

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

**SIÇANLARIN MEME DOKUSUNDA GEBELİK, LAKTASYON
VE LAKTASYON SONRASI DÖNEMDE EPİDERMAL BÜYÜME
FAKTÖRÜ (EGFR) VE VASKÜLER ENDOTELİYAL BÜYÜME
FAKTÖRÜ (VEGFR) RESEPTÖRLERİNİN DAĞILIMININ
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK GÖSTERİLMESİ**

**Doktora Tezi
Araş. Gör. Hakan SAĞSÖZ**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. M. Aydın KETANİ**

Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından DÜBAP-
2008-13-28 nolu proje olarak desteklenmiştir.**

Diyarbakır 2009

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

“Sıçanların Meme Dokusunda Gebelik, Laktasyon ve Laktasyon Sonrası Dönemde Epidermal Büyüme Faktörü (EGFR) ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGFR) Reseptörlerinin Dağılımının İmmunohistokimyasal Olarak Gösterilmesi” başlıklı Doktora tezi 01.10.2009 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. M. Aydın KETANİ

Tezi Teslim Eden : Araş. Gör. Hakan SAĞSÖZ

Jüri Üyesinin Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi

Başkan : Prof. Dr. Narin LİMAN

Üye : Doç. Dr. M. Aydın KETANİ

Üye : Doç. Dr. Sema GÜRGÖZE

Üye : Doç. Dr. Mehmet KILINÇ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Berna GÜNEY SARUHAN

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

...../...../.....

Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR YAZISI

Bu çalışmanın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. M. Aydın KETANİ'ye, önerileri ile beni yönlendiren Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Narin LİMAN'a, tez süresince her konuda desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Berna GÜNEY SARUHAN, aileme ve değerli arkadaşım Uzm. M. Erdem AKBALIK ile bu araştırmanın projelendirilmesini sağlayan ve maddi destekte bulunan Dicle Üniversitesi Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1.Önsayfalar	SayfaNo
1.1.Kapak	
1.2.İç Kapak	
1.3.Onay Sayfası.....	1
1.4.Teşekkür Sayfası	ii
1.5.İçindekiler Dizini	iii
1.6.Şekiller Dizini	v
1.7.Tablolar ve Grafikler Dizini	x
1.8. Kısaltmalar Dizini.....	xi
2.ÖzetSayfaları	
2.1.Türkçe Özet	xiii
2.2.İngilizce Özet.....	xiv
3.Tez metni	
3.1.Giriş ve Amaç.....	1
3.2.Genel Bilgiler.....	5
3.2.1- Prenatal Dönemde Memenin Gelişimi	6
3.2.2- Postnatal Dönemde Memenin Gelişimi	6
1. 3.2.2.1-Prepubertal meme gelişimi	6
2. 3.2.2.2-Pubertal meme gelişimi	7
3. 3.2.2.3-Gebelikte meme gelişimi	7
4. 3.2.2.4-Laktasyonda meme gelişimi	8
5. 3.2.2.5- Memenin İnvölüsyonu	9
3.2.3-Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri	10
3.2.3.1-İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri (ErbB/HER)	
Ailesi	12
3.2.3.1.1-Epidermal büyüme faktörü ve reseptörü (EGFR/erbB-1)	12
3.2.3.1.2- İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (ErbB2/HER2)	14
3.2.3.1.3- İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 3 (ErbB3/HER3)	14
3.2.3.1.4- İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 4 (ErbB4/HER4)	15
3.2.3.2-Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü ve Reseptörleri	16

3.2.3.2.1-Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	17
1. 3.2.3.2.2-Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörleri	19
1. 3.2.3.2.2.1- VEGFR-1 (flt-1)	19
2. 3.2.3.2.2.2- VEGFR-2 (flk-1/KDR)	20
3. 3.2.3.2.2.3- VEGFR-3 (flt-4)	20
3.2.4-Vasküler Endotel Hücre Büyümesini Baskılayan Faktör (VEGI)	21
3.2.5-Meme Gelişiminin Hormonal Düzenlenmesi	22
3.3.Gereç ve Yöntem.....	24
1. 3.3.1- Deney Hayvanları	24
2. 3.3.2- Histolojik Analiz	24
3. 3.3.3- İmmunohistokimyasal Analiz	25
4. 3.3.4- İmmunohistokimyasal Boyanma Sonuçlarının Değerlenmesi	26
3.4.Bulgular.....	28
1. 3.4.1- Meme Bezinin Yapısal Özellikleri	28
2. 3.4.2- Meme Bezinin İmmunohistokimyasal Özellikleri	31
3.5.Tartışma.....	68
3.6.Sonuç ve Öneriler.....	82
4. Kaynaklar	83
5. Ekler	
6. Özgeçmiş	95

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 4.1.** Gebeliğin 7. günündeki sıçanların memesinin genel görünümü, A: alveol, K: kanal, YD: yağ dokusu, k: kan damarı, kalın oklar: alveol ve kanal epitel hücreleri, üçlü boyama X 10..... **29**
- Şekil 4.2.** Gebeliğin 21. günündeki sıçanların memesinin genel görünümü, A: alveol, K: kanal, YD: yağ dokusu, k: kan damarı, kalın oklar: alveol ve kanal epitel hücreleri, üçlü boyama X 10..... **29**
- Şekil 4.3.** Laktasyon dönemindeki sıçanların memesinin genel görünümü, A: alveol, K: kanal, YD: yağ dokusu, kalın oklar: alveol ve kanal epitel hücreleri, üçlü boyama X 10..... **30**
- Şekil 4.4.** İnvölüsyon dönemindeki sıçanların memesinin genel görünümü, A: alveol, K: kanal, YD: yağ dokusu, k: kan damarı, kalın oklar: alveol ve kanal epitel hücreleri, üçlü boyama X 20..... **31**
- Şekil 4.5.** İmmunohistokimyasal boyanmanın görülmediği negatif kontrol, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, Gill Haematoksilen X10..... **32**
- Şekil 4.6.** Meme lenf düğümünün korteksinde yerleşen bazı hücrelerde ve damar endotelindeki EGFR/erbB1 lokalizasyonu, LD: lenf düğümü, KR: korteks, k: kan damarı, endotel hücresi (ok), X40..... **32**
- Şekil 4.7.** Meme lenf düğümünün korteksinde yerleşen bazı hücrelerde ve damar endotelindeki VEGF lokalizasyonu, KR: korteks, k: damar, endotel hücreleri (ok), X40..... **33**
- Şekil 4.8.** Gebeliğin 14. günündeki sıçan memesinde erbB1 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ dokusu, S: bağdoku, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endoteli (ince ok), X20 **34**
- Şekil 4.9.** Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde erbB2 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, S: bağdoku, k: kan damarı, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endoteli hücresi (ince ok), X40..... **34**
- Şekil 4.10.** Gebeliğin 21. günündeki sıçan memesinde erbB1 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ dokusu, S: bağdoku, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endoteli (ince ok), X40..... **35**

Sayfa No

- Şekil 4.11.** Gebeliğin 14. gününde sıçan memesinde erbB2 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ dokusu, k: kan damarı, kanal epitel (kalın ok), damar endoteli hücresi (ince ok), X20..... **36**
- Şekil 4.12.** Gebeliğin 7. günündeki sıçan memesinde erbB3 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel (kalın ok), X40..... **37**
- Şekil 4.13.** Gebeliğin 7. günündeki sıçan memesinde erbB4 lokalizasyonu, K: kanal, YD: yağ doku, kanal epitel hücreleri (ok), X40..... **38**
- Şekil 4.14.** Gebeliğin 14. günündeki sıçan memesinde erbB3 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, damar endoteli ve miyoepitel hücresi (ok), X40..... **38**
- Şekil 4.15.** Gebeliğin 21. günündeki sıçan memesinde erbB4 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücresi (kalın ok), damar endotel hücresi (ince ok), X20..... **39**
- Şekil 4.16.** Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde VEGF lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S:bağdoku, YD: yağ doku, ekstraselüler matriks immunreaktivitesi (ok), X20..... **41**
- Şekil 4.17.** Gebeliğin 14. gününde sıçan memesinde VEGF lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S:bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, X20 **41**
- Şekil 4.18.** Gebeliğin 21. gününde sıçan memesinde VEGF lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, alveollerdeki immunreaksiyon gösteren salgı materyali (ok), X20..... **42**
- Şekil 4.19.** Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde VEGFR-1 (flt1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitelinde boyanma (kalın ok), miyoepitel ve bağdoku hücrelerinde immunreaktivite (ince ok), X20..... **43**
- Şekil 4.20.** Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde VEGFR-2 (flk1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, S: bağdoku,) damar endotel hücrelerinde immunreaktivite (ok), X40.... **44**

Sayfa No

- Şekil 4.21.** Gebeliğin 21. gününde sıçan memesinde VEGFR-2 (flk1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, damar endotel hücrelerinde immunreaktivite (ok), X40..... **44**
- Şekil 4.22.** Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde VEGFR-3 (flt4) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücrelerinde boyanma (kalın ok), damar endotel hücresinde immunreaktivite (ince ok), X40..... **46**
- Şekil 4.23.** Gebeliğin 14. gününde sıçan memesinde VEGFR-3 (flt4) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaktivite (kalın ok), endotel, bağdoku ve miyoepitel hücrelerinde immunreaktivite (ince ok), X40..... **47**
- Şekil 4.24.** Gebeliğin 21. gününde sıçan memesinde VEGFR-3 (flt4) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaktivite (ok), X20..... **47**
- Şekil 4.25.** Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde VEGI lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaksiyon (ok), X40... **49**
- Şekil 4.26.** Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde ER lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, immunreaktive alveol ve kanal epitel hücreleri (ok), X40. **50**
- Şekil 4.27.** Gebeliğin 21. gününde sıçan memesinde ER lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, k: kan damarı, immunreaksiyon gösteren alveol ve kanal epitel hücreleri (ok), X10.... **51**
- Şekil 4.28.** Laktasyon döneminde sıçan memesinde erbB1 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endoteli ve miyoepitel hücreleri (ince ok), X40.... **52**
- Şekil 4.29.** Laktasyon döneminde sıçan memesinde erbB3 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, k: kan damarı, miyoepitel hücreleri (ok), X10... **53**
- Şekil 4.30.** Laktasyon döneminde sıçan memesinde erbB4 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, miyoepitel hücresi (ok), X40... **53**
- Şekil 4.31.** Laktasyon döneminde sıçan memesinde VEGF lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, ekstraselüler matrikste immunreaktivite (ok), X40.. **54**

Sayfa No

- Şekil 4.32.** Laktasyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-1 (flt1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, k: kan damarı, miyoepitel ve bağdoku hücrelerinde immunreaksiyon (ok), X20.... **55**
- Şekil 4.33.** Laktasyon döneminde sıçan memesinde içleri salgı ile dolu alveol ve kanallarda VEGFR-1 (flt1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, alveol ve kanal epitelinde immunreaksiyon (ok), X20... **55**
- Şekil 4.34.** Laktasyon döneminde sıçan memesinde damarlarda VEGF lokalizasyonu, A: alveol, YD: yağ doku, kan damarında media katmanındaki immunreaktivite (kalın ok), damar endotel hücresi (ince ok), X20... **56**
- Şekil 4.35.** Laktasyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-2 (flk1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, X40.... **57**
- Şekil 4.36.** Laktasyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-3 (flt4) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaktivite (kalın ok), endotel, bağdoku ve miyoepitel hücrelerinde immunreaktivite (ince ok), X40... **58**
- Şekil 4.37.** Laktasyon döneminde sıçan memesinde VEGI lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, interalveolar bölgede immunreaktive kapillar damarlar (ok), X10.... **59**
- Şekil 4.38.** Laktasyon döneminde sıçan memesinde ER lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, k: kan damarı, immunreaktive alveol ve kanal epitel hücreleri (ok), X10.. **60**
- Şekil 4.39.** İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde erbB1 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endoteli ve bağdoku hücresi (ince ok), X20... **61**
- Şekil 4.40.** İnvölüsyon döneminde sıçan meme bezinde erbB2 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, k: kan damarı, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endoteli hücresi (ince ok), X10... **61**
- Şekil 4.41.** İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde erbB3 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endotel hücresi (ince ok), X10... **62**

Sayfa No

- Şekil 4.42.** İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde erbB4 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, k: kan damarı, damar endotel hücresi (ok), X40.. **62**
- Şekil 4.43.** İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde VEGF lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, alveol ve kanal epitelinde immunreaksiyon (ok), X20. **63**
- Şekil 4.44.** İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-1 (flt1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, S: bağdoku, alveol ve kanal epitelinde immunreaksiyon (kalın ok), damar endotel ve bağdoku hücrelerinde immunreaksiyon (ince ok), X40... **64**
- Şekil 4.45.** İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-3 (flt4) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaksiyon (ok), 10... **64**
- Şekil 4.46.** İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-2 (flk1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaksiyon (ok), X40.... **65**
- Şekil 4.47.** İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde VEGI lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, immunreaksiyon gösteren damar endotel hücreleri (ok), X40.... **66**
- Şekil 4.48.** İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde ER lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, immunreaksiyon gösteren alveol ve kanal epitel hücreleri (ok), X10... **67**

TABLO VE GRAFİKLER

	<u>Sayfa No</u>
Tablo-3.1: Kullanılan antikorlara ait bilgiler	25
Tablo-3.2: Antikorların hücresel lokalizasyonları	26
Grafik 4.1. Sıçan memesinde EGFR/erbB1 reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru.	35
Grafik 4.2. Sıçan memesinde erbB2 reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru.	36
Grafik 4.3. Sıçan memesinde erbB3 reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru.	39
Grafik 4.4. Sıçan memesinde erbB4 reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru.	40
Grafik 4.5. Sıçan memesinde VEGF immunreaksiyonunun toplam skoru.	42
Grafik 4.6. Sıçan memesinde VEGFR-1 (Flt1) reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru.	45
Grafik 4.7. Sıçan memesinde VEGFR-2 (Flk1) reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru.	45
Grafik 4.8. Sıçan memesinde VEGFR-3 (Flt4) reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru.	48
Grafik 4.9. Sıçan memesinde VEGI immunreaksiyonunun toplam skoru.	49
Grafik 4.10. Sıçan memesinde östrojen reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru.	51

