



Akciğer Kanseri Deneysel Modelleri

Experimental Animal Models for Lung Cancer

© Cengiz Üstüner¹, © Emre Entok²

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

Öz

Akciğer kanseri, en sık ölüme sebep olan kanser türüdür. Hem küçük hücreli dışı akciğer kanseri hem de küçük hücreli akciğer kanseri biyolojisinin incelenmesi ve yeni terapötik stratejilerin karakterize edilmesi için klinik olarak daha uygun sistemlere ihtiyaç vardır. Bu amaçla, hayvan modelleri hem insan akciğer tümörlerinde bulunan genetik değişiklikleri hem de histolojik özelliklerini taklit etmelidir. Halen, çeşitli akciğer modelleri, deneysel akciğer kanseri araştırmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar kimyasal olarak indüklenmiş akciğer tümörlerini, transgenik fare modellerini ve insan tümör ksenograftlarını içerir.

Bu makale, insan akciğer kanseri modellerinin tekrarlanabilir, ucuz ve gerçekleştirilebilir kolay hayvan ya da ortotopik ksenograft modellerini gözden geçirmek amacı için hazırlandı. Akciğer kanseri ksenograft modellerinin, transgenik hayvan modellerinin, singenik modellerin ve kimyasal akciğer tümör oluşumu modellerinin karakteristik özelliklerini ve bunların avantajlarını ve dezavantajlarını kısaca tanımlayacağız.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, kanser modelleri, tedavi ajanları

Abstract

Lung cancer is the most lethal type of cancer after initial diagnosis. Clinically more suitable systems are needed for examination of both non-small cell lung cancer and small cell lung cancer biology and for characterizing new therapeutic strategies. For this purpose, animal models should mimic both genetic changes and histological features found in human lung tumors. Currently, various lung models are widely used for experimental lung cancer research. These include chemically induced lung tumors, transgenic mouse models, and human tumor xenografts.

This study was prepared to review the reproducible, inexpensive, and feasible easy animal or orthotopic xenograft models of human lung cancer models. We will briefly describe the characteristic features of lung cancer xenograft models, transgenic animal models, syngeneic models, and chemically induced lung tumor formation model as well as their advantages and disadvantages.

Keywords: Lung cancer, cancer models, therapy agents

Giriş

Akciğer kanseri, hem erkekler hem de kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında birinci sıradadır (1). Akciğer kanserine bağlı ölümlerin çoğunluğu tütün kullanıma bağlı iken (%85), geri kalan oranda ise radon, asbest, silika, polisiklik hidrokarbon, ağır metaller ve hava kirliliği gibi çevresel veya mesleki ajanlara maruz kalma neden olarak görülmektedir (2). Günümüzde tıbbi tedavi (kemoterapi) yöntemleriyle akciğer kanseri hastasının ortalama 5 yıllık sağkalım süresi %16

oranındadır (3). Yeni, etkili tedavilerin geliştirilmesi ve uygulanabilmesi için kolay uygulanabilir deneysel fare modellerinin olması gerekmektedir. Bu modellerde ideal olarak, insandaki akciğer tümörögenез, proliferasyon, anjiyogenez ve metastaz iyi taklit edilmiş olmalıdır. Bu durum tedavinin yanı sıra, akciğer kanserinin etiyojisini araştırmada ve tanıda da faydalı olacaktır.

Akciğer kanseri küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere 2 ana grupta sınıflandırılır (4). KHDAK bütün akciğer

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. Emre Entok, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

E-posta: eentok@yahoo.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-6164-636

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

kanser olgularının %80'nini oluşturur ve adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, adenoskuamöz karsinom, büyük hücreli karsinom ve sarkomatoid karsinom gibi morfolojilerine göre alt gruplara ayrılır (4). Murin akciğer tümörleri, insan tümörlerinde gözlenenlere benzer morfoloji, histopatoloji ve moleküler anomalileri taşır. Murin modellerinde gözlenen tümörlerin çoğu, belirgin sınırları olan ve iyi farklılaşmış hücrelerden oluşan iyi huylu pulmoner adenomlardır. Adenomlar insanlarda nadiren görülmekle birlikte, büyük olasılıkla asemptomatik oldukları ve sıklıkla teşhis edilmedikleri için, murin adenomları, hava yolu tip II hücrelerinden türetilen küçük hücreli olmayan akciğer adenokarsinomuna histolojik benzerlik göstermektedir. Murin adenomları öncül olarak kabul edilir (5).

Akciğer kanseri biyolojisinin tüm spektrumunu güvenilir bir şekilde yeniden yakalayan tek bir model sistemi mevcut değildir. Böyle karmaşık bir hastalığı doğru bir şekilde araştırmak için hastalığın çeşitli yönlerini doğru şekilde yansıtan farklı modeller gereklidir. Bu fare veya sıçan modellerinde tümörün oluşup oluşmadığını belirlemek için moleküler görüntüleme yöntemlerine [pozitron emisyon tomografi (PET)/bilgisayarlı tomografi (BT)] ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada çeşitli akciğer kanseri modelleri, bu modellerin karakteristik özellikleri ve avantaj ve dezavantajlarından bahsedeceğiz.

Deneysel Hayvan Modelleri

1) Ksenograft Modeli

Bu modelde tümör hücreleri orijin organın bir bölgesine nakledilir. Bu organa spesifik alan tümör hücrelerinin büyüme ve gelişmesi için optimal bir çevredir. Pahalı ve alışılmamış olan bu model akciğer kanseri gibi durumlarda, organ bölgesine spesifik sitotoksik ajanların etkilerini *in vivo* değerlendirmede kullanılmaktadır. Şu anda nude farelerle yapılan renal hücre karsinomu, pankreatik karsinom, beyin tümörleri, prostat, kolon ve akciğer kanserleri potansiyel ortotopik model kullanım alanlarıdır (6). Akciğer kanserinde, süspanse haldeki tümör hücreleri anestezi altındaki hayvanın sağ akciğerinin sağ bronş sapına doğrudan inoküle edilir (7). Tümör oluşumu hayvan sakrifiye edilerek değerlendirilebilir. Tümör büyümesine histolojik inceleme yapılır veya yayılmamış tümörün durumu moleküler görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilebilir.

