tam gerilemesi ve deney sonuna dek tümörsüz kaldıkları, 6 hayvanda dört ile altı haftada kontrol hayvanlarının dakinde eş bir tümör büyümesinin olduğu, fakat daha sonra deney sonunda tamamlanmayan geç bir gerilemenin başladığını gözlenmiştir. Bu 6 hayvandan 4'ü deney bitmeden metastazlarla ölmüş, 2'sinin deney süresi olan 15 hafta yaşamasına rağmen otoskopide metastazlar saptanmıştır. Geri kalan 6 hayvanda yaşam süresinin çok az uzamasından başka levamisol'ün olumlu bir etkisi saptanmamıştır<sup>20</sup>.

Bu çalışmaların incelenmesinde normal hayvanlarda deneysel tümörlerin yayılması ve tümör hücresi inokulasyonu ile tümör transplantatı oluşmasında levamisol'ün sistemik belirgin bir etkisi olmadığını göstermiştir. Fakat tümör kitlesi spesifik tedavi ile azaltılırsa levamisol'ün sistematik olarak nüksleri önleyebildiği ve remisyonu uzattığı kanıtlanmıştır<sup>6</sup>.

Nükslerin önlenmesi ve remisyonun uzaması levamisol'ün tümörü giderici tedaviden sonra immun kapasitesinin süratle iyileşmesine neden olmasıyla açıklanmaktadır<sup>28</sup>.

Eisenberg ve Shklar'ın hamsterlerde yaptığı çalışmada levamisol'ün kimyasal karsinojeneze etkisi araştırılmıştır. Bir grup hamsterin ağız mukozasına haftada üç kez 9,10 dimetil - 1,2 benzantrasen (DMBA)'nin %0,5'lik solüsyonu sürülmüş; bir grup hamstere de hem bu solüsyondan sürülmüş, hem de her sürüşten sonra hayvan başına yaklaşık 0,7 mg levamisol ağız yoluyla verilmiştir. Deney sonunda kimyasal karsinojene maruz kalan ve levamisol alan grupta oluşan tümör sayısının kontrol grubuna oranla daha az sayıda ve daha küçük hacimde olduğu saptanmıştır<sup>8</sup>.

Renoux ve ark.'larının 1976 da levamisol'ün hücresel bağılıklığa etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, fare türü kullanılmış ve hücresel bağılıklık, greft reddi ve geç aşırı duyarlık reaksiyonları ile araştırılmıştır. Bu çalışmada 2,5, 20, 25 mg/kg levamisol dozları kullanılmıştır. Intraperitoneal yoldan verilen tek doz 20, 25 mg/kg levamisol, greft konduğu gün ve greft konuktan 7 gün sonra verildiğinde greft reddini hızlandırdığı gözlenmiştir. Ayrıca farelerde 25 mg/kg levamisol verildiğinde düşük ve yüksek dozlardaki koyun alvularına karşı cevapta geç aşırı duyarlığın yüksek düzeylerde olduğu saptanmıştır. Gene yüksek levamisol dozlarının T-hücre aktivitesinin erken immunolojik uyarımına neden olduğu ve geç aşırı duyarlık düzeyinin koyun alyuvarlarına karşı cevapta 20 gün süreyle sabit kaldığı gözlenmiştir<sup>27</sup>.

Kaynakların araştırılmasında 20-25 mg/kg levamisol'ün farelerde geç aşırı duyarlığı güçlendirdiği, greft reddini hızlandırdığı, belirli tümör transplantatlı bazı deney hayatı türlerinde yüksek dozda levamisol'ün yaşam süresini uzattığı görülmüştür.

Gene kaynakların incelenmesinden görülmektedir ki, levamisol tümör antijeni organizmaya girdikten sonra denenmiştir. Karsinojenez e;nasında, yani tümör antijenin yeni yeni oluşmakta olduğu bir organizmada yaptığı etkinin yeterince araştırılmadığı dikkati çekmektedir. Bu değişik koşul altında levamisol'ün tümör immunobiolojisine olan etki biçimini hakkında bazı ipuçları verebilir düşüncesi ile 20 mg/kg levamisol'ün İsviçre türü albino farelerde kimyasal karsinojeneze etkisinin ne olabileceği üzerindeki araştırmamızı yaptıktır.

## YÖNTEM VE GEREÇLER

Deneysel çalışmamızda 150 İsviçre türü albino fareden yararlanılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan karsinojen, kullandığımız fare türünün oldukça duyar olduğu, Sigma Chemical Company, St. Louis U.S.A. firması yapımı

20-Methylcholanthere'dir (MC). Eritici olarak, susam yağı (SY) kullanılmıştır. Karsinojen dozu, fare başına 0,2 ml susam yağında 4 mg MC olmak üzere hazırlanmıştır.

Baz levamisol (L) steril fizyolojik serumda eriterek kullanılmıştır.

20 mg/kg levamisol, en ağır hayvana 1 ml de düşecek miktar olarak hesaplanıp eriyik hazırlanmıştır. Daha hafif farelere verilecek levamisol miktarı, 1 ml'lik, taksimatlı şırınga ile, ağırlıklarına göre düşecek hacim (ml) olarak tayin edilmiştir.

### Deneý Grupları :

I. Grup : 30 farenin ense derisi altına 0,2 ml karsinojenli susam yağı verildi.

II. Grup : 30 farenin ense derisi altına 0,2 ml karsinojenli susam yağı verildi. Ayrıca, korsinojenin verildiği gün, kilo başına 20 mg düşecek şekilde hazırlanan levamisol intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. Bu işlem, deney sonuna dek, her 30 günde bir hayvanların ağırlıkları kontrol edilerek tekrarlandı.

Ayrıca, 10 fareye de yalnız karsinojen verilip yedek olarak saklandı.