KISALTMALAR

AR	Aragulin
BTC	Betaselulin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EC	Endotel Hücresi
ECM	Ekstraselüler Matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
eNOS	Endoteliyal Nitrik Oksit Sentaz
EPR	Epiregulin
ER	Östrojen Reseptörü
FGFs	Fibroblast Büyüme Faktörü
Flt1	Fms Benzeri Tirozin Kinaz
Flk1	Fötal Karaciğer Kinaz 1
HB-EGF	Heparin Bağlayan Epidermal Büyüme Faktörü
HER1/erbB1	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 1
HER2/erbB2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HER3/erbB3	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 3
HER4/erbB4	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 4
HUVEC	İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücresi
IL-1	İnterlöykin 1
IL-2	İnterlöykin 2
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
NRG	Neurogulin

PBS	Fosfat Buffer Salin
PDGF	Trombositlerden Salinan Büyüme Faktörü
PIGF	Plasental Büyüme Faktörü
TGF α	Transformik Büyüme Faktörü
TNF α	Tümör Nekroz Faktör α
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VEGF-A	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü A
VEGF-B	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü B
VEGF-C	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü C
VEGF-D	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü D
VEGF-E	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü E
VEGFR	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü
VEGI	Vasküler Endotelial Büyüme Baskılayan Faktörü

ÖZET

Bu araştırma, sıçan memesinde EGFR (erbB-1), erbB-2, erbB-3, erbB-4, VEGI ve VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) ile VEGI ve Östrojen reseptörlerinin (ER) yerleşimi ve miktarlarında gebelik, laktasyon ve laktasyon sonrası dönemde oluşabilecek değişimlerin belirlenmesi amacıyla planlandı. Çalışmada Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DÜSAM) Müdürlüğü'nden temin edilen 35 adet erişkin, 220-250 gr ağırlığında Spraque-Dawley ırkı dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde rastgele 5 gruba ayrıldı. Gebeliğin 7., 14. ve 21. günü, doğumdan sonraki 7.günde (laktasyon dönemi) ve süttten kesildikten sonraki 7. günde (involüsyon dönemi) Ketalar (Ketamin HCl-Phizer) (90mg/kg) anestezisi altında; abdominal bölgedeki memenin iki tanesi total olarak çıkarıldı. Bütün gruplardan alınan meme dokuları % 10 nötral formalin solüsyonunda 24 saat tespit edildi. Daha sonra rutin histolojik işlemlerden geçirilerek paraplasta bloklandı. Meme bezinin genel yapısı için üçlü boyama, EGFR (erbB-1), erbB-2, erbB-3, erbB-4, VEGF ve VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) ile VEGI ve ER için ise immunohistokimyasal boyama yöntemi uygulandı.

Gebeliğin ilk haftasında meme yağ dokusunun bezin büyük bir kısmını meydana getirdiği ancak ikinci ve son dönemde ise yağ dokusunun azaldığı, lop ve lopçuk yapılarının belirginleştiği, alveol ve kanal sayılarının arttığı görüldü. Laktasyon döneminde bağdoku ve meme yağ dokusunun tamamıyla gerilediği ve alveol ile kanalların oldukça geliştiği saptandı. İnvolüsyon döneminde ise meme yağ dokusu ve bağdokusunun hacimce artmaya başladığı ve alveollerin lümeninin daraldığı belirlendi. İmmunohistokimyasal olarak ise, gebelik, laktasyon ve involüsyon süresince erbB, VEGF ve reseptörleri, VEGI ve ER'nin değişik yoğunluklarda boyandığı belirlendi. Özellikle erbB reseptörlerinin gebelik ve involüsyon süresince, VEGF ve reseptörlerinde laktasyon süresince yoğun immunreaktivite verdiği görüldü. ER immunreaktivitesinin ise gebeliğin son dönemi ve laktasyon süresince yoğun olduğu dikkati çekti. Bütün bu bulgular; meme bezinin farklı dönemlerde ve farklı bölgelerinde değişik oranlarda lokalize olan ErbB, VEGF ve reseptörleri ile östrojen reseptörlerinin, meme epitelinin büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde fizyolojik bir rol oynayabileceğini güçlü bir şekilde desteklemiştir.

Anahtar kelimeler: erbBs, VEGF, VEGI, ER, immunohistokimya, meme bezi, sıçan

ABSTRACT

This research is aimed to detect the probable changes in localization and quantity of EGFR (erbB-1), erbB-2, erbB-3, erbB-4, VEGF and VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) and VEGF-R3 (flt-4) with VEGI and also estrogen receptors in related to periods of Pregnancy, Lactation and Involution on rat mammary gland. In this study, 35 mature Spraque-Dawley female rats between 220-250 weight are used and obtained from the University of Dicle, Health Science Institution and Application Center (DÜSAM). Animals randomly taken into groups of five, each one has seven animals. Two mammary glands in the abdominal region were removed totally in the pregnancy periods of 7, 14 and 21 days; and after the 7 day of birth (lactation period), includes the 7 day of weaning (involution period) under the control of Ketamine (Ketamin HCl-Phizer) (90mg/kg) anesthesia. Mammary glands taken from all groups are fixed about 24 hours on %10 neutral formaline solution. Then, they are blocked in the paraplast by routine histological procedure. Triple staining for general structure, and immunohistochemical staining for EGFR (erbB-1), erbB-2, erbB-3, erbB-4, VEGF and VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) and VEGF-R3 (flt-4) with VEGI and estrogen receptors are applied.

It is seen that adipose tissue constitutes the great part of mammary gland of the first week, but after the second and last periods, adipose tissue decreased, structures of lob and lobuli are strongly marked, number of alveols and ducts increased. It is determined that in the lactation periods, connective and adipose tissue totally decrease, developed of alveols and ducts considerably progress. In the involution period, it is determined that adipose tissue and connective tissue increase size and constriction of alveols lumen. As immunohistochemical, during the periods of pregnancy, lactation and involution; It is also determined that erbB, VEGF and its receptors, VEGI and ER, are stained with different intensity. Especially erbB receptors are stained heavily during the pregnancy and involution, and also VEGF and its receptors during the period of lactation, but it attracted attention that ER is stained during the last periods of pregnancy and lactation. All these finding supports that different amounts ErbB, VEGF and its receptors with estrogen which is located in different times and also different regions of mammary gland play a physiological role for growth and differentiation of epithelium.

Key words: erbBs, VEGF, VEGI, ER, immunohistochemistry, mammary gland, rat

3.1- GİRİŞ VE AMAÇ

Memeli hayvanlar, aldıkları besin maddelerini süt gibi önemli bir ürüne dönüştüren biyolojik birer makine olarak düşünülebilirler. Bu dönüşümün yani süt üretiminin gerçekleştiği yer olması nedeniyle meme (süt bezi) önemli bir organdır. Yeryüzündeki canlılar arasında memelilerin en gelişmiş organizma olmalarında süt bezlerinin varlığı en büyük etmenlerden biridir. İnsan ve memeli hayvanlarda, yeni doğan yavruların beslenmeleri, sürekli yenilenen ve mevsim değişikliklerinden etkilenmeyen bir besin olan sütle sağlanmaktadır. Bu ise memelilere olağanüstü bir avantaj sağlamaktadır. Çünkü diğer türler, yavrularının besin ihtiyacını karşılamak için, her gün belli bir miktarda besin maddesini ya toplamak ya da avlamak zorundadırlar. Memeliler ise, annenin günlük beslenme miktarının biraz üstünde beslenmesi ile aldığı suyu, proteinleri ve mineral tuzları süte dönüştürebilmektedirler. Besin yetersizliği durumunda ise, anne kendi yağ rezervlerini kullanarak süt üretebilmektedir.

Dişi memelilerin yaşamı süresince meme, büyüme, farklılaşma, laktasyon ve involüsyon gibi bir takım periyodik değişimler geçirmektedir. Bu değişimler ovaryum ve hipofiz hormonları (östrojen, progesteron, prolaktin vs) ile meme epiteli (Epidermal büyüme faktörü-EGF, TGF α vs) ve stromasından salgılanan (hepatosit büyüme faktörü, fibrosit büyüme faktörü-2 vs) büyüme faktörlerinin kompleks etkileşimiyle düzenlenmektedir (1-3).

Gebeliğin şekillenmesini takiben dişi memelilerde kilo artışı, meme ve karındaki büyüme gibi bir takım fiziksel değişimler şekillenir (1). Memedeki bu değişiklikler östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi altında gerçekleşir. Meme gebelik süresince, östrojen ve progesteron reseptörlerini içerir. Progesteron, gebelik süresince yüksek olduğu halde östrojen, gebeliğin ikinci yarısından itibaren yükselmeye başlar. Bu nedenle de gebeliğin ilk yarısında memenin kanal ve tubulo-alveolar sistemi gelişir. Tubulo-alveolar proliferasyon ve alveolar sekretorik hücrelerin bölünmesi gebeliğin ilerlemesiyle artarak devam eder. Son dönemde alveol ve akıtıcı kanal epitelileri salgılama aktivitesi (laktogenez) kazanırlar ve memeler laktasyon periyoduna girer. Laktasyonda meme östrojen reseptörlerine sahipken, progesteron reseptörlerini içermez. Bundan ötürü de gebeliğin ilk yarısında meme büyümesinin büyük bir kısmını kanallar sisteminin büyümesi ve

lopçuk şekillenmesi oluşturur. Gebeliğin ikinci yarısından itibaren ise kanal büyümesi devam eder; ancak büyümenin çoğunluğu lobualveolar sistemde meydana gelir. Sonuç olarak, gebeliğin başlangıcında memenin alveol sistemi, ortasında meme lobları, son döneminde ise alveolar dokunun lobları belirginleşir ve içleri sıvı ile dolmaya başlar. Bu dönemde paraselüler yol olarak adlandırılan bir yol, süt aralığı ve intersitisyel aralık arasından materyallerin direkt geçmesine izin verir. Bu yol immunglobulinlerin memeye geçmesini sağlar. Meme tamamiyle süt sekresyonuna geçince de sıkı bir barrier ile kapanır. Bu barrier mastitis varlığında ve involüsyonda açılır (1-3).

Süt sekresyonunun başlaması olarak ifade edilen laktasyon, doğum sonucu şekillenen hormonal değişimler ile başlar. Bu değişimler bütün memeli türlerinde iki aşamada gerçekleşir. İlk dönem, doğumdan hemen önce, az miktarda süt sekresyonu ile aynı anda gerçekleşen alveolar hücrelerdeki sitolojik ve enzimatik farklılaşmalardır. Alveol epitelinde endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtının hipertrofisi ile birlikte lipid sentezinde, iyonlar ve suyun membranlardan geçişi ile immunglobulinler, hormonlar ve albumin gibi ekstra alveolar proteinlerin salgılanmasında artış gerçekleşir. İkinci dönem ise, birçok türlerde postpartum ilk birkaç gün boyunca görülen yoğun sekresyonun başlamasıdır. Bu dönemdeki salgı ürünü kolostrum olarak adlandırılır. Bu sıvı yüksek yoğunlukta immunglobulinleri, koruyucu proteinleri ve laktoferrini içerir. İmmunglobulinlerin plasental geçişinin mümkün olmadığı ruminant gibi türlerde yavrunun immun sistemi gelişinceye kadar pasif bir koruma sağlar (1, 4, 5). İmmunglobulinlerin plasental geçişinin mümkün olduğu diğer türlerde ise post-partum dönemin başlangıcında IgA, laktoferrin ve yüksek yoğunlukta oligosakkaridler aracılığıyla humoral bağışıklık sağlanır. Laktasyonun devamlılığında etkili olan prolaktin galaktopoietik bir hormon olup, ruminantlar dışındaki diğer tüm türlerde de çok önemlidir. Bu hormon ruminantlarda ve ruminant dışındaki memelilerde sütün memeden salınma zamanı geldiğinde salgılanır ve laktasyon boyunca süt sekresyonunu düzenleyen sistemik bir hormon olarak kalır. Ruminantlarda ve sığanlarda ise büyüme hormonu en önemli galaktopoietik hormondur (2, 3).

Laktasyonun sonlanmasıyla alveol epitelinin salgılama aktivitesi durur ve involüsyon süreci başlar. İnvölüsyon emme ve sağımın kesilmesiyle alveollerde

salgı toplanması, üretilen salgı boşaltılmadığı için epitel hücrelerinde dejenerasyonun başlaması ve epitel hücrelerinin yoğun yıkımı ile karakterizedir. Bu hücre kaybı apoptoz yoluyla gerçekleşir. Apoptoz doğal süreçte, memede biçim değiştirme, enfeksiyonlara karşı cevap oluşturma ve geri dönüşsüz hücre yıkımlanması ile şekillenir. İnvölüsyonun başlangıcında memede süt sekresyonunun durması hızlı değişimlere sebep olur (6). Özellikle memede salgının bileşiminde bir takım değişiklikler meydana gelir. Salgı bileşimindeki bu değişimlerin en önemlisi memede laktoz yoğunluğundaki hızlı düşmedir. Ancak; protein yoğunluğu, laktoferrin, serum albumin ve immunglobulinlerin konsantrasyonu involüsyonun başlangıcında artar. Laktoferrin involüsyon süresince meme salgılarında bulunan asıl proteindir ve özellikle memede nonspesifik hastalıklara karşı direncin artırılmasında potansiyel bir fonksiyona sahiptir (1, 4, 5).

Beslenmede büyük önem taşıyan sütün sağlıklı ve nitelikli olması, üretildiği yer olan memenin sağlığı ile yakından ilişkilidir. Bundan dolayı da meme hastalıkları ekonomik bir öneme sahiptir. Özellikle gebelikte, laktasyonda ve involüsyonda memede şekillenen fizyolojik değişimler enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan hastalıklara karşı olan duyarlılığı artırır. Bakteriler, virüsler, parazitler ve mantarlar enfeksiyöz, iritan kimyasal maddeler, dolaşım bozuklukları, yaralanma ve çeşitli sağım ekipmanlarına bağlı travmalar ise enfeksiyöz olmayan hastalıklara neden olurlar. Bu hastalıkların tanısı ve tedavisinde başarılı olunabilmesi için de memenin yapısı ve belirtilen dönemler içerisindeki fizyolojik değişimlerin mekanizmalarının daha iyi bilinmesi gereklidir (1, 4, 5).