Aktarılan hücrelerin tipine ve sayısına bağlı olarak hücrelerin çoğalması için 1-8 hafta büyüme periyodu

için gereklidir. Ksenograft modelleri daha çok tümör hücrelerinin tedaviye verdiği yanıtı incelemek için kullanılır. Optimum aktarılması gereken hücre sayısı 10^6 - 10^7 arasında olup, tümör gelişimi aktarılan hücrelerin tipine, boyutuna, yoğunluğuna ve büyüme faktörlerinin kullanılmasına bağlı olarak değişiklik gösterir (8). Bu modelde aktarılan tümörün kaynağı kanser hücre dizisi olabildiği gibi, ortotopik olarak insan akciğer kanserinden tümör dokusunun alınarak aktarılması da olabilir.

Adenokarsinoma oluşturmak için en yaygın kullanılan hücre dizileri A549, H1975, HCC4006 ve HCC827'dir (9,10,11,12). Karsinomlar için NCI-H1299 (13,14), büyük hücreli karsinomlar için NCI-H460 (15,16,17) ve skuamöz hücreli karsinomlar için NCI-H226 (17) hücre hatları en yaygın kullanılan dizilerdir. NCI-H460, atimik nude farelere aktarıldığında, az miktarda hücrenin yeterli olması, daha kısa sürede çoğalması ve %0 reddedilmesi nedeniyle diğer hücre hatlarına göre avantaja sahiptir (10,18). NCI-H226 ve NCI-H1299 hücre hatlarının istenilen tümör boyutuna gelmesi için 4 hafta gerekmesi ve tümör hücrelerinin kabulünün %45-100 oranında olması nedeniyle kullanımı kısıtlıdır (12,13,18,19). KHAK modelleri oluşturmak için NCI-H69 ve DMS-53 hücre hatları kullanılıyor olmasına karşın, bu hücre hatlarının süspansiyonda büyümelerinden dolayı kesin hücre sayısını belirlemesi zor olduğundan, tümörün kabulü ve büyüme oranları oldukça değişiklik göstermektedir (20,21).

A) Ortotopik Ksenograft Modeli

Tümör ortotopik modeli, doğrudan perkütan yolla intratorasik implantasyondur. Plevral alan, karın duvarı çevresi veya akciğer parankimasının dışında implante edilen süspansiyonun %30'unun kaçma ihtimali bu modelin dezavantajıdır (22). İntratorasik implantasyona göre intrabronşiyal uygulamada, tümöre bağlı ölüm oranı daha yüksektir.

Bu model kişiye özgü tedavinin geliştirilebilmesi için oldukça etkilidir (23,24,25). Dong ve ark.'nın yaptığı çalışmada (25), 32 adet KHDAK örnekleri obez olmayan diyabetik bağışıklık sistemi bastırılmış farelerin renal kapsüllerine aktarılmış ve tümör gelişimi sisplatin, dosetaksel ve gemsitabin ile değerlendirilmiştir. Tümörün kabul edilme oranı %90 olup ve sonuçlar 6-8 haftada değerlendirilebilme aşamasına gelmiştir. Hastalarda metastaz ile farelerdeki sonuçlar birbiriyle uyumlu şekilde bulunmuştur. Yine başka bir çalışmada Onn ve ark. insan akciğer adenokarsinom (PC14PE6), bronşiyal alveoler karsinom (NCI-H358), skuamöz

hücreli karsinom (NCI-H226), az farklılaşmış küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NCI-H1299 ve A549)-H69) Matrigel'deki hücreler çıplak farelerin sol akciğerlerine perkütan olarak enjekte etmiş ve farklı akciğer kanseri tümörlerinin büyüme paternini incelemiştir (26). İnsan primer akciğer kanseri için gözlemlendiği gibi, tümörler tek bir hastalık odağından oluşmuş ve akciğer kanserinin hem akciğerlerde hem de metastazda intratorasik lenf nodlarına yayılması ile karakterize yaygın ve ölümcül bir torasik sürece ilerlemiştir. Bununla birlikte, aynı hücreler akciğere ortotopik olarak implante edildiğinde, sadece tümör dokusunun immünohistokimyasal analizi, interleukin 8, bazik fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotel büyüme faktörü/vasküler geçirgenlik faktörünün proanjyogenik faktörlerinin ekspresyonunda artış olduğunu ortaya koymuşlardır.

Tümörün gelişebilmesi için, mikroçevrenin önemi uzun zamandır bilinmektedir. Bu nedenle ilaç tedavisinin değerlendirilebilmesi için, mikroçevrenin murin modellerde taklit edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple ortotopik ksenograft modelleri, tümör hücresinin geliştiği organa aktarılmasından dolayı mikroçevre açısından en uygun modeldir. Bu nedenle bu model diğer modellere göre çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Öncelikle insan tümör dokusundan alınan hücreler kullanıldığı için, insan tümör hücrelerinin kompleksliğini *in vivo* da en iyi yansıtan modeldir. Bu nedenle kişisel moleküler tedavide kullanımı uygundur. Kanser tedavilerinde birden fazla ilaç kullanıldığı için, ilaçlara verilen tepki, toksisite, mikroçevrenin cevabı gibi konularda araştırma için de uygun modeldir. Bu modelin dezavantajı insan tümör hücresinin konak tarafından reddedilmemesi için bağışıklık sistemi baskılanmış murin kullanılmasıdır. Bu nedenle etkin bağışıklık sisteme sahip canlıların tümör dokusuna verdiği tepki göz ardı edilmiş olmaktadır. Diğer dezavantajları ise zaman ve endobronşiyal transferi yapabilecek nitelikte donanımlı personele gereksinim duyulmasıdır.

