

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**MEME TÜMÖRLÜ KÖPEKLERDE METASTAZİK
POTANSİYELİN, PREOPERATİF DÖNEMDE ALINAN
PERİFERAL KANDAN PROGNOSTİK TÜMÖR
BELİRLEYİCİLERİN (MARKER) TAYİNİ İLE
BELİRLENMESİ**

ZEYNEP GÜNAY UÇMAK

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. KAZIM GÜVENÇ**

**DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü DOĞUM VE JİNEKOLOJİ Anabilim Dalı DOKTORA Programında ZEYNEP GÜNAY UÇMAK tarafından hazırlanan MEME TUMÖRLÜ KÖPEKLERDE METASTAZİK POTANSİYELİN, PREOPERATİF DÖNEMDE ALINAN PERİFERAL KANDAN PROGNOSTİK TUMÖR BELİRLEYİCİLERİN (MARKER) TAYİNİ İLE BELİRLENMESİ başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

23 / 05 / 2016

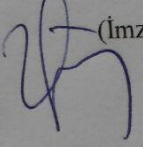
Tez Sınav JürisiÜnvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)İmzası

- 1.PROF. DR. ÇAĞATAY TEK (TEZ İZLEME KOMİTESİ ÜYESİ/ İ.Ü. VETERİNER FAK. DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ABD.)
- 2.DOÇ.DR. KAZIM GÜVENÇ (TEZ DANIŞMANI/ İ.Ü. VETERİNER FAK. DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ABD.)
- 3.PROF.DR. KUTLAY GÜRBULAK (ERCİYES ÜNİ. VETERİNER FAK. DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ABD.)
- 4.PROF. DR. CİHAN KAÇAR (KAFKAS ÜNİ VETERİNER FAK. DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ABD.)
- 5.PROF. DR. SEÇKİN ARUN (TEZ İZLEME KOMİTESİ ÜYESİ/ İ.Ü. VETERİNER FAK. PATOLOJİ ABD.)

BEYAN**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ZEYNEP GÜNEY UÇMAK

(İmza)


İTHAF

‘Meme tümörlü köpeklerde metastazik potansiyelin, preoperatif dönemde alınan periferel kandan prognostik tümör belirleyicilerin (marker) tayini ile belirlenmesi’ isimli doktora tezimi, yakın zamanda ailemize katılacak olan oğlum Yusuf Oğuz UÇMAK’a ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında benden desteklerini esirgemeyen başta ailem ve eşim olmak üzere, tez danışmanım Doç. Dr. Kazım GÜVENÇ'e, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. M. Ragıp KILIÇARSLAN'a ve kürsümüzdeki hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma, çalışmamın istatistik analizlerini yapan Prof. Dr. Bülent Ekiz'e, İ.Ü. DETAE'deki hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma ve Molgen ekibine teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31510

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
4. BULGULAR.....	27
5. TARTIŞMA	47
KAYNAKLAR	57
ETİK KURUL KARARI	66
ÖZGEÇMİŞ	67

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.3-1: Köpeklerde normal ve neoplastik meme dokusuna ait lenf drenajı; sayfa 3.

Tablo 2.10-1: 2010 yılında önerilen histolojik sınıflandırma ; sayfa 12.

Tablo 2.10-2: Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği TNM Sınıflandırması; sayfa 14.

Tablo 2.10-3: Dünya Sağlık Örgütü'nün Klinik Evre Sınıflandırılması; sayfa 15.

Tablo 2.10-4: Histolojik ve biyolojik bakıya göre tümör gruplarının derecelendirilmesi; sayfa 15.

Tablo 3.4-1: Köpeklerde epitelyal tip meme tümörlerinin histopatolojik sınıflandırması; sayfa 22.

Tablo 3.4-2: Histolojik ve biyolojik bakıya göre tümör tiplerinin derecelendirilmesi; sayfa 23.

Tablo 3.8-1: Laboratuvar analizlerinde kullanılan cihazlar, kullanım amaçları ve menşei; sayfa 26.

Tablo 4.2-1: Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı sınıflandırmaya (2010) göre malign epitelyal tümörlerin vakalara göre dağılımı; sayfa 28.

Tablo 4.4-1: Çalışma grubundaki köpeklere ait EPCAM, CLDN7, EGFR tümör belirleyicilerinin ΔC_t değerleri; sayfa 31-32.

Tablo 4.4-2: Kontrol grubundaki köpeklere ait EPCAM, CLDN7, EGFR tümör belirleyicilerinin ΔC_t değerleri; sayfa 33.

Tablo 4.4-3: Çalışma grubundaki köpeklere ait EPCAM, CLDN7 ve EGFR genlerinin ekspresyon sonuçları; sayfa 34-35.

Tablo 4.5-1: Tümör tiplerinin EPCAM, EGFR, CLDN7, WBC, PLT ve kitle sayısı parametreleri üzerine etkisi; sayfa 36-37.

Tablo 4.5-2: Kitle büyüklüğünün kitle sayısı, EPCAM, EGFR, CLDN7, PLT ve WBC parametreleri üzerine etkisi; sayfa 38.

Tablo 4.5-3: Yaşın kitle sayısı, EPCAM, EGFR, CLDN7, PLT ve WBC parametreleri üzerine etkisi; sayfa 39.

Tablo 4.5-4: Kısırlaştırmanın kitle sayısı, EPCAM, EGFR, CLDN7, PLT ve WBC parametreleri üzerine etkisi; sayfa 40.

Tablo 4.5-5: Ülserasyonun kitle sayısı, EPCAM, EGFR, CLDN7, PLT ve WBC parametreleri üzerine etkisi; sayfa 41.

Tablo 4.5-6: Metastaz varlığının kitle sayısı, EPCAM, EGFR, CLDN7, RNA miktarı, PLT ve WBC parametreleri üzerine etkisi; sayfa 41.

Tablo 4.5-7: Çalışma ve kontrol grubuna ait yaş, ağırlık, EPCAM, EGFR, CLDN7, RNA miktarı, PLT, WBC, kitle sayısı ve kitle büyüklüğü parametrelerinin ortalama değerleri ve bu iki grup arası önem derecesi; sayfa 42.

Tablo 4.5-8: Çalışma ve kontrol gruplarına ait EPCAM, CLDN7, EGFR, kitle sayısı ve ağırlık parametreleri arasındaki ilişki; sayfa 43.

Tablo 4.5-9: Çalışma grubunda tümör derecesinin (Grade 0 + Grade 1 ve Grade 2 + Grade 3) EPCAM, EGFR ve CLDN7 parametreleri üzerine etkisi; sayfa 43.

Tablo 4.5-10: Çalışma grubundaki köpeklere ait metastaz durumunun EPCAM, EGFR ve CLDN7 parametreleri üzerine etkisi; sayfa 44.

Tablo 4.5-11: Çalışma grubundaki köpeklere ait ülserasyon durumunun EPCAM, EGFR ve CLDN7 parametreleri üzerine etkisi; sayfa 44.

Tablo 4.5-12: Çalışma grubundaki köpeklere ait yaşın EPCAM, EGFR ve CLDN7 parametreleri üzerine etkisi; sayfa 44.

Tablo 4.5-13: Çalışma grubundaki köpeklere ait kısırlaştırma (OVH) durumunun EPCAM, EGFR ve CLDN7 parametreleri üzerine etkisi; sayfa 45.

Tablo 4.5-14: Çalışma grubundaki köpeklere ait tümör derecelerinin (Grade 0, Grade 1, Grade 2, Grade 3) EPCAM, EGFR ve CLDN7 parametreleri üzerine etkisi; sayfa 45.

Tablo 4.5-15: Çalışma grubundaki köpeklere ait tümör tiplerinin EPCAM, EGFR ve CLDN7 parametreleri üzerine etkisi; sayfa 46.

Tablo 4.5-16: Çalışma grubundaki köpeklere ait kitle büyüklüklerinin EPCAM, EGFR ve CLDN7 parametreleri üzerine etkisi; sayfa 47.

Tablo 4.5-17: Tümör derecelerine göre EPCAM, CLDN7, EGFR genlerinin downregulasyon yüzdesi ve P değerleri; sayfa 47.

Tablo 4.5-18: Tümör tipine göre EPCAM, CLDN7, EGFR genlerinin downregulasyon yüzdesi ve P değerleri; sayfa 47.

Tablo 4.5-19: Ülserasyon durumuna göre EPCAM, CLDN7, EGFR genlerinin downregulasyon yüzdesi ve P değerleri; sayfa 48.

Tablo 4.5-20: Metastaz durumuna göre EPCAM, CLDN7, EGFR genlerinin downregulasyon yüzdesi ve P değerleri; sayfa 48.

Tablo 4.5-21: Kitle büyüklüğüne göre EPCAM, CLDN7, EGFR genlerinin downregulasyon yüzdesi ve P değerleri; sayfa 48.

Tablo 4.5-22: Farklı kitle büyüklüklerine göre EPCAM geninin downregulasyon yüzdesi ve P değeri; sayfa 48.



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.4-1: Çalışma grubundaki köpeklerin EPCAM, CLDN7, EGFR markerlarının ortalama $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri; sayfa 33.



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BT: Bilgisayarlı tomografi

CLDN7: Klaudin 7

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

EPCAM: Epitelial hücre adhezyon molekülü

FSH: Follikül stimüle edici hormon

LH: Luteinizan hormon

LTH: Lüteotropik hormon

M1: Ön torakal memeler

M2: Arka torakal memeler

M3: Ön abdominal memeler

M4: Arka abdominal memeler

M5: İnguinal memeler

IGF-1: İnsulin benzeri büyüme faktörü-1

IGF-2: İnsulin benzeri büyüme faktörü-2

ER: Östrojen reseptörü

ER α : Östrojen reseptörü alfa

ER β : Östrojen reseptörü beta

PR: Progesteron reseptörü

PRL-R: Prolaktin reseptörü

AR: Androjen reseptörü

Somatotropin: Büyüme hormonu

ACTH: Adrenokortikotropik hormon

TNM: Tümör, lenf nodu, metastaz

WHO: World Health Organization

IHK: İmmunohistokimya

IF: İmmunofloresans

FAHÖ: Floresans akışlı hücre ölçümü

rt-PCR: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

CK: Sitokeratin

EPHB4: Ephrin tip B reseptör 4

ERBB-2: Epidermal büyüme faktör reseptörü-2

c-Met: Hepatosit büyüme faktör reseptörü

MUC-1: Musin-1

MMP9: Matriks metallopeptidaz 9

PLAUR: Plazminojen aktivator ürokinaz reseptörü

SAGE: Gen ekspresyonunun seri analizi

SqRT-PCR: Yarı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit

c-DNA: Kopya deoksiribonükleik asit

qPCR: Nicel polimeraz zincir reaksiyonu

UNG: Urasil N-Glikosilaz

Ct: Siklus eşiği

Δ Ct: Delta siklus eşiği

$\Delta\Delta$ Ct: Delta-delta siklus eşiği

iv: Damar içi

WBC: Akyuvarlar

PLT: Trombositler

°C: Santigrat derece

kg: Kilogram

cm: Santimetre

mm: Milimetre

ng/ml: nanogram/mililitre

μ L: Mikrolitre

% : Yüzde

<: Küçüktür

>: Büyüktür



ÖZET

Günay Uçmak, Z. (2016). Meme tümörlü köpeklerde metastazik potansiyelin, preoperatif dönemde alınan periferel kandan prognostik tümör belirleyicilerin (marker) tayini ile belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Jinekoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Meme tümörleri, köpeklerde görülen neoplazilerin %13,4'ünü oluşturmaktadır ve mortalitenin çoğunlukla metastazlarından kaynaklandığı bilinmektedir. Günümüzde makrometastazları belirlemek için radyografi ve bilgisayarlı tomografi gibi tekniklerden faydalanılmaktadır. Mikrometastazların tayini için, moleküler tekniklerle dolaşımdaki tümör belirleyiciler (markerlar) saptanabilmektedir.

Çalışmamızda 45 adet epitelyal tip meme tümörlü ve 9 adet sağlıklı köpekten preoperatif dönemde alınan kanlarda epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), kladin7 (CLDN7), epitelyal hücre adhezyon molekülü (EPCAM) markerlarının klinik parametreler üzerine etkisi değerlendirilerek, meme tümörlü köpeklerdeki prognostik öneminin ortaya konulması amaçlandı. Bu amaçla alınan periferel kanlardan öncelikle RNA izole edildi ve sonrasında cDNA sentezlendi. Son aşamada rt-PCR yöntemiyle bu markerların ekspresyon düzeylerine bakıldı. Elde edilen sonuçlar, Oneway-Anova, t-testi, Pearson korrelasyon ve ki-kare istatistik metotlarıyla değerlendirildi. Buna göre, çalışma ve kontrol grubunda EGFR ve CLDN7 genlerinin ekspresyonu açısından farkın önemli olduğu ve tümörlü köpeklerde bu markerların ortalama değerlerinin daha yüksek miktarlarda ölçüldüğü saptandı. Ayrıca EGFR, CLDN7 ve EPCAM markerları arasında pozitif korrelasyon tespit edildi. Çalışma grubundaki köpeklerin kanlarında yüksekten düşüğe sırasıyla EPCAM, EGFR ve CLDN7 markerlarının eksprese olduğu saptandı. Kanda EPCAM markerı kitle büyüklüğü arttıkça daha yüksek oranda ölçülürken, EGFR markerının ise kitle büyüklüğü azaldıkça daha yüksek miktarda ölçüldüğü belirlendi. Bunun yanı sıra ülserasyon varlığında ve metastazik meme tümörlü köpeklerde CLDN7 markerının saptanabildiği ve ekspresyon düzeyinde artış olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasıyla, EGFR, CLDN7 ve EPCAM genleriyle klinik parametreler arasındaki ilişki değerlendirilerek, meme tümörlü köpeklerde preoperatif dönemde kandan bu markerların ölçülebildiği ve köpeklerdeki etkinliği ortaya konuldu. Böylece meme tümörlü köpeklere erken teşhis ve tedavi şansı sunuldu.

Anahtar Kelimeler: Köpek, meme tümörü, dolaşımdaki tümör belirleyiciler, rt-PCR, metastaz.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31510

ABSTRACT

Günay Uçmak, Z. (2016). Determining the metastatic potential of canine mammary tumors with prognostic tumor markers in peripheral blood, on preoperative term. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Obstetrics and Gynecology. Phd Thesis. Istanbul.

Mammary tumors are 13.4% of neoplasms in dogs and the mortality usually arise from the metastasis. Nowadays, radiography and computed tomography are used for determining the macrometastasis. For determining the micrometastasis, circulating tumor cells can be arranged by molecular techniques.

In our research, epidermal growth factor receptor (EGFR), claudin7 (CLDN7), epithelial cell adhesion molecule (EPCAM) markers are investigated in blood of 9 healthy dogs and 45 dogs with epithelial tumor on preoperative term. The aim of our study is to evaluate the effects of the markers on clinical parameters and reveal the prognostic importance on dogs with mammary tumor. For this purpose, firstly RNA was isolated from peripheral blood and cDNA was synthesized. After, expression levels of this markers were determined by rt-PCR method. The results were investigated statistically by Oneway-Anova, t-test, Pearson correlation and chi-square methods. According to this, there was statistically significant differences on EGFR and CLDN7 expression between study and control groups. Mean values of this markers were measured higher in study group than control group. Also there was positive correlation between EGFR, CLDN7, EPCAM markers. In study group, EPCAM, EGFR and CLDN7 markers were highly expressed, respectively. In addition to this, EPCAM was highly expressed in increased tumor size but EGFR was highly expressed in decreased tumor size. Otherwise, CLDN7 was highly expressed in metastatic and ulcerative tumors.

In conclusion; efficiency and measurability of EGFR, CLDN7, EPCAM markers in peripheral blood of the dogs with mammary tumor on preoperative term were proved. Thus, early diagnosis and treatment chance is presented for dogs with mammary tumor.

Key Words: Canine, mammary tumor, circulating tumor cells, rt-PCR, metastasis.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 31510

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme tümörleri köpeklerde görülen neoplazmaların %13,4'ünü kapsar. Bu oranın artışı, kısırlaştırma uygulanıp uygulanmadığı, yaş, beslenme şekli, genetik faktörler, radyasyon ve ekzojen hormon uygulamaları gibi faktörlere bağlıdır. Köpek meme tümörlerinde mortalitenin daha çok metastazlara bağlı olduğu bilinmektedir. Günümüzde köpeklerde metastaz varlığının belirlenmesi için radyografi ve ultrasonografiden yararlanılmaktadır. Radyografiyle 6-8 mm'den fazla büyüklükteki akciğer lezyonları saptanabilir. Dört milimetre kadar küçük çaptaki erken metastazları tespit edebilmek için bilgisayarlı tomografi (BT) geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemler 0,4 cm çapından daha küçük metastaz odaklarının tümü tespit edilemediği için, hücresel yayılımlarla ilgili fikir vermemektedir. Bu sebepten dolayı dolaşımdaki tümör hücrelerinin saptanması büyük önem taşımaktadır, fakat bunun için saptanan tümör belirleyiciler (markerlar) köpeklerde insanlardaki kadar çok değildir. Meme tümörlü insanların kan dolaşımındaki markerlardan bazılarının, köpek meme karsinomu hücrelerini spesifik olarak belirlediği tespit edilmiş ve içlerinden en hassas ve duyarlı olanları belirlenmiştir.

Bu projede, periferik dolaşımdaki meme karsinomu hücrelerini belirlemede daha hassas ve duyarlı olduğu saptanan markerlardan; kludin-7'nin (CLDN-7) ve epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) tayin edilmesiyle, makroskopik boyutta metastaz oluşmadan önce metastazik potansiyeli ortaya koyabilmek amaçlanmaktadır. Köpeklerde spesifikliği kanıtlanan bu iki tümör belirleyicinin yanısıra insanlarda göğüs kanserine bağlı olarak gelişen mikrometastazların doğrudan tespitinde kullanılan bir tümör belirleyici olan epitelyal hücre adhezyon molekülü (EPCAM) markerının da işlevselliği değerlendirilecektir. Böylece erken teşhisle, metastazlar nedeniyle operasyon sırasında ve sonrasında karşılaşılabilecek başta solunum ve dolaşım problemleri olmak üzere, bunun akabinde seyredebilecek karaciğer ve böbrek rahatsızlıkları gibi olası risklerle ilgili hasta sahibinin preoperatif dönemde bilgilendirilmesi sağlanacak ve hastaya erken müdahale olanağı doğmuş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Köpeklerde Seksüel Siklusun Evreleri ve Etkili Hormonlar

Köpekler monoöstrik hayvanlardır; yılda bir veya iki kez östrus gösterirler. Östrus siklusu 4-10 ay (ortalama 7 ay) sürer. Köpeklerde östrusun evreleri; proöstrus, östrus, diöstrus, anöstrus olmak üzere 4 grupta incelenir (Kalkan ve Horoz 2005 pp.23-40).

Proöstrus evresinin süresi 2-22 gündür (ortalama 9 gün) ve dişinin çiftleşmeyi kabul etmediği, kanlı vajinal akıntının olduğu dönemdir (Kalkan ve Horoz 2005 pp.23-40). Bu evrede adenohipofizden salınan follikül stimule edici hormon (FSH), ovaryumda folliküllerin gelişip olgunlaşmasını sağlar ve teka interna hücrelerinden östrojen salgılanır. Östrojen sayesinde uterus mukozası katmanlaşır ve parmaklı çıkıntıların sayısı artar. Submukozadaki salgısal özellikteki inaktif hücreler aktifleşir. Uterustakine benzer değişimler az da olsa vajinal dokuda da şekillenir. Özetle proöstrus evresinde östrojen, FSH ve luteinizan hormonda (LH) artış, bu dönemin sonuna doğru da progesteronda artış gözlenir (Artan 1988 pp. 377-404).

Östrus evresi; 3-21 gün (ortalama 9 gün) süren, dişinin çiftleşmeyi kabul ettiği dönemdir (Kalkan ve Horoz 2005 pp.23-40). Graaf follikülünün gelişip ovulasyonun şekillendiği evredir. Kandaki östrojen seviyesinin artışı ile FSH üretimi azalır. Bununla birlikte, LH ve luteotropik hormone (LTH) yapımı artış gösterir. Uterus mukozası katmanlaşır ve mukus salgısı başlar. Vajinal mukoza ve vulva ödemlidir. (Artan 1988 pp. 377-404). Hormonal tabloyu özetlersek bu evrede, östrojen düşerken progesteron artar. FSH ve LH en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra düşmeye başlar (Kalkan ve Horoz 2005 pp.23-40).

Diöstrus evresi; dişinin çiftleşmeyi kabul etmemesiyle başlar ve 55-90 gün (ortalama 60 gün) sürer. Bu evrede progesteron ve prolaktin maksimuma ulaşır ve sonra düşer. Bununla birlikte, FSH ve LH'da da düşüş gözlenir (Kalkan ve Horoz 2005 pp.23-40). Bu evre korpus luteumun etkisi altındadır, luteal hücrelerden progesteron salgılanır. Progesteron negatif geri-bildirim mekanizmasıyla FSH ve LH üretimini engeller. Böylece kanda LTH artar ve ovaryumda folliküller gelişim durur. Bunun yanı sıra, meme ve uterus dokularında gelişim şekillenir. Bu evrede endometrial bezler uzar ve kıvrımlaşır, damarlaşma artar, uterus sütü salgılanır. Uterus mukozası fertilize olmuş yumurtanın yerleşimi için hazırdır. Bu evrenin sonunda uterus mukozası incelir (Artan 1988 pp. 377-404).

Anöstrus evresi; 40-270 gün (ortalama 120 gün) süren, hormonların bazal seviyede olduğu ve seksüel açıdan dişinin inaktif olduğu dönemdir. Bu dönemin sonuna doğru FSH, LH ve östrojen artar (Kalkan ve Horoz 2005 pp.23-40).

2.2. Meme Bezlerinin Anatomisi

Meme bezleri ektodermal hücre tabakasından oluşur. Meme bezlerinin gelişimi, epidermisin kalınlaşıp meme kabartılarının şekillenmesiyle başlar. Epitelyal hücreler mezenşime penetre olur ve buradan salgı kanalları (duktus laktiferus) gelişir. Duktus laktiferuslardan intralobular kanallar oluşur ve bu kanallar alveollere ayrılır. Böylece her meme lobuna özgü duktus laktiferus gelişmiş olur ve her biri ayrı meme başına açılır (Özfiliz 2005 pp. 236).

Kedi ve köpeklerde meme bezleri aksillar bölgeden inguinal bölgeye uzanan iki paralel paramedian zincir şeklinde dizilmektedir. Meme bezlerinin sayısı türlere göre değişir. Birçok köpekte 5 çift meme bezi bulunmasına rağmen bazı hayvanlarda 4 ile 6 çift meme bezi bulunmaktadır (White 2003 pp.349-351). Bunların iki çifti torakal (M1 ve M2), iki çifti abdominal (M3 ve M4) ve bir çifti inguinal (M5) meme bezleridir. Her iki paramedian zincirdeki meme lobları kendi içinde birbiriyle bağlantılıdır. Fakat sağ taraftaki meme bezi zinciri ile sol taraftaki meme bezi zinciri arasında bağlantı yoktur (Fidler ve Brodey 1967).

2.3. Meme Bezlerinin Lenfatik Drenajı

Anterior üç meme bezinin lenfatik drenajı aksiler lenf nodu ile sağlanır. Posterior iki meme bezi ise superfisiyal inguinal lenf nodu ile drene edilir. Lenfatik ilişki 2. ve 3., 4. ve 5. meme bezi arasında mevcuttur. Aynı zamanda 3. ve 4. meme bezi arasında da lenfatik ilişki bulunabilir (White 2003 pp.349-351; Sorenmo ve ark. 2011). Köpeklerde normal ve neoplastik meme dokusuna ait lenfatik drenaj Tablo 2.3-1’de belirtilmiştir.

Tablo 2.3-1: Köpeklerde normal ve noeplastik meme dokusuna ait lenfatik drenaj (LD: Lenf düğümü) (Sorenmo ve ark. 2011).