Yapılan literatür taramalarında sıçanlarda gebelik, laktasyon ve involüsyon döneminde memede bu reseptörlerin lokalizasyonu ve kantitatif analizleri ile ilişkili bir bilgiye rastlanılmamıştır. Bugüne kadar daha çok insanda ve bazı memeli hayvanlarda memede oluşan normal veya patolojik değişikliklerde meme epiteli ve stroması tarafından salgılanan büyüme faktörlerinin olası rolleri ortaya konmuştur. Özellikle farelerde memede alveol ve kanalların gelişiminde Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve reseptörünün (EGFR yada erbB-1) etkinliği ile ilgili birçok çalışmanın yapıldığı görülmüştür (7-14). İnsanlarda ise daha çok EGF, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ve bunların reseptörlerinin meme tümörleri ile ilişkileri araştırılmıştır (15-21).

Bu araştırma, sıçan memesinde EGFR (erbB-1), erbB-2, erbB-3, erbB-4, VEGF ve VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) ile VEGI ve ER yerleşim ve miktarında gebelik, laktasyon ve laktasyon sonrası döneme bağlı olarak oluşabilecek değişimlerin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır. Çalışma sıçanlarda gebelik, laktasyon ve involüsyon döneminde memede söz konusu reseptörlerin kantitatif analizleri ile ilişkili ilk araştırma olması bakımından önem taşımaktadır.

3.2- GENEL BİLGİLER

Meme (süt bezleri), deri ve karın duvarı arasında yerleşen dallanmış kanallar sisteminden oluşan özelleşmiş bir deri bezidir (22). Yerleşim yeri, büyüklüğü, sayısı ve makroskopik yapısı hayvan türleri arasında farklılık gösterir. Şekli ise, yaş, seksüel gelişim, laktasyon dönemi ve sayısına bağlı olarak değişir (4). Meme inek, koyun, keçi ve kısrakta vücudun inguinal bölgesinde, köpek, kedi, domuz, fare ve sıçanda ise torako-abdominal ve torako-inguinal bölgede paramediyan ve simetrik olarak çift sıra halinde yerleşir. İnekte 4, koyun, keçi ve kısrakta 2 adet meme lobu bir araya gelerek memeyi oluşturur. Köpek, fare ve sıçanda ortalama 10 adet, kedide ise 8 adet meme lobu bulunur. Köpek, fare ve sıçanda bu loplara 4 tanesi torakal, 4 tanesi abdominal ve 2 tanesi inguinal bölgede yerleşirken, kedide ise meme loplara torakoabdominal bölgede bulunur. Her bir meme lobu bir adet meme başı ile dışarıya açılır (5).

Bağdokudan oluşan bir kapsülle sarılı olan meme, bileşik tubulo-alveolar yapıda bir bez olup, lop ve lopçuklardan oluşur. Kapsülden ayrılarak loplara oluşturan geniş bağdoku bölmeleri interlober intersitisyum, lopçuklara oluşturan daha dar bağdoku bölmeleri ise interlobuler interstisyum adını alır. Bağdoku özelliğindeki kapsül ile interlober ve interlobuler interstisyum organın stromasını, salgı yapan oluşumlar ve yapılan salgıyı götüren kanallar ise organın parenşimini oluştururlar. Salgı üniteleri (alveoller) intralobuler olarak, akıtıcı kanallar (duktus laktiferus) intralobuler, interlobuler ve interlober yerleşim gösterirler. Parenşimin bir bölümü olan sinus laktiferus, interlober duktus laktiferuslardan gelen sütün toplandığı sarnıçtır. Burada toplanan süt parenşimin son bölümü olan meme başı içindeki duktus papillaris gelir ve dış ortama çıkar. Duktus laktiferuslardan intralobuler olanların duvarı tek katlı kübik, interlobuler olanların duvarı ise tek katlı prizmatik epitel ile örtülüdür. İnterlober duktus laktiferusların ve sinus laktiferusun duvarı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Her meme başı içinde türlere göre değişen sayılarda yerleşmiş olan duktus papillarisler ise çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. İnekte papillar kanalı örten epitelin hemen altında elastik ipliklerden zengin gevşek bağdokudan oluşan bir lamina propria bulunur. Bunu da dıştan üç kat halinde düz kas hücreleri sarar. Domuz, köpek ve özellikle ruminantlarda düz kas hücreleri bir araya gelerek sirküler yönlü m. sfinkter papillayı oluşturur. Bu kas elastik ipliklerle

de desteklenir. Memeyi örten deri, inek ve domuzda kılsız olduğu ve bez içermediği halde kısrak, kedi ve köpekte yoğun yağ bezleri ve ince kıllar bulunur (23-25).

Dişilerde meme prenatal, prepubertal, pubertal, gebelik, laktasyon ve involüsyon olarak adlandırılan, üreme ve seksüel değişim ile bağlantılı olan aşamalar geçirir (26). Bu nedenle yapısal özellikleri, dişinin yaşam sürecinde farklılıklar gösterir. Embriyonik ve postnatal yaşam süresince meme alveolleri ve kanallarının gelişiminde hormonlar bağımsız olarak meydana gelirken, pubertada kanal gelişimi ile gebelikte lobulo-alveolar gelişim hormonal olarak düzenlenir (27, 28).

3.2.1- Prenatal Dönemde Memenin Gelişimi: Meme gelişiminin ilk belirtisi aksillar bölgeden inguinal bölgeye kadar uzanan bant benzeri ektodermal kalınlaşmanın (süt çizgisi) görülmesidir. Bezin bireysel sayı ve yerleşimi türler arasında farklılık gösterir. Ancak süt çizgisinin yerleştiği bölge bütün türlerde ortaktır. Domuz ve köpek gibi bazı memelilerde, meme çiftlerinin gelişimi süt çizgisi boyunca olurken, insanda pektoral bölgede, inek ve balinada ise süt çizgisinin posterior bölümüne yakın olarak gelişim meydana gelir (29, 30). Memenin parenşim dokusu embriyonik olarak ektodermden, stroma dokusu ise mezodermden köken alır. Meme meme sürgünü olarak belirir. Kanalların şekillenmesinden önce meme başı deliği, meme başı ve meme bezi sisternaları gelişir. Bunu takiben sinuslar, büyük ve küçük kanallardan ibaret olan ve çok yönlü süt akımını sağlayan sistem şekillenir. Sinuslar sisternanın uzantısıdır ve sisterna gibi sütü depolama görevi görürler. Doğuma kadar her cinsiyet için rudimenter kanal sistemi ile birlikte rudimenter bir meme başı bulunur, ancak sekretorik bir doku görülmez (5, 26, 27).

3.2.2- Postnatal Dönemde Memenin Gelişimi

3.2.2.1-Prepubertal meme gelişimi: Organın parenşimi, intersitisyumuna oranla çok az yer kaplar. Parenşimi oluşturan korpus glandula ve akıtıcı kanallar tam gelişmemiş olup, az sayıda korpus glandulaya ve fazla dallanma göstermeyen duktus laktiferuslara rastlanır. İntersitisyumda bağdoku iplikleri ve az miktarda yağ doku bulunur. Bazı durumlarda yavrularda doğumdan hemen sonra kısa bir süre için süt sekresyonu görülebilir. Bu da plasenta aracılığıyla yavruya geçen, anneye ait hormonların etkisi ile şekillenen geçici bir durumdur (23-25).

3.2.2.2-Pubertal meme gelişimi: Meme doğumdan pubertiye kadar önemli bir değişim göstermez. Puberti ile birlikte epitel ve bağdokudaki yapısal unsurlar da

önemli bir proliferasyon oluşur. Ancak, hiç gebe kalmamış dişilerde gerçek bir alveol yapısıyla karşılaşılmaz. Sayısı da fazla olmayan bu alveollerde epitel basık ve yassıdır. Granüller ve yağ damlacıkları içermez. Daha çok kanallardan meydana gelmiş olan bir yapı ile karşılaşılr. İntersitisyumun bol olduğu yerlerde hücre az, bağdoku fazladır. Dallanma gösteren duktus laktiferusların hemen yakınındaki bağdoku hücreden zengindir ve ince bağdoku iplikleri içerir. Buralarda yağ hücreleri görülmez (27, 28).

Puberti sonrası dönemde meme gelişiminin sürmesi tür çeşitliliği gösterir. Çiftleşmenin olmadığı durumlarda uzayan östrus döneminde kalan tavşan gibi asiklik hayvanlarda kanal gelişimi bu dönemde yoğunlaşır ve birkaç alveol formu bulunur. Diğer taraftan, siklik hayvanlarda da kanal gelişimi başlar. Sıçanlar, kanallar proöstrus ve östrus süresince yağ doku içinde proliferer olur. Meme kanal gelişiminin ortalama %8'i östrus siklusunda meydana gelir. Bu ineklerdeki ile benzerdir, ancak östrus sonrasında parenşimal dokudaki azalma düzensizdir (31).

Büyüme oranı puberta öncesi ovaryum aktivitesinin başlangıcına kadar, vücut gelişimi ile uyumludur. Yani izometrik bir büyüme vardır. Boyut artışı büyük oranda bağ ve yağ doku artışından kaynaklanır (1). İlk östrus siklusundan kısa bir süre önce başlayarak inekte meme parenşimi vücut gelişiminden daha hızlı bir oranda büyümeye başlar. Bu büyüme oranı allometrik büyüme olarak adlandırılır. Bu hızlı meme gelişimi birkaç östrus siklusu boyunca devam eder ve daha sonra gebeliğe kadar izometrik modele döner. Yinelenen her bir östrus siklusu boyunca meme ovaryumdan salgılanan östrojen ve adenohipofizden salgılanan prolaktin ve somatotropin hormonları tarafından uyarılır. Gelişim temel olarak kanal sisteminin oluşumunu içerir. Fonksiyonel luteal fazlı uzun östrus siklusuna sahip inek, keçi, domuz, at ve insanda korpus luteum tarafından üretilen progesteron ile östrojen, prolaktin ve somatotropin sinerjik etkili olarak meme kanallarının lobüloalveolar sisteminin gelişmesini ve farklılaşmasını uyarırlar (1, 4, 5).

3.2.2.3-Gebelikte meme gelişimi: Meme gelişiminin önemli bölümü gebelik sırasında gerçekleşir. Büyüme oranı gebelik boyunca katlanarak artar. Türlerle bağlı olarak toplam meme gelişiminin %48-94' ü gebelik sırasında meydana gelir. Sıçanlarda gebelik süresince toplam meme parenşim dokusunun yaklaşık %65'i gelişir. Keçilerde allometrik meme gelişimi gebelik boyunca devam eder. Benzer

şekilde sütçü ineklerde memenin parenşim dokusundaki büyüme gebelik süresince katlanarak artar. Bu oran ayda yaklaşık %25 civarındadır. Gebelik sırasında toplam meme hücre sayısındaki artışın çoğu stromal değil parenşim dokusunun proliferasyonu ile ilişkilidir (1, 2).

İneklerde gebeliğin 3-4. ayından sonra meme kanalları daha da uzar ve alveoller oluşarak supramammar yağ kitlesi içerisinde adipoz dokunun yerini almaya başlar. Meme kanallarında uzayıp büyüme en üst noktaya ulaşırken, parenşimal dokular da stromanın yerini alır. Bu da ineklerde gebeliğin 6. ayının sonuna kadar lobuloalveolar sistemin kapsamlı gelişimine yol açar. İneklerde, östrojen gebeliğin ikinci yarısından itibaren yükselmeye başlarken, progesteron gebelik süresince yüksektir. Dolayısıyla da, gebeliğin ilk yarısında meme büyümesinin çoğunluğu kanal büyümesinde ve lobular yapıda olur. Gebeliğin ikinci yarısında kanal büyümesi devam eder, ancak büyüme çoğunlukla lobuloalveollerdir (1, 2).

Domuzlarda ise gebeliğin 45. gününde lobuloalveolar gelişim başlar. Kanda östrojen konsantrasyonunun artışı hem lobuler hem de alveoler büyümeyi aynı zamanda başlatır (2, 3).

Gebeliğin ilk yarısında plasental östrojenin etkisiyle duktus laktiferuslarda yeni dallanmalar ve genişlemeler görülür. Bunu takiben yine plasentadan salgılanan progesteronun etkisiyle bol miktarda yeni alveoller şekillenir ve loplar ile lopçuklar belirir. Lopçuklar arasındaki bağdokuda bol miktarda kan ve lenf damarlarına rastlanır. Alveoller tek katlı kübik epitel hücreleri ile döşelidir. Bu epitellerin sitoplazmasında gebeliğin son döneminde tüm türlerde yağ damlacıklarına da rastlanır (24).

3.2.2.4-Laktasyonda meme gelişimi: Lop ve lopçuk yapısının çok belirgin olduğu laktasyon periyodundaki memede, bağdoku gerilemiş durumdadır. Alveollerin duvarını oluşturan epitel hücreleri, salgılanma durumlarına göre farklı görünüştedir. Fonksiyon ritmine bağlı olarak tüm alveollerde ekstrüzyon değişik zamanlarda gerçekleşir. Buna göre de alveollerde salgıyla dolu yüksek prizmatik hücreler yanında, salgısını vererek yassılaştırmış hücrelere de rastlanır. Hücreler granüllü endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı ve mitokondriyonlardan yana zengindirler. Bazı alveollerin lümeninde kolloidal kitle halinde ya da konsantrik yapıda kazein konkromentlerine rastlanır. Bunlar kazein cisimcikleri veya korpus amilaseyum

olarak adlandırılırlar. Salgılanan sütün alveollerden boşaltılması yavrunun emmesi ve sağımda miyoepitel hücrelerinin kontraksiyonuyla sağlanır (2, 3, 23-25).