B) Dolaşan Tümör Hücrelerinin Aktarıldığı Ksenograft (CDX)

Ortotopik ksenograftlarda hastadan biyopsi alınması gerekmektedir ve biyopsi genellikle KHDAK hastalarından alınmakta olup, KHAK'de nadiren cerrahi gereksinimi olması nedeniyle biyopsi alınmadan daha çok görüntüleme yöntemleriyle konulmaktadır. Aynı zamanda girişimsel bir yöntem olduğu için, riskli bir yöntemdir. Kanserli hastaların kan dolaşımında dolaşan tümör hücrelerinin (CTC) ve dolaşan kanser DNA'sının

(ctDNA) hastanın kanından izole ederek immün sistemi bastırılmış fareye aktarıldığında bu hücrelerin tümörojenik olduğunu (CDX) Hodgkinson ve ark. göstermiştir (27). Bu çalışmada ksenograftın profil olarak hastanın tümör dokusuna benzediği ve kemoterapiye verilen cevabın hastanın verdiği cevaba da benzediği gösterilmiştir. Bu nedenle CDX modelinin tümör biyopsisi yerine kullanılabilmesi öngörülmektedir.

Bu yöntemin avantajı, girişimsel işlem olmadığı için hastaya zarar verme potansiyeli yoktur. Kandan basit bir işlemle alınabildiği için hastadan farklı zamanlarda alınarak tekrar edilebilir ve ayrıca tümörün gelişimsel aşaması da değerlendirilebilir. Biyopsinin nereden alındığına bağlı olarak tüm tümör dokusunun heterojenitesi sağlanmazken, CTC'ler heterojeniteyi daha iyi sağlamaktadır. Dezavantajı olarak, KHDAK tipinin bu yöntemle oluşturulmasının daha zor olması, bunun da nedeni, serbest dolaşan DNA'ların KHDAK'de KHAK'sine kıyasla çok daha az miktarda bulunmasıdır (28,29).

2) Singenik Model

Bu modelde, singenik murin modelleri, immünojenik açıdan uyumlu kanser hücrelerinin immünojenik uyumlu farelere enjeksiyon yoluyla gerçekleştirilir. Bu modelin oluşturulması oldukça zor ve kısıtlıdır. Bugüne kadar oluşturulmuş singenik tek model Lewis akciğer karsinomasıdır (LAK). LAK hücre dizisi oldukça tümörojeniktir ve özellikle metastaz çalışmalarında kullanılmaktadır (30). İlk defa 1951 yılında C57BL/6 soyu bir farenin akciğerinde spontane olarak bulunmuştur. İki ayrı enjeksiyon yoluyla farelere uygulanabilmektedir;

a) En çok tercih edilen metotta 1x10⁶/0,2 mL doz kuyruk veninden intravenöz yolla uygulanır. 5. güne doğru tümör oluşumu şekillenir. Fareler tedavi edilmezler ise ortalama sağkalım süreleri 20-25 gündür.

b) LAK'si yine 1x10⁶/0,2 mL dozda bu sefer sırt bölgesine uygulayarak solid form elde edilir. Bu modelde hayvanların sağkalım süreleri 19 ile 36 gün arasında gerçekleşir.

Bu modelin avantajı, enjekte edilen hücrelerin murin sistemle immün olarak uyumlu olması ve bu nedenle mikroçevreyi diğer modellere göre daha iyi yansımasıdır.

3) Transgenik ve Koşullu Transgenik Modeller

Genetiği değiştirilmiş modeller spontane neoplastik büyümeyi uyarmak için kullanılan modellerdir. Transgenik fareler DNA'nın zigotun pronükleusuna mikroenjeksiyonla aktarılması ile sağlanır. Bu yöntemle, tümör oluşumu sadece akciğerde, akciğerle birlikte diğer

dokularda veya akciğer dokusu dışındaki dokularda da sağlanır. Transgenik fareler, genetik anormalliklerin kanser oluşumu ve gelişimini araştırmak için önem arz etmektedir.

Akciğer için ilk kullanılan viral onkogen Simian virus T antijenidir (TAg). TAg akciğer kanserinde mutasyona uğradığı gösterilmiş Rb ve p53'e bağlanır ve inaktive eder (31). Akciğere özgü promotörlardan Clara hücre salgılaması proteini (CCSP) transgenik hale getirildiğinde murinlerde adenokarsinomanın geliştiği gösterilmiştir (32,33). Bu modelde fareler çok hızlı bir şekilde multifokal bronşiyololar neoplaziler geliştirdiler ve dört yaşından önce öldüler, bu nedenle bu yöntemde karsinogenezin erken aşamalarının araştırılması zordur. Pulmoner adenokarsinoma oluşturulması için alternatif bir model TAg transkripsiyonunun sıçan akciğerine özgü olan Calbindin D9K (CaBP9K) promotörünün 1011 baz çifti DNA parçasının uyarılmasıdır (34). Bu modelde tümör gelişimi daha yavaştır, hayvan yaklaşık 1 yıl yaşamakta ve bu da karsinogenezin erken aşamalarının incelenmesine olanak sağlamaktadır.

Başka bir transgenik akciğer kanseri oluşturma modeli, insan achaete-scute homologu-1 (hASH1) modelidir ve bunda insan transkripsiyon faktörünün akciğer spesifik Clara hücre 10kDA salgı proteininin (CC10) füzyonuyla sağlanır. Achaete-scute fetal gelişim sırasında nöral farklılaşmayı sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür. Nöroendokrin özelliği KHAK'nin ve bazı KHDAK'nin tipik özelliğidir ve bu modelin geliştirilmesindeki asıl amaç, nöroendokrin olmayan havayolu epitel hücrelerinde normalde sentezlenmeyen achaete-scute'un sürekli sentezlenmesinin etkisinin araştırılmasıdır ve hiperplazi gelişimi ve bronşiyoloalveolar metaplazi gözlemlenmiştir (35,36).