III. Grup : 15 fareye ilki II. grup ile aynı günde olmak üzere 20 mg/kg levamisol her 30 günde bir (i.p.) olarak verildi.

IV. Grup : 15 farenin ense derisi altına, yalnız 0,2 ml susam yağı verildi.

V. Grup : 15 fare saf kontrol olarak ayrıldı.

Karsinojen verilmiş ilk iki gruptaki fareler, MC'nin verilmesinden 99, 123, 140, ve 153 gün sonra olmak üzere kontrol edildi. Gelişen tümörler, uzun iki ekseninden ölçülerek cm<sup>2</sup> cinsinden büyüklükleri saptandı.

Yalnız MC verilen grupta ve MC ile levamisol verilen grupta gelişen tümörlerin büyümeye hızı, iki kontrol tarihi arasında, tümörlerin kazandıkları cm<sup>2</sup> cinsinden farklar hesaplanarak saptandı.

Birinci kontrolden sonra, daha düşük dozlardaki levamisol'ün karsinojenezdeki etkisini gözlemek üzere 4-5 aylık 15 farelik üç grup daha ahndı. Her gruba, karsinojen ile ilki karsinojenin verildiği gün olmak üzere, 30 günde bir sırayla 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg olmak üzere levamisol (i.p.) olarak verildi. 99 gün sonra kontrol edildi.

Deney sonunda, grupların tümündeki farelere «Pençe şişme testi» uygulandı.

#### **Pençe şişme testi (Footpad swelling test):**

Geç aşırı duyarlığı ölçmek için kullanılan bu yöntemde, farelere kuyruk veninden yaklaşık  $4 \times 10^5$  koyun alyuvarı (KA) verilmektedir. KA'na karşı duyarlı olan bu farelere, dört gün sonra geç aşırı duyarlık reaksiyonu ortaya çıkmak üzere, sağ arka ayak tabanı kaba kışım derisi altına yaklaşık  $10^8$  KA, sol arka ayak tabanı kaba kışım altına da fare türüne yabancı olan yaklaşık  $10^8$  kadar alyuvar kontrol olarak verilmektedir. Yirmidört saat sonra, farenin sağ ve sol arka ayak tabanlarının kalınlığı kompas ile ölçülür. Deney ayak tabanı ile kontrol ayak tabanı arasındaki kalınlık farkı hesaplanır<sup>18,21</sup>.

Deneyimizde kontrol olarak kullandığımız horoz alyuvarlarıdır (HA).

Deneyimizde, taban kalınlıkları kompas ile mm olarak ölçülmüş ve farklar mm olarak değerlendirilmiştir. Deney pençesi lehine olan fark (+), deney pençesi kalınlığı ile kontrol pençesinin eşitliği (0), kontrol pençesi lehine fark (-) olarak belirtilmiştir.

Tümör sayıları kritik orana, tümör büyüklükleri ve her gruptaki «Pençe şişme testi» değerleri de birbirleriyle istatistiksel olarak Student (+) testine göre değerlendirilmiş olup  $P > 0.05$  anlamsız olarak kabul edilmiştir.

## **BULGULAR**

### **I. Grup (MC verilmiş fareler)**

#### **Tümör gelişmesi**

Birinci kontrolde 2 farede tümör gelişti.

İkinci kontrolde 7 farede daha tümör gelişti.

Üçüncü kontrolde 9 farede daha tümör gelişti.

Dördüncü kontrolde ise yalnız 1 farede daha tümör gelişti.

#### **Tümör büyümesi**

Birinci ve ikinci kontroller arasında iki tümörde 11 ve  $13 \text{ cm}^2$ 'lik bir büyümeye izlendi.

İkinci ve üçüncü kontroller arasında en az büyümeye  $0.7 \text{ cm}^2$ , en fazla büyümeye ise  $16.5 \text{ cm}^2$  olarak izlendi.

Üçüncü ve dördüncü kontroller arasında da bazı tümörlerde büyümeye izlenmedi. Bazlarında ise büyümeye vardı ve en fazlası  $2 \text{ cm}^2$  idi.

#### **Pençe şişme testi**

Dördüncü kontrolden sonra tümörlü ve tümörsüz farelerde «pençe şişme testi» uygulandı. Tümör gelişenlerde;  $2 \text{ cm}^2$ 'lik tümörlülerden bazıları + 0.2, bazıları — 0.3 idi.  $9 \text{ cm}^2$  lik tümörlü bir farede  $0.8 \text{ cm}^2$ 'lik tümörlü bir farede ise + 0.1 idi. Tümör gelişmeyenlerde ise 0 ile + 0.3 arasında değişen değerler saptandı.

### **II. Grup (MC + L verilmiş fareler) :**

#### **Tümör gelişmesi**

Birinci kontrolde 10 farede tümör geliştiği saptandı.

İkinci kontrolde 6 farede daha tümör geliştiği saptandı.

Üçüncü kontrolde 4 farede daha tümör geliştiği saptandı.

Dördüncü kontrolde ise 4 farede daha tümör geliştiği saptandı.

#### **Tümör büyümesi**

Birinci ve ikinci kontroller arasında tümörlerde  $0.22 \text{ cm}^2$  ile  $16.2 \text{ cm}^2$ 'lik büyümeye izlendi.