MEME BEZİ	NORMAL LENFATİK DRENAJ	NEOPLASTİK LENFATİK DRENAJ
M1 (ön torakal)	Aksiler LD	Aksiler LD, Sternal LD
M2 (arka torakal)	Aksiler LD	Aksiler LD, Sternal LD
M3 (ön abdominal)	Aksiler LD, Süperfisiyal inguinal LD	Aksiler LD, Süperfisiyal inguinal LD, Median illiak LD
M4 (arka abdominal)	Süperfisiyal inguinal LD	Süperfisiyal inguinal LD, Aksillar LD
M5 (inguinal)	Süperfisiyal inguinal LD	Süperfisiyal inguinal LD, Popliteal LD

Torasik bezler, internal torasik arterin kollarıyla, interkostal arterlerin kutanöz kollarıyla ve lateral torasik arterlerle beslenmektedir. Kranial abdominal bezler, kranial epigastrik arter ve caudal interkostal arterlerin kutanöz kollarından kanı alırlar. Kaudal abdominal ve inguinal bezler, büyük çoğunlukla kaudal süperfisiyal epigastrik arterler ve eksternal pudental arterlerin perivulvar kollarıyla beslenmektedirler (White 2003 pp.349-351).

2.4. Meme Bezlerinin Sinirsel Uyarımı

Köpeklerde meme bezlerinin sinirsel uyarımı, damar düzeni ile alakalıdır ve lokal kan akışının düzenlenmesinde rol alan peptiderjik sinirler içerir. Ayrıca meme başını uyarıcı sinirlerdeki uyarıcı nöropeptidlerin, süt salınımında rol oynadıkları bildirilmiştir (Sorenmo ve ark. 2011).

2.5. Siklusun Evrelerinde Meme Bezlerinin Histolojisi

Yetişkin köpeklerde proöstrus evresinde, çok miktarda interlobular ve intralobular bağ doku ile çevrili bazı küçük lobuller ve interlobular kanalların başlıcalarını içeren bezler inaktiftir. Östrus siklusundan önceki alveoler yapılar, kübik vakuoler ya da yassı epitelyal hücrelerle çevrilidir. Makrofajlar, bu alveollerin lumeninde ve gevşek intralobuler bağ dokuda bulunan lipofusini içerir. Östrusun başlangıcı, loblardaki gevşek bağ doku ile katmanlaştırılmış epitelyum tarafından oluşturulan multiple küçük kanalcıkların şekillenmesiyle gelişen intralobular kanal epitelyumunun yayılmasına neden olur. Erken diöstrusta, progesteron seviyesi yüksekken, lobullerin oluşumu ile kanallar büyük oranda gelişirler. Geç diöstrusta, köpeklerde meme bezlerinin gelişimi, intralobular kanalların sonundaki salgısal alveollerin oluşmasıyla en üst seviyeye ulaşır. Alveol, eozinofilik proteinöz salgıyla dolar. Erken anöstrus, çok az miktarda salgı içeren alveoller ile karakterizedir. Vakuolize epitelyum hücreleriyle dizili alveoller çok çıkıntılı bazal membran ile örtülüdürler. Bazı loblar; meme bezinin gerilemesine, intralobuler bağ dokunun miktarında artışa ve lenfosit ve plazma hücrelerinin infiltrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterirler. Geç anöstrusta, meme bezinde gerileme çok belirgindir. Kanal lümenleri ve loblar boyut olarak azalmaktadırlar. Piknotik çekirdekli hücreler genellikle alveollere veya kanallara sıralanır. Eozinofilik yumrular duktal lamina ile birlikte görülür. İntersitisyum kalınlaşır, kollajen iplikçikler daha kompakt hal alır, lenfosit, plazma hücreleri ve lipofusin içeren makrofajların infiltrasyonu görülür (Santos ve ark. 2010; Sorenmo ve ark. 2011)

2.6. Meme Dokusuna Etkili Hormonlar

Meme bezinin gelişimi puberta ile başlar, reproduktif hayat boyunca, hormonal çevre, ovarian steroidler, polipeptid hormonlar ve östrus siklusunda üretilen büyüme faktörlerinin

morfogenetik süreci tarafından kontrol edilir. Dişi köpeklerde reproduktif ve hormonal fizyoloji meme bezinin histolojisine de etki etmektedir (Santos ve ark. 2010). Meme bezinin gelişimi meme kanallarının uzaması sonucu meydana gelir. Tekrarlayan östrus siklusu boyunca bu kanallar yan kollar verir. Gebelikte bu yan kollar artar ve alveologenezisi tetikler (Briskin ve O'Malley 2010).

Postpubertal dönem süresince meme gelişiminin süresi birçok türde farklılık gösterir. Örneğin; tavşanlar gibi asiklik hayvanlarda az miktarda alveol yapısı olsa bile östrusta kanal gelişimi artar. Siklik hayvanlarda da kanal gelişiminde artış gözlenmektedir. Sıçanlarda, proöstrus ve östrus süresince kanallar, yağ doku içine doğru tomurcuklanırlar. Meme kanallarının gelişimi her östrus siklusunda %8 oranında artar. Metöstrus ve diöstrusta bu kanallar geriler veya içe kıvrılır. Bu durum sığırlarda da aynıdır fakat östrus sonrası paranşimal dokuda düzensizlik gözlenir (Hurley 2009).

Östrustaki büyüme ovarian steroid hormonlarla ilişkilidir. Östrojen ve progesteron reseptörlerinin tümü puberta yaklaştıkça meme bezinde ortaya çıkarlar. Bununla birlikte, östrojen ve progesteronun kesin rolü hala tam olarak ortaya konulmamıştır. Mammogenik hormonlar, meme dokusundaki spesifik büyüme yapıları için uygun koşulları hazırlarlar (Wilson 1981 pp.394-404).

Östrojen hormonu; özellikle postpubertal dişilerde önemli bir mammogenik faktördür. Östrojen reseptörleri; kandaki östrojen konsantrasyonundaki siklik yükselmeye maruz kalan bezlerde olduğu gibi, puberta zamanında da bez çevresinde görünürler. Kemirgenlerde östrojen, stromal dokudaki reseptörler üzerine rol oynar ve böylece kanal gelişimini tetikleyen büyüme faktörlerinin üretimini düzenler (Sorenmo 2003).

Progesteron hormonu; meme gelişiminde anahtar rol oynayan diğer bir ovarian steroid hormondur. Progesteron reseptörlerinin memedeki yağ dokuda tespiti zor olsa da, progesteron alımı sonucunda stromal hücreler tomurcuklanır. Kanal epitelinde progesteronun DNA sentezi üzerine uyarıcı etkisi stromal hücreler aracılığıyla indirekt olarak sağlanır. Progesteronun esas mammogenik etkisi epitel hücrelerde bulunan reseptörlerine bağlanmasıyla şekillenir ve postpubertal meme gelişiminin niteliği olan alveolar tomurcuk veya kanallarda yan dallanma oluşumu ile etkisini gösterir. Progesteron, alveolar morfogenezisde büyük, kanal morfogenezisinde küçük rol oynamaktadır. Östrus siklusu süresince, kanal genişlemesi ve paranşimal dokunun yağ yatağının içine genleşmesi yükselmiş östrojen miktarı ile ilgilidir (Hurley 2009).

Östrojen ve progesteron arasındaki sinerji, tüm hormonların yüksek konsantrasyonda olduğu gebelik dönemi süresince de gözlemlenmektedir. Östrojen ve progesteronun meme

bezi üzerine direkt etkisi vardır. Bu durumun meme dokusunda lokal olarak otokrin ve parakrin faktörlerin üretimi ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, steroid hormonlar, prolaktin salgısındaki artış vasıtasıyla meme dokusu üzerine indirekt etkiye sahiptirler (Hurley 2009).

Prolaktinin genellikle laktasyon ve galaktopoezisi başlatma ile ilgisi olmasının yanı sıra mammogenik etkisi de vardır. Prolaktin reseptörleri epitelyumda olduğu gibi bazı türlerde yağ tabakasının içinde de bulunmaktadır. Prolaktin, büyüyen meme dokusunun hem stromal hem de epitelyal bileşiminde rol oynamaktadır. Prolaktin salgısının baskılanması gebe keçilerde, domuzlarda ve diğer türlerde meme bezi gelişimini de baskılamaktadır. Prolaktinin kandaki konsantrasyonu normalde gebelik süresince düşüktür. Gebelik boyunca meme gelişimi, prolaktinin kandaki normal konsantrasyonu ile sınırlandırılmaz (Hurley 2009).

Büyüme hormonunun (somatotropin) keçilerde kullanımının, laktasyon boyunca süt üretimini düzenlediği bilinmektedir. Somatotropin, insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) salgısını düzenleyerek indirekt yolla etki gösterir. Somatotropin ayrıca mammogenik hormondur ve gelişimin her evresinde memedeki büyümeyi düzenler. Somatotropinin meme dokusuna direkt etkisi, meme hücrelerindeki somatotropin reseptörlerinin varlığı ile anlaşılır. Birçok türde memedeki stromal veya epitelyal hücrelerde somatotropin reseptörleri mevcuttur. Somatotropin; meme epitel hücreleri için mitojenik olan IGF-1'in stromal üretimini düzenler. Meme dokusunda IGF-1 ekspresyonunun en yüksek seviyeleri yağ dokuda meydana gelir. Bununla birlikte, gebeliğin son dönemlerinde ve prepubertal allometrik büyüme fazı süresince en fazladır. Memede IGF-1 ekspresyonu; somatotropin, östrojen ve çoğalan epitelyum hücrelerden pozitif geri bildirim mekanizmasıyla düzenlenir. Meme gelişiminde insulin benzeri büyüme faktörü 2'nin (IGF-2) fonksiyonu, IGF-1'den daha az bilinmektedir. Hormonal uyarım ve meme gelişiminin evreleri tarafından düzenlenen stromal hücreler IGF-2 üretmektedir (Hurley 2009).

Meme gelişiminde gerekli diğer hormonlar glikokortikoidler, tiroid hormonları ve insulindir (Sorenmo 2003).

2.7. Tümör Gelişiminde Hormon Reseptör İlişkisi

Normal ve neoplastik meme bezlerinin gelişimi, steroid ve peptid hormonların veya büyüme faktörlerinin hedef hücrelerdeki reseptörlere bağlanmasıyla ilişkilidir (W. Misdorp 2002 pp.575-606). Meme bezlerinde bulunan östrojen reseptörleri (ER), progesteron reseptörleri (PR), prolaktin reseptörleri (PRL-R) ve EGFR; normal meme bezlerinde bulunurlar ve seksüel siklusun evreleri boyunca değişen hormonal aktiviteden etkilenir (Donnay ve ark. 1993).

Bening ve malign meme bezi tümörlerinde ER, PR, PRL-R, EGF-R ve androjen reseptörlerinin (AR) %40-60 oranında bulunduğu bildirilmektedir (Elling ve Ugenach 1983; Donnay ve ark. 1993). MacPhail (2013 pp.809-815), köpeklerde östrojen ve progesteron reseptörlerinin, malign tümörlerin %50'sinde, bening meme tümörlerinin %70'inde bulunduğunu, östrojen ve progesteron reseptörlerine sahip köpeklerin daha uzun süre yaşadıklarını bildirmiştir.

İnsanlardaki meme bezlerindeki aksine, köpeklerde normal epitelyal meme bezleri ER pozitifdir. Köpeklerde östrojen reseptörü alfa (ER α) pozitif meme tümörleri ve PR pozitif yangısal meme tümörleri genellikle daha iyimser bir klinik tabloya sahiptirler. Son yıllarda köpeklerdeki malign meme tümörlerinde, östrojen reseptörü beta (ER β) ekspresyonu belirlenmiştir (Illera ve ark. 2006).

Östrojen ve progesteron hormonları normal meme bezinin gelişiminde büyük rol oynar. Ayrıca bu hormonlar tümör gelişiminde de etkilidir (Selman ve ark. 1994). Normal doku ile karşılaştırıldığında karsinomlarda reseptör seviyeleri daha yüksektir (Donnay ve ark. 1995). Bununla birlikte kadınlarda göğüs kanserinde olduğu gibi köpeklerdeki meme tümörü olgularında ER; temel terapötik hedefin belirlenmesi için malign değişimin ortaya konmasını sağlar. Bir kadının ilerleyen göğüs kanseri riski, biyolojik olarak kullanılabilir östrojenin tedavi edici dozu ile kontrol altına alınabilir (Bernstein ve Ross 1993). İleri aşamadaki hastalıklarda ER, PR ve EGFR kodlayan genlerin ekspresyonu oluşmadığından, bölgesel ve uzak metastazlarda EGFR ve steroid reseptörler negatiftir. Farklılaşmamış karsinomlarda, farklılaşmış meme karsinomlarına göre daha düşük sayıda reseptörler vardır. Bir pozitif ER ve PR durumu kompleks karsinomlarda, basit karsinomlardan daha yaygındır ve kompleks karsinomlar daha iyi prognoza sahiptirler. Reseptörden zengin karsinomlar operasyon sonrası dönemde daha uzun yaşama sahiptirler (Sorenmo 2003). Yapılan diğer bir çalışmada köpeklerde yangısal meme karsinomu olgularında androjen ve östrojen seviyelerinin arttığı ve AR ve ER'nin yüksek oranda ekspresyonunun saptandığı bildirilmiştir (Illera ve ark. 2006).

2.8. Meme Tümörlerinin İnsidensi

Köpeklerde tümörler en sık deride görülmekle beraber, bunu meme tümörleri (%25-50) takip etmektedir (Boldizsar ve ark. 1992). Meme bezi tümörleri köpeklerdeki tüm tümöral olguların %13,4'ünü, kısırlaştırılmamış köpeklerdeki tümöral olguların %41,7'sini oluşturur (Dorn ve ark. 1968). Malign meme tümörleri ise her ırktaki dişi köpeklerde %53 oranında insidense sahiptir (Moe 2001; Santos ve ark. 2013).

2.9. Meme Tümörlerinin Etiyolojisi

Meme tümörlerinin etiyolojisinde yaş, beslenme, ırk yatkınlığı, ekzojen hormon uygulamaları, kısırlaştırma ve radyasyon önemli rol oynamaktadır (Sorenmo 2003).

Meme tümörleri çoğunlukla ileri yaşlarda görülmektedir. İki yaşın altındaki köpeklerde meme tümörlerine nadiren rastlanmaktadır. Özellikle 4-8 yaş arasında meme tümörlerinin gelişimi hızlıdır, 8 yaşın üzerindeki köpeklerde görülme oranı daha yüksektir. Meme tümörlerinin insidensi 1-4 yaşındaki köpeklerde %4, 4-8 yaşındaki köpeklerde %29,8 yaş ve üzeri köpeklerde %67 olduğu bildirilmiştir (Boldizsar ve ark. 1992; Yamagami ve ark. 1996). Sorenmo ve ark. (2011) meme tümörlerinin 9-11 yaşlar arasındaki köpeklerde yüksek insidense sahip olduğunu ve ekzojen hormonlarla (progestin) tedavi edilmediği takdirde 5 yaşın altındaki köpeklerde meme tümörü görülmesinin çok nadir olduğunu bildirmişlerdir.

Hayvan deneyleri ve insan epidemiyoloji çalışmaları yüksek yağlı diyet ve obezitenin meme kanseri riskini artırdığını göstermektedir. Köpeklerde meme tümörlerinin gelişimi açısından obezite ve çeşitli beslenme faktörleri risk teşkil etmektedir. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda bu konuda çelişkili bulgular ortaya konulmuştur. Yapılan bir çalışmada (Sonnenschein ve ark. 1991) meme bezi tümörlerinin gelişme riski 9-12 aylık yaşta zayıf olan kısır köpeklerde oldukça düşük olduğu belirlenirken, meme bezi tümörü gelişiminin 1 yıl öncesine kadar obez olan veya yüksek yağ oranına sahip diyetle beslenen köpeklerde meme tümörü gelişimi riskinde artış saptanmadığı bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada (Shofer ve ark. 1989) meme tümürlü köpeklerde bazı beslenme faktörlerinin prognoz üzerine etkileri değerlendirilmiş ve bunun sonucunda düşük yağ, yüksek proteine sahip diyetle beslenen köpeklerin, düşük yağ düşük proteinli diyetle beslenen köpeklere göre belirgin derecede daha uzun yaşam sürelerinin olduğu saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda yüksek yağlı diyetle beslenen köpeklerde, hayatta kalma süresi protein alımıyla ilişkilendirilmemiştir.

Yüksek yağ oranına sahip diyetle beslenme ve menopoza öncesi ve sonrası dönemde obezite kadınlarda göğüs kanseri riskini artırmaktadır. Buna, serbest serum östrojen seviyelerinde artışa sebep olan ve buna bağlı olarak göğüs kanseri riskini arttıran; hiperinsulinemi, insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) seviyelerinde artış ve serum cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) seviyelerinde azalma gibi çeşitli nedenler gösterilebilir (La Guardia ve Giammanco 2001).

Yaş ve beslenme faktörlerinin yanı sıra köpeğin ırk özelliği de meme tümörü gelişiminde önemli bir etkiye sahiptir. Uluslararası Klinik Federasyonunun (FCI) kriterine göre köpekler vücut ağırlıklarına göre; küçük (<10 kg), orta (10-23 kg), büyük (>23 kg)

olarak üç kategoride gruplandırılmaktadır (Santos ve ark. 2013). Belirli ırklar, meme tümörü oluşumunda yüksek oranda risklidir. Meme bezi tümörlerinde yüksek insidense sahip olan köpekler; Toy ve Miniatür Poodle, İngiliz Springer Spaniel, Brittany Spaniel, Cocker Spaniel, İngiliz Setter, Pointer, German Shepherd, Maltese, Yorkshire terrier, Labrador Retriever ve Dachshund ırklarındandır (Sorenmo 2003; Novosad 2003). Meme kanseri olguları saf ırk köpeklerde daha ön plandadır. Belirgin derecede yüksek riske sahip köpekler Dachshund ve Pointer ırklarındandır. Collie ve Boxer ırkı köpekler ise daha düşük riske sahiptirler (Frye ve ark. 1967; Moe 2001). Meme tümörü gelişim riski fazla olan ırklarda genetik bir bileşenin varlığı düşünülmektedir. Fakat bu köpeklerde belirgin bir genetik mutasyonun saptanmadığı bildirilmiştir. Köpek meme tümörlerinde de insanlarda olduğu gibi çoğunlukla mutasyona uğrayan gen, tümör baskılayıcı p53 genidir. Bunun yanı sıra tümör gelişimde rol oynayan breast cancer A (BRCA), c-erbB2, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), EGFR gibi çeşitli genler bulunmaktadır (Sorenmo 2003).

Yapılan bir çalışmada (Schnieder ve ark. 1969); gençlikte ovarian hormonlara maruz kalma süresinin, meme kanseri riskini belirlediği bildirilmiştir. Meme bezi tümörlerinin gelişim riski; ovariohisterektominin birinci östrüstan önce, ikinci veya herhangi bir östrüstan sonra uygulandığına bağlı olarak, sırasıyla % 0,5'den % 8'e ve % 26'ya kadar artar. İlk östrus siklusundan önce kısırlaştırılan köpeklerde meme bezi neoplazmalarının gelişim şansı yaklaşık % 0,5'tir. İlk östrüstan sonra bu risk % 8'e yükselir. İkinci östrüstan sonraki kısırlaştırmalarda risk % 26'ya yükselir ve artmaya devam eder (Baştan ve Kaymaz 1999; Novosad 2003; Sorenmo ve ark. 2011). İleri yaşlarda ovariohisterektomi, malign meme bezi tümörlerinin gelişim riskini azaltmaktadır. Kedilerde ovariohisterektominin rolü maalesef köpeklerde olduğu gibi değildir. Fakat altı aylıktan önce ovariektomi uygulanan kedilerde meme neoplazması gelişimi 7 kat daha düşük bulunmuştur (Novosad 2003). Yapılan diğer çalışmalarda da (Schneider ve ark. 1969; Misdorp ve ark. 1991); dişi kedi ve köpeklerde erken dönemde uygulanan ovariektominin meme karsinomuna karşı büyük ölçüde koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Misdorp (1988), ovariektominin ileri yaşlarda uygulanmasıyla, köpeklerde benign meme tümörlerinin gelişim riskinin devam edeceğini savunmaktadır. Sorenmo ve ark. (2000) meme tümürlü köpeklerde kısırlaştırmanın ve kısırlaştırma zamanının yaşam süresi üzerine etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada; meme tümürlü köpekleri kısırlaştırılmamış, mastektomi operasyonundan en az 2 yıl öncesine kadar süreçte kısırlaştırılmış ve mastektomi operasyonundan 2 yıldan daha fazla süre öncesinde kısırlaştırılmış köpekler olarak 3 grupta incelemiştir. Bunun sonucunda mastektomi

operasyonundan en az 2 yıl öncesine kadarki süreçte kısırlaştırılan köpeklerin diğer gruptaki köpeklere göre daha uzun yaşam sürelerine sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Progestinlerle tedavi tümör gelişim riskini artıran bir diğer faktördür (Stovring ve ark. 1997). Enjektabl progestinler bazı Avrupa ülkelerinde kedi ve köpeklerde östrusu engellemek amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu tarz tedavilerin meme tümörlerinin etiyolojisinde, benign ve malign meme tümörü insidensini yükselttiği bildirilmiştir (Misdorp 1988; Baştan ve Kaymaz 1999). Östrojen ve progesteron alımının köpeklerdeki etkisi konusunda toksisite çalışmaları vardır. Dietilstilbestrolün uzun süreli alımı veya diğer sentetik östrojenlerin kullanılması yalnızca meme tümörlerinin insidensini artırmamaktadır. Progesteron ve sentetik progestinlerle uzun süreli tedaviler köpeklerde meme hiperplazisini ve benign meme bezi tümörlerini indükler (Giles ve ark. 1978; Concannon ve ark. 1981). Kedilerde progesteronun düzenli alımı, malign ve benign meme tümörlerinin oluşum riskini belirgin bir şekilde artırdığı ve benign meme lezyonlarının, özellikle fibroadenomatöz değişimlerin, endojen (gebelik süresince) veya ekzojen progestinler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hayden ve ark. 1981; Misdorp 1991). Her ne kadar düşük dozlarda koruyucu amaçlı olarak önerilse de özellikle östrojen progesteron kombinasyonlarıyla ya da yüksek dozlarda progesteron ile tedavi sonucu malign meme tümörleri şekillenebilmektedir (Misdorp 1991). Kontraseptif steroidler, belli şartlarda, köpeklerde, rodentlerde, kedilerde ve maymunlarda meme tümörü gelişimi ile ilişkilidir (Rutteman 1992). Köpekte endojen progesteron ve sentetik progestinler, akromegali ve insülin direncinin bir neticesi olarak somatotropin üretimini arttırırlar (Theilen ve Madewell 1987; Selman ve ark. 1994). Büyüme hormonunun direkt olarak meme bezlerini büyütme yönelik etkisi vardır. Ayrıca indirekt olarak IGF-1 üzerine de etkilidir. İnsülin büyüme faktörlerinin; normal hücre proliferasyonu ve malignant değişim üzerine çok önemli rolü vardır. IGF-1; meme tümörleri dahil birçok değişik tümör tiplerinin tümörögenезisinde görülmüştür. Kan serumunda düşük IGF-1 seviyesine sahip kadınların meme kanserine yakalanma oranı yüksektir. Aşırı IGF-1 üreten transgenik farelerde; anormal meme bezi gelişimi ve tümör insidensinde artış saptanmıştır. IGF-1 apoptozisi engeller ve birçok meme kanseri hücre dizilimleri için etkili bir mitojen olmuştur (Sorensen 2003). Uzun süre yüksek miktarda medroksiprogesteron asetat verilen köpeklerde, somatotropin seviyelerinin arttığı, kortizol seviyelerinin baskılandığı bildirilmiş ve yüksek somatotropin seviyesine sahip dişi köpeklerde, akromegali benzeri durumun dış belirtilerinin yanısıra büyük meme nodüllerin de görüldüğü saptanmıştır. Ayrıca dişi köpeklerde meme neoplazmalarının oluşumunda hipofiziyal hormonların rolünün olduğu; prolaktin ve adrenokortikotropik hormon (ACTH) seviyelerinin arttığı belirtilmektedir (Theilen ve Madewell 1987).

Tüm bu faktörlerin yanısıra erken yaşlarda meydana gelen tüm meme neoplazmalarında radyasyonun da etkili bir faktör olduğu bildirilmektedir (Misdorp 2002).