Çeşitli onkogenlerin, kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP), SP-C ve CC10 gibi akciğere özgü promotörlarla füzyonuyla da yine transgenik modeller oluşturulmuştur. CGRP-Ha-Ras transgenik fareler pulmoner nöroendokrin hücre farklılaşmasını uyararak GTPaz aktif bir halini aşırı ifade ederler (37). CGRP promotörü bu füzyon proteininin sadece nöroendokrin ve nöral hücrelerde ifade edilmesini sağlar. Yapılan bir çalışmada bu transgenik farenin Clara hücrelerinin ve pulmoner nöroendokrin hücrelerinin hiperplazisi ile birlikte nöroendokrin olmayan primer akciğer kanserleri geliştirdiğini göstermişlerdir (38).

Raf kinaz bir protoonkogen olup Raf aracılığıyla aktifleşmektedir ve Raf'ın Ras'la bağlantısını sağlayan amino grup ucunda bir mutasyon oluşması Raf'ın sürekli olarak aktif hale gelmesine ve bu da hücre kültüründe

hücrelerin farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir (39,40). İnsan akciğer kanseri hatlarında ve biyopsilerde Raf'ın aşırı ifade edildiği belirlenmiş ve bu da Raf'ın karsinogenezle alakalı olabileceğini göstermiştir (41). Bunu araştırmak amacıyla SP-C promotörünün kontrolünde c-Raf ifade eden transgenik fare modeli oluşturulmuştur. Bu transgenik farelerin yarısında gecikmiş tümör oluşumuyla adenokarsinomlar oluşmuş ve bu da tümör gelişimi için ikincil mutasyonlarında olması gerektiğini göstermiştir (42). Başka bir çalışmada yine hücre döngüsünde rol alan c-myc protoonkogeninin transgenik modelinde bronşiyoloalveolar adenokarsinomlar belirlenmiştir (43,44). Bir tirozin kinaz reseptörü olan RON'un SP-C promotörü ile füzyonunda adenoma ve adenomakarsinomlar belirlenmiştir (45).

Transgenik hayvan modelinin bir başka alternatifi de koşullu transgenik modellerdir. Bu modellerde ifade edilmesi istenilen gen dışarıdan ligand verildiğinde aktifleşen bir düzenleyici genin kontrolünde yer alır. Bu şekilde istenilen gen, istenilen zaman ve istenilen dokuda ifade edilir (46,47,48,49). Farelerde farklı primer koşullu bitransgenik uyarılan sistemler vardır. Bunlardan birincisi revers tetrasiklin transaktivatör (rtTA) uyarılabilir sistemdir. Bu sistemde rtTA ifadesi dokuya özgü bir promotör füzyonuyla sağlanır ve ifade edilmesi istenen hedef gen tetrasikline duyarlı promotör ile birleştirilir ve ortama tetrasiklin veya türevi verildiğinde istenilen genin ifade edilmesi sağlanmış olur (46,48,50). Bu yöntemle en çok çalışılan genler K-Ras, EGFR ve FGF7 olup, doksisisiklin ortamdan uzaklaştırıldığında, K-ras modellerinde, tümörün yok olduğu gösterilmiştir bu da K-Ras onkogenin hem tümörün ilk gelişim aşamasında hem de tümörün kalıcılığındaki önemini göstermektedir (49). Bu sistemin dezavantajı K-ras ve FGF-7 modellerinde insan adenokarsinomlardan farklı olarak metastaz kapasitesi daha düşüktür (49,50). EGFR modelinde ise gelişimin erken evrelerinde metastaz gözükmekte bu da canlının ölümüne neden olarak kanserin erken gelişim evrelerinin incelenmesine olanak sağlamamaktadır (46,48).

rtTA sistemine alternatif bir diğer koşullu transgenik hayvan modeli Cre/loxP sistemidir. Bu sistemle endojenik genlerin knock-out olması sağlanabildiği gibi, canlıya ekzojen genlerin de aktarılması mümkündür. Geleneksel knock-out sistemler üzerine avantajı, genin istenilen zaman ve istenilen dokuda knock-out olması sağlanarak, embriyo aşamasında ölmesinin önüne geçilmesidir. KHAK modelleme için en uygun yöntem *Trp53* geninin tek başına veya pRb ile birlikte Cre/loxP sistemiyle knock-out edilmesidir. Bu hücrelerdeki metastaz yeteneği insandakine oldukça benzerdir ve de KHAK

hücrelerinin karakteristik özelliği olan nöroendokrin özellikleri de gösterir. Bu modelin dezavantajı ise oldukça invazif olduğundan erken farklılaşma aşamalarının incelenememesidir (51). Bu sistemle oluşturulan bir diğer oldukça favori olan model ise Lkb1:LSLK-RasG12D' dir ve insan metastazına oldukça benzer adenokarsinomlar ve skuamöz hücre karsinomları gelişir (52).

4) Deneysel Kimyasal Akciğer Kanseri

Fare, akciğer kanseri incelemesi için temel hayvan modelidir. Farelerin insan akciğer kanseri için model olarak yaygın olarak benimsenmesi, genetik çeşitliliğin genişliği, genetik manipülasyon kolaylığı ve akciğer hastalığını moleküler ve histolojik benzerliklerle indükleyebilme yeteneğinin uzun süredir kullanımının bir sonucudur. Fare akciğer kanseri modelleri günümüzde sıklıkla klinik öncesi tedavi ve önleme testlerinde kullanılmaktadır. Aktive edilmiş onkogenlerin ekspresyonu (örneğin; Kras) veya inaktive tümör supresör genlerinin (örneğin; P53) gibi insan tümörlerinde bulunan spesifik genetik lezyonları kopyalayan mühendislik modelleri sıklıkla akciğer kanserinin oluşumunu araştırmak için kullanılır. Ek olarak, insan akciğer tümörlerinin genetik karmaşıklığını başarılı bir şekilde ele almak için kansere yatkınlığı olan fare soylarını kullanan kimyasal kanserojen kaynaklı modeller kullanılmıştır. İnsanlarda, karmaşık kimyasal karışımlar, özellikle sigara dumanı, akciğer kanserinin baskın başlatıcısıdır. Sigara içmek insan akciğer kanserinin birincil nedeni olduğundan, bireysel sigara dumanı kanserojenleri sıklıkla farelerde akciğer tümörlerini uyarmak için kullanılır. Bu genellikle polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) ve nitrosamin sınıfının kanserojenlerinin intraperitoneal veya diyet uygulamasıyla gerçekleştirilir (53,54,55,56). PAH'ler büyük ölçüde tütünün yanması sırasında üretilirken, nitrozaminler yanmamış tütünde zaten bulunur ve tütün sertleştirme işleminin bir sonucu olarak oluşur. Benzo (a) piren [B (a) P], bir PAH ve nitrozaminler, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon (NNK) ve N'-nitrosornikotin (NNN), farelerde akciğer adenomları ve adenokarsinomların güçlü indükleyicileridir. Bu kimyasallar, DNA ile reaksiyona giren ve katkı maddeleri oluşturan elektrofilik bileşiklerde metabolik aktivasyon gerektiren pro-kanserojenlerdir. Daha sonra tamir başarısızlığı veya yanlış onarım genetik mutasyonlarla sonuçlanır. Sitokrom P450 enzimleri, B (a) P ve NNK'nin biyolojik olarak aktiveleştirilmesinde merkezidir ve doku ifadesinde ve kimyasal spesifiklikte farklılıklar gösteren çeşitli CYP genleri tarafından kodlanır (57). P450'ler