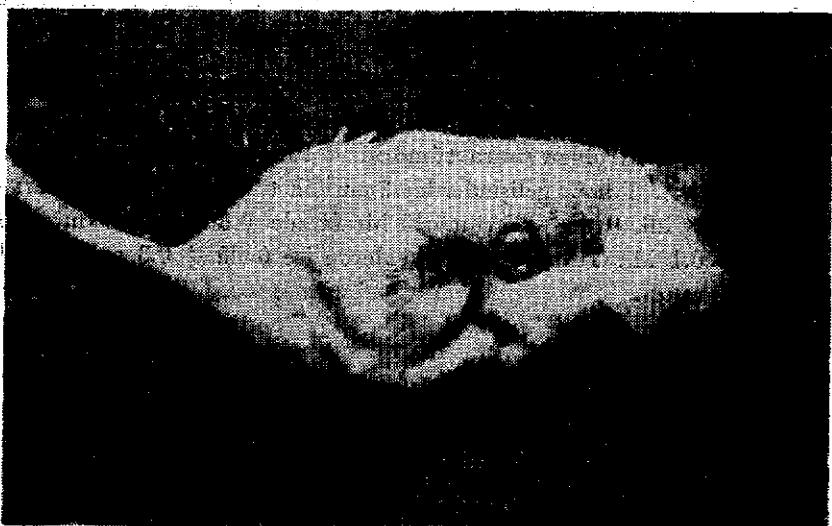
İkinci ve üçüncü kontroller arasında tümörlerde  $0.2 \text{ cm}^2$  ile  $16 \text{ cm}^2$  arasında değişen büyümeye izlendi.

Üçüncü ve dördüncü kontroller arasında tümörlerde  $0.8 \text{ cm}^2$  ile  $6 \text{ cm}^2$  arasında değişen büyümeye izlendi.

#### **Pençe şişme testi**

Dördüncü kontrolden sonra tümörlü ve tümörsüz farelere «Pençe şişme testi» uygulandı. Tümör gelişenlerden  $1 \text{ cm}^2$ 'lik bir tümörde + 0.1,  $2 \text{ cm}^2$ 'lik bir tümörde + 0.2 gibi değerler bulunurken  $10 \text{ cm}^2$  lik bir tümörde 0,  $25 \text{ cm}^2$  lik bir tümörde + 0.1,  $4 \text{ cm}^2$ 'lik bir tümörde de + 0.5 gibi değerler bulundu. Tümör gelişmeyenlerde ise + 0.1 ile + 0.9 arasında değişen değerler bulundu.

20 mg/kg levamisol verilmiş farelere uygulanan «Pençe şişme testi» değerleri  $+ 0.1$  ilâ  $+ 0.9$  arasında değişmektedir.

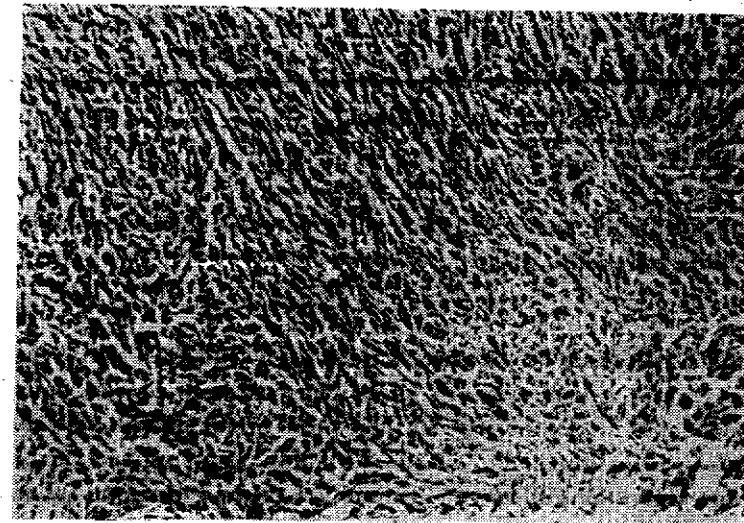


Resim 1 — Deri altında büyük kitle yapan tümör ve bunun yüzeyinde deri infiltrasyonu.



Resim 2 — Bir deney hayvanında sırttaki tümörün karın boşluğununa doğru ilerleyerek orada da kitle oluşturmasi.

Saf kontrollere uygulanan «Pençe şişme testi» değerleri 0 ilâ  $+ 0.3$  arasında değişmektedir.



Resim 3 — Tümörlerimizde rastlanan histolojik tablo. Atipik fusiform hücrelerin yaptığı düzensiz demetler ( $H + E \times 80$ ).

Susam yağı verilmiş farelere uygulanan «Pençe şişme testi» değerleri de  $0$  ilâ  $+ 0.7$  arasında değişmektedir.

Karsinojen verilmiş bu iki grupta gelişen tümörlerden makroskopik ve mikroskopik örnekler Resim : 1, 2, 3 te görülmektedir.

## İRDELEME VE SONUÇ

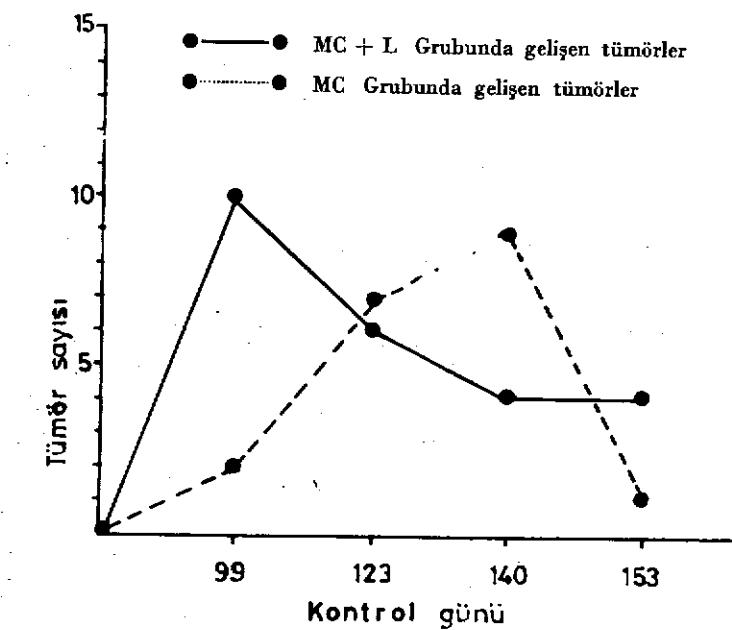
İmmun sistem, organizmada kanser gelişmesini önleyici bir etki göstermektedir. İmmun sistemin zayıf olduğu dönemlerde ve yıkıldığı durumlarda kanser insidensinin yüksek oluşu, bu görüşü kanıtlayıcı niteliktédir<sup>13,14</sup>.