2.10. Köpek Meme Tümörlerinin Histolojik Sınıflandırılması

Meme bezi tümörleri benign veya malign olabilmesine rağmen köpeklerde meme tümörlerinin yaklaşık olarak % 50'sinin malign karakterde olduğu bildirilmiştir (Novosad 2003). Yapılan bir çalışmada (Baştan ve Zonturlu 2002), meme tümörlerinin lokalizasyonu ile tümörün karakteri arasında belirgin bir bağlantı olduğu tespit edilmiştir. Köpeklerde genellikle meme tümörlerinin büyük bir kısmı inguinal meme lobunda yerleşim gösterdiği ve inguinal meme lobunda oluşan tümörlerin diğer meme loblarındaki tümörlere göre daha malign karaktere sahip oldukları bildirilmiştir (Baştan ve Zonturlu 2002).

Tümörün morfolojik özelliklerini ve prognozu belirlemek açısından dokunun kaynağına göre (epitelyal, miyoepitelyal veya mezenşimal doku) sınıflandırma yapılmıştır (Sorensen 2003). Köpek meme tümörlerinin histolojik sınıflandırılması ilk olarak 1974 yılında yapılmış ve 1999 yılında modifiye edilmiştir. Histolojik prognostik özellikleri ve dolayısıyla maligniteyi belirlemek amacıyla Dünya Sağlık Örgütü'nün 1974 yılında belirlediği meme dokusundaki tümör ve displazileri içeren 'Evcil Hayvanlarda Tümörlerin Uluslararası Histolojik Sınıflandırılması' yol göstericidir (Hampe ve Misdorp 1974). Bu sınıflandırma; karsinom, sarkom, malign miks tümör (karsinosarkom), benign tümörler, sınıflandırılmayan tümörler ve displaziler olmak üzere 6 ana başlık altında toplanmıştır. 1999 yılında revize edilen histolojik sınıflandırma ise; malign tümörler, benign tümörler, sınıflandırılmayan tümörler, meme bezi hiperplazileri ve displazileri olmak üzere 4 ana başlığa indirgenmiştir (Misdorp ve ark. 1999). 2010 yılında önerilen histolojik sınıflandırma; malign epitelial neoplazmalar, malign epitelial neoplazmaların özel tipleri, malign mezenşimal neoplazmalar (sarkom), malign miks neoplazmalar (karsinosarkom), benign neoplazmalar, hiperplazi ve displaziler, meme başının neoplazmaları, meme başının hiperplazi ve displazileri olarak 8 ana başlık altında düzenlenmiştir (Tablo 2.10-1) (Goldschmidt ve ark. 2011).

Tablo 2.10-1: 2010 Yılında Önerilen Histolojik Sınıflandırma –(Goldschmidt ve ark. 2011)

A. Malign epitelial tümörler 1- Karsinom- in situ 2- Karsinom –basit a) Tubular b) Tubulopapiller c) Kistikpapiller d) Kribriform 3- Karsinom – mikropapiller invaziv 4- Karsinom – solid 5- Komedokarsinom 6- Karsinom – anaplastik 7- Kompleks adenom/ miks tümörün içinde gelişen karsinom 8- Karsinom- kompleks tip 9- Karsinom ve malign miyoepiteliom 10- Karsinom- miks tip 11- Duktal karsinom 12- İntraduktal papiller karsinom B. Malign Epitelial Tümörler – Özel tipler 1- Yassı (skuamöz) hücreli karsinom 2- Adenoskuamöz karsinom 3- Musinöz karsinom 4- Yağ hücreli (sekretörük) karsinom 5- Mekik hücreli karsinom 6- Yangısal karsinom	C. Malign Mezenşimal Tümörler (Sarkomlar) 1- Osteosarkom 2- Kondrosarkom 3- Fibrosarkom 4- Hemanjiosarkom 5- Diğer sarkomlar D. Karsinosarkomlar- Malign Miks Tümörler E. Bening Tümörler 1. Adenom 2. İntraduktal papiller adenom 3. Duktal adenom 4. Fibroadenom 5. Miyoepiteliom 6. Kompleks adenom 7. Bening miks tümör F. Hiperplazi / Displazi 1. Duktal ektazi 2. Lobuler hiperplazi (Adenozis) 3. Epiteliozis 4. Papillomatozis 5. Fibroadenomatöz değişimler 6. Jinekomasti G. Meme başı tümörleri 1. Adenom 2. Karsinom 3. Epitel infiltrasyonlu karsinom H. Meme başının hiperplazisi / displazisi 1. Meme başı dersinin melanozu
--	---

Birçok meme tümörü epitelial kökenlidir. Bununla birlikte bazıları hem epitelial hem miyoepitelial dokuya ait histolojiler bulundurmaktadır. Çok az miktarda tümör tipi de mezenşimal kökenlidir (Sorenmo 2003).

Epitelial tümörler genellikle histopatolojik sınırlarına ve değişikliklerine göre sınıflandırılırlar. Malign epitelial tümörleri; karsinomlar ve bunların alt tipleri oluşturur. Karsinomlar; bazal membranı istila etmeyen malign karakterde bir epitelial tümördür (Goldschmidt ve ark. 2011). Bu lezyonlar genellikle multisentriktir ve önceden var olan kanallarda ve loblarda büyüyebilirler. Tubuler karsinomlar (adenokarsinom); köpeklerde en yaygın görülen meme tümörü tipidir. Bu tümörler, normal meme dokusunun orijinal tubular ve duktal morfolojilerinin bir kısmını yok ederler. Solid karsinomlar; daha az farklılaşmışlardır. Bu tümörler tubular/duktal yapılarını kaybetmişlerdir ve sert bir kağıt formundadırlar. Anaplastik meme bezi karsinomları; karsinom kategorilerinden hiçbirinde sınıflandırılmayan, farklılaşmamış, pleomorfik ve infiltratif epitelial tümörlerdir. Yangısal meme bezi karsinomları; ödem ve ağrıya sebep olacak şekilde derinin üzerini örten, yoğun yangı hücresi infiltrasyonuna sahip, derideki lenf kanallarında malign epitelial hücreler bulunduran, hızlı bir klinik ilerleme gösteren histopatolojik ve klinik özelliktedirler (Sorenmo 2003; Goldschmidt ve ark. 2011).

Dişi köpeklerde en yaygın görülen meme tümörü tipleri sırasıyla %46 oranında karsinom, %27 oranında kompleks karsinom ve %13 oranında karsinosarkomlardır (Tavasoly ve ark. 2013). Epitelial meme bezi tümörlerinin histopatolojik değişimi prognozu etkiler. Prognozun kötüleşmesi, farklılaşmanın kaybı ile alakalıdır. İn situ karsinom ve adenokarsinomlar, en iyi prognoza sahip iken anaplastik ve inflamatuvar karsinomlar en kötü prognoza sahip tümör tipleridir (Sorenmo 2003; Tavasoly ve ark. 2013). Malign miyoepiteliomlar veya mekik hücreli karsinomlar, meme dokusunun miyoepitelial hücrelerinden yükselen malign tümörlerdir ve köpeklerde nadiren görülürler (Sorenmo 2003).

Meme bezinin malign mezenşimal tümörleri sarkomlardır. Meme bezi sarkomları çok yaygın değildirler. Daha önceden var olan benign tümörlerin malign değişimi ile ya da interlobular stromadan geliştikleri düşünülmektedir. En yaygın görülen meme bezi sarkomları; osteosarkomlar ve fibrosarkomlardır. Bunu kondrosarkomlar ve liposarkomlar izler. Özellikle meme bezi osteosarkomları, erken dönemde kan yoluyla metastaz yapmaları ve kısa yaşam süresi sunmaları ile bilinirler (Goldschmidt ve ark. 2011).

Miks meme bezi tümörleri, kıkırdak ve kemik alanlara sahip miyoepitelial ve duktal hücreler içerirler (Sorenmo 2003). Malign miks tümörler, karsinosarkomlar olarak da bilinir ve köpeklerde çok yaygın değildirler (Goldschmidt ve ark. 2011). Malign miks tümörlü

köpeklerde prognoz zayıftır ve köpeklerde hastalığın ilk yılında metastaz gelişir. Tüm malign meme tümörleri metastaz yapma potansiyeline sahiptirler (Sorenmo 2003; Goldschmidt ve ark. 2011).

Metastazik risk ve süreç; tümör tipi, histolojik farklılaşma ve birçok prognostik klinik faktörlerle belirlenir. Genellikle malign epitelial tümörlerin metastazı lenf yoluyla bölgesel lenf düğümlerine ve akciğerlere, mezenseşimal tümörlerin metastazı ise tipik olarak kan yoluyla direkt akciğerlere olmaktadır. Malign meme tümörüne sahip köpeklerin yaşam süreleri benign meme tümörüne sahip köpeklerinkine göre daha kısadır (Sorenmo 2003).

Meme tümürlü köpeklerde malignite kriterleri olarak; tümör tipi, belirgin nükleer ve hücrel pleomorfizm, mitotik indeks, neoplazmaların üzerinde nekrotik bölgeleri varlığı, tümörün çevresel invazyonu, lenfatik invazyon ve bölgesel lenf yumrusu metastazı bildirilmiştir (Goldschmidt ve ark. 2011).

Meme tümörleri; Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği tümör, lenf nodu, metastaz (TNM) sistemine göre sınıflandırılırlar (Tablo 2.10-2.).

Tablo 2.10-2: Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği TNM Kısaltmaları (Owen 1980)

T: Tümör (a: fiske değil, b: deriye fiske, c: kasa fiske)	T ₀ : Tümör yok
	T ₁ : < 3 cm (a,b,c)
	T ₂ : 3-5 cm (a,b,c)
	T ₃ : >5 cm (a,b,c)
	T ₄ : Her boyutta tümör, yangısal karsinom
N: Bölgesel lenf düğümünün durumu (a: fiske değil, b: fiske)	N ₀ : Histolojik veya hücrel metastaz yok
	N ₁ : İpsilateral lenf nodu metastazı (a,b)
	N ₂ : Bilateral lenf nodu metastazı (a,b)
M: Uzak metastazlar	M ₀ : Uzak metastaz yok
	M ₁ : Uzak metastaz saptandı

Bu sebeple köpeklerde meme tümörlerinin sınıflandırılması, tümörün boyutu, lenf nodunun durumu, metastazın varlığı ile sağlanır. Derecelendirme sistemine göre tümörlerin sınıflandırılmasında en büyük çaptaki tümör kullanılır. Bu sınıflandırmada 'T' harfi tümörün

boyutunu, ‘N’ harfi bölgesel lenf yumrusunun gelişimini, ‘M’ harfi ise uzak metastazları ifade eder (Owen 1980) (Tablo 2.10-3).

Tablo 2.10.3. Dünya Sağlık Örgütü’nün Klinik Evre Sınıflandırılması (Owen 1980)

Evre I	T _{1(a,b,c)}	N ₀	M ₀
Evre II	T ₀ T _{1(a,b,c)} T _{2(a,b,c)}	N ₁ N ₁ N ₀ veya N _{1a}	M ₀
Evre III	T _{3(a,b,c)} Tüm T	Tüm N Tüm N _b	M ₀
Evre IV	Tüm T	Tüm N	M ₁

Birden fazla tümörü olan köpeklerde en büyük malign tümöre göre derecelendirme uygulanır. Direne eden lenf yumruları belirlenmelidir ve palpe edilebiliyorsa veya klinik olarak tümör genişlemişse sitolojik değerlendirme için ince iğne aspirasyon biyopsisi uygulanır (Sorenmo ve ark. 2011). Gilbertson ve ark. (1983), histolojik bakıyı ve biyolojik tutumu göz önünde bulundurarak, dişi köpeklerde meme karsinomlarının derecelendirilmesini amaçlamışlardır (Tablo 2.10-4).

Tablo 2.10-4: Histolojik ve biyolojik bakıya göre tümör gruplarının derecelendirilmesi – (Gilbertson ve ark. 1983)

Evre 0	Malign üreme meme kanallarının anatomik yapısına kadar sınırlandırılmıştır (<i>in situ karsinom</i>).
Evre 1	Malign üreme meme kanallarının anatomik sınırların ötesine kadar genişler, buraya komşu olan stromayı istila eder (<i>invazif karsinom</i> , vasküler ve lenf düğümü tanımlamasıyla) .
Evre 2	Vasküler ve lenfatik tutulumu sahip karsinom veya bölgesel lenf düğümünde metastazlar.
Evre 3	Bariz metastazik hastalık.

2.11. Meme Tümörlerinde Tanı Yöntemleri

Köpek meme tümörlerinde mortalitenin daha çok metastazlara bağlı olduğu bilinmektedir. Günümüzde malign meme tümürlü köpeklerde metastaz varlığının belirlenmesi için radyografi ve ultrasonografiden yararlanılmaktadır. Radyografiyle 6-8 mm’den fazla büyüklükteki akciğer lezyonları saptanabilir. Dört milimetre kadar küçük çaptaki erken

metastazları tespit edebilmek için bilgisayarlı tomografi (BT) geliştirilmiştir (Glasspool ve Evans 2000). Ancak bu yöntemler 0,4 cm çapından daha küçük metastaz odaklarını tespit edemediği için, hücresel yayılımlarla ilgili fikir vermemektedir. Meme tümörlü köpeklerde teşhis amacıyla cerrahi biyopsi yöntemlerinden yararlanılabilir. Bu yöntem dokunun histopatolojik incelemesini gerektirir ve ancak iyi huylu meme tümörü olgularında terapötik fayda sağlar. Bu amaçla ince iğne biyopsisi de kullanılır fakat iyi huylu tümör ile kötü huylu tümör ayrımını yapmakta başarı sağlamamaktadır (Sorenmo 2003). Sonuç olarak meme tümörlerinde metastazik potansiyelin prognozu ve teşhisi, cerrahi müdahale sonrası yapılan histopatolojik incelemeye bağlıdır. Bununla birlikte, metastaz şekillenmeden metastazik potansiyeli ortaya koyabilecek güvenilir bir histolojik kriter mevcut değildir ve histolojik prognoz ile hastalığın mevcut akıbeti arasında büyük farklılıklar vardır (Costa ve ark. 2011).

Kanser ile alakalı ölümlerin esas nedeni tümör değil, diğer organlara uzak metastazların oluşmasıdır. Meme kanseri; klasik görüntüleme ve laboratuvar yöntemleri ile teşhis edilemeyen mikrometastaz yapma özelliğine sahip olduğu için sistemik bir hastalık olarak düşünülmektedir (Ignatiadis 2008a; 2008b). Tümör gelişiminin erken evresi süresince tümörde gelişen kapillar damarlar ve kan damarları vasıtasıyla kanser hücreleri uzak organlara yayılırlar (Slade ve Coombes 2007). Epitelyal hücrelerin mezenşimal hücrelere değişimiyle, dolaşım sistemine metastazik hücrelerin girmesine olanak sağlayan proteazlar ve adhezyon molekülleri açığa çıkmaya başlar (Alunni-Fabbroni ve Sandri 2010).

Dolaşımdaki tümör hücreleri; tümörden veya onun metastazından dökülen, hastanın periferel kanında dolaşan neoplastik hücreler olarak tanımlanır (Ashworth 1869). Kemik iliğinde yayılan veya hastanın periferel kanında dolaşan tümör hücrelerinin varlığı, hastalığın tekrarlamasında ve hastalığa bağlı ölümlerde prognostik açıdan önem taşımaktadır. Özellikle kanda dolaşan tümör hücrelerinin varlığı, potansiyel metastazik hastalığın önemli bir göstergesi olabilir (Ignatiadis 2008a). Kanserli hastalardan alınan tam kan örneklerinden dolaşımdaki tümör hücrelerini izole etmek ve belirlemek için çeşitli analitik sistemler geliştirilmiştir. Bunlar; immunohistokimya (IHK), immunofloresans (IF), floresans akışlı hücre ölçümü (FAHÖ), ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (rt-PCR) gibi moleküler ölçümlerdir. Bu analizler, boyut ve biyolojik özelliklerine göre saflaştırılmış tümör işaretleyicilerini ayırt etmekte birbirinden farklı analitik metotlar kullanılmaktadırlar (Radhika ve Prayaga 2010). Dolaşan tümör hücrelerinin belirlenmesinde kullanılan tekniklerin, malign hücrelerden dolaşımdaki diğer tümör olmayan hematopoetik hücrelerin ayrımını yapabilecek özellikte ve duyarlılıkta olması gerekir. İmmun aracılı, sitometrik ve PCR esaslı stratejiler,

farklı performans özellikleriyle, dolaşan bir tümör hücresinin hücresel alt yapıdan ayrım şansını artırmaktadırlar (Smith ve ark. 2000). PCR esaslı analiz, dolaşan tümör hücrelerinin genetik görüntülenmesi için çok güçlü bir tekniktir ve birçok çalışmada PCR, immünohistokimya tekniğine göre daha hassas bulunmuştur (Lambrechts ve ark. 1999; Smith ve ark. 2000). PCR; 18-25 nükleotid uzunluğundaki kısa DNA dizilimlerinden oluşan oligonükleotid primerlerini kullanarak, enzimatik olarak spesifik DNA dizilimlerini büyüten ve böylece hedef DNA'daki ilgili bölgenin belirlenmesini sağlayan in vitro bir metottur (Ghossein ve ark. 1999). Real time PCR yöntemi, floresan maddelerle işaretli problemler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonunda DNA amplifikasyonunun floresan ölçümü sayesinde eş zamanlı olarak izlenebildiği bir yöntemdir. Bu yöntem nükleik asit miktarının kantitatif analizine olanak sağlamasının yanı sıra bilinen mutasyonların (ya da polimorfizimlerin) analizini de gerçekleştirebilmektedir (Alunni-Fabbroni ve Sandri 2010).

Ters transkriptaz PCR (rt-PCR) ise genellikle dolaşan tümör hücrelerine ait hedef mesajcı ribonükleik asitleri çoğaltma şansı veren nicel bir metottur (Bossolasco ve ark. 2002; Wang ve ark. 2006).

2.12. Meme Tümörleri Ve Metastazlarının Tanısında Kullanılan Belirleyiciler (Markerlar)

Tümör markerları; kan dolaşımında, vücut sıvılarında, tümöral dokuda ölçülebilen maddelerdir. Bunlar; onkofetal proteinler, hormonlar, enzimler, tümör antijenleri ve diğerleri (poliaminler, isoferitinler, nükleosidler, akut faz proteinleri) şeklinde sınıflandırılırlar. Marker proteinlerinin tamamı, sağlıklı hücrelerin de ürünleridir ve periferik kanda düşük seviyelerde olsa dahi ölçülebirlirler. Bazı markerlar ise bening tümörlerde, tümöral olmayan ve yangısal hastalıklarda artış gösterebilirler. Tümör belirleyicileri; kanser biyolojisinde, etiolojisinde, teşhisinde, tedavisinde ve prognozunda önemli rol oynamaktadır. Markerlar genellikle tümör hücrelerince üretilir. Buna bağılı olarak kitle büyüklüğü, kitle sayısı gibi parametrelerle marker düzeyleri arasında belirgin bir bağlantı olması gerektiği düşünülmektedir. Fakat bu durum; marker üreten hücrelerin miktarı, oranı, marker sentezleme hızları, markerların bu hücrelerdeki lokalizasyonu ve hücrelerin marker üretim mekanizmaları gibi faktörlerin etkisi altındadır (Küçükusta 1992).

İnsanlarda göğüs kanserinde dolaşımdaki tümör hücreleri; 10^6 - 10^7 periferik kan lökositinde 1 hücre olacak kadar düşük miktarlarda bulunmaktadırlar (Ross ve ark. 1993). Buna rağmen, insanlarda kanser üzerine yapılan çalışmalarda, kliniksel olarak belirgin

metastazların oluşumundan çok önce periferik kanda bu hücrelerin tespit edilebileceği bildirilmiştir (Hayes ve ark. 2006). İnsanlarda periferik kanda dolaşan tümör hücreleriyle göğüs kanserini teşhis etmek için birkaç mRNA çeşidi saptanmıştır (Mostert ve ark. 2009). İnsanlardaki en yaygın epitelyal belirleyiciler; sitokeratinler (CK) ve EPCAM'dir. Çünkü bu belirleyiciler hem hücre tiplerini hem de farklarını yansıtırlar ve epitelyal hücrelerde veya karsinomlarda bulunurlar (Tan ve ark. 2005; Alunni-Fabroni ve Sandri 2010). Hücre adhezyon melekülünde olduğu gibi sitoskeletal proteinler de her zaman epitelyal hücrelerde bulunurlar (Alunni-Fabroni ve Sandri 2010).

Yapılan bir çalışmada (Costa ve ark. 2011), insanlarda göğüs kanserinde dolaşan tümör hücreleri işaretleyicilerinden 16 tanesi, meme tümörlü köpeklerde dolaşan tümör hücrelerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Bunlar; sitokeratin-18 (CK-18), CK-19, EPCAM, ephrin tip B reseptör 4 (EPHB4), CD44, CLDN7, epidermal büyüme faktör reseptörü-2 (ERBB-2), hepatosit büyüme faktör reseptörü (c-Met), EGFR, ELF3, GABA A π , musin-1 (MUC-1), Maspin, matriks metalopeptidaz 9 (MMP9), plazminojen aktivatör ürokinaz reseptörüdür (PLAUR). Bunların içinden PCR ölçümlerinde periferik kanda karsinom hücrelerini tespit etmekte en duyarlı işaretleyiciler CLDN7, EGFR, ERBB2, ELF3 ve CK19 olarak belirlenmiştir. Costa ve ark. (2011) yaptığı çalışmada, meme tümörlü köpeklerin dolaşımındaki tümör hücrelerine uygun işaretleyiciler sağlıklı köpeklerin periferik kanında saptanmamış olup metastatik meme tümörlü köpeklerde yüksek oranda saptanmıştır.

Dolaşımdaki tümör hücrelerinin belirlenmesinde kullanılan teknikler, dolaşımdaki diğer tüm hematopoetik hücrelerden malign hücreleri ayırmaya spesifik ve yeteri kadar hassas olmalıdırlar. Farklı performans özellikleriyle immün bazlı, sitometrik ve PCR bazlı teknikler, dolaşımdaki tümör hücrelerini diğer hücrelerden ayırma şansını arttırmayı hedeflemektedir (Alunni-Fabroni ve Sandri 2010). Yapılan bir çalışmada (Criscitiello ve ark. 2010), sitometrik/antikor esaslı ve moleküler yaklaşımlar kullanılarak da periferik kandaki epitelyal tümör hücrelerinin saptanabileceği ve bu amaçla kullanılan birçok tekniğin, sadece EPCAM-pozitif hücreleri tespit edebileceği ve dolaşımdaki tümör hücrelerine ait alt populasyonu kliniksel olarak kaçırabilecekleri bildirilmiştir. EPCAM ve CD49f öncelikle insanlarda normal meme dokusundan köken alan bazal ve luminal hücrelerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada (Keller ve ark. 2010), mammaplastik dokudan üretilen epitel hücreleri karakterize etmekte akış sitometrisi kullanılarak daha faydalı ve kullanışlı olduğu düşünülen EPCAM ve CD49f ekspresyonu uygulanmıştır.

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, HER-1 veya c-erbB1), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü ailesinin bir üyesidir. Bu aile tirozin kinaz reseptörüne sıkı sıkıya

bağlı dört üyeden (EGFR, HER-2/neu veya c-erbB2, HER3 veya c-erbB3 ve HER4 veya c-erbB4) oluşur ve günümüz literatüründe büyük önem arz etmektedir (Hynes ve Lane 2005; Park ve ark. 2007; Sassen ve ark. 2008). EGFR; insanlardaki neoplazmalarla doğrudan ilişkili olan ilk transmembran tirozinkinaz reseptörüdür (Hynes ve Lane 2005). Ayrıca hücrel üreme, damarlaşma, metastaz sürecinde ve tümör gelişiminde rol almaktadır (Shien ve ark. 2005). EGFR; köpeklerde meme dokusunda birçok metotla saptanabilmekte olup yapılan bir çalışmada normal, benign ve malign meme dokusuna immunohistokimya uygulanmış ve klinik patolojik parametreler ile yaşam süresi arasında korrelasyon sağlanmıştır (Rutteman ve ark. 1994). Buna göre biyolojik önemine, potansiyel teşhise ve prognostik kullanımına yönelik bilgiler elde edilmiştir. Köpeklerdeki meme tümörlerinde, EGFR'nin immunohistokimyasal ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalar, ekspresyon ve tümörün agresifliği arasında bir bağlantı olduğunu belirtmektedirler (Gama ve ark. 2009). Siklooksijenaz-2 (COX-2) ve EGFR; hücrenin yaşamı, çoğalması, damarlaşma ve invazyon gibi kanser gelişiminin çeşitli evrelerinde görev paylaşımı yapmaktadırlar (Dannenberg ve ark. 2005). Tirozinkinaz reseptörü (erbb1), EGFR ve ilgili faktörler, insanlardaki epitelyal neoplazmalarda tümör oluşumuna neden olan birçok faktöre aracılık etmektedir. EGFR, köpek meme tümörlerinde malign fenotipe sahip birçok özelliği düzenler. Böylece, EGFR'ye yönelik yeni tedavilerin araştırılması köpek meme tümörleri için önemli dönüşümsel bir model olabileceği düşünülmektedir (Kennedy ve ark. 2011).