ayrıca kendiliğinden aldehitlere ve diazonyum iyonlarına ayıran NNK'nin a-hidroksilasyonunu katalize eder, ardından 6-metil-guanin eklentileri oluşturur (58). P450 enzimleri en çok karaciğerde eksprese edilir, fakat aynı zamanda akciğerin periferik ve bronş epitelinde de bulunur.

A/J ve SWR gibi yerleşik fare soylarında, spontane akciğer tümörü gelişimi insidansı yüksektir. A/J soyma fareler 24 ay sonra kabaca %80-100 oranında spontane akciğer tümörü insidansına sahiptir ve tümörler sıklıkla ilk 6 ay içinde tespit edilir (53,59). Bu suşlar ayrıca kanserojen kaynaklı akciğer tümörlerine karşı çok hassastır. C57BL6/J, C3H/J ve DBA gibi diğer suşlar kanserojen kaynaklı akciğer tümörlerine karşı çok dirençli iken, O20 ve BALB/c gibi suşlar orta duyarlılığa sahiptir. A/J suşu fareler, kanserojen etil karbamat (üretan) ile tedaviden 14-16 hafta sonra akciğerde yaklaşık 25 tümör geliştirirken, C57BL/6J suşu akciğerde ortalama 1 tümörden daha az gelişir (53,55,60,61,62). Bu suşa bağlı farklılıklar, birçok araştırma grubunun hem kanserojen kaynaklı hem de spontane akciğer tümörü gelişimi ile ilişkili genetik duyarlılık lokuslarını haritalamasına izin vermiştir (63,64).

Bu modellerden, üretan ile indüklenen akciğer tümörü oluşum modelinin birçok avantajı vardır. Üretanın periton içi verilmesinin güvenilir bir şekilde tekrarlanabileceği gösterilmiştir ve daha sonra kanserogenez zamana bağlı bir şekilde gelişir. Kanserogenezi, insan akciğer kanserinin karakteristik özelliği olan sıralı genetik değişikliklere cevap olarak hiperplaziden adenoma ve sonra adenokarsinomlara ilerler (65). Bu genetik değişikliklerden K-Ras ve p53, üretan kaynaklı model ile ilişkili en belirgin mutasyonlardır (65,66). Benzo(a)piren ile indüklenen sistem aynı zamanda farelerde adenomu da modeller, ancak bağımsız deneylerde oldukça değişken büyüme düzenleri ile sonuçlandığı gösterilmiştir (67). N-nitroso-metil-biskloroetilüre ve N-nitroso-trischloroethylurea (NTCU) gibi N-Nitrosobis- (2-kloroetil) ürelerin, Cr:NIH(S) farelerine topikal uygulamada hiperplazi, displazi ve metaplazi büyümesini indüklediği gösterilmiştir (68). 3-Metilkolantren, dietilnitrosamin, etilnitrosoüre ve dimetilhidrazinin, A/J farelerinde tekrarlanabilir adenom büyümesini indüklediği gösterilmiştir (69). Her ne kadar bu modeller, kanserojen tatbikatı yoluyla karsinogenezi araştırmacının kontrol etmesinin avantajını sağlasa da, sonuçlarda tutarsızlıklara yol açan uygulama tekniğindeki değişkenlikler gibi, bu modellerle ilişkili birçok dezavantaj da vardır.

Sonuç

Günümüzde insan tümörlerinin araştırılması için en yaygın kullanılan yöntem ksenograftlar olarak yer almaktadır. Bu yöntemlerden sonuç olarak en güçlüsü genetik olarak modifiye edilmiş modeller olsa da bu modellerin oluşturulmasının zorluğu, pahalı olması ve çok zaman alması nedeniyle pek tercih edilmemektedir. Bu hayvan modellerinin araştırmacılara daha rahat ulaştırılması, akciğer kanserinin tanı ve tedavisi hakkında çalışmaların daha efektif olmasını sağlayacaktır. Bu çalışmada en yaygın kullanılan modellerden bahsedildi fakat bu modeller dışında kısa ilmek RNA (shRNA), RNA interferans gibi RNA çeşitleri kullanılarak ekspresyonun bloke edildiği modellerde yavaş yavaş literatürde yerini bulmaktadır. shRNA kullanılarak oluşturulan bir model p19ARF olup, bu modellerde akciğer adenokarsinoma gözlemlenmiş ve terapötik olarak kullanılmıştır (70).