İmmun sistemi güçlendirerek, kanser gelişmesinin ve nükslerin önlenmesine çalışılmaktadır. İmmun sistemi güçlendirerek uyarı yapacak etkenler arasında levamisol'ün de sayılabileceği, bu ilaç hakkında son zamanlarda yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur<sup>9,28</sup>.

Levamisol'ün 20 - 25 mg/kg dozlarının bazı tümörlü deney hayvanlarının yaşam süresini uzatması ve farelerde hücresel bağımlılığı güçlendirmesi nedeniyle çalışmamızda da 20 mg/kg kullanılmıştır. Levamisol hayvanlara ağızdan, deri altına, ven içine ve periton içine (i.p.) olmak üzere dört yolla verilebilmektedir. Emilimin süratli ve doz kaybının yok denecek derecede az olacağunu düşündürse de, biz, deney hayvanlarımızda (i.p.) yolu seçtik. 20 ve 25 mg/kg'in her ikisinin de amacımıza uygun dozlar olmasına rağmen, (i.p.) olarak 22 mg/kg'in fareler için öldürücü doz olması<sup>35</sup> nedeniyle 20 mg/kg çalışma dozumuz olarak alınmıştır. 20 mg/kg'lik dozun, organizmadaki etkinliğini ancak 20 gün süreyle yüksek düzeyde sabit tutması özelligidinden hareketle, ilâcın bu dozunu 30 günde bir tekrarlamak zorunda kaldık.

Tümör jenezinde latent süre, karsinojen verildikten sonra yapılan kontrollerde, tümör gelişmesinin ilk günü, hayvanlarda oluşan şüpheli lezyonların histolojik incelenmesi ile bu lezyonun tümör olduğu saptanarak belirlenmektedir. Bu durumda, oluşan lezyonun tamamının çıkarılması gerekmektedir. Eğer oluşan lezyon tümör ise, bunun tamamı çıkarıldığı için, daha sonraki gözlemleri yapma olağanı ortadan kalkmaktadır. Bu durum, deneyimiz için sakincalı olduğundan, tümörün geliştiği ilk gün saptanamamıştır. Bizim için tümörlerin büyümeye hızları da anlam taşıdığından, gelişen lezyonlar çıkarılmamıştır. Karsinojen verilmiş gruplarda, belirli bir süre sonra gelişen; gözle tümör olduğuna kesinlikle karar verilebilen oluşumların sayısı latent süre için işaret olarak kabul edilmiştir. Kaynakların araştırılarak rastladığımız Eisenberg ve Shklar'ın hamsterlerde yaptığı deneyde de deney sonunda gelişen lezyonların histolojik incelenmesi yapılarak tümör sayısı yönünden değerlendirilmeye gidilmiştir. Aynı çalışmanın sonunda levamisol verilmiş hayvanlarda kontrollere oranla latent sürenin uzadığı gözlenmiştir. Deneyimizde ise, karsinojen verildikten 99 gün sonra, yalnızca MC verilmiş grupla, MC ve 30 günde bir levamisol verilmiş grupta gelişen tümörlerin sayısı tespit edilmiştir. Bu oluşumların tümör olduğu, hayvanların deney süresi içinde ölmesi ya da deney sonunda öldürülmesi neticesi yapılan histolojik incelemeyle de doğrulanmıştır. MC grubunda gelişen 2 tümöre karşı MC + L grubunda gelişen 10 tümör, %6.6 ile %33.3'lük bir oran ortaya çıkmıştır ki, bu da istatistiksel yönden anamli bulunmuştur ( $\chi^2$  değeri = 2.588,  $P < 0.01$ ). Bu durum, levamisol'ün deneyimizde latent süreyi kısalttığını göstermektedir. Bu farkın rastlanrıya bağlı olmadığı istatistiksel olarak kanıtlanıyorsa da bunun doğrudan doğruya

levamisol'ün etkisi ile açıklanması sakincalı olabilir. Eğer levamisol'ün etkisine bağlanabilirse, karsinojenezin dönüşme, ya da üreme dönemlerinden hangisinde etkili olduğunu söyleme olağanı yoktur. Ancak, kimyasal karsinojenlerin etki mekanizmasının, bir taraftan hücreyi kanser hücresi haline dönüştürmesiyle diğer taraftan da organizmanın immun sistemini yıkarak bu hücrelerin üremesine elverişli bir ortam oluşturmasıyla tümör geliştirdiği<sup>21</sup> hipotezinden hareket edilerek levamisol'ün, tahminlerin aksine, kimyasal karsinojenlerin etkisine paralel bir etki gösterdiği düşünülebilir.



GRAFİK I  
MC ve MC + L Gruplarında Belirli Zamanlardaki Tümör Frekansı

Grafik I'de görüldüğü gibi MC ve MC + L verilmiş grupların 99. günde yapılan kontrolunda, MC grubunda tümör sayısı 2 iken, MC + L grubunda tümör sayısı bu grup için en yüksek düzey olan 10 olarak saptanmıştır. Üçüncü kontrola rastlayan 140. güne kadar, MC grubunda yeniden tümör gelişmesinin giderek arttığı tümörlerin 123. günde 7, 140. günde 9 tane olmasından anlaşılmaktadır. MC + L grubunda ise 99. günden sonra tümör sayısı 6'ya düşmüştür, MC grubunun en yüksek düzeyi olan 9 sayısı-

na ulaştığı 130 günde ise MC + L grubunun en düşük sayısı olan 4'e düşüğü, MC grubunun en az tümör sayısı olan 1 e indiği 153. günden MC + L grubunun 4 sayısını koruduğu ve böylece 140. günden sonra tümör sayısının sabit kaldığı saptanmaktadır.