Gebeliğin doğuma çok yakın döneminde ve doğumdan birkaç gün sonrasında kadar alveoller kolostrum adı verilen kolloidal, sarımtırak ve sütün daha az yağ içeren bir salgı yaparlar. Yeni doğanların ilk beslenmesinde gerekli olan bu salgı, laksatif etkisiyle bağırsaktaki fetal içeriğin boşaltılmasını sağlar. Ayrıca bu yolla, plasenta bariyerini aşamayan anneye ait antikorlar da yavruya geçer (3, 24).

3.2.2.5- Memenin İnvölüsyonu: Laktasyonun sonlanmasıyla alveol epitellerinin salgılama aktivitesi durur ve involüsyon süreci başlar. İnvölüsyonda emme veya sağımın kesilmesiyle alveollerde salgı toplanır ve üretilen salgı boşaltılmadığı için de epitel hücrelerinde dejenerasyon ve takiben apoptozis başlar. İnvölüsyonun başlangıcında memede süt sekresyonunun durması hızlı değişimlere sebep olur. Özellikle memede salgının bileşiminde bir takım değişiklikler meydana gelir (32-36).

Farelerde meme involüsyonu doku fonksiyonlarının hızlı kaybı, alveolar yapının dejenerasyonu ve epitel hücrelerinin yoğun yıkımı ile karakterizedir. Bu hücre kaybı apoptoz yoluyla gerçekleşmektedir. Apoptotik hücre ölümleriyle oluşan değişim sütün durmasının ikinci gününde kemiricilerin memesinde gözlenir. Çekirdek ve sitoplazma da yoğunlaşma ile kromatinde parçalanma oluşur. Apoptotik cisimler şekillenir. Bu hücre kayıpları farelerde involüsyonun başlangıç dönemi boyunca alveolar yapının yıkımlanmasıyla sonuçlanır (37, 38). Apoptozda görülen sarmal tiplerine erken ve geç laktasyon süresince keçilerin meme bezinde ve ineklerde laktasyonun sonunda rastlanır (39). Bu da apoptoz yoluyla salgı epitel hücrelerinin kaybının ruminant memesinde normal fizyolojik bir olay olduğunu akla getirir. Süt verimi durduğunda da hem keçi, hem de ineklerde stimule sarmal tiplerinin bulunduğu saptanmıştır (39, 40). Hücre kaybına rağmen, ineklerde meme alveolleri involüsyon süresince yapısal bütünlüklerini korurlar. İnvölüsyon süresince fare memesinde hücre kayıplarının rolü açık iken, ineklerde meme apoptozunun durumu tamamiyle net değildir (41).

İnek memesinde involüsyonla ilişkili değişimler süt salınımının kesilmesinden sonraki 48 saat içinde başlar. En belirgin değişim yağ damlacıkları ile salgı veziküllerinin intraselüler birikimi sonucunda epitel hücrelerinde büyük vakuollerin oluşmasıdır (36, 41). Bu vakuoller involüsyonun 14. gününe kadar

kalıcıdır ve bazen 28. güne kadar da görülmeye devam eder (41). İnvölüsyon süresince alveollerin lümeni daralır ve interalveoler bağdokuda artış meydana gelir. Meme hacmindeki büyük azalma involüsyonun 3. ve 7. günleri arasında gerçekleşir. 28. günden sonra kollabe olan alveolar yapıların kalıntısı laktasyondakinden çok daha küçüktür ve dar bir lümeneye sahiptir (36).

İnvölüsyon süresince inek memesinde oluşan değişikliklere ilişkin histolojik ve ultrastruktural çalışmalar kemiricilerden elde edilen bulgular kadar önemli değildir (36, 41-44). Süt üretimi kesildikten sonraki sınırlı otofagositik süreç başlangıçtaki iki günde meydana gelir. Kemiricilerin memesinde otofagositik yapıların oluşması involüsyon için karakteristiktir (42-44). Bazal membran üzerindeki hücrelerin bağlantılarının bozulması ve dokudaki kayıpları kemiriciler ve diğer türlerde bildirilmiştir (43, 45-47). Bazal membran üzerinden dökülen epitel hücrelerin şekillendirdiği boşluklar miyoepitel hücreleri tarafından doldurulmaktadır. Bu durumlar involüsyon inek memesinde gözlenmemektedir (41, 48).

3.2.3-Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri

Büyüme faktörleri, ağırlıkları 4000-60.000 dalton arasında değişen, çok az miktarları bile hücrel aktiviteyi etkileyebilen proteinlerdir. Bu faktörler, hücreleri endokrin, parakrin, otokrin veya intrakrin mekanizmalar yoluyla etkilerler (49). Bir hücre hem büyüme faktörü, hem de onun reseptörünü taşıyorsa, kendisini uyararak büyüme halkasına sahip demektir. Buna otokrin büyüme halkası denir. Bu halka normal hücrelerde bulunur ve fizyolojik uyarılara cevap verir (50).

Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi o hücrenin o faktör için reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucunda hücre içinde cevaba neden olan bir dizi sinyal ortaya çıkar. Etki, çoğunlukla tirozin kinazın uyarılmasıyla sağlanır. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayılarda reseptörleri bulunur (49). Büyüme faktörlerinin başında EGF gelmektedir. Bunun dışındaki büyüme faktörleri,

- plateletten salınan büyüme faktörü (PDGF)
- asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü (FGFs)
- transforming büyüme faktörü, alfa ve beta (TGF α , β)
- interlökin-1 (IL-1)
- interlökin-2 (IL-2)

- tümör nekroz faktör alfa (TNF α)
- vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)
- insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1, 2) vs. olarak sıralabilir (49-51).

Büyüme faktörü reseptörleri hücre dışında yer alan bir amino ucuna, membran içi bölge ve sitoplazmik bölgeye sahiptir. Hücre dışındaki bölüm, ikisi ligand bağlayan ve ikisi ise yön tayin eden dört kısımdan oluşur. Membran içi bölge ise eskiden sanıldığı gibi aradaki bağlantıyı sağlayan pasif bir uzantı değil, reseptörlerin birbiriyle temasından ve dimerleşmesinden sorumludur. Sitoplazmik bölge ise üçe ayrılır: ligand bağlama özelliklerini değiştiren fosforilasyon bölgesi, ikinci haberci "*second messenger*" sistemi ile etkileşerek bu sistemi harekete geçiren fosforilasyon bölgesi ve tirozin kinaz bölgesidir.

Büyüme faktörü reseptörlerinde aktivite artışı üç şekilde gerçekleşebilir:

1. Reseptörlerin yapısında ve sayısında bir değişiklik olmadığı halde ligand sayısında çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkan artış nedeniyle reseptör aktivitesi artar,
2. Reseptör molekülü normal yapısını koruduğu halde transkripsiyon artışı ve/veya gen amplifikasyonu sonucunda fazla sayıda eksprese olur,
3. Reseptör molekülü üzerinde gerçekleşen mutasyonlar nedeniyle molekül sürekli aktif durumunu korur (52).

Büyüme faktörlerinin uyarım yollarındaki sapmalar anormal büyüme ve gelişmelerle sonuçlanır. Bu faktörlerin reseptörlerindeki fonksiyon kayıpları diyabet ve cücelik gibi kalıtsal hastalıklara, fazla salgılanması ise psoriasis gibi tümoral olmayan hastalıkların gelişmesine neden olur. Tümoral bozukluklar karışık bir sürecin sonucu olarak ortaya çıkar. Büyüme faktörleri ya da onların uyarım yollarındaki bileşenlerin düzensiz salınması malign tümörlerin şekillenmesinde rol oynar (17). Meme tümörleri hem insan hem de evcil hayvanlarda yaygın bir durumdur. Hem erkek hem de dişi köpeklerde meme tümörleri deri tümörlerinden sonraki en yaygın ikinci tümör tipidir. Kedilerde de yaygın olarak bu tip tümörler görülmektedir (53).

3.2.3.1-İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri (ErbB/HER) Ailesi

Bu ailedeki reseptörlerin aktivasyonu hücre proliferasyonu, farklılaşma, hücre göçü ve farklı dokuların yaşamsal fonksiyonlarının düzenlenmesinde, yani homeostazis sağlanmasında, ayrıca meme, sinir sistemi ile sindirim sistemi

dokularında oluşan yaralanma durumlarında çeşitli cevapların şekillenmesinde rol oynar (54).

c-ErbB tip1 (HER) reseptör tirozin kinaz ailesi; epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR/erbB1/HER1), İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (erbB2/HER2), İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 3 (erbB3/HER3) ve İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 4 (erbB4/HER4) olmak üzere dört üyeden meydana gelir (55). Diğer büyüme faktörü reseptörlerinde olduğu gibi HER ailesindeki moleküller de ligand tarafından uyarıldıklarında dimerler oluşturarak başka molekülleri fosforile eder ve böylece belirli sinyal yollarının harekete geçmesini sağlarlar (56). Bu sinyal yolları, hücrede eksprese olan reseptörlerin tipi ve sayısı ile ligandın türüne ve sayısına da bağlıdır. Tüm HER molekülleri birbirleriyle kompleks kurabildiklerinden oluşması mümkün olan kompleks sayısı on tanedir. HER1 (EGFR) ile HER4 homodimerler oluşturabilmelerine karşın, heterodimer oluşumu daha çok görülür. Heterodimer oluşumu yoluyla aktifleşme özellikle sinyal yolunun harekete geçmesi için üç bileşenin (kompleks kuran iki reseptör ve bunlardan birini uyanan ligand) gerekli olması açısından önem taşır (52).

3.2.3.1.1-Epidermal büyüme faktörü ve reseptörü (EGFR/erbB-1)

EGF ve reseptörünün (EGFR) keşfi yirmi yıl önce olmasına rağmen, bu proteinin biyolojik rolünün anlaşılmasındaki süreç nispeten yavaş işlemiştir. En önemli ilerlemeler çoğunlukla EGF benzeri ligandlar, erbB reseptörleri ile erbB reseptörlerinin aktive formlarına bağlanmış olan SH₂ içeren proteinlerin keşfiyle yapılmıştır. Bütün dikkatler EGF benzeri ligandlar ve erbB üyelerinin homo- ya da heterodimerleri arasındaki kompleks yapılanmaların doğasının anlaşılmasına yoğunlaştırılmıştır (17, 57)

EGF Urogastron ile identik olup, 53 amino asitli bir polipeptidtir. Birçok dokuda bulunur ve platelet degranülasyonu sonrasında salınır (49). İlk olarak 1962 yılında hücre kültürlerinde fibroblastlar üzerinde kuvvetli mitojenik etki gösterdiği bulunmuştur. 1980'li yıllarda ise EGF' nin tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran reseptörü olan EGFR'ne bağlandığı gösterilmiş ve ardından güçlü mitojenik aktiviteye sahip pek çok büyüme faktörü ve reseptörü tanımlanmıştır (50). Epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) sinyal yollarının memeli hücrelerinde büyüme, yaşam, proliferasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesinde en önemli

yollardan biri olduğu tespit edilmiştir (58).

ErbB reseptör tirozin kinaz ailesinin üyesi olan EGFR, 170 kilo dalton ağırlığında tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoproteini olup, hücre dışı sinyalleri hücre içine iletir. EGFR, hücre dışı ligandların (EGF, TGF-a, amfiregülin) bağlandığı N terminali, hidrofobik transmembran bölgesi ve hücre içi yerleşimli tirozin kinaz aktivitesine sahip C terminali olmak üzere üç bölgeden oluşur. Büyüme faktörlerinin EGFR ile etkileşimine bağlı olarak, EGFR’de dimerizasyon ve ardından otofosforilasyon sonucu, mitojenik sinyalizasyonda rol alan sitoplazmik proteinler aktifleşir (50, 59). EGFR en çok epitel hücrelerinde bulunur. Ayrıca endotel, fibroblast ve düz kas hücrelerinde de reseptörler görülür. Epitel ve endotel hücreleri ile fibroblastlar için EGFR’nin kemotaktik özelliği vardır. Bunun dışında angiogenesis ve kollagenaz aktivitesini de uyarıcı özelliğe sahiptir (49).

EGFR, EGF, transforming büyüme faktörü (TGF), amfiregulin (AR), heparin bağlayan EGF (HB-EGF), betaselulin (BTC) ve epiregulin (EPR) içine alan ligandlar tarafından aktive edilir. Bu ligandlar proteolitik parçalanmalar ve hücre yüzey değişiklikleri yoluyla transmembran prekürsörleri olarak üretilirler (59). ErbB molekülleri ya homodimerizasyon ya da heterodimerizasyon yoluyla uyarılırlar. Bu ligandlarından üçü (EGF, TGF ve AR) sadece EGFR ye bağlanırken, diğer üçü de (HB-EGF, BTC ve EPR) direkt olarak erbB-4’e bağlanır. Neuregulin erbB-3 ve erbB-4 ile direkt olarak bağlanır. Homo- ya da heterodimerize bağlı erbB reseptörleri intraselüler uzantılarındaki spesifik tirozin kalıntılarının oto- ya da trans-fosforilasyonuna maruz kalırlar (53, 54, 59).

Kemiricilerde meme, EGF reseptör sistemi için önemli olduğuna inanılan birkaç epitelial dokudan biridir. EGF reseptör ligandları memede büyüme, farklılaşma ve yaşamsal faktörleri uyarmaktadır (12). Fare memesinde EGF reseptörleri terminal tomurcuk çevresindeki stromal hücreler, yağ hücreleri, miyoepitel hücreleri ile luminal epitel hücrelerinde eksprese olur. EGF, çiftleşmemiş ya da gebe farelerde meme epitel hücrelerinin büyümesini uyardığı için meme kanallarının büyümesi ve dallanmasını EGF reseptörlerine bağlanma yoluyla gerçekleştirir (10).