Klaudinler (CLDN); 17-27 kDa integral membran sıkı bağlama (tight junction-TJ) proteinleri ailesindendir. TJ; epitelyal ve endotelyal hücre katmanlarında hücreden hücreye yapışmanın sunulma şeklidir. CLDN proteinleri, TJ oluşumu ve işlevi açısından çok önemlidirler. İlk klaudin geni olan oklaudin (CLDN1), integral TJ proteini ile etkileşim içinde olan murin proteinlerini görüntüleme sırasında bulunmuştur (Furuse ve ark. 1998). CLDN proteinleri; luminal bariyerin korunmasında, dinamik hücrel bağ oluşturmada, paraselüler taşımada ve sinyal iletiminde etkilidirler. Normal TJ fonksiyonunun kaybı, insanlardaki karsinomların karakteristik özelliğidir. Klaudinler, TJ homeostazında ve bariyer oluşumunda merkezi bir rol oynamaktadırlar. Bunun sonucu olarak, farklılaşmış epitelyal doku veya endotelyumda yerel kaludinlerin yuvalanması ve ekspresyonu, intravazasyon ve ekstravazasyon işlemi süresince, invaziv ve dolaşan karsinomlara karşı ilk koruyucu bariyeri oluşturmalarını sağlar (Swisshelm ve ark. 2005). İnsanlarda, CLDN ailesinin 24 üyesi tanımlanmıştır. Anormal TJ fonksiyonu ve epitelyal tümör gelişimi arasındaki ilişki, insanlarda epitelyal kanserlerde TJ yapısındaki değişiklikleri ortaya koyarak yapılan çalışmalarca açığa çıkarılmıştır (Martinez-Palomo 1970).

Klaudinler; immunohistokimya, RT-PCR, gen ekspresyonunun seri analizi (SAGE), yarı-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (sqRT-PCR), Western gibi metotlar kullanılarak saptanabilirler ve genellikle plazma membranında ve sitoplazmada lokalizedirler (Swisshelm ve ark. 2005). CLDN3, CLDN4 ve CLDN7; pankreas, mesane, tiroid, fallop tüpleri, ovaryum, mide, kolon, göğüs, uterus ve prostattan köken alan birçok malignitede yüksek miktarlarda bulunmuştur (Hewitt ve ark. 2006). Özellikle CLDN3 ve CLDN4 miktarı; göğüs, ovaryum ve prostat tümörlerinde artar. Ayrıca CLDN4 pankreas kanserinde, CLDN6 ve CLDN7 insanlarda meme bezi neoplazmalarında yüksek oranda saptanır (Swisshelm ve ark. 2005). CLDN7'nin ekspresyonunun, insanlarda invaziv meme kanalı karsinomunda normal göğüs epiteline göre daha düşük olduğu ve ekspresyonun karsinomun histolojik evresiyle ters orantılı olduğu bildirilmiştir (Kominsky ve ark. 2003). Klaudinler, köpeklerdeki meme epitel hücrelerinin TJ işlevinin ayrılmaz bir parçasıdır. İnsanlardaki meme dokusu ile karşılaştırıldığında, aynı klaudinler köpek meme epitelinde de bulunmaktadır (Tökes ve ark. 2005). CLDN7 ekspresyonu meme bezlerinin kanal karsinomunun yanı sıra yemek borusunun, dilin, baş ve boynun skuamöz hücreli karsinomunun metastazında, tümör invazyonunda indirgendiği yapılan çalışmalarca bildirilmiştir (A.l.Moustafa ve ark. 2002; Usami ve ark. 2006; Bello ve ark. 2008). Yapılan diğer bir çalışmada ise (Dahiya ve ark. 2011), CLDN7'nin ovaryum kanserinin teşhisinde potansiyel belirleyici olabileceği saptanmıştır. Ayrıca kolorektal kanserde karaciğer metastazı ve venöz invazyon ile CLDN7 geninin ekspresyonunun indirgenmesi ilişkilendirilmektedir. Bu sebeple CLDN7'nin kaybının veya azalan seviyeleri, yeni bir belirleyici veya metastaz öngörücü olabileceğini araştırmacılar tarafından savunulmaktadır (Oshima ve ark. 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Çalışma grubu İ.Ü. Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji kliniğine getirilen 11,19±0,41 yaşında ve 16,26±1,49 kg ağırlığında, 45 adet meme tümörlü köpekten oluşmaktadır. Kontrol grubu ise kliniğimize kısırlaştırma amacıyla getirilen ortalama 5,94±1,21 yaşında ve 20,16± 2,73 kg ağırlığında, 9 adet sağlıklı köpekten oluşmaktadır.

3.2. Klinik Muayene

Tüm köpeklerin genel muayenesi yapıp, anamnez bilgileri arşivlendi. Operasyon öncesinde köpeklerin hemogram, glikoz, üre, kreatinin, alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) parametreleri değerlendirildi. Akciğer ve kalp yönünden değerlendirilmesi için ventrodorsal, laterolateral sağ ve sol olmak üzere 3 poz thoraks radyografisi görüntülendi.

3.3. Anestezi ve Operatif Müdahale

Tüm köpekler 4 mg/kg dozunda iv yolla propofol (Propofol-Lipuro %1, B. Braun Melsungen AG, Almanya) ile indüklendikten sonra entübe edildi. Entübasyonu takiben %3-4 oranında isofloran (Forane likid, Abbot Laboratuvarı, İngiltere) ve oksijenizasyon ile anestezinin devamı sağlandı.

Kontrol grubunu oluşturan köpeklere rutin kısırlaştırma operasyonu uygulandı. Köpeklerin abdominal bölgesinin traş ve dezenfeksiyonu sağlandıktan sonra, göbek deliğinin 1-2 cm gerisinden yapılan ensizyon ile abdominal boşluğa girildi. Ovaryumlar ve uterus ligatüre edilerek (Monocryl No:0, Medeks, Türkiye) uzaklaştırıldıktan sonra laparotomi ensizyonu basit ayrı dikişle kapatıldı. Çalışma grubundaki meme tümörlü köpeklerin traş ve dezenfeksiyonu sağlandıktan sonra total bilateral mastektomi ile tüm meme lobları ve ilgili lenf yumruları uzaklaştırıldı. Her iki gruptaki köpeklerin periton, kas ve deri altı bağ dokusu monofilament iplikle (Monocryl No:0, Medeks, Türkiye) dikildikten sonra deri emilemeyen iplikle (Propilen No:0, Doğsan, Türkiye) kapatıldı.

3.4. Histopatolojik İnceleme

Mastektomi sonrası elde edilen tümörlü meme dokusu çalışmamızda altın standart olarak kabul edilen histopatolojik tip ve derecelendirmenin yapılması için İ.Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi. Meme tümörlerinin histopatolojik tipinin belirlenmesinde, Dünya sağlık örgütünün 2010 yılında yaptığı köpek meme tümörleri sınıflandırması esas alındı (Tablo 3.4-1). Çalışmamızda bakılacak olan EPCAM, EGFR ve CLDN7 markerları epitelyal tümörlerde bulunduğu (Swisshelm ve ark. 2005; Alunni-Fabroni ve Sandri 2010; Tang ve ark. 2012) çalışma grubumuzu, histopatoloji sonucuna göre malign epitelyal tümörlü 45 adet köpek oluşturmaktadır. Dünya sağlık örgütünün 1983 yılında kabul ettiği histolojik ve biyolojik bakıya göre tümör tiplerinin derecelendirilmesi esas alınarak grade 0, grade 1, grade 2 ve grade 3 olarak (Tablo 3.4-2) gruplandırıldı (Gilbertson ve ark. 1983).

Tablo 3.4-1: Köpeklerde epitelyal tip meme tümörlerinin histopatolojik sınıflandırması

A. Malign epitelial tümörler	B. Malign Epitelial Tümörler – Özel tipler
1- Karsinom- in situ	1- Yassı (skuamöz) hücreli karsinom
2- Karsinom –basit	2- Adenoskuamöz karsinom
a) Tubular	3- Musinöz karsinom
b) Tubulopapiller	4- Yağ hücreli (sekretörük) karsinom
c) Kistikpapiller	5- Mekik hücreli karsinom
d) Kribriform	6- Yangısal karsinom
3- Karsinom – mikropapiller invaziv	C. Karsinosarkomlar- Malign Miks Tümörler
4- Karsinom – solid	
5- Komedokarsinom	
6- Karsinom – anaplastik	
7- Kompleks adenom/ miks tümörün içinde gelişen karsinom	
8- Karsinom- kompleks tip	
9- Karsinom ve malign miyoepiteliom	
10- Karsinom- miks tip	
11- Duktal karsinom	
12- İntraduktal papiller karsinom	

Tablo 3.4-2: Histolojik ve biyolojik bakıya göre tümör tiplerinin derecelendirilmesi

Evre 0	Malign üreme meme kanallarının anatomik yapısına kadar sınırlandırılmıştır.
Evre 1	Malign üreme meme kanallarının anatomik sınırların ötesine kadar genişler, buraya komşu olan stromayı istila eder.
Evre 2	Vasküler ve lenfatik tutulumu sahip karsinom veya bölgesel lenf düğümünde metastazlar.
Evre 3	Bariz metastazik hastalık.

3.5. Kan Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

Tüm köpeklerin vena jugularis bölgesinin traş ve dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra yeşil renk vakumlu iğne ucu kullanılarak etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) içeren 2 ml'lik steril tüplere operasyon öncesi dönemde kan alındı. Anamnez bilgilerinin yazılı olduğu formdaki numara ve çalışma/kontrol grubu olduğu belirtilerek tüpler etiketlendi. Her bir köpek için önceden hazırlanmış olan iki adet ependorf tüpüne 0,5 ml EDTA'lı kandan ve 1,3 ml RNA-later solüsyonundan katıldı. Tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra nazikçe iki defa alt üst edilerek -20°C'de depolandı.

3.6. RNA İzolasyonu

Çalışma ve kontrol gurubuna ait kan numuneleri toplandıktan, her ayın sonunda o ay içinde toplanan numunelerden RNA izole edilerek -86°C soğutucularda saklandı. RNA izolasyonu için Jena Bioscience (Almanya) firmasından tedarik edilen PP-210S katalog numaralı total RNA putrifikasyon ticari kiti kullanıldı. Kitin prosedürüne göre hazırlanan 1,8 ml'lik kan ve RNA-later solüsyonu karışımı öncelikle mikrosantrifüj cihazında 1 dakika santrifüj edilerek iki faza ayrıldı. Üstte kalan sıvı kısım (supernatant) uzaklaştırıldı. Tüpün alt kısmında kan hücreleri ve plazma proteinlerini içeren 'pellet' olarak adlandırılan koyu kahverengi kısma, kan hücrelerini eritmek için 800 µl Lysis solüsyonu ve 50 µl Sodyum Asetat solüsyonu eklenerek tüp karıştırıcıda homojenizasyon sağlanana dek karıştırıldı. Elde edilen homojen karışıma 500 µl Asit fenol kloroform eklenerek, 30 saniye tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika beklettikten sonra iki ayrı faz elde etmek için karışım mikrosantrifüj cihazında 1 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan, RNA içeren sıvı faz 2 ml'lik steril bir ependorf tüpüne aktarıldı. Elde edilen sıvı fazın hacmi her bir numune için 1-1,2 ml arasında değişmekteydi. Bu fazın içine 600 µl %100 etanol (Taç Kimya, Türkiye) eklenerek sertçe karıştırıldı ve ependorf tüpünün etrafında kalan sıvıyı toplamak için 1 dakika santrifüj edildi. Her numune için 100 µl konulacak şekilde kitin içinde bulunan RNaz içermeyen tüpe

ayırıştırma solüsyonu ilave edilerek, hazırlanan bu solüsyon 75°C'ye ısıtıldı. Her bir numune için kitin içindeki tüpleri etiketledikten sonra, tüpün içine filtreli kartuş yerleştirildi. RNA eldesinde kullanılmak üzere kit içindeki toplama tüplerinden bir seri daha hazırlandı. Numunelerden 700 µl filtreli kartuşa döküldükten sonra sıvının filtreden geçmesi için 5-10 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonunda dibe çöken sıvı kısım uzaklaştırıldı. RNAları tutan filtre yine aynı tüpe yerleştirildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Filtreli kartuşa 700 µl 1 numaralı yıkama solüsyonu eklenerek 5-10 saniye santrifüj edildi. Dipte kalan sıvı dökülerek filtreli kartuş tekrar aynı tüpe yerleştirildi. Bu kez 2/3 numaralı yıkama solüsyonundan yine 700µl filtreli kartuşa eklenerek 5-10 saniye santrifüj edildi. Filtreden geçen sıvı dökülerek filtre aynı tüpe yerleştirildi ve bu işlem 2/3 numaralı yıkama solüsyonu için iki defa tekrarlandı. Son yıkamadan sonra tüpün altında toplanan sıvı dökülüp aynı filtreli kartuş tüpe yerleştirildi. Kalıntı sıvıların filtreden akıp gitmesi için 1 dakika santrifüj edilip ve dibe çöken sıvı atıldı. Daha önceden etiketlenerek hazırlanan kit içindeki toplama tüplerine filtreli kartuşlar yerleştirildi. Filtrenin merkezine önceden 75°C'de ısıttığımız ayırıştırma solüsyonundan 50 µl ilave edildi. Tüpün kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 20 saniye bekletildikten sonra en yüksek hızda 20-30 saniye santrifüj edildi. Aynı işlem bir kez daha tekrarlandı ve böylece tüpün dibinde 100 µl RNA elde edildi. Bu şekilde de -20°C ve daha altındaki sıcaklıkta elde edilen RNA saklanabilir fakat RNA içeren bu sıvının içinde bulunabilecek olası DNA parçacıklarını uzaklaştırmak için kısa bir işlem daha uygulandı. Bunun için elde edilen RNA'ya, 1/20 hacminde 20x DNaz tampon maddesi ve 1 µl DNaz ilave edildi. Karışım yavaşça fakat iyice karıştırıldı ve 37°C'de 30 dakika inkubasyona bırakıldı. Elde edilen RNA miktarının %20'si kadar DNaz inaktivasyon ayracı eklendi. Eklenen ayraç ve RNA karıştırıcı ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2 dakika beklettikten sonra 1-2 kez tüpe parmakla hafifçe vurmak suretiyle tekrar karıştırıldı. DNaz inaktivasyon ayracını çöktürmek ve bu karışımdan RNA'yı ayırmak amacıyla 1 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan RNA, steril olan ayrı bir ependorf tüpüne aktarıldı.

RNA izolasyonu yapıldıktan sonra tüm örneklerin RNA konsantrasyonları ve saflıkları Thermo Scientific Nanodrop 2000 cihazı ile ölçüldü. 1 µl RNA örneği alınıp cihaza konularak konsantrasyon miltarı ve 260/280 ve 260/230 oranlarına bakılarak saflıkları belirlendi. Elde edilen RNA'lar -80°C sıcaklığındaki derin dondurucularda saklandı.

3.7. cDNA Sentezi

En düşük RNA konsantrasyonu (ng/ml) baz alınarak RNA miktarları eşitlendi. Bunun için yeni ependorf tüpleri etiketlendikten sonra RNA'ların üzerine DNaz-RNaz içermeyen su ilave edilerek toplamda 20 ng/ml olacak şekilde bir dilüsyon hazırlandı. Dibe çöken RNA'ların su ile karışması için karışımın olduğu ependorf tüplerini mikrosipin cihazında birkaç tur döndürüldü. Kopya deoksiribonükleik asit (cDNA) sentezi için Jena Bioscience (Almanya) firmasının PCR-511L katalog numaralı kiti kullanıldı. cDNA sentez reaksiyonu aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

RNAse free su.....10 µl
 Script RT Buffer (5X).....4 µl
 Oligo-(dT) 20 primer (100uM).....0,5 µl
 dNTP Mix 10 mM her biri.....1 µl
 DTT stock solüsyonu 100 mM.....1 µl
 RNase İnhibitör 40 ünite/ul.....1 µl
 SCRIPT Reverse Transcriptase 200 ünite/ul.....0,5 µl

Karışım 2 ml' lik ependorf tüplerine koyuldu. Daha sonra bu karışımdan reaksiyon başına 18 µl olacak şekilde 0,2 µl' lik PCR tüplerine koyuldu. Üzerine 2 µl RNA örnekleri eklenerek toplam hacim 20 µl yapıldı. Tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Tüpler önce 42°C 10 dakika, daha sonra 50°C 1 saat olacak şekilde inkübe edilip, BioRad T100 thermal cycler (California, ABD) cihazı kullanılarak, cDNA sentez işlemi gerçekleştirildi. İşlem sonrası oluşan cDNA +4°C Real Time işlemi yapılana kadar saklandı.

3.8. Real Time PCR

Yapılan çalışmada elde edilen cDNA'dan Jena Bioscience (Almanya) firmasından tedarik edilen PCR-306L katalog numaralı nicel polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) GreenMaster UNG/lowROX kiti ve EGFR, CLDN7 ve EPCAM'e ait primer dizileri kullanılarak Real time PCR işlemi gerçekleştirildi. Real time PCR cihazı olarak Agilent Stratagene MX3005P kullanıldı. Real Time PCR işlemi aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

PCR grade Su.....6,8 µl
 qPCR GreenMaster with UNG/lowROX.....10 µl
 Forward Primer(10µM).....0,6 µl
 Reverse Primer(10µM).....0,6 µl

Karışım 2 ml' lik ependorf tüplerine konuldu. Daha sonra bu karışımdan reaksiyon başına 18 µl olacak şekilde uygun 96 kuyucuklu PCR tablaları içerisine konuldu. Üzerine 2 µl cDNA ürünü eklendi. Sonra seal ile kapatıldıktan sonra table cihaza konuldu. Real Time programı aşağıdaki şekilde gerçekleşti.

Urasil N-Glikosilaz (UNG) işlemi: 50°C, 2 dakika, 1 siklus

Birinci denatürasyon ve polimeraz aktivasyonu: 95°C, 2 dakika, 1 siklus

Denatürasyon: 95°C, 15 saniye, 40 siklus

Annealing: 50°C, 20 saniye, 40 siklus

Elongasyon: 72°C, 30 saniye, 40 siklus

Housekeeping gen olarak ATP5B geni kullanıldı. Real Time işlemi sonucunda elde edilen her bir örneğe ait her bir genin eşik değeri (Ct), o örneğin housekeeping Ct değerinden çıkartılarak delta siklus eşiği (ΔCt) değerleri hesaplandı. Daha sonra her bir hastanın ΔCt değerleri kontrol grubunun Ct değerinden çıkartılarak delta-delta siklus eşiği ($\Delta\Delta Ct$) değerleri hesaplandı. Son olarak; her bir genin ne kadar eksprese olduğu hesaplamak için, son değerlerin başlangıça olan oranı alınarak (fold change) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri belirlendi.

Tablo 3.8-1: Laboratuvar analizlerinde kullanılan cihazlar, kullanım amaçları ve menşei

CİHAZ ADI VE MODELİ	KULLANIM AMACI	MENŞEİ
Thermo Scientific Nanodrop 2000	RNA miktarının ve saflığının belirlenmesi	Amerika
BioRad T100 Thermal Cycler	cDNA sentezi	Amerika
Agilent Stratagene MX3005P	Real time PCR	Amerika
Arçelik derin dondurucu (-20°C)	Kan numunelerinin saklanması	Türkiye
Evermed Ultra Derin Dondurucu (-86°C)	İzole edilen RNA'ların saklanması	İtalya

3.9. İstatistik Analizler

Tümör tipinin, kitle büyüklüğünün ve yaşı; EPCAM, EGFR, CLDN7, RNA miktarı, WBC, PLT ve kitle sayısı parametreleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (Oneway ANOVA) ve Duncan testi; tümör derecesinin, kısırlaştırmanın, ülserasyonun, metastaz durumunun aynı parametreler üzerine etkisini belirlemek içinse bağımsız örneklem t-testi uygulandı. Elde edilen bulgulardaki ortalama veriler standart hata değerleriyle birlikte verildi. EPCAM, CLDN7, EGFR, kitle sayısı parametreleri arasındaki ilişki Pearson korrelasyon testi ile değerlendirildi. Tümör derecesi, tümör tipi, ülserasyon, metastaz ve kitle büyüklüğü parametrelerinde EPCAM, CLDN7 ve EGFR genlerinin yüksek/düşük regülasyon durumları da ki-kare testi ile belirlendi. İstatistik analizler için SPSS 22.0 (IBM SPSS Statistics, ABD) programı kullanıldı. $P<0,05$, $P<0,01$ ve $P<0,001$ değerleri önemli olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Muayene Bulguları

Alınan anamnez doğrultusunda, çalışma grubundaki tümörlü 45 köpekten 6 tanesinin daha önce kısırlaştırılmadığı tespit edildi. Çalışma grubundaki köpeklere ait meme tümörlerinin 15 tanesinin 5 cm'den küçük, 26 tanesinin 5-10 cm arasında, 4 tanesinin de 10 cm'den büyük olduğu ve ortalama $4,09 \pm 0,37$ sayıda meme lobunda bulunduğu saptandı. Tümör varlığında ve RNA izolasyonunda önem arz eden PLT ve WBC parametrelerinin ortalama değerleri, meme tümörlü köpeklerde sırasıyla $522,71 \pm 30,83 \mu\text{l}$ ve $19,13 \pm 1,88 \times 10^3 \mu\text{/ml}$, kontrol grubundaki sağlıklı köpeklerde sırasıyla $324,89 \pm 74,68 \mu\text{l}$ ve $18,38 \pm 4,41 \times 10^3 \mu\text{/ml}$ olarak ölçüldü. Lenf yumrularının palpasyonu, akciğer radyografisi ve ultasonografik muayenede meme tümörlü köpeklerin 22 tanesine makroskopik olarak metastaz teşhisi konuldu.

4.2. Histopatolojik İnceleme Bulguları

Total mastektomi operasyonundan sonra elde edilen meme dokusuna yapılan histopatolojik inceleme sonucunda, malign epiteliyal tip meme tümörlü olguların Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı sınıflandırmaya göre dağılımı tablo 4.2-1'de belirtilmektedir. Çalışma grubundaki köpeklerin hepsine ait tümörler, malign epitelyal tip tümör teşhisi konuldu. Histopatolojik olarak derecelendirilen meme tümörlerinden 3 tanesi Grade 0, 13 tanesi Grade 1, 13 tanesi Grade 2 ve 16 tanesi Grade 3 olarak ölçüldü.

Tablo 4.2-1: Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı sınıflandırmaya (2010) göre malign epitelyal tümörlerin vakalara göre dağılımı

Dünya Sağlık Örgütü'nün Sınıflandırması (2010)	Vaka Sayısı
Malign Epitelial Tümörler	
A) Karsinom-in situ	-
B) Karsinom- basit	
a) Tubular	7
b) Tubulopapillar	9
c) Kistikpapillar	-
d) Kribriform	-
C) Karsinom- Mikropapillar invaziv	-
D) Karsinom- solid	6
E) Komedokarsinom	-
F) Anaplastik karsinom	-
G) Kompleks adenom	-
H) Karsinom- kompleks tip	18
I) Karsinom ve malign miyoepiteliom	-
J) Karsinom- miks tip	-
K) Duktal karsinom	-
L) İntraduktal papillar karsinom	-
Malign Epitelial Tümörler – Özel Tip	
A) Yassı (squamos) hücreli karsinom	-
B) Adenosquamos karsinom	-
C) Musinöz karsinom	-
D) Yağ hücreli karsinom	-
E) Mekik hücreli karsinom	-
F) Yangısal karsinom	-
Karsinosarkomlar – Malign miks tümörler	
A) Karsinosarkom	3
B) Malign miks tumor	2

4.3. İzole Edilen RNA Miktarları

Çalışma ve kontrol gurubuna ait köpeklerden alınan ve RNA'nın bozulmasını geciktirici özel bir solüsyon içinde saklanan kanlardan izole edilen RNA miktarları ölçüldükten sonra kalan RNA'lar -86°C 'de saklandı. RNA izolasyonu sırasında şekillenen protein kontaminasyonu (260/280) ve solvent kontaminasyonu (260/230) değerleriyle hesaplandı. Meme tümörlü köpeklerden alınan kandan ortalama $62,12 \pm 7,99$ ng/ml RNA izole edilirken, kontrol grubundaki köpeklerden alınan kandan ortalama $36,82 \pm 4,86$ ng/ml RNA izole edildi.