Grafik I de görülen iki eğrinin birbirinden belirgin şekilde farklı oluşu levamisol'ün etki durumu hakkında bazı fikirlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır :

a) Levamisol'ün karsinojenezde immun sistem üzerine etkisi zamanla değişmektedir. MC + L grubunda latent sürenin kısalması ve bu süre içinde tümör sayısının en yüksek düzeye ulaşması levamisol'ün karsinojenezin dönüşme ve üreme aşamasında immun sistemin etkinliğini zayıflatlığı fikrini vermektedir. Bundan sonra levamisol grubunda tümör sayısının birden düşmesi üreme aşamasının uzadığını göstermektedir. Bu uzama, iki türlü mekanizma ile olabilir :

1 — 99. günden sonra levamisol'ün immun sisteme olan olumlu etkisinin birdenbire artması,

2 — Levamisol'ün zayıflatıcı etkisine karşı 99. günden sonra immun sistemin kompansasyon amacıyla hiperaktivite durumuna geçmesi. Levamisol grubunda 140. günden sonra yeni yeni tümörlerin oluşmakta devam etmesi ise ya levamisol'ün immun sistem üzerine olan baskı etkisinin tekrar artmasına ya da kompansasyon olayının zayıflamasına bağlanabilir.

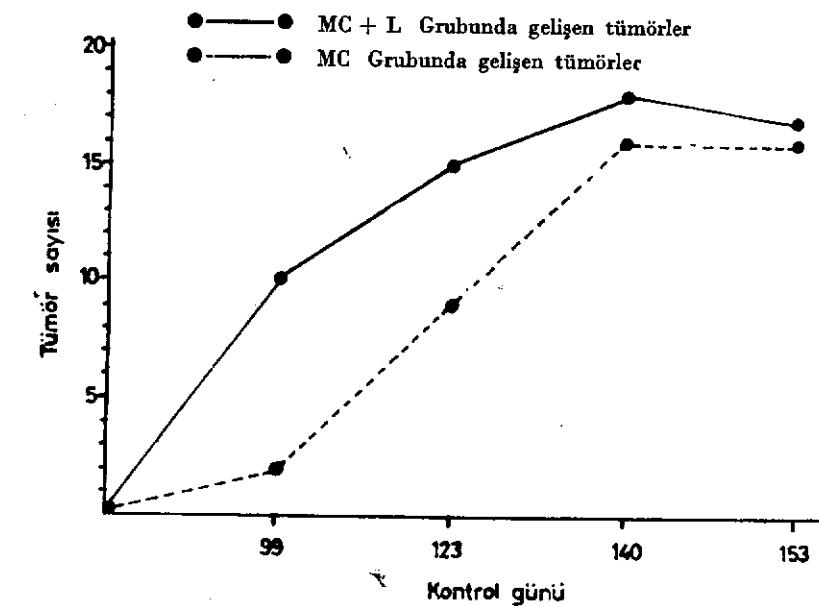
b) 140. günden sonra deneyin başında bir defa olmak üzere verilmiş olan MC'nin gittikçe atılımı nedeniyle vücutta konsantrasyonunu ve böylece de etkinliğini kaybetmesine karşın MC + L'li grupta yeni tümörlerin oluşmakta devam etmesi, diğer taraftan levamisol'ün bütün karakterlerinin yeterince işlenmemiş bir madde olması nedeniyle bu maddenin, immun mekanizmaya etkinliği yanında ko-karsinojen etkisinin de gözönüne alınması gerekmektedir. Böyle bir durum gerçekten mevcut ise bu iki etkinin zaman zaman birbirine paralel, zaman zaman ise zıt yönde işlediklerini kabul etmek zorunluğunu vardır. Nitekim, 99. güne kadar olan sürede bu iki etki aynı yönde yani karsinojenez'i kolaylaştırıcı yönde işlemektedir. 99 - 140. günler arasında iki etki zıt yönedir. Zira, yeni oluşan tümör miktarı hızla azalmaktadır. 140. günden sonra bu iki etki yine aynı yönde (karsinojenez'i kolaylaştırıcı yönde) işlemektedir. Deneylerin çeşitli nedenler etkisiyle 153. günden kesilmesi zorunluluğu doğduğundan, dönüşen hücrelerin miktarı hakkında kesin fikir edinmek olağanı kalmamıştır. Yalnız, her iki grupta tüm olarak gelişen tümör sayıları

(MC grubu : 19, MC + L grubu : 24) arasındaki fark istatistiksel yönden anlamsız bulunmuştur ( $\epsilon$  değeri = 1.459,  $p = 0.14$ ).

Tümörlerin büyülüklelerini, iki uzun eksenin çarpımı sonucu çıkan rakam ( $\text{cm}^2$ ) olarak saptamıştık. Zira, tümörün derinliği diye kabul ettiğimiz üçüncü boyut yaklaşık olarak her tümörde eşit bulunduğuundan kıyaslama yönünden büyük bir değer taşımayacaktı.

Gelişen tümörlerin büyülükleri, kontrol dönemlerinde ve deney sonrasında karşılaştırıldığında levamisol'lü grupta bir üstünlük varmış gibi görünümeye isede bu durum istatistiksel yönden destek bulamamıştır ( $t = 0.42$ ,  $0.50 < P < 0.90$ ).