3.2.3.1.2- İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (ErbB2/HER2)

ErbB2 (HER2/neu) proteini 185 kilo dalton ağırlığında bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür ve EGF reseptör ailesinin bir üyesidir. HER2, kromozom 17q21 üzerinde yerleşmiş bir gen tarafından kodlanır. Topoizomeraz IIa genine komşu olan HER2 geni kanatlı eritroblastozis virusunun onkojen v-erbB'si ile benzerdir ve tümör olgularında, bir onkojen gibi davranır. Bu reseptörde, ekstrasellüler ligand bağlayan bölge, kısa transmembran bölgesi ve tirozin kinaz ile bağlantılı intrasellüler bölge olmak üzere HER1 ile benzer moleküler yapıları içerir. Uyarımların başlangıcında ekstrasellüler bölgeye farklı ligandların bağlanması hücre proliferasyonu, apoptoz, adezyon, migrasyon ve farklılaşmayı da içine alan hücre biyolojilerini etkiler. HER2 bilinen ligandların hiç birine bağlanmaz, ancak HER ailesinin diğer üyeleriyle heterodimerize partnerler meydana getirir (60-62).

HER1 ve HER2 arasında sekans homolojisi bulunmasına rağmen EGF hiçbir zaman HER2'ye bağlanmaz. HER2'nin salgılanma miktarındaki artış meme, ovaryum, tiroid, akciğer, tükürük bezleri ve midede maling tümörlerin oluşmasına neden olur. Fazla miktarlarda salgılanan HER2, tümör hücrelerinin makrofajlara karşı direncini artırır. Bu yüzden de, HER2 tümörlerin gelişiminde ve devamlılığında önemli rol oynar (63, 64).

ErbB2 ekspresyonu ve birkaç erbB2 agonisti gelişmekte olan kemiricilerin meme bezlerinde belirlenmiştir. ErbB2 çiftleşmemiş fare memesinde stromal ve epiteliyal hücrelerde, gebelik ve laktasyondaki farelerde ise lobuloalveolar epitelde ekspresyon olur. Benzer hücresel ve geçici ekspresyon örnekleri EGFR (erbB1), erbB3 ve erbB4 için de bildirilmiştir. Ancak erbB4'ün ekspresyonu gebelikte daha yüksektir. Ayrıca, EGFR agonisti olan EGF, TGF- α ve AR hem çiftleşmemiş hem de gebelerin meme dokusunda ekspresyon olur. Bu ligandların aksine, erbB3 ve erbB4 ligandlarının önemli oranlardaki ekspresyonu (NRG1 gibi) sadece gebelik süresince belirlenir (65-67).

3.2.3.1.3- İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 3 (ErbB3/HER3)

ErbB3 reseptörü, reseptör tirozin kinaz tip I ailesine aittir. Karakteristik ekstrasellüler bölge yapısına sahip reseptör L₁, S₁, L₂ ve S₂ olarak isimlendirilen dört alt bölgeden oluşur ve bu bölgeler ailedeki tüm reseptörler tarafından paylaşılır. L₁ ve L₂ bölgelerinin direkt ligand bağlanmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. S₂,

reseptör aktivitesinde ligand stimülasyonunda önemlidir. Yüksek disülfid bağları ve zorunlu bölgeler, L₁/L₂ tarafından tanımlanan ligandlar için gereklidirler (68).

ErbB3 için en önemli ligand neuregulin (NRG) ya da heregulin olarak da bilinen neu'dan farklılaşan faktördür. Başlangıçta erbB2'nin ligandı olduğu düşünülen neuregulinin, erbB3 ve erbB4 reseptörlerine bağlandığı gösterilmiştir. Ailedeki diğer üyelerin aksine tirozin kinaz ilişkili bir sekansla kodlanan erbB3'ün sitoplazmik bölgesi çok düşük bir katalitik aktiviteye sahiptir. Bu reseptör, hücre uyarımları ve diğer etkili uyarım mekanizmaları için önemlidir (68, 69).

ErbB3 reseptörü daha çok normal dokularda eksprese edilir. Diğer aile üyeleri ve erbB3 arasındaki en önemli farklılık çok az ya da hiç tirozin kinaz aktivitesine sahip olmamasıdır. Bu yüzden de, erbB3'ün homodimerleri inaktiftir. EGFR ya da erbB4 heterodimerleri ve özellikle erbB2 ile önemli etkinliklere sahip çiftler meydana getirdikleri görülmüştür. İnsanlarda meydana gelen tümöral hastalıklarda da erbB3'ün miktarının arttığı saptanmıştır (70).

ErbB3 puberteye yeni ulaşmış çiftleşmemiş farelerin memesinde çok düşük düzeylerde eksprese olur. Ancak gebelik ve laktasyon süresince yüksek oranlarda salgılanır. Bu farklı ekspresyon durumları gelişen memede EGFR ve erbB2'nin önemli rollere sahip olduğunu ortaya koyarken, erbB3'ün meme gelişimi ve farklılaşmasının sonraki aşamalarında önemli olduğunu gösterir (7, 14). Postnatal meme gelişimi süresince erbB3 çok düşük düzeylerde eksprese olması, erken meme gelişimde EGFR ve erbB2 nin önemli olduğunu göstermiştir. Çünkü erbB3 ve erbB4'ün ligandı olan NRG başlangıçtaki meme gelişim dönemlerinde belirlemek güçtür (14, 71).

3.2.3.1.4- İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 4 (ErbB4/HER4)

ErbB4 proteini 180 kilo dalton ağırlığında reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. Bu reseptör kalp, akciğer ve sinir sisteminin embriyonik gelişiminde önemlidir. Metastatik hastalıkların progresinde de önemli roller oynamaktadır. Örneğin erbB1, meme, ovaryum, prostat ve akciğer kanserlerini de içeren insanlardaki maling tümörlerinin çoğunda fazla miktarlarda sentezlenir. ErbB2 meme kanserli hastalarda tümör agresifitesi ve kötü bir prognozla ilişkilidir. ErbB3 ise insanlarda meme ve mide kanserlerinden elde edilmektedir. Birçok araştırma erbB4 ekspresyonundaki ya da uyarımındaki artışın tümör gelişimiyle ilişkili olduğunu

göstermiştir. ErbB4'ün aşırı salgılanması meme, tiroid ve sindirim sisteminde tümöral gelişime neden olmaktadır. Ancak, bu tümörlerde erbB4 ekspresyonunun prognostik önemi erbB ailesindeki üyelerle erbB4'ün koekspresyonuna bağlıdır (72,73).

ErbB4 fonksiyonlarını açıklamaktaki çabalar birçok faktör tarafından engellenmektedir. ErbB4 reseptörü için spesifik agonist ve antagonistler bilinmemektedir. EGF ailesindeki peptid hormonlarının tamamı, erbB ailesinin diğer üyelerinden en az biri ve erbB4 ile bağlanma yeteneğindedirler. Örneğin; epiregulin ve betacellulin hem erbB1, hem de erbB4'ü aktive eder ve onlara bağlanırlar. Ayrıca, erbB ailesindeki reseptörlere bağlanmayan ligandlar, ligand uyaran reseptör heterodimerizasyonu yoluyla değişime uğratarak uyarımları aktive ederler. Sonuç olarak, erbB4'ü doğrudan aktive eden ve bağlayan ligandlar (neuregulin, betacellulin ve epiregulin) erbB1, erbB2 ve erbB3 sinyallerini de uyarırlar (72, 74).

Memenin farklılaşmasında erbB4'ün rolü, farede normal meme gelişimi süresince reseptör ekspresyonunu ve aktivasyonunu bir dereceye kadar destekler. Puberti süresince eksprese ve aktive olan EGFR ve erbB2'nin aksine, erbB4 ekspresyonu erişkin dişilerde güçlüdür. ErbB4 gebelik süresince yoğun olarak eksprese olmasına rağmen, daha çok epiteliyal farklılaşma ve sekretör aktivitenin yoğun olduğu gebeliğin son döneminde belirlenebilmektedir. Laktasyon süresince de pik noktaya ulaşmaktadır (74-76).

3.2.3.2-Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü ve Reseptörleri

Vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGFs), VEGF homoloji bölgesinde sekiz sistein rezidüsü bulunduran büyüme faktörleriyle karakterize VEGF/PDGF (plateletlerden elde edilen büyüme faktörü) ailesine aittirler. Anjiogenezis ve lenfanjiogenezisde işlev görürler. Memelilerde VEGF'lerin beş üyesinin varlığı bildirilmiştir. Basit omurgasızlarda da VEGF'nin ve reseptör homologlarının varlığı, bu faktörlerin multisellüler organizmaların evrimi öncesinde var olduklarını ve hücre göçü gibi çok daha ilkel gelişimsel fonksiyonlarla ilişkili olduklarını akla getirmektedir. Drosophilada, VEGFR homologları hemosit olarak adlandırılan kan hücrelerinde eksprese edilmiştir. Bu da hemositlerin göç yolu boyunca, üç VEGF homologunun hemosit göçünün uyarılmasındaki gerekliliğini gösterir (77).

3.2.3.2.1-Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Anjiyogenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dür ve vasküler permeabilite faktörü (VPF) olarak da bilinmektedir. Önceleri iki ayrı yapı oldukları düşünülen bu proteinlerin sonradan aynı protein oldukları tespit edilmiştir (78-80).

VEGF güçlü anjiyogeneze ve vasküler permabiliteye neden olan endotelial hücreye özgü bir mitojendir (81). Temel anjiyogenik faktör olmasının yanı sıra, VEGF'ye maruz kalan damarlarda endotel hücreleri arasında fenestrasyon, veziküler organeller ve transsellüler bağlantı oluşumuna olanak sağlayarak vasküler permeabiliteyi artırma özelliğine de sahiptir (82). VEGF endotel hücrelerinin migrasyonunda, ekstrasellüler matriksin (ECM) yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile urokinaz ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımlarının uyarılmasında da rol oynar. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırır (78, 83, 84).

VEGF, 45 kDa'luk, homodimerik, heparin-bağımlı bir glikoprotein olup, çeşitli alt grubları tanımlanmıştır. VEGF A, B, C, D, E, ya da aminoasit sayılarına göre VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, ve VEGF₂₀₆ gibi izoformları bulunmaktadır. Vasküler geçirgenlik faktörü olarak da bilinen VEGF-A, disülfid bağlı homodimerlere bağlanmış olan 34-46 kDa'luk sekret glikoproteindir. Endotel hücreleri üzerindeki vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 1 (VEGFR-1) ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2 (VEGFR-2) ile neuropilin-1 ve -2'ye bağlanır (78, 79, 83-85). Tümör anjiyogenezinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. VEGF-B'nin, VEGF-B₁₆₇ ile VEGF-B₁₈₆ olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. VEGF-B ekspresyonu uyarıldığında ve ürokinaz tip plazminojen aktivatörü arttığında sadece VEGFR-1'e bağlanır ve ekstrasellüler matriksin dejenerasyonunu (ECM) ve endotel hücre (EC) migrasyonunu uyarır (85). VEGF-C ve VEGF-D, protein maturasyonu sırasında ayrılmış olan, N- ve C-terminal uzamlarında merkezi bir VEGF homoloji bölgesi içerirler. Nonkovalent dimerlerden oluşan VEGF-C ve -D'nin her ikisi de VEGFR2 ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 3 (VEGFR3)' e bağlanır. VEGF-C lenfanjiyogeneze önemli bir rol oynar ve embriyogenez süresince eksprese olur. Buna karşın VEGF-D erişkin kalp, akciğer ve iskelet kaslarında da eksprese olur (83-85). Yakın zamanlarda,

VEGF-C ekspresyonunun gastrik, meme, tiroid ve servikal kanserlerin tümör invazyonuna ve lenf düğümü metastazına neden olduğuyla ilişkili çalışmalar yapılmıştır (7, 81). VEGF-E ise parapoks orf virusun bir geni tarafından kodlanan proteindir (85).

İnsanlarda VEGF'nin en az sekiz proanjiyogenik izoformu bulunur. Bunlar tek bir gene alternatif bağlanmalar yoluyla üretilirler. VEGF₁₂₁ heparinle bağlanmaz ve ekstrasellüler aralıkta serbest olarak yayılır. Buna karşın VEGF₁₈₉ heparine güçlü bir şekilde bağlanır ve ECM ile hücre yüzeyinde diziler oluşturur. En baskın isoform olan VEGF₁₆₅ heparine orta düzeyde bir affiniteye sahiptir. İnsan VEGF'sinin diğer izoformları ise VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₈₃ ve VEGF₂₀₆ dır (79, 83-85).

Fare izoformları kısa bir aminoasit zincirinden oluşur. Farklı potansiyellerine rağmen bütün VEGF izoformları hem VEGFR-1 hem de VEGFR-2' yi aktive eder ve onlara bağlanırlar (86). VEGF₁₆₅ izoformu damar gelişiminde merkezi bir rol oynamasına rağmen, daha az görülen diğer izoformlar ise damar modellerinde ve özellikle de arter gelişiminde farklı roller üstlenirler. Eksik heparin bağlayan VEGF izoformları miyokardiyal anjiogenezi zayıflatarak işemik kardiyomiyopatiye neden olur ve doğumdan sonraki iki hafta içinde fareler ölür (77). Bu farelerde ölüm kapillar dallanmadaki azalma sonucu şekillenir (87).

VEGF, aktivitesini üç reseptör ile gerçekleştirir: Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1/KDR) ve VEGFR-3 (flt-4)'dür. Bunlardan VEGFR-1 ve R-2 endotel hücreleri üzerinde, VEGFR-3 ise lenf damarları üzerinde bulunur. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfoinositol-3 kinaz, fosfolipaz-C ve *ras* GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinini fosforile ederek endotel hücrelerinin çoğalma, göç ve farklılaşmasına neden olur (7, 81).

Meme kanserlerinde VEGF ekspresyonu ile tümör mikrovaskülarizasyonu, malignite ve metastaz arasında ilişki bulunmuştur. Bu genin 5' bölgesi analiz edildiğinde bireyler arasında VEGF tanımı bakımından varyasyonların olduğu saptanmıştır. Bu çeşitlilik birçok polimorfizmlerin varlığını göstermektedir. Bu gendeki polimorfik bölgelerin anjiyogenezisde kritik rol oynadığı ve bazı hastalıklarda genin protein üretimi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (7, 81, 88).