Çok çeşitli hayvan modellerinin olması, hepsinin farklı özelliklerinin olması nedeniyle model yapılacak çalışmanın amacına bağlı olarak seçilebilir. Örneğin; tedaviye karşı yanıtın kısa sürede araştırılmasında ksenograft modelleri en uygundur. Ksenograftların en yaygın kullanılan yöntem olmasında sonuçların 4-8 haftada elde edilebiliyor olmasıdır. Fakat ksenograftların kullanılması klinik aşamada hüsrana neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda erlotinib ve BIBW2992'nin CCSP-rtTA; Tet-O7-EGFRL858R modelinde *in vivo* olarak dramatik şekile tümör gerilemesiyle sonuçlanırken, BIBW2992 için Faz I klinik deneyleri, hastalarda önemli bir kısmı ya da tam tepki vermemiştir (41,71,72,73,74).

Singenik modelde ise klinik ve modelde yapılan çalışmalar daha uyumlu bulunmuştur. Navelbin ve karboplatinin etkileri, LLC arka plan tümörlü C57BL farelerinde değerlendirildiğinde, *in vivo* olarak, IV navelbin uygulama yüzde 72,7 oranında tümör gerilemesi ile sonuçlanmıştır (75). Alternatif olarak, paklitaksel ile kombinasyon halinde IV karboplatin uygulaması, deney popülasyonunun %30-50'sinde uzun süreli hayatta kalma ile sonuçlanmıştır. Ortanca sağkalım 34 haftaya uzatıldığı için prelinik navelbin sonuçlarının klinik çalışmalara çevrilebilir olduğu gösterilmiştir (76). Ayrıca karboplatin paklitaksel kombinasyon tedavisinin klinik çalışmalarda etkili olduğu, medyan sağkalımın hastalarda 10,3 aya kadar uzatıldığı ve ayrıca LLC modelinin seçilmiş tedavilerin klinik yararını öngörmeye değerli bir araç olduğunu öne sürdüğü gösterilmiştir.

Hayvan modellerinin kullanılması ile ilgili çeşitli dikkat edilmesi gereken konular bulunmaktadır. İnsan ile murinler arasındaki biyolojik farklılıklar, hatta aynı türdeki canlılarda P450 sistemindeki farklılıklardan

dolayı hem tümör gelişiminde hem de tümöre karşı tedavide farklı sonuçların alınmasına neden olmaktadır. Bazen farede kanser tedavisi için etkili olan bir ilaç insanda herhangi bir sonuç vermemektedir. Bu da genelde iki canlıda hedef alınan proteinlerin birbirinin aynı olmayıp homoloğu olması neden iledir (77,78,79). Yapılan bir çalışmada insan P450 2A13 geninin fareye aktarıldığında, insan geninin sigara dumanında bulunan karsinojenik kimyasalları daha etkili bir şekilde aktive edildiği gösterilmiştir (80).

Özet olarak insan akciğer kanserinin etiyolojisini anlamak ve uygun tedavi yöntemlerini belirlemek amacıyla çeşitli murin deney modelleri bulunmaktadır. Fakat hiçbir model insan akciğer kanserinin *in vivo* olarak bütün karakteristik özelliklerini tamamıyla kapsayacak özelliklere sahip değildir. Her modelin avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Yöntem seçiminde hangi kanser tipinin araştırılacağı, hangi hücre tipine bakılacağı, genetik anormalliklerin olup olmadığı, o kanser dokusunun belli bir gelişimsel zamana ve dokuya özgü olup olmadığına, hedef bir genin uzaysal ve zamansal ifadesinin kontrolü yapılıp yapılmayacağına, tümörün mikroçevresine ve metastaz potansiyeli gibi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Fare modellerinin kullanımıyla elde edilen sonuçlar, akciğer kanseri için yeni fare modellerinin geliştirilmesindeki ilerlemeler, akciğer kanserinin etiyolojisi ve tedavileri hakkında çok fazla bilgi sağlamaktadır.

Finansal Destek: Bu makalenin hazırlanmasında finansal destek alınmamıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

1. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008;83:5874-594.
2. Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E. *Histological typing of lung and Pleural Tumours*. Berlin: Springer Verlag; 1999.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer statistics, 2013*. *CA Cancer J Clin* 2013;63:11-30.
4. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc Am Thorac Soc* 2011;8:381-385.
5. Vikis HG, Rymaszewski AL, Tichelaar JW. Mouse models of chemically-induced lung carcinogenesis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2013;5:939-946.