Tümör büyümesinde hız birimi olarak, kontrollerde elde ettiğimiz büyülüklük farklarını oluşturan belli dönemleri aldık. Her iki karsinojenli grupta gelişen tümörlerin 24 günlük, 17 günlük, 13 günlük ve ilk kontolle son kontrol arasında uyan 54 gün içindeki büyümeleri gözden geçirildiğinde 3. - 4. kontrol arasına uyan 13 günlük dönemdeki büyümeye hızının MC + L grubunda daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, istatistiksel değerlendirmede de anlamlı bulunmuştur ( $t = 2.98$ ,  $P < 0.01$ ). Bundan önce yapılan kontroller arasında büyümeye hızı ve tüm büyümeleri ise anlamlı bulunmamıştır.



GRAFİK II  
MC ve MC + L Gruplarında Belirli Zamanlarda Yaşayan Tümörlü Fare Sayısı

Bu durum büyük olasılıkla, hayvanların immun sistemlerinin tüketliğini; o sırada, yaşayan hayvanlarda levamisol'ün immun sistemi kuvvetlendirici etkisinin ortadan kalktığını göstermektedir.

Deney süremiz boyunca MC'li gruptan 19 tümörlü hayvandan 3'ü MC + L'li grupta 24 tümörlü hayvandan 7'si tümör kaşeksisine bağlı olarak ölmüşlerdir. Zira, otopsilerinde, ölüm nedenlerini açıklayacak başka bulgular saptanmamıştır. Grafik II de görüldüğü gibi, her iki grupta, kontrol dönemde yaşayan tümörlü hayvan sayıları bir fark göstermemektedir. Bu bulguda, çalışmamızda kullandığımız 20 mg/kg levamisol'ün yaşam süresi üzerine belirgin bir etkisi olmadığını göstermiştir.

Saf kontrol grubu farelerinden elde edilen Pençe sisme testi değerleri yalnız 20 mg/kg levamisol verilmiş farelerinkilerle karşılaştırıldığında levamisol'lu farelerde geç asırı duyarlığın şiddetinin arttığı yani hücresel bağılıklığın güçlendiği saptanmıştır ( $t = 3.91$ ,  $P < 0.001$ ). Bu bulgumuzu kaynaklar da desteklemektedir<sup>27</sup>. Fakat, saf kontrol grubundaki farelerin Pençe sisme testi değerleri yalnız susam yağı verilmiş farelerinkilerle karşılaştırıldığında, kontrol farelerine oranla susam yağı verilmişlerin geç asırı duyarlığının da güçlendiği saptanmıştır ( $t = 3.02$ ,  $P < 0.01$ ). Bu bulgu susam yağının da geç asırı duyarlığı levamisol'ün etkisine benzer bir etki yaptığıını göstermektedir. Levamisol verilmiş farelerle susam yağı verilmiş farelerin Pençe sisme testii değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel sonuç anlamsız bulunmuştur ( $t = 1.33$ ,  $0.02 < P < 0.30$ ). Bu da levamisol'ün hücresel bağılıklık uyarmada bir özelliği olmadığı; herhangi bir uyarıcı gibi etki gösterdiğini izlenimini vermiştir.

Karsinojenli farelerin tümör gelişenlerinde levamisol verilmişlerle verilmemişler arasında, Pençe sisme testi değerlerinde istatistiksel yönden anlamlı bir sonuç alınamamıştır ( $t = 0.38$ ,  $0.50 < P < 0.90$ ). Her iki grubun tümör gelişmeyen fareleri arasındaki Pençe sisme testi değerleri de anlamsız bulunmuştur ( $t = 2.54$ ,  $0.02 < P < 0.05$ ). MC verilmiş grupta tümör gelişenlerle, tümör gelişmeyenlerin değerleri de istatistiksel yönden anlamsızdır. ( $t = 0.40$ ,  $0.50 < P < 0.90$ ). MC + L verilmiş farelerde, tümör gelişen ve gelişmeyenler arasındaki Pençe sisme testi değerleri de anlamsızdır ( $t = 1.40$ ,  $0.20 < P < 0.30$ ).

Ayrıca karsinojen verilmiş (MC ve MC + L) gruplarla, karsinojen verilmemiş (L ve SY) gruplarındaki Pençe sisme testi değerleri karşılaştırıldığında sonuç, karsinojen verilmemiş gruplar lehine anlamlı çıkmıştır ( $t = 2.80$ ,  $P < 0.01$ ). Bu durum, kaynaklarda da gördüğümüz kimyasal karsinojen verilmiş farelerin immun sistemlerinin yıkıldığı<sup>21</sup> Pençe sisme testi ile de saptadığımızın kanıt olmuştur. Fakat gerek MC, gerekse, MC + L verilmiş grup-

larda gelişmiş tümörlerin büyülüklükleri ile Pençe sisme testi değerlerine bakarak farelerin hücresel bağılıklık durumları arasında bir ilişki kurma olasılığı olmadığı gibi daha önce belirttiğimiz üzere karsinojen verilmiş ya da karsinojen ve levamisol verilmiş de tümör gelişmemiş farelerin Pençe sisme testi değerlerinde de istatistiksel bir anlamlılık yoktur. Bu nedenlerle kimsayal, karsinojen verilmiş farelerde, geç asırı duyarlığın durumu hakkında bilgi edinebilmek için «Pençe sisme testi»'nın geçerli bir yöntem olmadığı kanısına varılmıştır.