4.4. EPCAM, CLDN7 ve EGFR Genlerine Ait PCR Sonuçları

Çalışma grubundaki köpeklere ait ortalama EPCAM (ΔCt) değeri $4,54 \pm 0,22$, CLDN7 (ΔCt) değeri $7,24 \pm 0,19$ ve EGFR (ΔCt) değeri $6,12 \pm 0,17$ olarak ölçüldü. Kontrol grubundaki köpeklere ait ortalama EPCAM (ΔCt) değeri $3,83 \pm 0,52$, CLDN7 (ΔCt) değeri $5,04 \pm 0,27$ ve EGFR (ΔCt) değeri $4,84 \pm 0,39$ olarak ölçüldü. Çalışma grubundaki meme tümörlü köpeklerin EPCAM, CLDN7, EGFR değerlerine ait ΔCt sonuçları tablo 4.4-1'de, kontrol grubundaki sağlıklı köpeklerin EPCAM, CLDN7, EGFR ΔCt sonuçları ise tablo 4.4-2'de gösterildi.

Tablo 4.4-1: Çalışma grubundaki köpeklere ait EPCAM, CLDN7, EGFR tümör belirleyicilerinin ΔCt değerleri

Çalışma grubu	EPCAM (ΔCt)	CLDN7 (ΔCt)	EGFR (ΔCt)
1	7,61	5,80	5,84
2	5,35	8,54	7,51
3	3,65	9,23	8,04
4	3,28	7,90	6,43
5	4,30	8,25	8,09
6	3,05	9,58	6,11
7	3,44	5,87	5,39
8	2,61	6,57	5,26
9	4,75	7,13	6,57
10	6,31	7,22	6,10
11	4,68	6,79	6,66
12	6,28	8,68	8,29
13	4,81	7,41	7,10
14	4,09	7,31	7,61
15	5,88	9,31	7,2
16	3,47	8,24	6,47

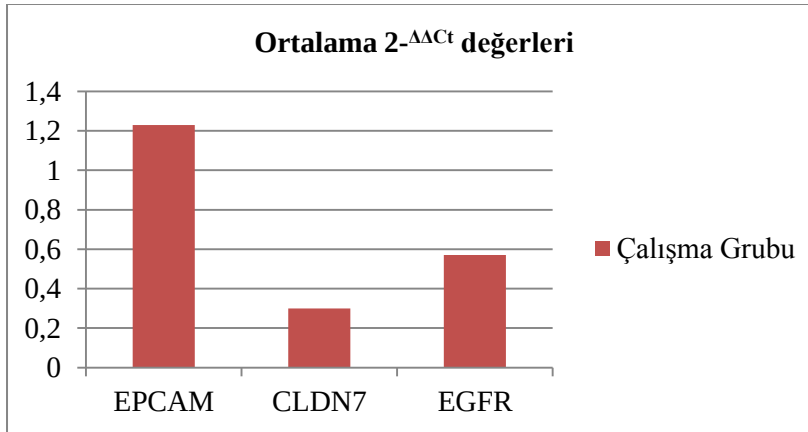
Çalışma grubu	EPCAM (ΔCt)	CLDN7 (ΔCt)	EGFR (ΔCt)
17	4,46	8,07	6,88
18	4,47	7,94	6,88
19	5,39	8,05	8,19
20	5,43	10,61	6,51
21	4,12	7,17	6,06
22	6,17	7,73	5,7
23	4,01	5,01	6,66
24	3,47	7,53	4,04
25	5,20	5,35	4,24
26	1,94	6,72	4,82
27	2,09	6,16	4,54
28	5,04	5,58	3,74
29	5,38	7,56	7,14
30	4,59	6,09	6,17
31	5,73	6,26	5,58
32	5,91	6,82	5,15
33	5,86	6,6	6,44
34	3,42	7,33	5,02
35	0,52	5,33	3,71
36	0,26	5,09	3,72
37	3,64	8,23	6,23
38	6,20	7,27	6,36
39	3,93	6,72	6,18
40	5,45	10,08	6,16
41	4,83	7,09	6,00
42	6,56	6,94	6,27
43	6,21	6,96	6,48
44	5,31	6,12	5,84
45	5,72	5,45	6,20

Tablo 4.4-2: Kontrol grubundaki köpeklere ait EPCAM, CLDN7, EGFR tümör belirleyicilerinin ΔC_t değerleri

Sağlıklı köpekler	EPCAM (ΔC_t)	CLDN7 (ΔC_t)	EGFR (ΔC_t)
K1	5,52	6,71	6,13
K2	5,70	5,91	6,59
K3	4,60	5,13	4,85
K4	2,86	4,18	4,13
K5	1,92	4,24	4,07
K6	3,37	4,47	3,63
K7	1,39	4,68	3,36
K8	3,97	4,69	4,70
K9	5,17	5,37	6,11

Tümörlü köpeklere ait genlerin, kontrol grubundakilere göre ne oranda eksprese olduğunu $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri göstermektedir (Şekil 4.4-1). Elde edilen değerin 1'den küçük olması o genin, elde edilen değer kadar kat az eksprese olduğunu (downregule) göstermektedir. Eğer elde edilen değer 1'den büyük ise gen o değer kadar kat fazla eksprese olduğu (upregule) anlamına gelmektedir. Çalışmamızdaki köpeklere ait EPCAM, EGFR ve CLDN7 genlerinin ekspresyon sonuçları Tablo 4.4-3'te verildi.

Şekil 4.4-1: Çalışma grubundaki köpeklerin EPCAM, CLDN7, EGFR markerlarının ortalama $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri



Tablo 4.4-3: Çalışma grubundaki köpeklere ait EPCAM, CLDN7 ve EGFR genlerin ekspresyon sonuçları

Materyal no	EPCAM (2- $\Delta\Delta C_t$)	CLDN7 (2- $\Delta\Delta C_t$)	EGFR (2- $\Delta\Delta C_t$)
1	0,07	0,59	0,50
2	0,35	0,09	0,16
3	1,14	0,05	0,11
4	1,47	0,14	0,33
5	0,73	0,11	0,11
6	1,73	0,04	0,42
7	1,31	0,56	0,68
8	2,35	0,35	0,75
9	0,53	0,24	0,30
10	0,18	0,22	0,42
11	0,56	0,30	0,28
12	0,18	0,08	0,09
13	0,51	0,19	0,21
14	0,84	0,21	0,15
15	0,24	0,05	0,20
16	1,29	0,11	0,32
17	0,65	0,12	0,24
18	0,65	0,13	0,24
19	0,34	0,12	0,10
20	0,33	0,02	0,32
21	0,82	0,23	0,43
22	0,20	0,16	0,55
23	0,89	1,02	0,28
24	1,29	0,18	1,74
25	0,39	0,81	1,52
26	3,73	0,31	1,01
27	3,36	0,46	1,23
28	0,44	0,69	2,15
29	0,34	0,17	0,20
30	0,59	0,48	0,40
31	0,27	0,43	0,60

Materyal no	EPCAM (2 ^{-$\Delta\Delta C_t$})	CLDN7 (2 ^{-$\Delta\Delta C_t$})	EGFR (2 ^{-$\Delta\Delta C_t$})
32	0,24	0,29	0,81
33	0,25	0,34	0,33
34	1,33	0,20	0,88
35	9,99	0,82	2,19
36	11,92	0,97	2,17
37	1,14	0,11	0,38
38	0,19	0,21	0,35
39	0,94	0,31	0,39
40	0,33	0,03	0,40
41	0,50	0,24	0,45
42	0,15	0,27	0,37
43	0,19	0,26	0,32
44	0,36	0,47	0,50
45	0,27	0,76	0,39

4.5. İstatistiki Analizler

Kontrol ve çalışma gruplarında tümör tipinin (tablo 4.5-1), kitle büyüklüğünün (Tablo 4.5-2) ve yaşı (Tablo 4.5-3); EPCAM, EGFR, CLDN7, WBC, PLT ve kitle sayısı parametreleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla uygulanan tek yönlü varyans analizi (Oneway ANOVA) ve Duncan testi ile (çoklu karşılaştırma testi) elde edilen bulgular ve kısırlaştırmanın (Tablo 4.5-4), ülserasyon (Tablo 4.5-5) ve metastaz durumunun (Tablo 4.5-6) aynı parametreler üzerindeki etkisini belirlemek için uygulanan bağımsız örneklem t-testi ile elde edilen bulgular belirtilen tablolarda sunuldu.

Çalışma ve kontrol grubuna ait yaş, EPCAM, EGFR, CLDN7, WBC, PLT, RNA, kitle sayısı ve kitle büyüklüğü parametrelerinin ortalama değerleri ve bu parametrelerin çalışma ve kontrol grubu arasındaki önem derecesini belirlemek için kullanılan t-testine (Tablo 4.5-7) ait sonuçlar ilgili tablolarda verildi. EPCAM, CLDN7, EGFR, kitle sayısı ve ağırlık parametreleri arasındaki ilişki Pearson korrelasyon testi ile değerlendirilerek tablo 4.5-8'de sunuldu.

Çalışma grubundaki köpeklere ait tümör dereceleri (Grade 0 + Grade 1 ve Grade 2 + Grade 3) (Tablo 4.5-9), metastaz durumu (Tablo 4.5-10), ülserasyon durumu (Tablo 4.5-11), yaş (Tablo 4.5-12), kısırlaştırma durumu (Tablo 4.5-13) gibi klinik parametrelerin EPCAM, EGFR ve CLDN7 markerları üzerine etkisi t-testi ile analiz edilerek belirtilen tablolarda sunuldu. Ayrıca tümör derecesi (Grade 0, Grade 1, Grade 2, Grade 3), tümör tipi ve kitle büyüklüğü parametrelerinin EPCAM, EGFR, CLDN7 markerları üzerine etkisi ise Oneway-

Anova metoduyla belirlenerek, analiz sonuçları sırasıyla tablo 4.5-14, tablo 4.5-15, tablo 4.5-16'da verildi. Çalışma grubundaki köpekler için EPCAM, CLDN7 ve EGFR genlerinin; tümör derecesi (Tablo 4.5-17), tümör tipi (Tablo 4.5-18), ülserasyon (Tablo 4.5-19), metastaz (Tablo 4.5-20) ve kitle büyüklüğü (Tablo 4.5-21) parametrelerindeki up/down regülasyon durumları da ki-kare testi ile değerlendirilerek sonuçlar ilgili tablolarda belirtildi. Ayrıca farklı kitle büyüklüklerine göre EPCAM genin downregülasyonuna etkisi ve önem derecesi tablo 4.5-22 sunuldu.

Tablo 4.5-1: Tümör tiplerinin EPCAM, EGFR, CLDN7, WBC, PLT ve kitle sayısı parametreleri üzerine etkisi

Parametreler	Tümör tipleri	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata	P değeri
Kitle sayısı	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	0,00 ^b	0,00	P<0,05
	Tubuler karsinom	7	3,14 ^a	0,59	
	Tubulopapiller karsinom	9	3,89 ^a	0,82	
	Solid karsinom	6	3,67 ^a	1,54	
	Kompleks karsinom	18	4,78 ^a	0,60	
	Karsinosarkom ve malign miks tümör	5	3,80 ^a	1,02	
EPCAM (ΔCt)	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	3,83	0,52	P>0,05
	Tubuler karsinom	7	4,42	0,40	
	Tubulopapiller karsinom	9	4,72	0,63	
	Solid karsinom	6	4,11	0,85	
	Kompleks karsinom	18	4,59	0,35	
	Karsinosarkom ve malign miks tümör	5	4,76	0,47	
CLDN7 (ΔCt)	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	5,04 ^b	0,27	P<0,001
	Tubuler karsinom	7	7,89 ^a	0,58	
	Tubulopapiller karsinom	9	6,55 ^a	0,28	

	Solid karsinom	6	7,45 ^a	0,66	
	Kompleks karsinom	18	7,31 ^a	0,31	
	Karsinosarkom ve malign mik s tümör	5	7,04 ^a	0,49	
EGFR (ΔCt)	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	4,84 ^b	0,39	P<0,05
	Tubuler karsinom	7	6,72 ^a	0,30	
	Tubulopapiller karsinom	9	5,96 ^{ab}	0,28	
	Solid karsinom	6	5,55 ^{ab}	0,54	
	Kompleks karsinom	18	6,04 ^{ab}	0,29	
	Karsinosarkom ve malign mik s tümör	5	6,58 ^a	0,67	
WBC ($\times 10^3$ / μl)	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	18,37	4,41	P>0,05
	Tubuler karsinom	7	18,35	2,02	
	Tubulopapiller karsinom	9	14,43	2,39	
	Solid karsinom	6	24,20	5,91	
	Kompleks karsinom	18	20,25	3,94	
	Karsinosarkom ve malign mik s tümör	5	18,56	3,62	
PLT ($\times 10^3$ / μl)	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	324,89 ^b	74,68	P<0,05
	Tubuler karsinom	7	554,71 ^{ab}	90,00	
	Tubulopapiller karsinom	9	435,56 ^{ab}	29,69	
	Solid karsinom	6	599,00 ^a	97,62	
	Kompleks karsinom	18	499,89 ^{ab}	52,32	
	Karsinosarkom ve malign mik s tümör	5	625,40 ^a	95,69	

^{a,b} Bir parametre için farklı harf taşıyan ortalama değerler arası farklılık önemlidir (P<0,05).

Tablo 4.5-2: Kitle büyüklüğünün kitle sayısı, EPCAM, EGFR, CLDN7, PLT ve WBC parametreleri üzerine etkisi

Parametreler	Kitle büyüklüğü	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata (±)	P değeri
Kitle sayısı	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	0,00 ^b	0,00	P<0,001
	< 5 cm	15	4,33 ^a	0,59	
	5-10 cm	26	4,35 ^a	0,52	
	>10 cm	4	1,50 ^b	0,50	
EPCAM (ΔCt)	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	3,83 ^{ab}	0,52	P>0,05
	< 5 cm	15	5,04 ^a	0,45	
	5-10 cm	26	4,47 ^{ab}	0,26	
	>10 cm	4	3,19 ^b	0,45	
CLDN7 (ΔCt)	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	5,04 ^b	0,27	P<0,001
	< 5 cm	15	7,01 ^a	0,30	
	5-10 cm	26	7,35 ^a	0,29	
	>10 cm	4	7,36 ^a	0,24	
EGFR (ΔCt)	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	4,84 ^b	0,39	P<0,001
	< 5 cm	15	6,22 ^a	0,32	
	5-10 cm	26	6,13 ^a	0,21	
	>10 cm	4	5,72 ^{ab}	0,80	
WBC(×10 ³ /μl)	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	18,37	4,41	P>0,05
	< 5 cm	15	14,16	1,66	
	5-10 cm	26	21,50	2,98	
	>10 cm	4	22,40	2,86	
PLT (×10 ³ /μl)	Kontrol grubu (Sağlıklı köpekler)	9	324,89 ^b	74,68	P<0,05
	< 5 cm	15	509,07 ^a	51,12	
	5-10 cm	26	530,88 ^a	44,19	
	>10 cm	4	520,75 ^a	70,82	

^{a,b}: Bir parametre için farklı harf taşıyan ortalama değerler arası farklılık önemlidir (P<0,05).

Tablo 4.5-3: Yaşın kitle sayısı, EPCAM, EGFR, CLDN7, PLT ve WBC parametreleri üzerine etkisi

Parametreler	Yaş	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata (±)	P değeri
EPCAM (ΔCt)	>10 yaş	27	4,41	0,31	P>0,05
	5-10 yaş	24	4,34	0,30	
	< 5 yaş	3	5,27	0,34	
CLDN7 (ΔCt)	>10 yaş	27	7,16	0,29	P>0,05
	5-10 yaş	24	6,66	0,30	
	< 5 yaş	3	5,92	0,45	
EGFR (ΔCt)	>10 yaş	27	5,97	0,24	P>0,05
	5-10 yaş	24	5,85	0,26	
	< 5 yaş	3	5,85	0,52	
WBC ($\times 10^3 / \mu l$)	>10 yaş	27	17,0	1,35	P>0,05
	5-10 yaş	24	22,02	3,48	
	< 5 yaş	3	12,46	1,69	
PLT ($\times 10^3 / \mu l$)	>10 yaş	27	549,26	41,83	P>0,05
	5-10 yaş	24	433,54	44,02	
	< 5 yaş	3	403,67	119,88	
Kitle sayısı	>10 yaş	27	4,26 ^a	0,54	P<0,05
	5-10 yaş	24	2,88 ^a	0,50	
	< 5 yaş	3	0,00 ^b	0,00	

^{a,b}: Bir parametre için farklı harf taşıyan ortalama değerler arası farklılık önemlidir (P<0,05).

Tablo 4.5-4: Kısırlaştırmanın (OVH) Kitle Sayısı, EPCAM, EGFR, CLDN7, WBC ve PLT Parametreleri Üzerine Etkisi

Parametreler	OVH (+/-)	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata (±)	P değeri
Kitle sayısı	OVH (-)	48	3,44	0,40	P>0,05
	OVH (+)	6	3,17	1,01	
EPCAM (ΔCt)	OVH (-)	48	4,49	1,44	P>0,05
	OVH (+)	6	3,89	0,94	
CLDN7 (ΔCt)	OVH (-)	48	6,93	0,22	P>0,05
	OVH (+)	6	6,35	0,38	
EGFR (ΔCt)	OVH (-)	48	6,04	0,17	P<0,05
	OVH (+)	6	4,84	0,41	
WBC ($\times 10^3 / \mu l$)	OVH (-)	48	19,46	1,88	P>0,05
	OVH (+)	6	15,31	3,21	
PLT ($\times 10^3 / \mu l$)	OVH (-)	48	499,92	33,12	P>0,05
	OVH (+)	6	408,33	43,79	

Tablo 4.5-5: Ülserasyonun Kitle Sayısı, EPCAM, EGFR, CLDN7, RNA miktarı, WBC ve PLT Parametreleri Üzerine Etkisi

Parametreler	Ülserasyon (+/-)	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata (±)	P değeri
Kitle sayısı	Ülserasyon (+)	19	3,95	0,56	P>0,05
	Ülserasyon (-)	35	3,11	0,49	
EPCAM (ΔCt)	Ülserasyon (+)	19	4,12	0,33	P>0,05
	Ülserasyon (-)	35	4,59	0,26	
CLDN7 (ΔCt)	Ülserasyon (+)	19	7,41	0,31	P=0,05
	Ülserasyon (-)	35	6,58	0,25	
EGFR (ΔCt)	Ülserasyon (+)	19	6,17	0,28	P>0,05
	Ülserasyon (-)	35	5,76	0,21	
RNA (ng/ml)	Ülserasyon (+)	19	78,83	18,32	P<0,05
	Ülserasyon (-)	35	46,39	5,09	
WBC($\times 10^3 / \mu l$)	Ülserasyon (+)	19	25,14	3,83	P<0,01
	Ülserasyon (-)	35	15,67	1,38	
PLT ($\times 10^3 / \mu l$)	Ülserasyon (+)	19	537,00	54,01	P>0,05
	Ülserasyon (-)	35	464,09	35,67	

Tablo 4.5-6: Metastaz varlığının Kitle Sayısı, EPCAM, EGFR, CLDN7, RNA miktarı, WBC ve PLT Parametreleri Üzerine Etkisi

Parametreler	Metastaz (+/-)	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata ($\pm$)	P değeri
Kitle sayısı	Metastaz (+)	22	4,41	0,53	P<0,05
	Metastaz (-)	32	2,72	0,49	
EPCAM (Δ Ct)	Metastaz (+)	22	4,65	0,31	P>0,05
	Metastaz (-)	32	4,27	0,28	
CLDN7 (Δ Ct)	Metastaz (+)	22	7,40	0,29	P<0,05
	Metastaz (-)	32	6,50	0,25	
EGFR (Δ Ct)	Metastaz (+)	22	6,47	0,22	P<0,01
	Metastaz (-)	32	5,52	0,22	
RNA (ng/ml)	Metastaz (+)	22	71,06	16,86	P>0,05
	Metastaz (-)	32	48,69	4,56	
WBC ($\times 10^3$ / μ l)	Metastaz (+)	22	20,96	3,55	P>0,05
	Metastaz (-)	32	17,65	1,57	
PLT ($\times 10^3$ / μ l)	Metastaz (+)	22	507,00	53,13	P>0,05
	Metastaz (-)	32	477,88	35,67	

Tablo 4.5-7: Çalışma ve kontrol grubuna ait yaş, ağırlık, EPCAM, EGFR, CLDN7, RNA, PLT, WBC, kitle sayısı ve kitle büyüklüğü parametrelerinin ortalama değerleri ve bu iki grup arasındaki önem derecesi

Parametreler	Grup	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata ($\pm$)	P değeri
Kitle sayısı	Çalışma	45	4,09	0,37	P<0,001
	Kontrol	9	0,00	0,00	
EPCAM (Δ Ct)	Çalışma	45	4,54	0,22	P>0,05
	Kontrol	9	3,83	0,52	
CLDN7 (Δ Ct)	Çalışma	45	7,24	0,19	P<0,001
	Kontrol	9	5,04	0,27	
EGFR (Δ Ct)	Çalışma	45	6,12	0,17	P<0,01
	Kontrol	9	4,84	0,39	
RNA (ng/ml)	Çalışma	45	62,00	8,76	P>0,05
	Kontrol	9	36,81	4,86	
Kitle büyüklüğü (cm)	Çalışma	45	6,80	0,67	P<0,001
	Kontrol	9	0,00	0,00	
PLT ($\times 10^3$ / μ l)	Çalışma	45	522,71	30,83	P<0,05
	Kontrol	9	324,89	74,68	
Yaş	Çalışma	45	11,19	0,41	P<0,001
	Kontrol	9	5,94	1,21	
Ağırlık (kg)	Çalışma	45	16,26	1,49	P>0,05
	Kontrol	9	20,16	2,73	
WBC ($\times 10^3$ / μ l)	Çalışma	45	19,13	1,88	P>0,05
	Kontrol	9	18,38	4,41	

Tablo 4.5-8: Çalışma ve kontrol gruplarına ait EPCAM, CLDN7, EGFR, kitle sayısı ve ağırlık parametreleri arasındaki ilişki

Parametreler		EPCAM (ΔCt)	CLDN7 (ΔCt)	EGFR (ΔCt)	Kitle sayısı	Ağırlık (kg)
EPCAM (ΔCt)	Pearson Korrelasyon	1	0,302	0,532	0,359	-0,346
	P değeri		P<0,05	P<0,001	P<0,01	P<0,05
	Köpek sayısı (N)	54	54	54	54	54
CLDN7 (ΔCt)	Pearson Korrelasyon	0,302	1	0,667	0,381	-0,189
	P değeri	P<0,05		P<0,001	P<0,01	P>0,05
	Köpek sayısı (N)	54	54	54	54	54
EGFR (ΔCt)	Pearson Korrelasyon	0,532	0,667	1	0,345	-0,134
	P değeri	P<0,001	P<0,001		P<0,05	P>0,05
	Köpek sayısı (N)	54	54	54	54	54
Kitle sayısı	Pearson Korrelasyon	0,359	0,381	0,345	1	-0,343
	P değeri	P<0,01	P<0,01	P<0,05		P<0,05
	Köpek sayısı (N)	54	54	54	54	54
Ağırlık (kg)	Pearson Korrelasyon	-0,346	-0,189	-0,134	-0,343	1
	P değeri	P<0,05	P>0,05	P>0,05	P<0,05	
	Köpek sayısı (N)	54	54	54	54	54

Tablo 4.5-9: Çalışma grubunda tümör derecesinin (Grade 0 + Grade 1, Grade 2 + Grade 3) EPCAM, EGFR, CLDN7 Parametreleri Üzerine Etkisi