6. Howard RB, Chu H, Zeligman BE. Irradiated nude rat model for orthotopic human lung cancers. *Cancer Res* 1991;51:3274-3280.
7. Hastings RH, Burton DW, Quintana RA, Biederman E, Gujral A, Deftos LJ. Parathyroid hormone-related protein regulates the growth of orthotopic human lung tumors in athymic mice. *Cancer* 2001;92:1402-1410.
8. Kellar A, Egan C, Morris D. Preclinical murine models for lung cancer: clinical trial applications. *Biomed Res Int* 2015;2015:621324.
9. Memon AA, Jakobsen S, Dagnaes-Hansen F, Sorensen BS, Keiding S, Nexø E. Positron emission tomography (PET) imaging with [11C]-labeled erlotinib: a micro-PET study on mice with lung tumor xenografts. *Cancer Res* 2009;69:873-878.
10. Steiner P, Joynes C, Bassi R, et al. Tumor growth inhibition with cetuximab and chemotherapy in non-small cell lung cancer xenografts expressing wild-type and mutated epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2007;13:1540-1551.
11. Sakuma Y, Matsukuma S, Nakamura Y, et al. Enhanced autophagy is required for survival in EGFR-independent EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. *Lab Invest* 2013;93:1137-1146.
12. Akhtar S, Meeran SM, Katiyar N, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit the growth of human nonsmall cell lung cancer xenografts by targeting insulin-like growth factor binding protein-3, tumor cell proliferation, and angiogenic factors. *Clin Cancer Res* 2009;15:821-831.
13. Chen MF, Chen WC, Wu CT, et al. p53 status is a major determinant of effects of decreasing peroxiredoxin I expression on tumor growth and response of lung cancer cells to treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66:1461-1472.
14. Wang H, Li M, Rinehart JJ, Zhang R. Pretreatment with dexamethasone increases antitumor activity of carboplatin and gemcitabine in mice bearing human cancer xenografts: in vivo activity, pharmacokinetics, and clinical implications for cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2004;10:1633-1644.
15. McLemore TL, Liu MC, Blacker PC, et al. Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. *Cancer Res* 1987;47:5132-5140.
16. Carter CA, Chen C, Brink C, et al. Sorafenib is efficacious and tolerated in combination with cytotoxic or cytostatic agents in preclinical models of human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59:183-195.
17. Feng Z, Zhao G, Yu L, Gough D, Howell SB. Preclinical efficacy studies of a novel nanoparticle-based formulation of paclitaxel that out-performs Abraxane. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:923-930.
18. Yamori T, Sato S, Chikazawa H, Kadota T. Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:1205-1210.
19. Qin M, Chen S, Yu T, Escudero B, Sharma S, Batra RK. Coxsackievirus adenovirus receptor expression predicts the efficiency of adenoviral gene transfer into non-small cell lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2003;9:4992-4999.
20. Pettengill OS, Sorenson GD, Wurster-Hill DH, et al. Isolation and growth characteristics of continuous cell lines from small-cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1980;45:906-918.
21. Taylor JE, Bogden AE, Moreau JP, Coy DH. In vitro and in vivo inhibition of human small cell lung carcinoma (NCI-H69) growth by a somatostatin analogue. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;153:81-86.
22. McLemore TL, Eggleston JC, Shoemaker RH, et al. Comparison of intrapulmonary, percutaneous intrathoracic, and subcutaneous models for the propagation of human pulmonary and nonpulmonary cancer cell lines in athymic nude mice. *Cancer Res* 1988;48:2880-2886.
23. Fichtner I, Rolff J, Soong R, et al. Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clin Cancer Res* 2008;14:6456-6468.
24. Merk J, Rolff J, Becker M, Leschber G, Fichtner I. Patient-derived xenografts of non-small-cell lung cancer: a pre-clinical model to evaluate adjuvant chemotherapy? *Eur J Cardiothorac Surg* 2009;36:454-459.
25. Dong X, Guan J, English JC, et al. Patient-derived first generation xenografts of non small cell lung cancers: promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2010;16:1442-1451.
26. Onn A, Isobe T, Itasaka S, et al. Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 2003;9:5532-5539.
27. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small cell lung cancer. *Nat Med* 2014;20:897-903.
28. Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1556-1563.
29. Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:525-532.
30. Sakai Y, Sasahira T, Ohmori H, Yoshida K, Kuniyasu H. Conjugated linoleic acid reduced metastasized LL2 tumors in mouse peritoneum. *Virchows Arch* 2006;449:341-347.
31. Virmani AK, Gazdar AF. Tumor suppressor genes in lung cancer. *Methods Mol Biol* 2003;222:97-115.
32. DeMayo FJ, Finegold MJ, Hansen TN, Stanley LA, Smith B, Bullock DW. Expression of SV40 T antigen under control of rabbit uteroglobin promoter in transgenic mice. *Am J Physiol* 1991;261:70-76.
33. Wikenheiser KA, Clark JC, Linnoila RI, Stahlman MT, Whitsett JA. Simian virus 40 large T antigen directed by transcriptional elements of the human surfactant protein

- C gene produces pulmonary adenocarcinomas in transgenic mice. *Cancer Res* 1992;52:5342-5352.
34. Raben D, Bianco C, Damiano V, et al. Antitumor activity of ZD6126, a novel vascular-targeting agent, is enhanced when combined with ZD1839, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, and potentiates the effects of radiation in a human non-small cell lung cancer xenograft model. *Mol Cancer Ther* 2004;3:977-983.
 35. Linnoila RI, Sahu A, Miki M, Ball DW, DeMayo FJ. Morphometric analysis of CC10-hASH1 transgenic mouse lung: a model for bronchiolization of alveoli and neuroendocrine carcinoma. *Exp Lung Res* 2000;26:595-615.
 36. Linnoila RI, Zhao B, DeMayo JL, et al. Constitutive achaete-scute homologue-1 promotes airway dysplasia and lung neuroendocrine tumors in transgenic mice. *Cancer Res* 2000;60:4005-4009.
 37. Mabry M, Nakagawa T, Baylin S, Pettengill O, Sorenson G, Nelkin B. Insertion of the v-Ha-ras oncogene induces differentiation of calcitonin-producing human small cell lung cancer. *J Clin Invest* 1989;84:194-199.
 38. Sunday ME, Haley KJ, Sikorski K, et al. Calcitonin driven v-Ha-ras induces multilineage pulmonary epithelial hyperplasias and neoplasms. *Oncogene* 1999;18:4336-4347.
 39. Stanton VP Jr, Nichols DW, Laudano AP, Cooper GM. Definition of the human raf amino-terminal regulatory region by deletion mutagenesis. *Mol Cell Biol* 1989;9:639-647.
 40. Heidecker G, Huleihel M, Cleveland JL, et al. Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol Cell Biol* 1990;10:2503-2512.
 41. Rapp UR, Huleihel M, Pawson T, et al. Role of raf oncogenes in lung carcinogenesis. *Lung Cancer* 1988;4:162-167.
 42. Kerkhoff E, Fedorov LM, Siefken R, Walter AO, Papadopoulos T, Rapp UR. Lung-targeted expression of the c-Raf-1 kinase in transgenic mice exposes a novel oncogenic character of the wild-type protein. *Cell Growth Differ* 2000;11:185-190.
 43. Broers JL, Viallet J, Jensen SM, et al. Expression of c-myc in progenitor cells of the bronchopulmonary epithelium and in a large number of non-small cell lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9:33-43.
 44. Lorenz J, Friedberg T, Paulus R, Oesch F, Ferlinz R. Oncogene overexpression in non-small-cell lung cancer tissue: prevalence and clinicopathological significance. *Clin Invest* 1994;72:156-163.
 45. Chen YQ, Zhou YQ, Fu LH, Wang D, Wang MH. Multiple pulmonary adenomas in the lung of transgenic mice overexpressing the RON receptor tyrosine kinase. *Recepteur d'origine nantais. Carcinogenesis* 2002;23:1811-1819.
 46. Perl AK, Tichelaar JW, Whitsett JA. Conditional gene expression in the respiratory epithelium of the Mouse. *Transgenic Res* 2002;11:21-29.
 47. Politi K, Fan PD, Shen R, Zakowski M, Varmus H. Erlotinib resistance in mouse models of epidermal growth factor receptor-induced lung adenocarcinoma. *Dis Model Mech* 2010;3:111-119.
 48. Politi K, Zakowski MF, Fan PD, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* 2006;20:1496-1510.
 49. Fisher GH, Wellen SL, Klimstra D, et al. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev* 2001;15:3249-3262.
 50. Tichelaar JW, Lu W, Whitsett JA. Conditional expression of fibroblast growth factor-7 in the developing and mature lung. *J Biol Chem* 2000;275:11858-11864.
 51. Politi K, Fan PD, Shen R, Zakowski M, Varmus H. Erlotinib resistance in mouse models of epidermal growth factor receptor-induced lung adenocarcinoma. *Dis Model Mech* 2010;3:111-119.
 52. Ji H, Ramsey MR, Hayes DN, et al. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* 2007;448:807-810.
 53. Shimkin MB, Stoner GD. Lung tumors in mice: application to carcinogenesis bioassay. *Adv Cancer Res* 1975;21:1-58.
 54. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:733-744.
 55. Malkinson AM. The genetic basis of susceptibility to lung tumors in mice. *Toxicology* 1989;54: 241-271.
 56. Malkinson AM. Primary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma. *Cancer Res* 1992;52(Suppl 9):2670-2676.
 57. Anttila S, Raunio H, Hakkola J. Cytochrome P450-mediated pulmonary metabolism of carcinogens: regulation and cross-talk in lung carcinogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;44:583-590.
 58. Hecht SS. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res* 1999;424:127-142.
 59. Manenti G, Dragani TA. Pas1 haplotype-dependent genetic predisposition to lung tumorigenesis in rodents: a meta-analysis. *Carcinogenesis* 2005;26:875-882.
 60. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 2002;21:7435-7451.
 61. Malkinson AM, Beer DS. Major effect on susceptibility to urethan-induced pulmonary adenoma by a single gene in BALB/cBy mice. *J Natl Cancer Inst* 1983;70:931-936.
 62. Wakamatsu N, Devereux TR, Hong HH, Sills RC. Overview of the molecular carcinogenesis of mouse lung tumor models of human lung cancer. *Toxicol Pathol* 2007;35:75-80.
 63. Demant P. Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. *Nat Rev Genet* 2003;4:721-734.
 64. Liu P, Wang Y, Vikis H, et al. Candidate lung tumor susceptibility genes identified through whole-genome association analyses in inbred mice. *Nature Genet* 2006;38:888-895.