Deney sonunda aşağıdaki sonuçlara varılmıştır :

- 1 — MC verilmiş grup ile MC + L verilmiş grup arasında karsinojenezin her aşamasında bir fark görülmüştür.
- 2 — Bu fark, latent sürenin kısalması ve üç ay içinde yeni gelişen tümör sayısının artmasında (karsinojenezin dönüşme ve üreme aşamalarının kısalmasına) kendini göstermektedir.
- 3 — Deneyimiz, levamisol'ün karsinojeneze etkisinin mekanizması hakkında iki izah şekli vermektedir :
  - a) Levamisol immun sistemin karsinojenez olayındaki etkisini zaman zaman kuvvetlendirmekte, zaman zaman azaltmaktadır. Ancak, burada konak organizmanın levamisol'ün immun sisteme olan baskı etkisine karşı gösterdiği kompansasyonu da göz önüne almak gereklidir.
  - b) Levamisol'ün immun sisteme etkisi yanında ko-karsinojen etkisinin mevcut olması muhtemeldir. Bu iki etki bazen paralel, bazen zıt yönlerde işler.
- 4 — MC nin konak organizmada pek çok azaldığı zamanlara uyan 140. günden sonra da MC + L grubunda yeni tümör gelişmesinin devam etmekte olmasına bir defa daha degeiniyoruz. Bu olay nedeniyle deneyi daha uzun bir süreyle tekrarlamak ve tamamlayıcı diğer deneylerin de yapılmasıyla karsinojen varlığını incelemenin gerekli olduğu kanısındayız.
- 5 — MC ve MC + L gruplarında tümör gelişen ve gelişmeyenler arasındaki «Pençe sisme testi» değerlerinin anlamlı olmaması nedeniyle tümörlü ve tümör-süz, karsinojen verilmiş hayvanların immun sistemin durumunu ve tümör büyülüklükleri ile konağın immun sistemi arasındaki ilişkiye ortaya çıkaracak yeterli bir yöntem olmadığı sonucuna varılmıştır.

## SUMMARY

## THE EFFECT OF LEVAMISOLE 20 mg/kg ONTO CHEMICAL CARCINOGENESIS IN SWISS ALBINO MICE.

With lately studies, as it is observed; levamisole known as an antihelminthic drug with the dose of 20 - 25 mg/kg in mice, strengthen the late hypersensitivity, accelerates the graft-rejection. Levamisol called our attention to its effects of prolonging life span onto some species of animals, transplanted certain tumors. As the effect of this drug onto chemical carcinogenesis is not well enough investigated, this study is realized in order to observe the effect of levamisole onto chemical carcinogenesis with the dose of 20 mg/kg in Swiss albino mice.

## Experiment groups :

*Group I* : 4 mg methylcholanthrene dissolved in 0.2 ml sesame oil was given subcutaneously into the nape of 30 mice.

*Group II* : 4 mg methylcholanthrene dissolved in 0.2 ml sesame oil and 20 mg/kg intraperitoneally levamisole firstly given at the same day with carcinogen were given in periods of 30 days to mice.

*Group III* : 0.2 sesame oil was given subcutaneously into the nape of 15 mice.

*Group IV* : 20 mg/kg levamisole was intraperitoneally given to 15 mice in periods of 30 days.

*Group V* : 15 mice as the control group.

The Groups controled in certain periods. The number longness and the speed of growth of the tumor is observed. Foot-padswelling test applied to all mice of the groups as a measure of late-hypersensitivity.

The findings are appraised statistically. The dose of 20 mg/kg levamisole gives rise to the latent period of carcinogenesis and acceleration of the tumoral growth.

We have got the opinion that the footpad swelling test is not a valid method for measuring the late hypersensitivity in mice which taken the carcinogen. We considered that levamisole may also play role as co-carcinogen.

## KAYNAKLAR

- ASHLEY, D.J.B.: *An introduction to the general pathology of tumors*. John Wright and Sons Ltd. Bristol, 1972.
- BIELSCHOWSKY, F.: *Aspects of endocrine carcinogenesis*. Brit. Med. Bull., 14 : 106, 1958.
- BISKIND, G.R., BISKIND, M.S.: *Experimental ovarian tumors in rats*. Am. J. Clin. Path., 19 : 501, 1949.
- BURNET, F.M.: *Cancer - A biological approach*. Br. Med. J., 1 : 779, 1957.

- BURNET, F.M.: *Immunological factors in the process of carcinogenesis*. Brit. Med. Bull., 20 : 154, 1964.
- CHIRIGOS, M.A., FUHRMAN, F.S. and PRYOR, J.: *Prolongation of chemotherapeutically induced remission of a syngeneic murine leukemia by L-2, 3, 5, 6-tetra hydro-6-phenylimidazo (2, 1-b) thiazole hydrochloride*. Cancer Res., 35: 927, 1975.
- CHIRIGOS, M.A., PEARSON, J.W. and PRYOR, J.: *Augmentation of chemotherapeutically induced remission of a murine leukemia by a chemical immuno-adjuvant*. Cancer Res., 33 : 2615, 1973.
- EISENBERG, E. and SHKLAR, G.: *Levamisole and hamster pouch carcinogenesis*. Oral Surg., 43(4) : 562, 1977.
- FISCHER, G.W., OI, V.T., KELLEY, J.L., PODGORÉ, J.K., BASS, J.W., WAGNER, F.S. and GORDON, B.L.: *Enhancement of host defense mechanisms against gram-positive pyogenic coccal infections with levo-tetramisole (levamisole) in neonatal rats*. Ann. Allergy, 33 : 193, 1974.
- FOLEY, E. J.: *Antigenic properties of methylcholanthrene induces tumors in mice of the strain of origin*. Cancer Res., 13 : 835, 1953.
- FORBES, J.T., NAKAO, Y. and SMITH, R.T.: *Tumor specific immunity to chemically induced tumors*. J. Exp. Med., 141 : 1181, 1975.
- FREI, J.Y., HARSONO, T.: *Increased susceptibility to low doses of a carcinogen of epidermal cells in stimulated DNA synthesis*. Cancer Res., 27 : 1482, 1967.
- GATTI, R.A. and GOOD, R.A.: *A ging. Immunity and malignancy*. Geriatrics, 25 : 158, 1970.
- GATTI, R.A. and GOOD, R.A.: *Occurrence of malignancy in immunodeficiency disease. A literature review*. Cancer, 28 : 89, 1971.
- GORE, H., HERTIG, A.T.: *Carcinoma in situ of the endometrium*. Am. J. Obst. Gyn. 94 : 134, 1966.
- GREENE, H.S.: *A conception of tumor autonomy based on transplantation studies: A review*. Cancer Res., 11 : 899, 1951.
- GROSS, L.: *Intradermal immunization of C<sub>3</sub>H mice against a sarcoma that originated is an animal of the same line*. Cancer Res., 3 : 326, 1953.
- HALLIDAY, N.V. and WEBB, M.: *Delayed hypersensitivity to chemically induced tumors in mice and correlation with an in vivo test*. J. Nat. Cancer Invest., 43 : 141, 1969.
- HUMPREY, L.J.: *Tumor Immunity*. J. Surg. Res., 10 : 493, 1970.
- IBRAHIM, A.B., TRIGLIA, R., DAN, P.C. and SPITLER, L.E.: *Antitumor effects of levamisole on an allogeneic hamster melanoma and a syngeneic rat hepatoma. Control of neoplasia by modulation of the immune system*. Progress in Cancer Research and Therapy. Volume 2. Ed. by M.A. Chirigos. Raven Press, New York 1977.
- JERNE, N.K. and NORDIN, A.A.: *Plaque formation in agar by single antibody-producing cells*. Science, 140 : 405, 1963.