Parametreler	Tümör dereceleri	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata ($\pm$)	P değeri
EPCAM ($\Delta\Delta Ct$)	Grade 0 ve 1	16	1,42	0,63	P>0,05
	Grade 2 ve 3	29	1,12	0,39	
CLDN7 ($\Delta\Delta Ct$)	Grade 0 ve 1	16	0,36	0,05	P>0,05
	Grade 2 ve 3	29	0,28	0,05	
EGFR ($\Delta\Delta Ct$)	Grade 0 ve 1	16	0,67	0,14	P>0,05
	Grade 2 ve 3	29	0,52	0,10	

Tablo 4.5-10: Çalışma grubundaki köpeklere ait metastaz durumunun EPCAM, EGFR, CLDN7 Parametreleri Üzerine Etkisi

Parametreler	Metastaz (+/-)	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata ($\pm$)	P değeri
EPCAM ($\Delta\Delta Ct$)	Metastaz (+)	22	1,17	0,52	P>0,05
	Metastaz (-)	23	1,28	0,44	
CLDN7 ($\Delta\Delta Ct$)	Metastaz (+)	22	0,29	0,06	P>0,05
	Metastaz (-)	23	0,32	0,04	
EGFR ($\Delta\Delta Ct$)	Metastaz (+)	22	0,42	0,09	P>0,05
	Metastaz (-)	23	0,72	0,13	

Tablo 4.5-11: Çalışma grubundaki köpeklere ait ülserasyon durumunun EPCAM, EGFR, CLDN7 Parametreleri Üzerine Etkisi

Parametreler	Ülserasyon (+/-)	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata ($\pm$)	P değeri
EPCAM ($\Delta\Delta Ct$)	Ülserasyon (+)	19	1,44	0,50	P>0,05
	Ülserasyon (-)	26	1,08	0,45	
CLDN7 ($\Delta\Delta Ct$)	Ülserasyon (+)	19	0,27	0,05	P>0,05
	Ülserasyon (-)	26	0,33	0,05	
EGFR ($\Delta\Delta Ct$)	Ülserasyon (+)	19	0,57	0,13	P>0,05
	Ülserasyon (-)	26	0,57	0,10	

Tablo 4.5-12: Çalışma grubundaki köpeklere ait yaşın EPCAM, EGFR, CLDN7 Parametreleri Üzerine Etkisi (t-testi)

Parametreler	Yaş	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata ($\pm$)	P değeri
EPCAM ($\Delta\Delta Ct$)	>10 yaş	26	1,59	0,57	P>0,05
	5-10 yaş	19	0,74	0,11	
CLDN7 ($\Delta\Delta Ct$)	>10 yaş	26	0,32	0,05	P>0,05
	5-10 yaş	19	0,29	0,05	
EGFR ($\Delta\Delta Ct$)	>10 yaş	26	0,66	0,12	P>0,05
	5-10 yaş	19	0,46	0,08	

Tablo 4.5-13: Çalışma grubundaki köpeklere ait kısırlaştırma (OVH) durumunun EPCAM, EGFR, CLDN7 Parametreleri Üzerine Etkisi (t-testi)

Parametreler	OVH (+/-)	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata ($\pm$)	P değeri
EPCAM ($\Delta\Delta Ct$)	OVH (+)	6	2,85	1,87	P>0,05
	OVH (-)	39	0,98	0,26	
CLDN7 ($\Delta\Delta Ct$)	OVH (+)	6	0,48	0,12	P>0,05
	OVH (-)	39	0,28	0,03	
EGFR ($\Delta\Delta Ct$)	OVH (+)	6	1,21	0,32	P<0,05
	OVH (-)	39	0,47	0,07	

Tablo 4.5-14: Çalışma grubundaki köpeklere ait tümör derecelerinin (Grade 0, Grade 1, Grade 2, Grade 3) EPCAM, EGFR, CLDN7 Parametreleri Üzerine Etkisi (Oneway- Anova)

Parametreler	Tümör dereceleri	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata ($\pm$)	P değeri
EPCAM ($\Delta\Delta Ct$)	Grade 0	3	0,32	0,04	P>0,05
	Grade 1	13	1,67	0,76	
	Grade 2	13	0,64	0,11	
	Grade 3	16	1,52	0,71	
CLDN7 ($\Delta\Delta Ct$)	Grade 0	3	0,42	0,20	P>0,05
	Grade 1	13	0,34	0,05	
	Grade 2	13	0,24	0,05	
	Grade 3	16	0,31	0,07	
EGFR ($\Delta\Delta Ct$)	Grade 0	3	0,65	0,44	P>0,05
	Grade 1	13	0,67	0,15	
	Grade 2	13	0,53	0,18	
	Grade 3	16	0,52	0,11	

Tablo 4.5-15: Çalışma grubundaki köpeklerle ait tümör tiplerinin EPCAM, EGFR, CLDN7 Parametreleri Üzerine Etkisi

Parametreler	Tümör tipleri	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata ($\pm$)	P değeri
EPCAM ($\Delta\Delta Ct$)	Tubuler karsinom	7	0,82	0,21	P>0,05
	Tubulopapiller karsinom	9	1,11	0,46	
	Solid karsinom	6	2,48	1,89	
	Kompleks karsinom	18	1,19	0,53	
	Karsinosarkom ve malign miks tümör	5	0,65	0,22	
CLDN7 ($\Delta\Delta Ct$)	Tubuler karsinom	7	0,23	0,10	P>0,05
	Tubulopapiller karsinom	9	0,41	0,08	
	Solid karsinom	6	0,30	0,13	
	Kompleks karsinom	18	0,28	0,05	
	Karsinosarkom ve malign miks tümör	5	0,32	0,12	
EGFR ($\Delta\Delta Ct$)	Tubuler karsinom	7	0,30	0,05	P>0,05
	Tubulopapiller karsinom	9	0,53	0,11	
	Solid karsinom	6	0,88	0,34	
	Kompleks karsinom	18	0,62	0,14	
	Karsinosarkom ve malign miks tümör	5	0,48	0,26	

^{a,b} Bir parametre için farklı harf taşıyan ortalama değerler arası farklılık önemlidir (P<0,05).

Tablo 4.5-16: Çalışma grubundaki köpeklere ait kitle büyüklüklerinin EPCAM, EGFR, CLDN7 Parametreleri Üzerine Etkisi

Parametreler	Kitle büyüklüğü	Köpek sayısı (N)	Ortalama değer	Standart hata (±)	P değeri
EPCAM ($\Delta\Delta Ct$)	>10 cm	4	1,83	0,64	P>0,05
	5-10 cm	26	1,16	0,44	
	< 5 cm	15	1,19	0,66	
CLDN7 ($\Delta\Delta Ct$)	>10 cm	4	0,21	0,03	P>0,05
	5-10 cm	26	0,31	0,05	
	< 5 cm	15	0,32	0,05	
EGFR ($\Delta\Delta Ct$)	>10 cm	4	0,80	0,36	P>0,05
	5-10 cm	26	0,55	0,10	
	< 5 cm	15	0,54	0,13	

^{a,b} Bir parametre için farklı harf taşıyan ortalama değerler arası farklılık önemlidir (P<0,05).

Tablo 4.5-17: Tümör derecelerine göre EPCAM, CLDN7 ve EGFR genlerinin downregulasyon yüzdesi ve P değerleri

	GRADE				P DEĞERİ
	0	1	2	3	
EPCAM	%100	% 46,2	% 46,2	%43,8	P>0,05
CLDN7	%66,7	%84,6	%85,7	%81,3	P>0,05
EGFR	%75,0	%61,5	%76,9	%75,0	P>0,05

Tablo 4.5-18: Tümör tipine göre EPCAM, CLDN7 ve EGFR genlerinin downregulasyon yüzdesi ve P değerleri

	TÜMÖR TİPİ					P DEĞERİ
	Tubuler karsinom	Tubulopapiller karsinom	Solid karsinom	Kompleks karsinom	Karsinosarkom ve malign miks tümör	
EPCAM	% 42,9	% 33,3	%50,0	%50,0	%60,0	P>0,05
CLDN7	%85,7	%77,8	%83,3	%83,3	%80,0	P>0,05
EGFR	%100	%66,7	%66,7	%61,1	%80,0	P>0,05

Tablo 4.5-19: Ülserasyon durumuna göre EPCAM, CLDN7 ve EGFR genlerinin downregulasyon yüzdesi ve P değerleri

	ÜLSERASYON		P DEĞERİ
	(+)	(-)	
EPCAM	% 27,8	% 55,6	P>0,05
CLDN7	%89,5	%76,9	P>0,05
EGFR	%68,4	%73,1	P>0,05

Tablo 4.5-20: Metastaz durumuna göre EPCAM, CLDN7 ve EGFR genlerinin downregulasyon yüzdesi ve P değerleri

	METASTAZ		P DEĞERİ
	(+)	(-)	
EPCAM	% 47,8	% 50,0	P>0,05
CLDN7	%81,8	%82,6	P>0,05
EGFR	%81,8	%60,9	P>0,05

Tablo 4.5-21: Kitle büyüklüğüne göre EPCAM, CLDN7 ve EGFR genlerinin downregulasyon yüzdesi ve P değerleri

	KİTLE BÜYÜKLÜĞÜ			P DEĞERİ
	>10 cm	5-10 cm	<5 cm	
EPCAM	% 0	%42,3	% 66,7	P<0,05
CLDN7	%100	%76,9	%86,7	P>0,05
EGFR	%50,0	%73,1	%73,3	P>0,05

Tablo 4.5-22: Farklı kitle büyüklüklerine göre EPCAM geninin downregulasyon yüzdesi ve P değeri

Kitle büyüklüğü	EPCAM Downregulasyon yüzdesi	P Değeri
>10 cm	%0	P>0,05
5-10 cm	%42,3	
>10 cm	%0	P< 0,05
< 5 cm	%66,7	
5-10 cm	%42,3	P>0,05
< 5 cm	%66,7	

5. TARTIŞMA

Meme tümörü teşhisi konularak araştırmamızda yer alan 45 adet dişi köpekten 19 tanesi 5-10 yaş aralığında, 26 tanesi ise 10 yaşından büyük yaşıydılar. Bu köpeklerin yaşları en düşük 5, en yüksek 13 ve ortalama $11,19 \pm 0,41$ olarak tespit edildi. Yapılan çalışmalarda meme tümörü insidensinin 8-11 yaş aralığındaki köpeklerde yüksek olduğu bildirilmiştir (Boldizar ve ark. 1992; Sorenmo ve ark. 2011). Çalışmamızda meme tümörlü köpekler ile kontrol grubundaki sağlıklı köpeklerin yaşları karşılaştırıldığında, meme tümörlü köpeklerin yaş ortalamasının daha yüksek olduğu, hastalığın genellikle orta yaş ve üzeri köpeklerde görüldüğü tezini doğrular niteliktedir (Boldizar ve ark. 1992; Sorenmo ve ark. 2011).

Shofer ve ark. (1989) tarafından, 145 adet köpekte yapılan çalışmada histopatolojik ve beslenme faktörlerinin meme karsinomları üzerine etkisi incelenmiştir. Meme tümörü teşhisinden bir yıl önceki süreç boyunca ev yemeğiyle ve yüksek yağ oranına sahip diyetle beslenen köpeklerde meme karsinomu gelişiminin daha yüksek olduğunu, ayrıca düşük yağ ve yüksek protein oranına sahip diyetlerle beslenen köpeklerin düşük yağ ve düşük protein oranına sahip diyetlerle beslenen köpeklere göre daha uzun yaşam süresine sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Perez Alenza ve ark. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada erken yaşlarda veya meme tümörü teşhisinden bir yıl öncesi dönemde obeziteye sahip ve yüksek oranda kırmızı et içeren diyetle beslenen köpeklerin meme tümörü ve displazi gelişimine yatkın olduğu belirlenmiştir. Araştırmamızdaki meme tümörlü köpekler ortalama $16,26 \pm 1,49$ kg ağırlığında ölçüldü ve alınan anamnez bilgileri doğrultusunda, bu köpeklerin beslenme protokollerine bakıldığında yağ ve protein oranı yüksek kuru mamaların yanı sıra çoğunlukla ev yemeği verildiğinin tespit edilmesi araştırmacıların çalışmalarında savunduğu, beslenmenin meme tümörü gelişimini etkilediği tezini desteklemektedir (Shofer ve ark. 1989; Perez Alenza ve ark. 1998).

Sorenmo ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada; mastektomiden en az 2 yıl önce kısırlaştırılmış meme karsinomlu köpeklerin, mastektomiden 2 yıldan daha fazla süre önce kısırlaştırılmış ve hiç kısırlaştırılmamış köpeklere göre daha uzun yaşam sürelerine sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca MacPhail (2013 pp.575-606) kısırlaştırılmamış kedi ve köpeklerin, kısırlaştırılmış kedi ve köpeklere göre meme tümörüne yakalanma riskinin yedi kat daha fazla olduğunu belirtmiştir. Kristiansen ve ark. (2015) yaptıkları bir çalışmada, ER pozitif, Grade 2 veya operasyon öncesi dönemde yüksek E2 konsantrasyonuna sahip meme

tümörlü köpeklerin tümörlerinin uzaklaştırılması sırasında uygulanan kısırlaştırmanın faydalı olduğunu savunmaktadırlar. Alaçam (2008 pp.130-142) ve MacPhail (2013 pp.809-815) ilk östrüstan önce yapılan ovariohisterektomi operasyonlarının meme tümörü riskini % 0,5'e düşürdüğünü, ilk östrüstan sonra yapılan operasyonlarda bu riskin % 8'e, ikinci östrüstan sonra % 26'ya çıktığını bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki 45 meme tümörlü köpekten 6 tanesinin kısırlaştırılmış olduğu, geri kalan 39 tanesinin kısırlaştırılmamış olması, kısırlaştırılmamış hayvanlarda meme tümörü oluşma riskinin fazla olduğunu doğrular niteliktedir. Ayrıca araştırmamızdaki meme tümörlü köpeklerden kısırlaştırılmış olan 6 köpeğin, birçok östrus gösterdikten sonra orta yaşlarda kısırlaştırılmış olması araştırmacıların bildirileriyle uyumlu olduğu görüldü (Alaçam 2008 pp.130-142; MacPhail 2013 pp.809-815).

Alaçam (2008 pp.130-142) köpeklerde meme tümörlerinin yaklaşık % 65'inin dördüncü ve beşinci çift meme loblarında geliştiğini bildirmiştir. Baba ve Catoi (2007) köpeklerde tüm meme tümörlerinin yaklaşık % 40'ının inguinal meme bezlerinde lokalize olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmamızdaki köpeklerdeki meme tümörlerinin yaklaşık %60'ının dördüncü ve beşinci çift meme bezlerinde tespit edilmesi ve bu meme tümörlerinin yaklaşık %34 oranla en çok inguinal meme bezlerinde gelişmiş olması yapılan çalışmalarla uyumlu görülmektedir (Alaçam 2008 pp.130-142; Baba ve Catoi 2007).

Baba ve Catoi (2007) dişi köpeklerde meme tümörlerinin farklı histolojik formlarının insidensini %51 benign tümörler, %45,5 karsinomlar, %3,5 karsinosarkomlar ve malign miks tümörler olarak bildirmiştir. Karsinomların insidensini de sırasıyla solid karsinomlar, tubuler adenokarsinomlar, papiller adenokarsinomlar ve anaplastik karsinomlar olarak belirlemiştir. Araştırmamızdaki malign epitelyal tümör tiplerinden insidensi yüksek olanların sırasıyla kompleks karsinomlar, tubulopapiller karsinomlar, tubuler karsinomlar ve solid karsinomlar olarak tespit edilmesi ve Baba ve Catoi'nin (2007) bildirisindeki karsinomların insidensi ile uyumlu olmaması, araştırmacıların ve bizim çalışmamızdaki köpeklerin yaşadığı ekolojik çevre, genetik faktörler, beslenme ve kısırlaştırma durumları gibi meme tümörlerinin etiyolojisindeki faktörlerin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir .

MacPhail (2013 pp.809-815), progesteron alımının kedilerde malign meme tümörü, köpeklerde benign meme tümörü gelişimiyle alakalı olduğunu bildirmiştir. Misdorp (2002 pp.575-606) ise bazı Avrupa ülkelerinde dişi kedi ve köpeklerde östrusun önlenmesi amacıyla enjektabl progesteron kullanıldığını ve bu tedavilerin köpeklerde malign olmasa da benign meme tümörü gelişimini tetiklediğini bildirmiştir. Ayrıca dietilstilbestrolün uzun süreli kullanımının veya sadece diğer sentetik östrojenlerin kullanımının meme tümörü insidensini

artırmayacağı, progesteron veya sentetik progestinlerle uzun süreli tedavilerin meme bezi hiperplazilerini ve bening meme tümörlerini indüklediği araştırmacılar tarafından savunulmaktadır (Giles ve ark. 1978; Concanon ve ark. 1981). Araştırmamızdaki malign meme tümörlü köpeklerle östrusu önlemek amacıyla östrojen veya progesteron uygulanmamış olması ve tümör histopatolojilerinin malign karakterde olması, bu tedavilerin köpeklerde daha çok bening meme tümörü gelişimini tetiklediğini doğrular niteliktedir.

Wang ve ark. (2015) insanlarda göğüs kanserinde dolaşımdaki tümör hücrelerini izole etmek ve belirlemek amacıyla IHK, IF, FAHÖ, rt-PCR gibi moleküler ölçümlerin kullanıldığını ve bu ölçüm tekniklerinin kanser hücrelerine özgü markerların veya epitelyal markerların ekspresyonu gibi biyolojik özellikler veya boyut bakımından farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Criscitiello ve ark. (2010) yaptıkları bir çalışmada epitelyal hücrelerde bulunan EPCAM'i belirlemek için sitometrik/antikor esaslı moleküler yöntemlerden faydalanmıştır. Gama ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada, köpeklerde meme dokusunda EGFR'nin radyoligand bağlayıcı veya immunoenzimatik ölçümler gibi birçok metotlar belirlenebilmesine rağmen IHK ile yapılabildiğine dair bir veriye rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra Jakab ve ark (2008b) yaptıkları bir çalışmada bening ve malign epitelyal tümörlü köpeklerde klauudinleri IHK ile saptamışlardır. Wang ve ark. (2014) yaptıkları bir çalışmada PCR esaslı metotların birçok örneği bir kerede görüntüleyebilme imkanı sunmasından ötürü, kantitatif rt-PCR analizinin, dolaşımdaki tümör hücrelerinin tümörle ilgili genlerinin ekspresyon analizinde daha kullanışlı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca rt-PCR; performans, hız, doğruluk, duyarlılık ve yüksek verimlilik kapasitesine sahip olduğundan, rt-PCR'ın standart metot olma potansiyelinde bir teknik olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark. 2014). Araştırmamızda ise, malign epitelyal meme tümörlü köpeklerden alınan kandan EGFR, CLDN7 ve EPCAM markerlarının belirlenmesi amacıyla rt-PCR kullanılması araştırmacılarla (Wang ve ark. 2014; Wang ve ark. 2015) uyumludur. Araştırmamızdaki tümör markerlarını belirlemekte kullandığımız metot açısından ise Jakab ve ark. (2008b), Gama ve ark. (2009), Criscitiello ve ark. (2010) yaptıkları çalışmalar ile paralellik yoktur.

Costa ve ark. (2011), köpeklerde EGFR, CLDN7 ve EPCAM markerlarının periferik kanda RT-PCR yöntemiyle belirlemişlerdir. Çalışmamızda da Costa ve ark. (2011) ile uyumlu olarak köpeklerde EGFR, CLDN7 ve EPCAM markerları RT-PCR yöntemiyle periferik kanda saptandı.

Araştırmacılar (Tang ve ark. 2012) EGFR'nin bir çeşit transmembran glikoproteini olduğunu ve tümör hücrelerinin anabolizan düzeninde, üremesinde, farklılaşmasında ve

büyümesinde rol oynadığını bildirmişlerdir. Tang ve ark. (2012), yaptıkları bir çalışmada insanlarda meme karsinomunda EGFR ekspresyonunun, normal epitelyal dokudan önemli ölçüde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmamızda çalışma grubundaki malign epitelyal tümörlü köpekler ile kontrol grubundaki sağlıklı köpeklerden alınan kanlarda EGFR ekspresyon düzeyleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($P<0,05$). Ayrıca meme tümörlü köpeklerde ölçülen EGFR miktarının, kontrol grubundaki köpeklerde ölçülen EGFR miktarına göre daha yüksek olması Tang ve ark. (2012) yaptıkları çalışma ile uyumlu bulundu. Bu artışın sebebi olarak EGFR'nin tümör hücrelerinin anabolizan düzeninde, üremesinde ve büyümesinde etkin rol alması düşünülmektedir.

Carvalho ve ark. (2013) malign meme tümörlü köpeklerde yaptıkları bir çalışmada immunohistokimya yöntemiyle EGFR ekspresyonuna bakmışlar ve tümör tipleri arasında belirgin bir fark saptamamışlardır. Sunulan çalışmada bununla uyumlu şekilde EGFR ekspresyonu bakımından tümör tipleri arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Bununla birlikte, çalışma grubundaki tümör tiplerinden tubuler karsinom, karsinosarkom ve malign miks tümörlü köpeklerdeki EGFR ekspresyonu ile kontrol grubundaki köpeklere ait kanlardaki EGFR ekspresyonu arasında fark önemlidir. Buna göre, EGFR'nin kandaki düzeyine bakılarak sağlıklı ve tümörlü ayrımı yapılabileceği fakat tümör tipleri arasında EGFR'ye spesifik bir ayırım yapılamayacağı sonucuna varıldı.

Costa ve ark. (2012) metastazik meme tümörlü köpeklerde yaptıkları bir çalışmada, metastazik meme tümörleri ile metastazik olmayan meme tümörleri arasında EGFR ekspresyonu açısından farkın önemli ($P<0,05$) olduğunu bildirmişlerdir ve metastazik olan köpeklerden aldıkları periferik kanda EGFR ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Araştırmamızda çalışma ve kontrol grupları arasında metastaz varlığının EGFR ekspresyonu açısından önemli olması ($P<0,01$) ve metastazik meme tümörlü hayvanlardan aldığımız periferik kanda EGFR ekspresyon düzeyinin daha yüksek olması Costa ve ark. (2012) yaptığı çalışma ile uyumlu bulundu. Fakat çalışma grubundaki metastazik ($n=22$) ve non-metastazik ($n=23$) tümörlü köpeklerdeki EGFR ekspresyonu açısından istatistiksel açıdan önemli bir fark ($P>0,05$) saptanmadı. Bunun nedeni olarak; ekspresyonuna baktığımız markerların ölçümleri periferik kandan yapıldığı için hayvan materyalinin azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Ribeiro ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada, histolojik derecelendirme ve miks tümörlerdeki invaziv malign epitelyal yapının immunofenotipik profili arasında istatistiksel olarak belirgin bir korrelasyonun olmadığını ($P>0,05$) bildirmişlerdir. Buna uyumlu olarak

Gama ve ark. (2009) köpeklerde meme dokusunda EGFR'nin immunohistokimyasal ekspresyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada nekroz, ülserasyon varlığı ve tümörün histolojik derecesinin EGFR ekspresyonu açısından önemli olmadığını ($P>0,05$) bildirmişlerdir. Belirtilen parametrelerin araştırmamızda da EGFR ekspresyonu açısından önemli bir fark oluşturmaması araştırmacılarla uyumludur (Gama ve ark. 2009; Ribeiro ve ark. 2012). Bunun nedeni olarak ülserasyon ve nekrozun genellikle büyük tümörlerde şekillenmesi ve özellikle 10 cm'den büyük kitlelerde EGFR düzeyinin sağlıklı hayvanlardaki ekspresyon düzeyine yakın miktarlarda olması ve dolayısıyla aradaki farkın istatistiki açıdan önemli bulunmadığı düşünülmektedir.