65. Ohno J, Horio Y, Sekido Y, et al. Telomerase activation and p53 mutations in urethane-induced A/J mouse lung tumor development. *Carcinogenesis* 2001;22:751-756.
66. Horio Y, Chen A, Rice P, Roth JA, Malkinson AM, Schrumph DS. Ki-ras and p53 mutations are early and late events, respectively, in urethane-induced pulmonary carcinogenesis in A/J mice. *Mol Carcinog* 1996;17:217-223.
67. Gunning WT, Kramer PM, Lubet RA, et al. Chemoprevention of benzo(a)pyrene induced lung tumors in mice by the farnesyltransferase inhibitor R115777. *Clin Cancer Res* 2003;9:1927-1930.
68. Rehm S, Lijinsky W, Singh G, Katyal SL. Mouse bronchiolar cell carcinogenesis. Histologic characterization and expression of Clara cell antigen in lesions induced by N-nitrosobis-(2-chloroethyl) ureas. *Am J Pathol* 1991;139:413-422.
69. Stoner GD, Greisiger EA, Schut HA, et al. A comparison of the lung adenoma response in strain A/J mice after intraperitoneal and oral administration of carcinogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;72:313-323.
70. Premssirut PK, Dow LE, Kim SY, et al. A rapid and scalable system for studying gene function in mice using conditional RNA interference. *Cell* 2011;145:145-158.
71. Memon AA, Jakobsen S, Dagnaes-Hansen F, Sorensen BS, Keiding S, Nexø E. Positron emission tomography (PET) imaging with [¹¹C]-labeled erlotinib: a micro-PET study on mice with lung tumor xenografts. *Cancer Res* 2009;69:873-879.
72. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 2008;27:4702-4711.
73. Perez-Soler R. The role of erlotinib (Tarceva, OSI 774) in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:4238-4240.
74. Eskens FA, Mom CH, Planting AS, et al. A phase I dose escalation study of BIBW 2992, an irreversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) and 2 (HER2) tyrosine kinase in a 2-week on, 2-week off schedule in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2008;98:80-85.
75. Marty M, Fumoleau P, Adenis A, et al. Oral vinorelbine pharmacokinetics and absolute bioavailability study in patients with solid tumors. *Ann Oncol* 2001;12:1643-1649.
76. Papageorgiou A, Stravrovavdi P, Sahnazidou D, Natsis K, Chrysogelou E, Toliou T. Effect of Navelbine on inhibition of tumor growth, cellular differentiation and estrogen receptor status on Lewis lung carcinoma. *Chemotherapy* 2000;46:188-194.
77. Kohl NE, Omer CA, Conner MW, et al. Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nat Med* 1995;1:792-797.
78. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-4689.
79. Lerner EC, Qian Y, Hamilton AD, Sebt SM. Disruption of oncogenic K-Ras4B processing and signaling by a potent geranylgeranyltransferase I inhibitor. *J Biol Chem* 1995;270:26770-26773.
80. Megaraj V, Zhou X, Xie F, Liu Z, Yang W, Ding X. Role of CYP2A13 in the bioactivation and lung tumorigenicity of the tobacco-specific lung procarcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone: in vivo studies using a CYP2A13-humanized mouse model. *Carcinogenesis* 2014;35:131-137.