22. KLEIN, G., SJÖGREN, H.O., KLEIN, E. and HELLSTRÖM, K.E.: Demonstration of resistance against Methylcholanthrene induced sarcoma in the primary autochthonous host. *Cancer Res.*, **20** : 1561, 1960.
23. MILLER, J.A. MILLER, E.C.: Natural and Synthetic chemical carcinogens in the etiology of cancer. *Cancer Res.*, **25** : 1292, 1965.
24. OLD, J.L., BOYSE, E.A., CLARKE, D.A. and CARCSWELL, E.A.: Antigenic properties of chemically induced tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **101** : 80, 1962.
25. PERK, K., CHIRIGOS, M.A., FUHRMAN, F. and PERRIGREW, H.: Some aspects of host response to levamisole after chemotherapy in a murine leukemia. *J. Nat. Cancer Inst.*, **54** : 253, 1974.
26. PREHN, R.T. and MAIN, J.M.: Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. *J. Nat. Cancer Inst.*, **18** : 769, 1957.
27. RENOUX, G., KASSEL, R.L., RENOUX, M., FIORE, N.C., GUILLAUMIN, J.M. and PALAT, A.: Immunomodulation by Levamisole in normal and leukemic mice. Evidences for a serum transfer. In : *First International Conference on Modulation of Host Immune Resistance in the Prevention of Induced Neoplasias*, ed. by M.A. Chirigos, Fogarty International Center Proceedings, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., Baskida (*Control of Neoplasia by Modulation of the Immune system. Progress in Cancer Research and Therapy, Volume 2*, Ed. by M.A. Chirigos, Ph. D., Raven Press, New York 1977'den).
28. RENOUX, G. and RENOUX, M.: Action du phenylimidothiazole (tétramisole) sur la réaction du Greffan contre l'hôte. Role des macrophages. *C.R. Acad. Sci. (D)*, **274** : 3320, 1972.
29. RENOUX, G. and RENOUX, M.: Action immunostimulante de dérivés du phenylimidothiazole sur les cellules spléniques formatrices d'anticorps. *C.R. Acad. Sci. (D)*, **274** : 756, 1972.
30. RENOUX, G. and RENOUX, M.: Effect immunostimulant d'un imidothiazole dans l'immunisation des souris contre l'infection par *Brucella abortus*. *C.R. Acad. Sci.*, **272** : 349, 1971.
31. RENOUX, G. and RENOUX, M.: Restaurante par le phenylimidothiazole de la réponse immunologique des souris âgées. *C.R. Acad. Sci. (D)*, **274** : 3034, 1972.
32. RANDONI, B., BRAETTI, G.: SH Groups and Chemical carcinogenesis. Abst. Exc. Med., **1** : 185, 1948.
33. SACCOMONO, G., ARCHER, V.E., AUERBACH, O., SAUNDERS, R.P., BRENNAN, L.M.: Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer*, **33** : 256, 1974.
34. SYMOENS, J. and BRUGMANS, J.: The effects of levamisole on host defense mechanisms. A review. In : *First International Conference on Modulation of Host Immune Resistance in the Prevention or Treatment of Induced Neoplasias*, Ed. by M.A. Chirigos, Fogarty International Center Proceedings, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., Baskida (*Control of Neoplasia by Modulation*

- of the Immune System. *Progress in Cancer Research and Therapy*. Volume 2. Ed. by M.A. Chirigos, Ph. D., Raven Press, New York 1977'den).
35. The Merck Index : 8. baskı, Merck and Co., Inc., Rahway, N.J., U.S.A. 1968.
  36. THIENPONT, D., VANPORIJS, O.F.J., RAEYMAEKERS, A.H.M., VANDENBERK, J., ALLEWIJN, F.T.N., MARSBOOM, R.P.H., NIEMEGEERS, C.J.E., SCHELLEKENS, K.H.L. and JANSEN, P.A.J.: Tetra misole (R 8299), A new patent, broad spectrum antihelminthic. *Nature*, **209** : 1084, 1966.
  37. WERNER, D., DAHM, K.: New aspects of carcinogenesis in the resected stomach. *Abst. Ext. Med.*, **34** : 27, 1975.
  38. WILKIE, D., EGILSSON, V. and IVANS, I.H.: Mitochondria in oncogenesis. *Lancet*, **1** : 697, 1975.