Guimaraes ve ark. (2014) köpeklerde malign meme tümörlerinde EGFR ekspresyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada, EGFR ekspresyonunun; tümör boyutu ($P=0.001$) ile belirgin bir bağlantısı olduğunu bildirmişlerdir. St-Arnaud ve ark. (1984) yaptıkları bir çalışmada, EGFR seviyelerinin birçok faktör tarafından değiştirilebileceğini ve epidermal büyüme faktörünün, reseptörünü azaltarak düzenleyebileceğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, EGF reseptörlerinin sayısı; diğer büyüme faktörleri, birçok tümör destekleyicileri ve viral değişimler tarafından azaltılabileceğini savunmaktadırlar. Araştırmamızdaki çalışma ve kontrol grubundaki köpekler için EGFR ekspresyonunun; kitle boyutu ($P<0,05$) ile belirgin bir bağlantısı olmasına rağmen çalışma grubundaki tümörlü hayvanlarda kitle büyüklüğü açısından EGFR ekspresyonunda önemli bir fark ($P>0,05$) saptanmaması St-Arnaud ve ark. (1984) yaptıkları çalışma ile açıklanmaktadır. EGFR; normal hücre fonksiyonunun sürdürülmesinde önemli bir yere sahip olmasına rağmen, EGFR ekspresyonunun tümör hücrelerinin hayatta kalması ve büyümesine katkı sağladığı Kim ve ark. (2001) tarafından bildirilmiştir. Bu veriyle uyumlu olarak araştırmamızda 10 cm büyüklüğe kadarki kitlelere sahip meme tümörlü köpeklerin kanından, kontrol grubuna göre daha yüksek oranda EGFR ekspresyonu sağlandı. Fakat 10 cm'den büyük kitleye sahip köpeklerdeki EGFR ekspresyonu ile kontrol grubundaki köpeklerdeki EGFR ekspresyonu arasında belirgin bir fark saptanmadı. St-Arnaud ve ark. (1984) bildirisinden yola çıkarak, EGF'de artış ve buna bağlı olarak tümör lehine büyüyen dokudaki EGF reseptörlerinin azalması, 10 cm'den büyük tümöral kitlelere sahip köpeklerdeki EGFR ekspresyon düzeyinin kontrol grubundaki sağlıklı hayvanlarındaki EGFR ekspresyon düzeyine yakın ve 10 cm'den küçük kitleye sahip köpeklerdeki EGFR ekspresyonuna göre daha düşük sonuçlar elde etmemize ve istatistiki açıdan önemli bir fark oluşmamasına neden olduğu düşünülmektedir.

Gama ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada EGFR ekspresyonu ile hayvanın yaşı arasında belirgin bir bağlantı ($P<0,05$) tespit etmişlerdir. Araştırmamızdaki 5-10 yaş aralığındaki meme tümörlü köpeklerle, 10 yaşından büyük meme tümörlü köpekler arasında EGFR ekspresyonu açısından belirgin bir fark saptanmamış olması ($P>0,05$) Gama ve ark. (2009) ile uyumlu değildir. Bunun nedeni olarak, Gama ve ark.nın (2009) yaptıkları çalışmada EGFR ekspresyon düzeyine tümör dokusunda bakmış olmaları ve daha fazla sayıda numune kullanmış olmaları düşünüldü. Çalışmamızda meme tümörlü köpeklerle ait periferik kandan EGFR ekspresyonunun dokuya göre daha düşük oranda gerçekleşmesi ve numune sayımızın daha düşük olması istatistiksel açıdan fark saptanmamış olmasına neden olabileceğini düşündürmektedir.

Gama ve ark.nın (2009) 136 meme tümörlü köpekte yaptıkları bir çalışmada kısırlaştırma durumunun EGFR ekspresyonu açısından belirgin bir fark oluşturmadığını bildirmişlerdir. Donnay ve ark. (1993) meme tümörlü köpeklerde malign tümörlü dokuda EGFR ve östrojen reseptörlerinin belirgin ve pozitif korrelasyon gösterdiğini saptamışlardır. Bunun yanı sıra, karsinomların kendi bezzel yapılarını kaybettiği ve belirgin derecede daha düşük miktarlarda reseptörlere sahip olduklarını bildirmişlerdir. Araştırmamızda ise çalışma ve kontrol grubundaki köpeklerde kısırlaştırma durumlarına göre EGFR ekspresyon düzeyleri açısından belirgin bir fark ($P<0,05$) saptanması ve kısırlaştırılmamış meme tümörlü köpeklerde EGFR'nin daha yüksek miktarda eksprese olduğu belirlenmesi Donnay ve ark.nın (1993) yaptıkları çalışma ile uyumludur. Bunun sebebi olarak EGFR ile ER arasındaki pozitif korrelasyon varlığı düşünülmektedir. Fakat çalışma grubundaki meme tümörlü köpeklerden kısırlaştırılmamış olanlarda, kısırlaştırılmış olanlara göre EGFR miktarının daha düşük ölçülmesi karsinomların bezzel yapılarını kaybettiği ve daha düşük miktarda reseptör barındırdığından ötürü olduğu düşünülmektedir.

İnsanlarda CLDN7 ekspresyonunun invaziv meme kanalı karsinomunda, normal meme epiteline göre azaldığını bildirmiştir (Kominski ve ark. 2003). Araştırmamızda çalışma grubundaki meme tümörlü köpekler ile kontrol grubundaki sağlıklı köpekler arasındaki CLDN7 ekspresyonu açısından farkın önemli olmasına rağmen ($P<0,001$) çalışmamızda meme tümörlü köpeklerde CLDN7 ekspresyonunun daha yüksek olması Kominski ve ark. (2003) ile uyumlu değildir. Jakab ve ark. (2008a) CLDN7'nin köpeklerde normal meme bezi epitelinin bileşimini oluşturduğunu, hücrelerin lateral bölgelerine yakın lokalize olduğu ve normal meme bezinde yüksek miktarda eksprese olduğunu bildirmişlerdir. İnsanlarda göğüs kanserinde CLDN7'nin kaybının preneoplastik ya da neoplastik hücrelerde TJ geçirgenliğinin

bozulması sonucu geliştiği ve böylece CLDN7 kaybının kanser hücrelerinin yayılmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Kominski ve ark. 2003). Yapılan tüm bu çalışmalar tümörlü dokuda CLDN7 ekspresyon düzeyini araştırmaktadır. Bu nedenle TJ geçirgenliğinin dolayısıyla hücre bileşiminin bozulduğu bir dokuda CLDN7 ekspresyonunun azalmasının muhtemel olduğu düşünülmektedir. Araştırmamızda CLDN7 ekspresyon düzeyini ölçtüğümüz materyal olarak periferik kan kullanılmış olup, permeabilitesi bozulan hücrelerden açığa çıkan CLDN7'nin kandaki miktarında artış olabileceği düşünüldü. Bu nedenle tümörlü köpeklerden alınan kanlarda CLDN7 ekspresyonunun, sağlıklı hayvanlardan alınan kanlardaki CLDN7 ekspresyonuna göre daha yüksek miktarda olmasının sebebi olarak, analizin doku değil kandan yapılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Costa ve ark. (2012) meme tümörlü köpeklerde periferik kanda marker tayini ile ilgili yaptıkları bir çalışmada sağlıklı köpeklerde CLDN7'nin eksprese olmadığını, tümörlü köpeklerde ise CLDN7 bakımından yüksek miktarda pozitif kan örneklerinin saptandığının bildirilmesi araştırmamızda savunulan düşüncüyü destekler niteliktedir.

Park ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada, invaziv meme kanalı karsinomunda ve invaziv lobuler karsinomda CLDN7 ekspresyonu açısından fark olmaması, araştırmamızda tümör tipleri arasında CLDN7 ekspresyonu yönünden önemli bir fark saptanmamış olması ($P>0,05$) ile uyumludur. Metastazik lezyonlarda, invaziv meme kanalı karsinomlarında en büyük metastazik odağın boyutu ile güçlü CLDN7 ekspresyonu arasında belirgin bir korrelasyon olduğu bildirmişlerdir. Ayrıca CLDN7, invaziv meme kanalı karsinomlarındaki metastazik tümörlerde artış göstermiştir (Park ve ark. 2007). CLDN7'nin kaybının hücre adhezyonunun kaybı ve artan metastazlar ile bağlantısı olduğu ve CLDN7'nin metastaz varlığında tekrar eksprese olduğu bildirilmiştir (Dahiya ve ark. 2011). Araştırmamızda çalışma ve kontrol grubundaki köpeklerde CLDN7 ekspresyonunun metastaz varlığı açısından istatistiksel olarak önemli ($P<0,05$) bulunması ve metastaz varlığında CLDN7 miktarının artması araştırmacılarla (Park ve ark. 2007; Dahiya ve ark. 2011) uyumludur.

Araştırmamızda CLDN7 ekspresyonu ile tümör dereceleri arasında istatistiksel açıdan fark önemli olmaması, Park ve ark.nın (2007), hem primer hem metastazik tümörlerde, tümör dereceleri ile adhezyon moleküllerinden CLDN7 ekspresyonu arasında bir bağlantı bulunmadığını bildirdiği araştırmasıyla uyumludur.

Sauer ve ark. (2005), azalan CLDN7 ekspresyonunun tümör boyutu ile belirgin bir korrelasyon göstermediği bildirilmiştir. Çalışmamızda kitle büyüklüğü açısından çalışma ve kontrol grubundaki CLDN7 ekspresyon düzeyi arasında istatistiki açıdan fark önemlidir

($P<0,001$). Bununla birlikte CLDN7 ekspresyonunun kontrol grubuna göre çalışma grubundaki tümörlü köpeklerde daha yüksek oranda gerçekleştiği görüldü. Fakat 5 cm'den küçük, 5-10 cm büyüklüğünde, 10 cm'den büyük kitleler değerlendirildiğinde, farklı kitle büyüklükleri arasında CLDN7 ekspresyonu açısından önemli bir fark ($P>0,05$) olmaması Sauer ve ark. (2005) ile uyumludur.

Araştırmamızda kontrol ve çalışma gruplarındaki CLDN7 ekspresyonu ile ülserasyon varlığı arasında istatistiksel açıdan önem ($P=0,05$) mevcuttur ve ülserasyon varlığında CLDN7 miktarı daha yüksektir. Klinik parametrelerden ülserasyon varlığının meme tümörlü köpeklerde kandan CLDN7 ekspresyonu üzerine etkisi ile alakalı literatür bilgiye rastlanılmadı. Bu durum Costa ve ark. (2012) bildirdiği gibi tümör gelişimiyle haraplanan hücrenin sıkı bağ yapısının ülserasyon varlığında da aynı şekilde etkilendiği ve böylece yıkılan dokudan açığa çıkan CLDN7'nin kandaki ekspresyon düzeyinin arttığı şeklinde açıklanabilir.

Oshima ve ark. (2008) tarafından CLDN7 geninin ekspresyon düzeyi ile lenf düğümü metastazı, tümör boyutu ve lenfatik invazyonda olduğu gibi yaş arasında da bir bağlantı olmadığı bildirilmiştir. Araştırmamızda CLDN7 ekspresyonu ile yaş arasında istatistiki açıdan önem ($P>0,05$) saptanmamış olması Oshima ve ark. (2008) yaptığı çalışma ile uyumlu bulundu.

Osta ve ark. (2004) göğüs kanseri olan insanlarda EPCAM ekspresyonunun normal meme dokusuna göre daha fazla gerçekleştiğini bildirmişlerdir ($P<0,01$). Wang ve ark. (2015) insanlarda yaptıkları bir çalışmada sağlıklı ve göğüs kanseri olan hastalarda EPCAM ekspresyon düzeyini incelemişlerdir ve sağlıklı bireylerde EPCAM ekspresyonunun düşük olduğunu, göğüs kanseri hastalarında daha yüksek miktarda EPCAM ekspresyonu şekillendiğini bildirmişlerdir. Songun ve ark. (2005) yaptıkları bir çalışmada, EPCAM'in hücre içi adhezyon molekülü olarak rol oynadığını ve EPCAM ekspresyonunun azalması nedeniyle hücreler arası adhezyonun azaldığını ve dolayısıyla bunun tümör hücrelerinin yayılımının artması anlamına geldiğini bildirmişlerdir. İnsanlarda göğüs kanseri olgularına spesifik EPCAM markerının, yapılan çalışmalarda dokudaki ekspresyonuna bakılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda EPCAM'in köpeklerdeki etkinliğine bakmak ve kanda teşhis edilemediğini belirlemek amaçlandı. Araştırmamızda ise sağlıklı ve tümörlü köpeklere ait kanlarda EPCAM ekspresyon açısından önemli bir fark ($P>0,05$) saptanmadı. Sağlıklı köpeklerde EPCAM'in düşük olması ve bununla birlikte tümör varlığında hücreler arası adhezyon azalacağından EPCAM düzeyinin azalması nedeniyle elde edilen değerler arasında

istatistiki açıdan önemli fark saptanmadığı düşünülmektedir. Buna rağmen, çalışma grubundaki meme tümörlü köpeklerde kandaki EPCAM, EGFR ve CLDN7 ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında EPCAM'in daha yüksek miktarlarda eksprese olduğu belirlendi. Bununla birlikte tümör tipleri arasında da EPCAM ekspresyonu açısından önemli bir fark ($P>0,05$) saptanmadı. EPCAM'in sağlıklı ve meme tümörlü köpeklerde etkinliğinin ispatlanabilmesi için numune sayısını artırarak ve hem kan hem de doku materyalinden EPCAM ekspresyon düzeylerine bakılarak çalışılması gerekliliğini düşündürmektedir.

Schmidt ve ark. (2008) insanlarda yaptıkları bir çalışmada EPCAM ekspresyonu ile tümörün histolojik derecesi arasında pozitif korrelasyon ($P=0,017$) olduğunu göstermişlerdir. Araştırmamızda histolojik derecelendirme açısından değerlendirildiğinde çalışma grubundaki tümörlü köpeklerde EPCAM ekspresyonu istatistiki açıdan farkın önemsiz ($P>0,05$) bulunması araştırmacılarla (Schmidt ve ark. 2008) uyumlu değildir. Osta ve ark. (2004) insanlarda yaptıkları bir çalışmada RT-PCR analizi ile metastazik lenf düğümlerindeki ortalama EPCAM ekspresyon seviyesinin, normal lenf düğümlerindeki ortalama EPCAM ekspresyon seviyesine göre daha yüksek miktarda ($P<0,01$) olduğunu bildirmişlerdir. Cimino ve ark. (2010) insanlarda göğüs kanseri üzerine yaptıkları bir çalışmada nicel RT-PCR ile yaptıkları ölçümlerde, metastaz varlığında EPCAM ekspresyonu açısından farklılıklar olabileceğini fakat bu farklılığın önemli düzeyde olmadığı bildirilmiştir. Çalışmamızda aynı tümörün histolojik dereceleri arasından EPCAM ekspresyonu açıdan fark olmadığı gibi, metastaz durumu ve ülserasyon varlığı değerlendirildiğinde de EPCAM ekspresyonu açısından istatistiki önem saptanmadı. Çalışmamızda EPCAM ekspresyon düzeyine kandan bakılarak bu sonuçlar elde edildi. Bu nedenle EPCAM geninin fenotipe yansımalarının yani protein seviyelerindeki durumunun araştırılması, metastaz ve ülserasyon durumlarında EPCAM ekspresyonunun köpeklerdeki etkinliği hakkında daha iyi bir sonuç verebileceğini düşündürmektedir.

İnsanlarda meme karsinomunda yüksek EPCAM ekspresyonunun az diferensiye karsinomlarda görüldüğü ve bu durumun tümörün büyüklüğü, lenf düğümü metastazının varlığı ve kötüleşen prognoz ile alakalı olduğu bildirilmiştir (Spizzo ve ark. 2004). Soysal ve ark. (2013) insanlarda göğüs kanseri üzerine yaptıkları bir çalışmada EPCAM ekspresyonunun prognozun kötüleşmesi ile alakalı olduğunun yanısıra ortalama 34,2 mm'den büyük kitleye sahip hastalarda EPCAM ekspresyonunun yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Buna paralel olarak, Tandon ve ark. (1990) tümör büyüklüğünün, tümörün çoğalma hızını yansıtmada kısmen etkili olabileceğini ve aslında bunlar arasında yüksek derecede önemle

($P<0,0001$) bağlantılı olduğunu yaptıkları çalışmayla ortaya koymuşlardır. Araştırmamızda 5 cm'den küçük kitleler ile 10 cm'den büyük kitleler arasında EPCAM ekspresyonu açısından fark önemli bulundu. Beş cm'den küçük kitlelere sahip köpeklerde EPCAM daha düşük miktarlarda ölçülürken (downregule), 5 cm'den büyük kitlelere sahip köpeklerde EPCAM daha yüksek miktarlarda (upregule) ölçülmesi araştırmacılarla (Tandon ve ark. 1990; Spizzo ve ark. 2004; Soysal ve ark. 2013) uyum sağlamakla birlikte, 5 cm'den büyük kitlelere sahip meme tümörlü köpeklerde prognoz takibinin yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Schmidt ve ark. (2008), EPCAM ekspresyonunun yaş ile belirgin bir bağlantısını olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmamızda da Schmidt ve ark. (2008) uyumlu olarak yaş ve EPCAM ekspresyonu arasında istatistiki açıdan önem saptanmadı.

Bazı klinik parametreleri istatistiki açıdan değerlendirdiğimizde, araştırmamızda kitle büyüklüğünün tümörün histolojik derecesi üzerine etkisi önemli ($P<0,05$) bulundu ve grade 2 ve grade 3'te memedeki kitlelerin daha büyük oldukları tespit edildi. Bunun yanı sıra kitle sayısı ve kitle büyüklüğü arasında istatistiki açıdan önem ($P<0,001$) saptandı. Ayrıca kitle sayısı arttıkça metastazik potansiyelin de arttığı tespit edildi ($P<0,05$). Kitle sayısı ile EPCAM, EGFR, CLDN7 tümör belirleyicileri arasında pozitif korrelasyon varlığı saptandı. Dünya sağlık örgütü'nün belirlediği TNM sınıflandırmasında tümörün büyüklüğü, lenf yumrusu metastazı ve uzak metastazları hastalığın prognozunu tespit etmekte kullanılmaktadır. Buna uyumlu olarak, çalışmamızda istatistiki açıdan önemli olduğu bahsedilen klinik parametrelerdeki artış, prognozun kötüleşmesini sağlamaktadır.

Sonuç olarak, EGFR ve CLDN7 markerları ile tümörlü ve sağlıklı köpeklerin ayrımı yapılabilmektedir. Ayrıca tümörlü hayvanlarda EPCAM ekspresyonu, EGFR ve CLDN7 ekspresyonuna göre daha yüksek seviyelerde ölçülmektedir. Tümör tipleri ve tümörün histolojik dereceleri açısından bu üç genin ekspresyon düzeylerinde bir farklılık olmasa da farklı kitle büyüklüklerinde EPCAM ve EGFR markerlarının upregüle veya downregule olduğu belirlendi. Kısırlaştırma durumunun EGFR ekspresyonu üzerine, ülserasyon durumunun da CLDN7 ekspresyonu üzerine etkili olduğu saptandı. Bu klinik parametreler ile araştırmamızdaki tümör belirleyicilerinin (EPCAM, EGFR, CLDN7) istatistiki açıdan önemli olması, meme tümörlü köpeklerde EGFR, CLDN7'nin prognostik açıdan önem teşkil ettiğini ve insanlarda etkinliği kanıtlanmış olan EPCAM markerının meme tümörlü köpeklerde de kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- A.I.Moustafa, A.E, Alaoui-Jamali, M.A., Batist, G., Hernandez-Perez, M., Serruya, C., Alpert, L. ve ark. (2002). Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene*, 21, 2634-2640.
- Alaçam, E (2008). *Köpek Ve Kedilerde Üreme Süreci ve Sorunları*. Ankara: Medisan.
- Alunni-Fabbroni, M., Sandri, M.T. (2010). Circulating tumor cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterixation. *Methods*, 50, 289-297.
- Artan, E. (1988). *Histoloji*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları.
- Ashworth, T. (1869). A case of cancer in which cells similar to those in the tumors are seen in the blood after death. *Australia Medical Journal*, 14,146.
- Baba A.I. ve Cătoi C. (2007). *Comparative Oncology*. Mammary Gland Tumors. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy; Chapter 11, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9542/>
- Baştan, A. ve Kaymaz, M. (1999). Köpeklerde meme tümörleri. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 3, 40-44.
- Baştan, A. ve Zonturlu, A.K. (2002). Köpek meme tümörlerinde yaş, ırk ve yerleşim yeri arasındaki ilişkinin araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 49, 203-206.
- Bello, I.O., Vilen, S., Niinimaa, A., Kantola, S., Soini, Y. ve Salo, T. (2008). Expression of claudins 1, 4, 5 and 7 and occludin and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Human Pathology*, 39, 1212-1220.
- Bernstein, L. ve Ross, R.K. (1993). Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiologic Reviews*, 15, 48-65.
- Briskin, C. ve O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2:a003178, 1-15.
- Boldizsar, H., Szienci, O., Muray, T. ve Csenki, J. (1992). Studies on canine mammary tumours. Age, seasonal and breed distribution. *Acta Veterinaria Hungarica*, 40, 75-78.
- Bossolasco, P., Ricci, C., Farina, G., Soligo, D., Pedretti, D., Scanni, A. ve ark. (2002). Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-PCR for the mammaglobin gene. *Cancer Detection and Prevention*, 26, 60-63.

- Carvalho, M.I., Guimaraes, M.J., Pires, I., Prada, J., Silva-Carvalho, R., Lopes, C. ve ark. (2013). EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science*, 95, 1094-1099.
- Cimino, A., Halushka, M., Illei, P., Wu, X., Sukumar, S. ve Argani, P. (2010). Epithelial cell adhesion molecule (EPCAM) is overexpressed in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123, 701-708.
- Concannon, P.W., Sparker, T.R., Casey, H.W. ve Hansel, W. (1981). Gross and histopathologic effects of medroxyprogesterone on the mammary gland of adult beagle bitches. *Fertility and Sterility*, 36, 373-387.
- Costa, A., Oliveira, J.T., Gartner, F., Kohn, B., Gruber, A.D. ve Klopffleisch, R. (2011). Potential marker for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. *The Veterinary Journal*, 190, 165-168.
- Costa, A., Kohn, B., Gruber, A.D. ve Klopffleisch, R. (2012). Multiple RT-PCR markers for detection of circulating tumour cells of metastatic canine mammary tumours. *The Veterinary Journal*, 196, 34-39.
- Criscitello, C., Satiriou, C. ve Ignatiadis M. (2010). Circulating tumor cells and emerging blood biomarkers in breast cancer. *Current Opinion in Oncology*, 22 (6), 552-558.
- Dahiya, N., Becker, K., Wood, W.H., Zhang, Y. ve Morin, P.J. (2011). Claudin-7 is frequently overexpressed in ovarian cancer and promotes invasion. *PlosOne*, 6(7), e22119.
- Dannenberg, A.J., Lippman, S.M., Mann, J.R., Subbaramaiah, K. ve DuBois, R.N. (2005). Cyclooxygenase targets for chemoprevention. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 254-266.
- Donnay, I., Ravis, J., Wouters-Ballman, P., Devleeschouwer, N., Leclercq, G. ve Versteegen, J.P. (1993). Receptors for estrogen, progesterone and epidermal growth factors in normal and tumorous canine mammary tissues. *Journal of Reproduction & Fertility*, 47, 501-512.
- Donnay, I., Ravis, J., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G. ve Versteegen, J. (1995). Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 56(9), 1188-1194.
- Dorn, C.R., Taylor, D.O.N. ve Schneider R. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of National Cancer Institute*, 40, 301-318.
- Elling, H. ve Ungenach, F.R. (1983). Simultaneous occurrence of receptors for estradiol, progesterone and dihydrotestosterone in canine mammary tumors. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 105, 321-237.