VEGF immunreaktivitesi insan ve primatların memesinde terminal kanalların epitel hücrelerinde görülür. Düşük miktardaki VEGF proteini ve VEGF mRNA (189, 165 ve 121 aminoasit izoformları) insanlarda memede bildirilmiştir. Endotel hücrelerinde mitozu uyaran VEGF ve VEGFR-2 gebelik süresince artar. VEGF, VEGF-C ve VEGFR-1, -2, -3 ün post-pubertal dönemde kemirici memesinde eksprese olduğu ortaya konulmuştur. VEGF-C and VEGFR-3 gebelik ve laktasyonda çok az artar. Erişkinlerin birçok dokusundaki lenfatik damarlara spesifik olduğu bilenen VEGFR-3, dinlenme fazındaki memede kan kapillar endotel hücrelerinden de eksprese olur. VEGF, VEGFR -1 ve -2'nin laktasyon süresince aşırı miktarda arttığı da görülür (19, 81).

3.2.3.2.2-Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörleri

3.2.3.2.2.1- VEGFR-1 (flt-1)

Flt1 (Fms benzeri tirozin kinaz 1) olarak bilinen VEGFR-1, kan damarlarının endotel hücreleri, monosit/makrofaj, dentritik hücreler, hemopoyetik kök hücreleri, trofoblastlar ve osteoklastların membranına bağlı bir reseptördür (89). Zayıf bir kinaz aktivitesine sahip olmasına rağmen, VEGFR-1 monosit/makrofajların migrasyonunu uyarır (90, 91). Erken embriyonik gelişim süresince anjiogenezde negatif düzenleyici olarak işlev görür. Eksik olduğu farelerde endotel hücre büyümesinde aşırılık meydana geldiği ve kan damarlarında organizasyon bozuklukları olduğu için ölümler görülür (77). VEGFR1'in tirozin kinaz bölgesinin ortadan kalkması, anjiogenezin normal gelişimine izin verir. Son yıllardaki çalışmalarda, hem makrofaj migrasyonunda, hem de patolojik anjiogeneziste VEGFR-1 tirozin kinaz için birçok aktif uyarım yolları gösterilmiştir. VEGFR-1'in inhibisyonu periferal kanda kemikiliğinden ayrılan miyeloid progenitörlerin mobilizasyonunu ve yangısal dokuya lökosit infiltrasyonunu azaltarak patolojik neovaskülarizasyonu ve yangıyı da baskılar (77, 92).

İnsanlarda VEGFR-1 1338 aminoasitten oluşur ve ekstrasellüler ligand bağlama bölgesi, transmembran bölgesi, tirozin kinaz bölgesi ve karboksi terminal bölgesi olmak üzere 4 bölge taşır. VEGFR-1 VEGF-A, VEGF-B, plasental büyüme faktörü (PIGF) ve VEGF-F ye karşı yüksek bir affinite gösterir. Ancak ligandlar bağlandığında çok zayıf bir otofosforilasyon gösterir. VEGF-A için bağlanma

bölgesi, VEGFR-1'in ikinci Ig-benzeri bölgesine yerleşmiştir. Bu reseptörde Ig-benzeri bölge reseptör dimerizasyonu ve aktivasyonunda önemli rol oynar (93).

3.2.3.2.2.2- VEGFR-2 (flk-1/KDR)

Farelerde Flk1 (fötal karaciğer kinazı 1) ya da insanlarda KDR (kinaz insert bölgesi içeren reseptör) olarak da bilinen VEGFR-2 hemanjioblastlar ile endotel ve hemotopoitik hücre prekürsörleri için en önemli belirteçtir (94). Farelerde VEGFR-2'nin ortadan kalkması hem hematopoetik hem de endotelial hücrelerde eksikliklere neden olduğundan embriyonik ölümlere sebep olur. Bu nedenle VEGFR-2 endotelial hücre prekürsörlerinin farklılaşmasında önemli bir role sahiptir (77). Ayrıca VEGFR-2, şekillenmiş olan kan adacıklarında, vitellüs kesesindeki posterior primitif çizgide ve erken hematopoezisin intraembriyonik döneminde hücrelerin direkt lokalizasyonu için gereklidir (77, 95). Güçlü tirozin kinaz aktivitesinden dolayı, VEGFR-2 endotelial hücrelerde anjiyogenezis, proliferasyon, migrasyon ve yaşamsal uyarımlarda en önemli pozitif sinyal düzenleyici olarak hareket eder (90). Endotel hücrelerinde VEGFR-2 Raf1'i (kemirgen lösemi viral onkojen homolog) aktive ederek, DNA sentezine ve hücre proliferasyonuna sebep olur (77). Ayrıca, hücre migrasyonunu uyaran aracı molekülleri kullanarak PI3 kinazı (96) ve damarlarda permeabilityi düzenleyen endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS) fosforilasyonunu (97) aktive eder. VEGFR-2 ekspresyonu vasküler gelişimin son dönemlerinde azalır, ancak erişkinlerde fizyolojik ve patolojik anjiogenezisde önemli bir düzenleyici olur ve endotel hücrelerinde VEGFR-2 ekspresyonunun yüksek olduğu görülür. VEGFR-2 hematopoetik kök hücrelerinde de eksprese olur (77). Ayrıca non-endotelial ekspresyonu sinir hücreleri, osteoblastlar, pankreatik kanal hücreleri, retinal projenitör hücreler ve megakaryositlerde de gözlenmiştir (90). VEGFR-2'nin sıvı bir formu da belirlenmiştir. Ancak bunun meydana gelmesinde proteolitik parçalanmaların mı, yoksa alternatif bağlanmaların mı etkisinin olup olmadığı tam olarak ortaya konulamamıştır (98).

3.2.3.2.2.3- VEGFR-3 (flt-4)

Flt-4 olarak bilinen VEGFR-3 diğer VEGFR'ler ile karşılaştırıldığında farklı bir yapısal özelliğe sahiptir. Beşinci Ig-homoloji bölgesinde proteolitik ayrılma yoktur ve aminoterminal bölgesinde bulunan disülfid köprüleri molekülün geri kalan bölümleriyle bağlantılıdır (77). VEGFR-3 homodimerik konfigürasyonlarda farklı

karboksiterminal fosforilasyona ve sinyal transdüksiyonuna neden olduğu için, VEGFR-2 ile heterodimerize yapılar oluşturabilme yeteneğine sahiptir (99). Vasküler gelişimin başlangıcında VEGFR-3 kan damarlarının endotelinde eksprese olur. Anjiogenezis için gerekli olmamasına rağmen, primer vasküler pleksusların yeniden şekillenmesi ve maturasyonu için gereklidir (77). Embriyogenezin daha sonraki dönemlerinde kan damarlarında azalır. Azalma ilk olarak arterlerde ve daha sonra venlerde olur. Sonunda lenf damarlarının endotel hücreleri ile sınırlı kalır. VEGFR-3 venlerden farklılaşmış lenfatik endotelial hücrelerin çoğalması ve migrasyonu ile de ilişkilidir. Embriyonik gelişim süresince lenf damarlarının yaşamsal faaliyetleri ve kalıcılığı için gereklidir (77, 100). VEGFR-3 ilişkili uyarımlar lenf damarlarının büyümesini uyararak için yeterlidir (77). Uyarılan hücre migrasyonuna ek olarak, çeşitli aracı moleküller yardımıyla izole lenfatik endotel hücrelerinin gelişmesini ve hayatta kalmasını sağlar. Erişkinlerde fenestralı kan damarlarında ve monosit/makrofajlarda da bulunur (77, 101). Ayrıca tümörlerde yeni şekillenmiş kan damarlarında da gözlenir (102). Son yıllarda VEGFR-3'ün osteoblastlar ve sinir progenitor hücrelerde de varlığı bildirilmiştir (103, 104).

3.2.4-Vasküler Endotel Hücre Büyümesini Baskılayan Faktör (VEGI)

Vasküler endotel hücre büyümesini baskılayan faktör (VEGI) ilk olarak insan umbilikal ven endotel hücrelerinden tanımlanmıştır ve anjiyogenezin spesifik bir inhibitörüdür (105). VEGI geni I, II, III ve IV ekzon ve üç introndan meydana geldiğinden yaklaşık olarak 17 kb'dir. Bu gen, 251, 192 ve 174 aminoasit rezidüsünden oluşan üç VEGI izoformuna sahiptir. İnsanlardaki üç izoformunda N-terminal bölgesi birbirinden farklıdır fakat bu izoformlar C-terminallerinde 151 rezidü segmentini paylaşırlar. VEGI de varsayılan ekstrasellüler bölge, hücre kültürlerinde endotel hücre proliferasyonunu baskılayıcı yönde etki gösterir. VEGI₂₅₁ I, II, IIIb ve IV ekzonları tarafından, VEGI₁₇₄ ise IVa ve IVb ekzonları tarafından kodlanır. İzoformların her biri IVb ekzonuna sahiptir. Protein VEGI₁₇₄ ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmış olmasına karşılık, VEGI₂₅₁ hakkındaki bilgiler daha azdır (106). VEGI₂₅₁ plasenta, böbrek, akciğer ve karaciğerde, VEGI₁₇₄ ise karaciğer, kalp, iskelet kasları ve böbrekte daha fazla bulunur. VEGI₁₇₄ mRNA kalp, iskelet kasları, pankreas, adrenal bez ve karaciğerde çok fazla miktarda bulunurken, VEGI₂₅₁ ise fetal böbrek ve fetal akciğerde daha fazladır. VEGI₂₅₁ ayrıca sekretör sinyal

peptidlerine sahiptir ve aşırı ekspresyonu endotelial hücrelerde apoptoza ve tümör gelişiminde inhibisyona sebep olur (107). Ayrıca anjiyogeneziste de endotel hücre salgı inhibitörü olarak da görev yapar (105, 106).

İnsanlarda VEGF, TNF' den tanımlanmış tip II transmembran proteini ile kodlanır. TNF ailesindeki diğer üyelerin aksine, endotel hücrelerinde ekspresyon olur. Erişkin dokularının çoğunda VEGF'nin ekspresyonu damarlaşmanın dengeli bir devamlılığı için fizyolojik bir rol sahiptir. VEGF'nin insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC), erişkin sığır aortik ve pulmoner arter endotel hücrelerinde büyümeyi sınırladığı ve apoptoza neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca insanlarda plasenta, akciğer, iskelet kasları, böbrek, pankreas, dalak, prostat, ince bağırsaklar ve kolon gibi birçok organın normal damarlaşmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (107). Meme kanserlerinde de epitel ve miyeloid tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı ifade edilmektedir (108). VEGF'nin fazla miktarda salgılanmasının kemiricilerin kolon kanser hücrelerinde tümör büyümesinde bir azalma oluşturduğu ve bu etkisinin VEGF'nin güçlü anti-anjiyogenik aktiviteye sahip olmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (105).

3.2.5-Meme Gelişiminin Hormonal Düzenlenmesi

Östrus siklusu süresince memedeki büyüme ovaryumdan sentezlenen steroid hormonları ile ilişkilidir. Östrojen ve progesteron reseptörlerinin her ikisi de puberta ile birlikte meme bezinde görülürler. Bu nedenle mammojenik hormonlar olarak nitelendirilirler. Gebeliğin sonuna doğru östrojen ve progesteronun aynı zamanda artan kan konsantrasyonu parenşimal büyüme ve meme alveollerin şekillenmesiyle sonuçlanır. Buna karşılık östrus siklusu ile ilişkili bu hormonların siklik değişimi başlangıçta kanalların uzaması ve birkaç lobuler doku formasyonu ile sonuçlanır. Ancak alveollerin şekillenmesi söz konusu değildir. Genel olarak meme gelişimi, ilişkili hormonların kompleks etkileşimi ile ortaya çıkar. Birçok mammojenik hormonun etkisinin parakrin tarzda etki gösteren stroma ile ilişkili büyüme faktörleri yoluyla olabileceği tahmin edilmektedir. Bu yüzden mammojenik hormonlar ve büyüme faktörlerinin fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasında kemiriciler kullanılmaktadır (1-3).

Postpubertal dişilerde özellikle östrojen en önemli mammojenik faktördür. Puberti ile birlikte östrojenin kandaki konsantrasyonunun yükselmesine bağlı olarak

memede reseptörleri görülür. Kemiricilerde östrojen, büyüme faktörlerinin üretimini uyarmak için stromal dokudaki reseptörleri aracılığı ile harekete geçer. İneklerde yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular da meme gelişimi üzerine östrojenin etkisinin stroma yolu ile olduğunu göstermiştir (109).

Progesteron da meme gelişiminde önemli rol oynayan diğer bir ovarial steroid hormondur. Meme yağ dokusunda progesteron reseptörlerini belirlemek oldukça güçtür. Bazı fizyolojik durumlarda progesteron stromal hücrelerin proliferasyonunu uyarır. Kanal epitellerinde DNA sentezi üzerine progesteronun uyarıcı etkisi stromal hücrelerin indirekt yolla etkilenmesi ile meydana gelir. Progesteronun mammojenik etkisi, epitel hücrelerindeki reseptörlerine bağlanması ile olur. Bu şekilde memede kanalların dallanmasını ve alveollerin şekillenmesini uyarır. Bu nedenle progesteron meme alveollerinin şekillenmesinde en önemli role sahipken, kanalların gelişimindeki rolü daha azdır (110, 111).

Gebelik süresince östrojen ve progesteron arasındaki sinerji her iki hormon yüksek konsantrasyona ulaştığı zaman görülür. Östrojen ve progesteronun kandaki konsantrasyonunun artması hücre büyümesi için gereklidir. Lobuloalveoler gelişme gebelik süresince meme hacminde önemli bir artışa neden olur. Progesteron gebelik süresince yüksektir. Buna karşın östrojen gebeliğin son döneminde artar. Bu da meme hacmindeki büyük artışla aynı döneme denk gelir (112, 113).

3.3- MATERYAL VE METOT

3.3.1- Deney Hayvanları

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu (DÜHADEK) tarafından onaylanmıştır (karar sayısı 2008-02).