- Fidler, I.J. ve Brodey, R.S. (1967). A necropsy study of canine malignant mammary neoplasms. *Journal of American Medical Association*, 151(6), 710-715.
- Frye, F.L., Dorn, C.R., Taylor, D.O.N., Hibbard, H.H. ve Klauber, M.R. (1967). Characteristics of canine mammary gland tumor cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 3, 1-12.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. ve Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of Cell Biology*, 141, 1539-1550.
- Gama, A., Gartner, F., Alves, A. ve Schmitt, F. (2009). Immunohistochemical expression of EGFR in canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, 87, 432-437.
- Ghossein, R.A., Bhattacharya, S. ve Rosai, J. (1999). Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 5, 1950-1960.
- Gilbertson, S.R., Kurzman, I.D., Zachrau, R.E., Hurvitz, A.I. ve Black, M.M. (1983). Canine mammary epithelial neoplasm: Biologic implication of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology*, 20, 127-142.
- Giles, R.C., Kwapiem, R.P., Geil, R.G. ve Casey, H.W. (1978). Mammary nodules in beagle dogs administered investigational contraceptive steroids. *Journal of the National Cancer Institute*, 60, 1351- 1364.
- Glasspool, R.M. ve Evans, T.R.J. (2000). Clinical imaging of cancer metastasis. *European Journal of Cancer*, 36(13), 1661-1670.
- Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R. ve Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48 (1), 117-131.
- Hampe, J.F. ve Misdorp, W. (1974). Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World Health Organ*, 50, 111–133.
- Guimaraes, M.J., Carvalho, M.I., Pires, I., Prada, J., Gonzales Gil, A., Lopes, C. ve ark. (2014). Concurrent expression of cyclo-oxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in canine malignant mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 150, 27-34.
- Hayden, D.W., Johnston, S.D., Kiang, D.T., Johnston, K.H. ve Barnes, D.M. (1981). Feline mammary hypertrophy/fibroadenoma complex. Clinical and hormonal aspects. *American Journal of Veterinary Research*, 42, 1699-1703.
- Hayes, D.F., Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Miller, M.C. ve ark. (2006). Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patient predict progression-free and overall survival. *Clinical Cancer Research*, 12, 4218-4224.

- Hewitt, K.J., Agarwal, R. ve Morin, P. (2006). The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*, 6,186.
- Hurley, W.L. (2009). *Mammary Development*. Erişim 29.11.2015. Resource Library: <http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/Mamdevelop/postpubertal.htm>
- Hynes, N.E. ve Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5, 341-354.
- Ignatiadis, M., Georgoulas, V. ve Mavroudis, D. (2008a). Circulating tumor cells in breast cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 20, 55-60.
- Ignatiadis, M., Georgoulas, V., ve Mavroudis, D. (2008b). Micrometastatic disease in breast cancer: clinical implications. *European Journal of Cancer*, 44(18), 2726-2736.
- Illera, J.C., Perez-Alenza, M.D., Nieto, A., Jimenez, M.A., Silvan, G., Dunner, S. ve ark. (2006). Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, 71, 541-548.
- Jakab, C., Halasz, J., Szasz, A.M., Batmunkh, E., Kiss, A., Schaff, Z. ve ark. (2008a). Expression and localisation of claudin -1,-2,-3,-4,-5,-7 and -10 proteins in the normal canine mammary gland. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56(3), 341-352.
- Jakab, C., Halasz, J., Szasz, A.M., Kiss, A., Schaff, Z., Rusvai, M. ve ark. (2008b). Expression of claudin -1,-2,-3,-4,-5 and -7 proteins in bening and malignant canine mammary gland epithelial tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 139, 238-245.
- Kalkan, C. ve Horoz, H. (2005). Pubertas ve Seksüel Sikluslar. İçinde: E. Alaçam (Ed.), *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*. Ankara: Medisan; 23-40.
- Keller, P.J., Lin, A.F., Arendt, L.M., Klebba, I., Jones, A.D., Rudnick, J.A. ve ark. (2010). Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines. *Breast Cancer Research*, 12(5), R87.
- Kennedy, K.C., Quorllo, B.A., Rose, B.J. ve Thamm, D.H. (2011). Epidermal growth factor enhances the malignant phenotype in canine mammary carcinoma cell lines. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9(3), 196-206.
- Kim, E.S., Khuri, F.R. ve Herbst, R.S. (2001). Epidermal growth factor receptor biology. *Current opinion in Oncology*, 13, 506-513.
- Kominsky, S.L., Argani, P., Korz, D., Evron, E., Raman, V., Garrett, E. ve ark. (2003). Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*, 22, 2021-2033.
- Kristiansen, V.M., Pena, L., Diez Cordova, L., Illera, J.C., Skjerve, E., Breen, A.M. ve ark. (2016). Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary

carcinomas: A randomized controlled trail. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30, 230-241.

Küçükusta, A.R. (1992). Tümör markerleri. *Endoskopi Dergisi*, 1, 50-52.

La Guardia, M. ve Giammanco, M. (2001). Breast cancer and obesity. *Panminerva Medica*, 43(2), 123-133.

Lambrechts, A.C., Bosma, A.J., Klaver, S.G., Top, B., Perebolte, L., Van't Veer, L.J. ve ark. (1999). Comparison of immunocytochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and nucleic acid sequence-based amplification for the detection of circulating breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 6, 219-231.

MacPhail M.C. (2013). Mammary neoplasia. İçinde T.W. Fossum (Ed.), *Small Animal Surgery*. Philadelphia: Elsevier Mosby; 809-815.

Martinez-Palomo, A. (1970). Ultrastructural modifications of intercellular junctions between tumor cells. *In Vitro*, 6, 15-20.

Misdorp, W. (1988). Canine mammary tumours: Protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Veterinary Quarterly*, 10, 26-33.

Misdorp, W. (1991). Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. *Acta Endocrinologica*, 125, 27-31.

Misdorp, W., Romijn, A. ve Hart, A.A.M. (1991). Feline mammary tumors: A case-control study of hormonal factors. *Anticancer Research*, 11, 1793-1798.

Misdorp, W., Else, R.W., Hellmen, E. ve Lipscomb, T.P. (1999). Histologic classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization*, 7, 58.

Misdorp, W. (2002). Tumours of the mammary gland. İçinde D.J. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. USA: Iowa State Press; 575-606.

Moe, L. (2001) Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57, 439-443.

Mostert, B., Sleijfer, S., Foekens, J.A. ve Gratama, J.W. (2009). Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 35, 463-474.

Novosad, C.A. (2003). Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18 (2), 107-109.

Oshima, T., Kunisaki, C., Yoshihara, K., Yamada, R., Yamamoto, N., Sato, T. ve ark. (2008). Reduced expressions of the claudin-7 gene correlates with venous invasion and liver metastasis in colorectal cancer. *Oncology Reports*, 19, 953-959.

- Osta, W.A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y.A. ve ark. (2004). EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *American Association for Cancer Research*, 1734, 1-11.
- Owen, L.N. (1980). *Classification of tumors in domestic animals*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Özfiliz, N. (2005). Meme bezleri. İçinde A. Özer (Ed.), *Veteriner Embriyoloji*. Bursa, Türkiye: Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları; 236.
- Park, K., Han, S., Shin, E., Kim, H.J. ve Kim, J.Y. (2007). EGFR gene and protein expression in breast cancers. *European Journal of Surgical Oncology*, 33, 956-960.
- Perez Alenza, D., Rutteman, G.R., Pena, L., Beynen, A.C. ve Cuesta, P. (1998). Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12, 132-139.
- Radhika, K. ve Prayaga, A.K. (2010). Estrogen and progesterone hormone receptor status in breast carcinoma: comparison of immunocytochemistry and immunohistochemistry. *Indian Journal of Cancer*, 47, 148-150.
- Ribeiro, G.M., Bertagnolli, A.C., Rocha, R.M. ve Cassali, G.D. (2012). Morphological aspects and immunophenotypic profiles of mammary carcinomas in benign-mixed tumors of female dogs. *Hindawi Publishing Corporation Veterinary Medicine International*, 432763, 1-7.
- Ross, A.A., Cooper, B.W., Lazarus, H.M., Mackay, W., Moss, T.J., Ciobanu, N. ve ark. (1993). Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood*, 82(9), 2605-2610.
- Rutteman, G.R. (1992). Contraceptive steroids and the mammary gland. Is there a hazard? *Breast Cancer Research and Treatment*, 23, 29-41.
- Rutteman, G.R., Foekens, J.A., Portengen, H., Vos, J.H., Blankenstein, M.A., Teske, E. ve ark. (1994). Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in non-affected and tumorous mammary tissue of female dogs. *Breast Cancer Research and Treatment*, 30, 139-146.
- Santos, M., Marcos, R. ve Faustine, A.M.R. (2010). Histological study of canine mammary gland during the oestrus cycle. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 146-154.
- Santos, A.A., Lopes, C.C., Riberiro, J., Martins, L.R., Santos, J.C., Amorim, I.F. ve ark. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary tumours: a multivariable

- survival study. *BMC Veterinary Research*, 9:1. Erişim 04.01.2013, <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-9-1>
- Sassen, A., Rochon, J., Wild, P.J., Hartmann, A., Hofstaedter, F., Schwarz, S. ve ark. (2008). Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patient. *Breast Cancer Research*, 10(1), 1-13.
- Sauer, T., Pedersen, M.K., Ebeltoft, K. ve Naess, O. (2005). Reduced expression of claudin-7 fine needle aspirates from breast carcinomas correlated with grading and metastatic disease. *Cytopathology*, 16, 193-198.
- Schmidt, M., Hasenclever, D., Schaeffer, M., Boehm, D., Cotarelo, C., Steiner, E. ve ark. (2008). Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(18), 5849-5855.
- Schneider, R., Dorn, C.R. ve Taylor D.O.N. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and post surgical survival. *Journal of the National Cancer Institute*, 43, 1249-1261.
- Selman, P.J., Mol, J.A., Rutteman, G.R. ve Rjinberg, A. (1994). Progesterin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*, 134, 287-292.
- Shien, T., Tashiro, T., Omatsu, M., Masuda, T., Furuta, K., Sato, N. ve ark. (2005). Frequent overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in mammary high grade ductal carcinomas with myoepithelial differentiation. *Journal of Clinical Pathology*, 58, 1299-1304.
- Shofer, F.S., Sonnenschein, E.G., Goldschmidt, M.H., Laster, L.L. ve Glickman L.T. (1989). Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, 13 (1), 49-60.
- Slade, M.J. ve Coombes, R.C. (2007). The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 4, 30-41.
- Smith, B.M., Slade, M.J., English, J., Graham, H., Lüchtenborg, M., Sinnett, H.D. ve ark. (2000). Response of Circulating Tumor Cells to Systemic Therapy in Patients With Metastatic Breast Cancer: Comparison of Quantitative Polymerase Chain Reaction and Immunocytochemical Techniques. *Journal of Clinical Oncology*, 18, 1432-1439.
- Songun, I., Litvinov, S.V., Van de Velde, C.J., Pals, S.T., Hermans, J. ve Van Krieken, J.H. (2005). Loss of EPCAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer. *British Journal of Cancer*, 92, 1767-1772.
- Sonnenschein, E.G., Glickman, L.T., Goldschmidt, M.H. ve McKee, L.J. (1991). Body confirmation, diet and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *American Journal of Epidemiology*, 133 (7), 694-703.

- Sorenmo, K.U., Shofer, F.S. ve Goldschmidt, M.H. (2000). Effects of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14 (3), 266-270.
- Sorenmo, K. (2003). Canine mammary gland tumors. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 33,573-596.
- Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V. ve Goldschmidt, M.H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48 (1), 85-97.
- Soysal, S.D., Muenst, S., Barbie, T., Fleming, T., Gao, F., Spizzo, G. Ve ark. (2013). EPCAM expression variessignificiantly and is differentially associated with prognosis in the luminal B HER2, basal-like and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer. *British Journal of Cancer*, 108, 1480-1487.
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Simon, R., Spichtin, H. ve ark. (2004). High EPCAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 86, 207-213.
- St-Arnaud, R., Chabot, J.G., Pelletier, G., Labrie, F. ve Walker, P. (1984). Epidermal growth factor: structure, location, phosphorylation and regulation of its receptor. *Biochimie*, 66 (7-8), 515-530.
- Stovring, M., Moe, L. ve Glatte, E. (1997). A population based case-control study of canine mammary tumors and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 105 (8), 590-596.
- Swisshelm, K., Macek, R. ve Kubbies M. (2005). Role of claudins in tumorigenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 919-928.
- Tan, P.H., Aw, M.Y., Yip, G., Bay, B.H., Sii, L.H., Murugaya, S. ve ark. (2005). Cytokeratins in papillary lesions of the breast: is there a role indistinguishing intraductal papilloma from papillaryductal carcinoma in situ? *The American Journal of Surgical Pathology*, 29, 625-632.
- Tandon, A.K., Clark, G.M., Chamness, G.C. ve McGuire, W.L. (1990). Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer. *Cancer Research*, 50, 3317-3321.
- Tang, Y., Zhu, L., Li, Y., Ji, J., Li, J., Yuan, F. ve ark. (2012). Overexpression of epithelial growth factor receptor (EGFR) predicts better response to neo-adjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Translational Medicine*, 10, 1-7.
- Tavasoly, A., Golshahi, H., Rezaie, A. ve Farhadi, M. (2013). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Research Forum*, 4 (1), 25-30.

- Theilen, G.H. ve Madewell, B.R. (1987). *Veterinary Cancer Medicine*. (2nd edition). Philadelphia: Lea&Febiger.
- Tökes, A.M., Kulka, J., Paku, S., Szik, A., Paska, C., Novak, P.K. ve ark. (2005). Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Research*, 7, 296-305.
- Usami, Y., Chiba, H., Nakayama, F., Ueda, J., Matsuda, Y., Sawada, N. ve ark. (2006). Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of esophagus. *Human Pathology*, 37, 569-577.
- Wang, J.Y., Wu, C.H., Lu, C.Y., Hsieh, J.S., Wu, D.C., Huang, S.Y. ve ark. (2006). Molecular Detection of Circulating Tumor Cells in the Peripheral Blood of Patients with Colorectal Cancer Using RT-PCR: Significance of the Prediction of Postoperative Metastasis. *World Journal of Surgery*, 30, 1007-1013.
- Wang, H., Ahn, S., Kim, S., Park, S., Park, S., Han, H. ve ark. (2014). Detection of circulating tumor cells in patients with breast cancer using the quantitative RT-PCR assay for monitoring of therapy efficiency. *Experimental and Molecular Pathology*, 97, 445-452.
- Wang, H., Ahn, S., Kim, S., Park, S., Jung, D., Park, S. ve ark. (2015). Detection of circulating tumor cell-specific markers in breast cancer patients using the quantitative RT-PCR assay. *International Journal of Clinical Oncology*, 10147, 1-13.
- White, R.A.S. (2003). Surgical treatment of specific skin disorders. Mammary gland surgery. İçinde D. Slatter (Ed.), *Textbook of Small Animal Surgery*. USA: Elsevier Science; 349-351.
- Wilson, G.P.(1981). Mammary glands: Their developments and diseases. İçinde M.J. Bojrab (Ed.), *Pathobiology in Small Animal Surgery*. Philadelphia: Lea&Febiger, 394-404.
- Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K. ve Sugiyama M. (1996). Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant tumours. *Journal of Small Animal Practice*, 37, 462- 466.

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2013/ 14

31/01/2013

Sn: Doç.Dr. Kazım GÜVENÇ
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No :2013/ 14

Başvuru :25.01.2013

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **Doktora Öğrencisi Zeynep GÜNAY'a** ait "Meme Tümörlü Köpeklerde Metastazik Potansiyelin, Preoperatif Dönemde Alınan Periferik Kandan, Prognostik Tümör Belirleyicilerin (Marker) Tayini İle Belirlenmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Köpek
	Cinsiyeti	Dişi
	Sayısı	60
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	BAP Onayından sonra başlanacak/ 2 yıl sonra tamamlanacaktır.	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İ.Ü.HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
İ.Ü.HADYEK Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Mak.Yük.Müh. Yard.Doç.Dr.Burak OLGUN
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ZEYNEP	Soyadı	GÜNAY UÇMAK
Doğ.Yeri	BEYOĞLU/ İSTANBUL	Doğ.Tar.	19.12.1986
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	22784127384
Email	zeynep.gunay@istanbul.edu.tr	Tel	05363316482

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ	2016-MAYIS
Yük.Lis.	-	-
Lisans	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ	2010-OCAK
Lise	ÖZEL KÜLTÜR LİSESİ	2004-HAZİRAN

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ	İ.Ü. VETERİNER FAKÜLTESİ	2 YIL (2014-Halen)
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	66.25	Cambridge University PET Certificate (2001)
Almanca	Orta	Orta	Zayıf	-	Discover Dil Okulları (2008-2009, 4 kur)

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	78,97	77,85	78,95
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
WORD	İYİ
EXCEL	ORTA
POWER POINT	İYİ

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

SCI, SSCI, AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Yılmaz Ö., Gündüz M.C., Evkuran Dal G., Uçmak M., Günay Uçmak Z., Karaçam E., et al., "Evaluation Of Changes in Doppler Ultrasonography Indices and Levels of Maternal Serum Angiogenic Factors Throughout Pregnancy in Ewes", Theriogenology, No.1, Pp.1-1, 2015.

Yılmaz Ö., Toydemir T.S.F., Kirşan İ., Günay Uçmak Z., Karaçam E., "Anti Müllerian Hormone as a Diagnostic Tool for Ovarian Remnant Syndrome", Veterinary Research Communications, Vol.9639, Pp.1-4, 2015.

Uçmak M., Yılmaz Ö., Gündüz M.C., Günay Uçmak Z., Düzgün O., Eskiuyurt N., et al., "Osteoporotic Risk and Physeal Closure in Prepubertal Ovariohysterectomized Cats", Animal Reproduction Science, Vol.161, Pp.146-151, 2015.

Yılmaz Ö., Uçmak M., Günay Uçmak Z., Caliskan Karacam E., Mehmet Erzengin O., "Doppler Evaluation of Fetal And Feta-Maternal Vessels During Dystocia in Cats: Four Cases", Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Vol.20, Pp.971-974, 2014.

Yılmaz Ö., Toydemir T.S.F., Kirşan İ., Dokuzeylül B., Günay Uçmak Z., Karaçam E., "Effects Of Surgical Wound İnfiltration with Bupivacaine on Postoperative Analgesia in Cats Undergoing Bilateral Mastectomy", Journal Of Veterinary Medical Science, Vol.76 , Pp.1595-1601, 2014.

Yılmaz Ö., Uçmak M., Günay Uçmak Z., Kirşan İ., "Vaginal Fold Prolapse and Transmissible Venereal Tumour Related to Ovarian Remnant Syndrome in a Bitch: A Case Report", Veterinarni Medicina, Vol.58, Pp.628-632, 2013.

Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Günay Uçmak Z., Sabuncu A., Kiliçarslan M.R., Sönmez K., Arun S.S., Karaçam E. , "Dişi Bir Kedide Piyometra ile Seyreden Uterus Sarkomu Olgusu", İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Cilt.42, Ss.106-110, 2016.

Sabuncu A., Enginler S.Ö., Karaçam E. , Günay Uçmak Z., Demirlek T. , Erdoğan Bamaç Ö., Et Al., "Excision of a Vaginal Bening Peripheral Nerve Sheath Tumor (Schwannoma, Neurofibroma) from Abdominal Cavity in an Intact Bitch", International Journal Of Veterinary Science, Vol.3, Pp.43-45, 2014.

Günay Uçmak Z., Uçmak M., Yildirim F., Sabuncu A., Tek Ç., Caliskan Karacam E., "Dişi Bir Köpekte Görülen Jinekolojik Patolojiler Kompleksi", İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Cilt.39, Ss.277-283, 2013.

Sabuncu A., Günay Uçmak Z., Uçmak M., Enginler S.Ö., Erzengin Ö.M., Kurban İ., et al., "Different Sizes and Degrees of Foetal Mummification During Pregnancy in a Dog", International Journal of Veterinary Science, Vol.2, Pp.75-77, 2013.

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

Günay Uçmak Z., Uçmak M., Yılmaz Ö., Evkuran Dal G., Karaçam E. , Gündüz M.C., "Evaluation Of Pregnancy in Queen By Doppler Ultrasonography", International Vetistanbul Group Congress 2015, Sankt. Petersburg, Rusya, 7-9 Nisan 2015, Pp.620-621.

Uçmak M., Yılmaz Ö., Gündüz M.C., Günay Uçmak Z., Düzgün O., Eskiuyurt F.N., et al., "Osteoporotic Risks And Physeal Closure in Prepubertal Neutered Cats", International Vetistanbul Group Congress 2015, Sankt. Petersburg, Rusya, 7-9 Nisan 2015, Pp.670-671.

Yılmaz Ö., Gündüz M.C., Evkuran Dal G., Uçmak M., Günay Uçmak Z., Karaçam E., et al., "Koyunlarda Gebelik Boyunca Doppler Ultrasonografi İndeksleri ve Maternal Serum Anjiyogenik Faktör Seviyelerindeki Değişikliklerin Değerlendirilmesi", Türk Veteriner Jinekoloji Derneği VI. Ulusal Kongresi, Muğla, Türkiye, 15-18 Ekim 2015, Ss.94-95.

Uçmak M., Yılmaz Ö., Evkuran Dal G., Günay Uçmak Z., Karaçam E., Gündüz M.C., "Evaluation of Pregnancy in Queen by Doppler Ultrasonography", International Vetistanbul Group Congress, İstanbul, Türkiye, 28-30 Nisan 2014, Pp.30-30.

Günay Uçmak Z., Uçmak M., Yildirim F., Sabuncu A., Tek Ç., Caliskan Karacam E., "Complex Gynecologic Pathologies in a Bitch", International Vetistanbul Group Congress 2014, İstanbul, Türkiye, 28-30 Nisan 2014, Pp.91-91.

Uçmak M., Yılmaz Ö., Evkuran Dal G., Günay Uçmak Z., Karaçam E. , Gündüz M.C., "Kedilerde Gebeliğin Doppler Ultrasonografi ile Değerlendirilmesi", V. Veteriner Doğum Ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 31 Ekim - 3 Kasım 2013, Ss.182-182.

Karaçam E. , Toydemir T.S.F., Günay Uçmak Z., Yılmaz Ö., Yüzbaşıoğlu Öztürk G., Gülçubuk A., "Dişi Bir Tavşanda Görülen Kompleks Jinekolojik Patolojiler", V. Veteriner Doğum Ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 31 Ekim - 3 Kasım 2013, Ss.210-210.

Günay Uçmak Z., Karaçam E., Kirşan İ., Uçmak M., Yılmaz Ö., Enginler S.Ö., et al., "Gebe Bir Köpekte Prolapsus Uteri Olgusu", V. Veteriner Doğum Ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 31 Ekim - 3 Kasım 2013, Ss.200 -200.

Yılmaz Ö., Uçmak M., Günay Uçmak Z., Karaçam E., Erzenin Ö.M., "Kedilerde Güç Doğum Sırasında Fötal Ve Föto-Maternal Damarların Doppler Ultrasonografi ile Değerlendirilmesi: 4 Olgu Sunumu", V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 31 Ekim - 3 Kasım 2013, Ss.180-180.

Yılmaz Ö., Toydemir T.S.F., Kirşan İ., Dokuzeylül B., Günay Uçmak Z., Karaçam E., "Kedilerde İntraoperatif Lokal Bupivakain Uygulamasının Bilateral Radikal Mastektomi Operasyonu Sonrası Analjezi Düzeyi Üzerine Etkisi", V. Veteriner Doğum Ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 31 Ekim - 3 Kasım 2013, Ss.102-102.

Evkuran Dal G., Gündüz M.C., Yılmaz Ö., Enginler S.Ö., Günay Uçmak Z., Kurban İ., et al., "Siklik Kısıraklarda İntrafoliküler Amh, Igf-1, İnhibin-A, İnhibin-B, Östradiol ve Progesteron Konsantrasyonları", V. Veteriner Doğum Ve Jinekoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 31 Ekim - 3 Kasım 2013, Ss.38-38.

Günay Uçmak Z., Uçmak M., Yildirim F., Sabuncu A., Çalışkan Karacam E., Tek Ç., "Complex Gynecologic Pathologies in a Bitch", 8th Joint Scientific Symposium, Münih, Almanya, 9-12 Nisan 2013, Pp.63-63.

Günay Uçmak Z., Uçmak M., Yildirim F., Sabuncu A., Caliskan Karacam E., Tek Ç., "Complex Gynecologic Pathologies in a Bitch", 2nd Turkish Bosnian Scientific Days, İstanbul, Türkiye, 9-11 Mayıs 2013, Pp.45-45.

Yilmaz Ö., Toydemir T.S.F., Kirşan İ., Dokuzeylül B., Sontaş H. , Günay Uçmak Z., Et Al., "Effect Of Intravenous and Local Bupivacain Administration on Postoperative Analgesia in Cats Undergoing Bilateral Radical Mastectomy", 16th Evssar Congress, Toulouse, Fransa, 5-7 Temmuz 2013, Pp.175-175.

Günay Uçmak Z., Sontaş H. , Yildirim F., Fırat İ., Kaşıkçı G., "A Diffuse Metastasis of Feline Mammary Carcinoma", Bosnian Turkish Scientific Days, Sarajevo, Bosna Hersek, 14-17 Nisan 2011, Pp.62-62.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap okumak, müzik dinlemek, voleybol ve yüzme.