Çalışmada Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin PAYZIN Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DÜSAM) Müdürlüğü'nden temin edilen 35 adet erişkin, 220-250 g ağırlığında Spraque-Dawley ırkı dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar, deney süresince 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ışık periyodunda barındırıldı. Pelet yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak karşılandı. Hayvanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde rastgele 5 gruba ayrıldı. Her gruptaki dişiler iki erkek sıçanla çiftleşmeye alındı. Vaginal smear metoduyla gebelik muayenesi yapıldı. Vaginal smear örneklerinde spermatozoon bulunan ve vaginal plak şekillenen dişiler gebeliğin 1. gününde kabul edildi (19).

Gebeliğin 7., 14. ve 21. günü, doğumdan sonraki 7.günde (laktasyon dönemi) ve süttten kesildikten sonraki 7. günde (involüsyon dönemi) Ketalar (Ketamin HCl-Phizer) (90mg/kg) anestezisi altında; abdominal bölgedeki memenin iki tanesi total olarak çıkarıldı. Deney hayvanları postoperatif bakıma alındı.

Bütün gruplardan alınan meme dokuları % 10 nötral formalin solüsyonunda 24 saat tespit edildi. Daha sonra bir gün süreyle akarsu altında dokular yıkandı. Yıkama işlemini takiben dokular dereceli alkoller, metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafin bloklandı.

Hazırlanan parafin bloklarından, Leica RM 2125 Rotary mikrotomunda 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı. Bu kesitlerden birincisi normal lama diğerleri ise 3-aminopropyl-triethoxysilane (APES) ile kaplanmış diğer lamlara alındı.

3.3.2- Histolojik Analiz:

Normal lamlara alınan kesitler Crossman'ın üçlü boyaması ile boyandı ve dönemlere bağlı olarak memede şekillenen yapısal değişiklikler belirlendi (19).

3.3.3- İmmunohistokimyasal Analiz:

Diğer kesitlere streptavidin peroksidaz immunohistokimya yöntemi uygulandı (19, 81).

Tablo-3.1: Kullanılan antikorlara ait bilgiler

Antikoronun Adı	Antikoronun Türü	Katalog Numarası
1- Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (erbB-1/EGFR)	Rabbit polyclonal	Santa Cruz, sc-03
2- ErbB-2 Reseptörü (Neu)	Mouse monoclonal	Santa Cruz, sc-7301
3- ErbB-3 Reseptörü	Rabbit polyclonal	Santa Cruz, sc-285
4- ErbB-4 Reseptörü	Rabbit polyclonal	Santa Cruz, sc-283
5- Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF)	Mouse monoclonal	Santa Cruz, sc-53462
6- Flt-1 Reseptörü	Rabbit Polyclonal	Santa Cruz, sc-316
7- Flk-1 Reseptörü	Mouse monoclonal	Santa Cruz, sc-6251
8- Flt-4 Reseptörü	Rabbit Polyclonal	Santa Cruz, sc-321
9- Vasküler Endoteliyal Hücre Büyümesini Baskılayan Faktörü (VEGI)	Rabbit polyclonal	Santa Cruz, sc-32945
10- Östrojen Reseptörü (ER)	Rabbit Polyclonal	Thermo Scientific, RB-1521-P

5 mikrometre kalınlığındaki parafin kesitler, deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra distile suda çalkalandı. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için kesitler distile suda hazırlanmış %3'lük H₂O₂ ile 20 dakika muamele edildikten sonra 0.01 M Fosfat Buffer Saline (PBS)'de iki kez 5'er dakika yıkandı. Antijen retrieval işlemi uygulanmaksızın, immüoglobulinlerin özgül olmayan bağlanmalarını engellemek için bloking serumda 15 dakika muamele edilen kesitler primer antikor ile +4°C'de 1 gece süresince inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 0.01 M PBS'te 4 kez yıkanan kesitler, biotinlenmiş sekonder antikor (Histostain Plus Bulk Kit, Zymed) ile 20 dakika nem odasında, oda ısısında inkübe edilip, tekrar 4 kez PBS ile yıkandıktan sonra da enzim konjugatlı streptavidinde (Histostain Plus Bulk Kit, Zymed) 20 dakika muamele edildi. Kesitler, tekrar 4 kez PBS ile yıkandıktan sonra

3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (VEGF, Flt-1, Flk-1, Flt-4 ve VIGF) veya Diaminobenzidine (DAB) (ErbB-1 (EGFR), ErbB-2, ErbB-3 ve ErbB-4) kromojen solüsyonlarında 5-15 dakika bekletildi. Gill'in hematoksileninde 1 dakika süreyle zıt boyama yapılan kesitler çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı. AEC kromojen solüsyonu kullanılan kesitler üzerine aköz yapıştırıcı (Aqueous mounting medium) damlatılıp lamelle kapatıldı. DAB kromojen solüsyonu kullanılmış kesitler ise alkoller ve ksilolden geçirilip entellan ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak kullanılan meme tümörleri temin edilemediği için boyanmaların doğruluğunu kanıtlamada negatif kontroller kullanıldı. Negatif kontrol olarak alınan doku örnekleri ise primer antikor yerine PBS ile muamele edildi.

Boyamalar sonrası preparatlar Nikon-Eclipse 400 colpix-4500 dijital fotoğraf makinesi ataçmanlı araştırma mikroskobunda incelenerek fotoğraflandı.

Tablo-3.2: Antikorların hücresel lokalizasyonları

Antikor	Hücre lokalizasyonu			
	Hücre membranı	Sitoplazma	Çekirdek	Ekstraselüler matriks
erbB-1	+	-	-	-
erbB-2	+	-	-	-
erbB-3	+	+	-	-
erbB-4	+	+	-	-
VEGF	+	+	-	+
VIGF	+	+	-	+
Flt-1	-	+	-	-
Flk-1	-	+	-	-
Flt-4	+	+	-	-
ER	-	-	+	-

3.3.4- İmmunohistokimyasal Boyanma Sonuçlarının Değerlenmesi

İmmunohistokimyasal boyanmalar, yoğunluk (intensity score) ve oransal skordan (proportional score) oluşan total skor (Quick score) olarak isimlendirilen ikili derecelendirme yöntemi kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirildi (114, 115). Yoğunluk skorunda (I), hücrelerdeki pozitif boyanma yoğunlukları

değerlendirilirken, oransal skorda (P) ise pozitif boyanan hücrelerin yüzde oranı belirlendi. Seri kesitlerde, X40 objektif büyütmede gelişi güzel seçilen üç farklı bölgede 100 adet alveol ve kanal epitel hücresi sayıldı. Daha sonra elde edilen değerlerin ortalaması alınarak her bir hayvan için tek bir değer elde edildi.

İmmunohistokimyasal boyanma sonuçlarındaki skorlama işlemi aşağıdaki gibi yapıldı.

Yoğunluk skoru

0: Negatif (yüksek büyütmede hiçbir hücrede boyanma yok)

1: Zayıf (sadece yüksek büyütmede görülen boyanmış hücreler)

2: Orta (düşük büyütmede kolaylıkla görülen boyanmış hücreler)

3: Güçlü (çok düşük büyütmede görülen boyanmış hücreler)

Oransal skor

0: 0 %11-33: 3

%1<: 1 %34-66: 4

%1-10: 2 %67-100: 5

Yoğunluk skoru ve oransal skor toplandığında 0-8 arasındaki “Quick score-total skor” elde edildi.

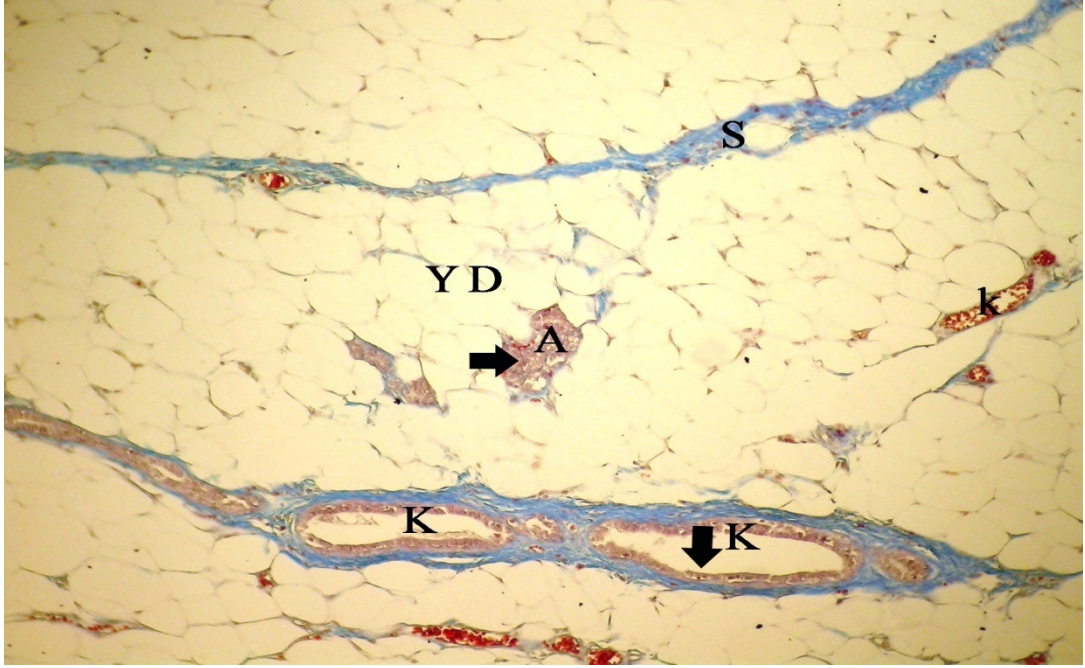
Elde edilen bütün veriler bilgisayara girildi ve SPSS 12.0 (SPSS 12.0, SPSS, Inc., 2003, Chicago, IL, USA) programı ile istatistiksel analizleri yapıldı. Gruplar arasında farklılık olup olmadığını belirlemek için non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, farklılık bulunduğu ise hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için de Mann-Whitney U testi uygulandı ($p<0,05$) (20).

3.4- BULGULAR

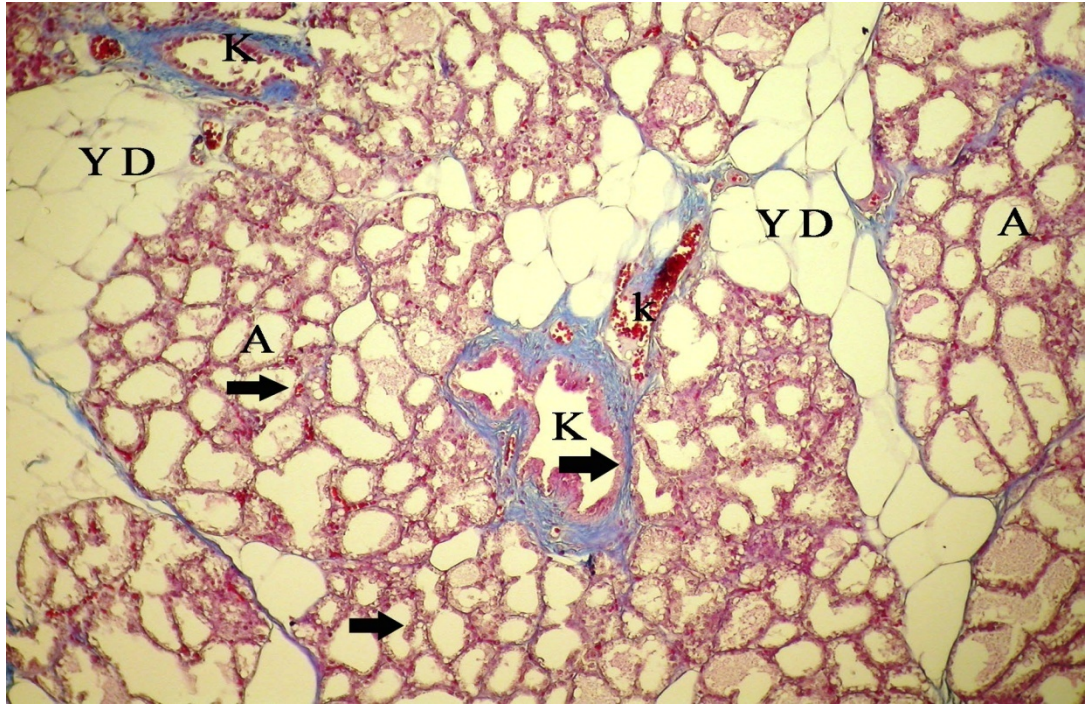
3.4.1- Memenin Yapısal Özellikleri

Meme, bütün gruplarda 4 torakal, 4 abdominal ve 2 inguinal bölgede olmak üzere paramediyan ve simetrik olarak çift sıra halinde yerleşmişti. Derinin hemen altında bulunan meme loplarının her birinin de bir adet meme başı ile dışarıya açıldığı görüldü. Bağdokudan oluşan bir kapsülle sarılı bezin bileşik tubulo-alveolar yapıda olduğu, lop ve lopçuklardan meydana geldiği belirlendi.

Gebeliğin ilk haftasında meme yağ dokusu bezin büyük bir kısmını meydana getirmekteydi. Az sayıdaki meme alveolleri ve kanalları bağdoku ile birlikte bu yağ dokusu içerisine yerleşmişti. Alveoller tek katlı kübik epitel ile döşenmişti ve lumenleri belirgin değildi. İntralobuler, interlobuler ve interlober kanalların duvarları tek katlı kübik epitel ile örtülüydü. Alveoller ve kanalların yerleşmiş olduğu bağdokuda kan ve lenf damarları, sinir pleksusları ile bağdoku hücreleri bulunmaktaydı (Şekil 4.1). Gebeliğin 14. ve 21. günlerinde yağ dokusunun gerilediği, lop ve lopçuk yapılarının belirginleştiği, alveol ve kanal sayılarının arttığı görüldü. Alveollerin lümeni belirginleşmişti ve içleri gebeliğin 21. günündeki grupta salgı materyali ile dolmuştu. Özellikle alveol epitellerinin sitoplazmasında gebeliğin son döneminde yağ damlacıklarına da rastlandı. İnterlobuler ve intralobuler bağdokudaki dikkati çeken azalma interalveolar bağdokuda da görülmekteydi. Duktus laktiferuslar dallanmış ve lümenleri oldukça genişlemişti. Bu kanalların duvarı intralobuler yerleşimli olanlarda tek katlı kübik epitel ile interlobuler ve interlober yerleşimli olanlarda ise tek katlı basık prizmatik epitel ile örtülmüştü. Lümeni salgı maddeleri ile doluydu. Her iki dönemde de lop ve lopçuklar arasındaki bağdokuda çok sayıda kan ve lenf damarı bulunmaktaydı. Özellikle gebeliğin son döneminde bağdoku hücrelerinin sayısının arttığı dikkati çekti (Şekil 4.2).

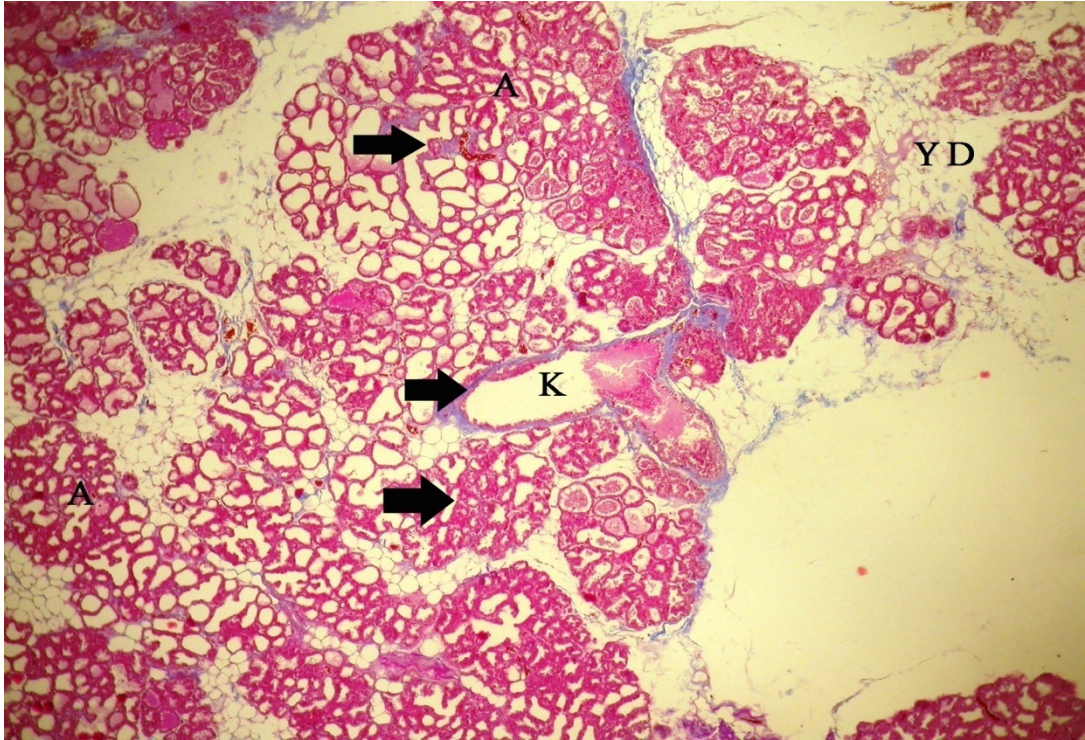


Şekil 4.1. Gebeliğin 7. günündeki sıçanların memesinin genel görünümü, A: alveol, K: duktus laktiferus, YD: yağ dokusu, k: kan damarı, kalın oklar: alveol ve kanal epitel hücreleri, üçlü boyama X 10.



Şekil 4.2. Gebeliğin 21. günündeki sıçanların memesinin genel görünümü, A: alveol, K: duktus laktiferus, YD: yağ dokusu, k: kan damarı, kalın oklar: alveol ve kanal epitel hücreleri, üçlü boyama X 10

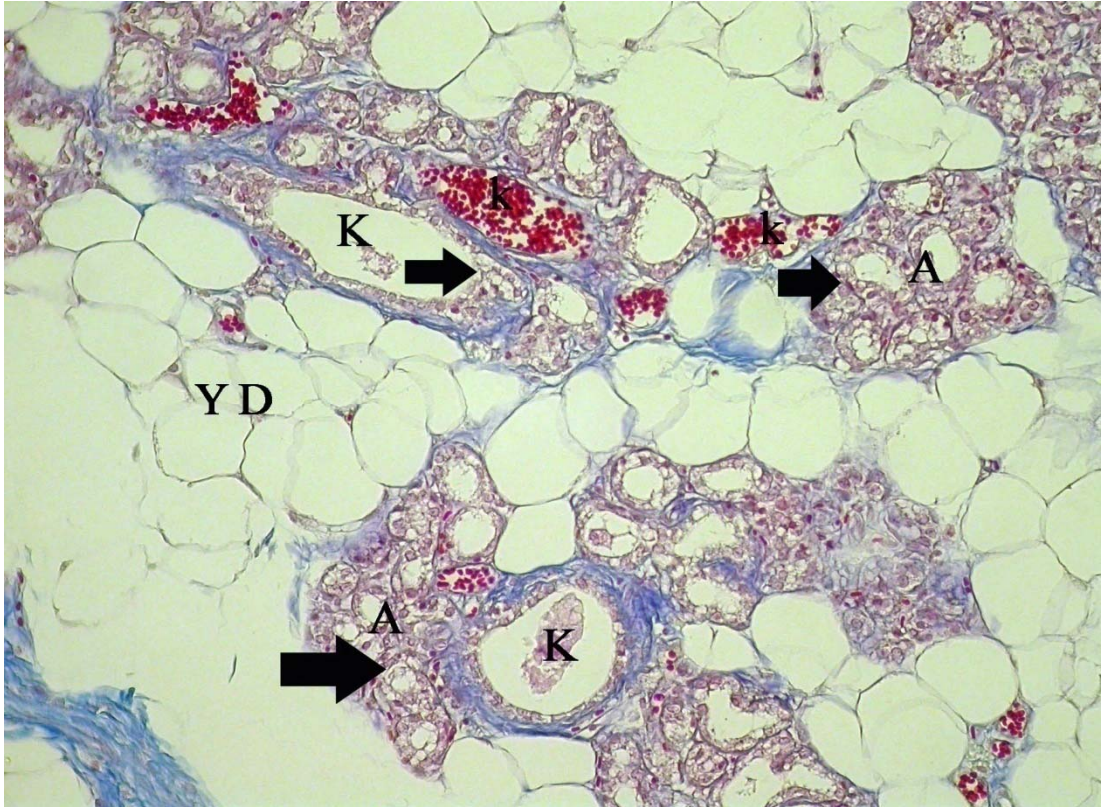
Lop ve lopçuk yapısının çok belirgin olduğu laktasyon döneminde, bağdoku ve meme yağ dokusu tamamıyla gerilemişti. Alveoller uzamış, dallanmış ve lümenleri oldukça genişlemişti. Duvarlarını oluşturan epitel hücreleri, salgılama durumlarına göre farklı görünüşteydi. Buna göre de alveollerde salgıyla dolu yüksek prizmatik hücreler yanında salgısını vererek yassılaştırmış hücreler de bulunmaktaydı. Bazı alveollerin lümeninde koloidal kitle halinde ya da konsantrik yapıda kazein konkromentlerine rastlandı. Etrafları ince bir bağdoku ile çevrelenmiş olan kanalların duvarları tek katlı basık prizmatik epitel hücreleri ile örtülmüştü. Dallanmış olan bu kanalların bazılarının genişlemiş olan lümenleri salgı materyali ile doluydu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Laktasyon dönemindeki sıçanların memesinin genel görünümü, A: alveol, K: duktus laktiferus, YD: yağ dokusu, kalın oklar: alveol ve kanal epitel hücreleri, üçlü boyama X 10

İnvölüsyon döneminde meme yağ dokusu ve bağdokusunun hacimce artmaya başladığı görüldü. Alveollerin lümeni daralmış ve interalveoler bağdokuda artış meydana gelmişti. Kollabe olan alveollerin kalıntıları dar bir lümenine sahipti. Bazı alveollerin lümeninde koloidal kitleler bulunmaktaydı. Tek katlı kübik epitel ile döşeli alveollerin bazılarının epitel hücrelerinin sitoplazmalarında lipid damlacıkları

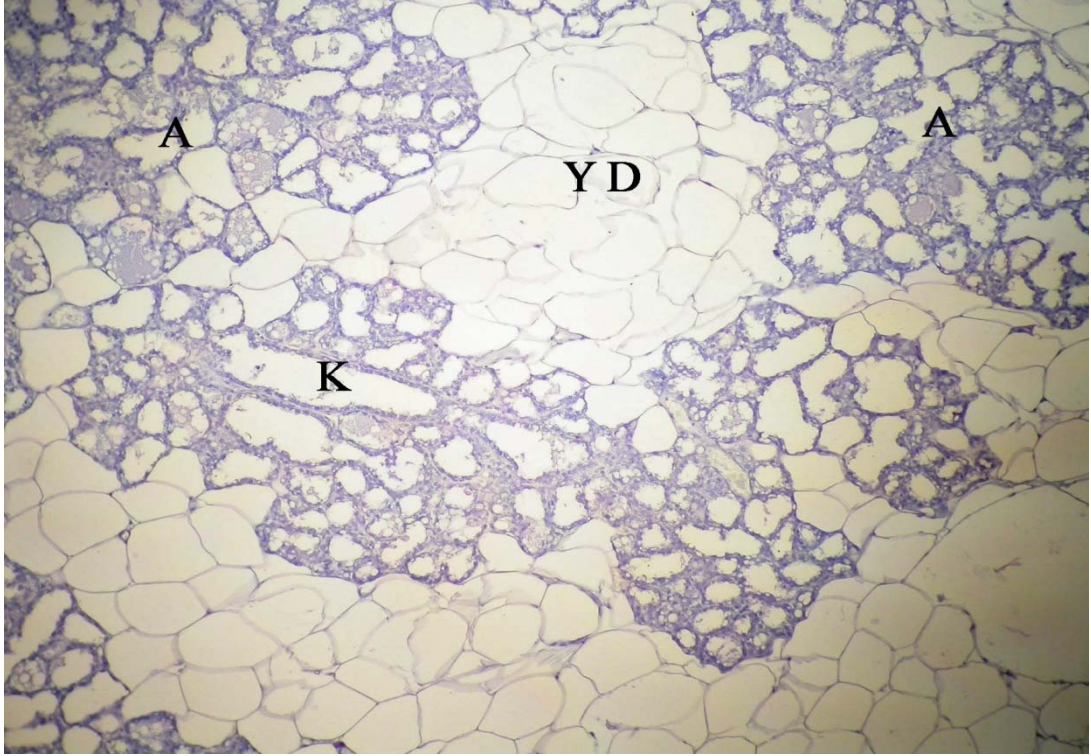
görüldü. Kanallardaki dallanmalar azalmıştı, ancak lümenleri gebelik döneminde bulunan kanalların lümenine göre daha geniştir. Kanallar tek katlı kübik ya da yassı epitelle döşenmişti ve içlerinde salgı materyali bulunmaktaydı. İnterlobar ve intralobar bağdoku içinde de kan ve lenf damarları ile bağdoku hücreleri bulunmaktaydı. Ayrıca tüm gruplarda meme içine yerleşmiş intramammar lenf düğümü görülmekteydi (Şekil 4.4).



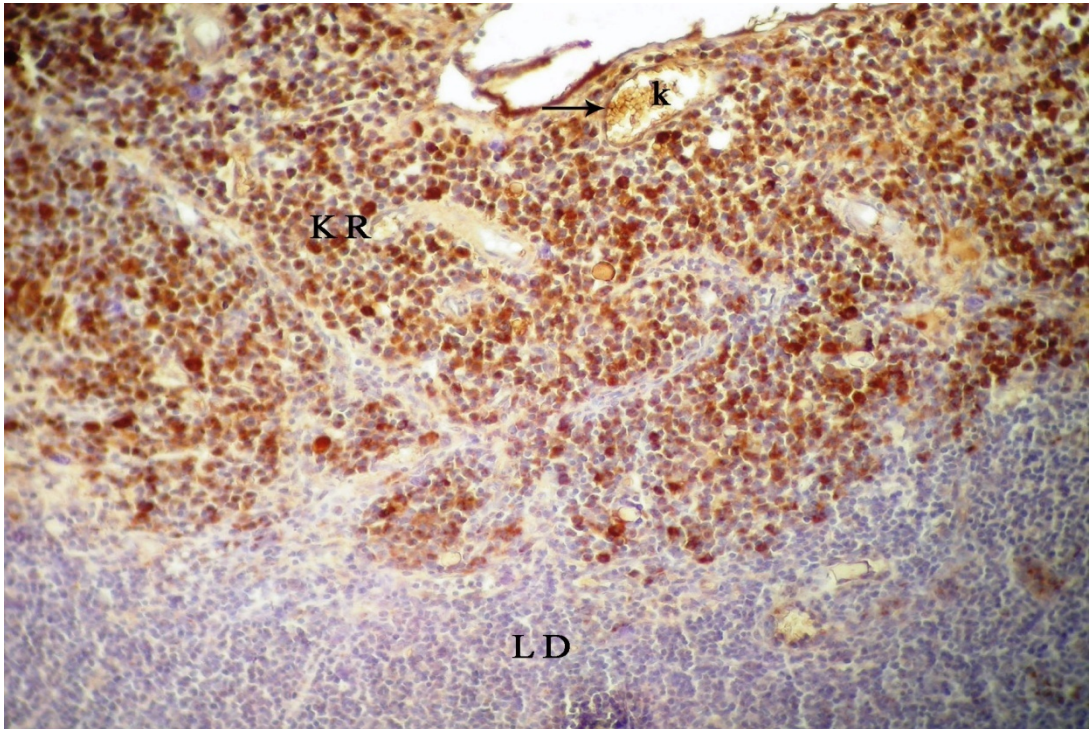
Şekil 4.4. İnvölüsyon dönemindeki sıçanların memenin genel görünümü, A: alveol, K: duktus laktiferus, YD: yağ dokusu, k: kan damarı, kalın oklar: alveol ve kanal epitel hücreleri, üçlü boyama X 20

3.4.2- Memenin İmmunohistokimyasal Özellikleri

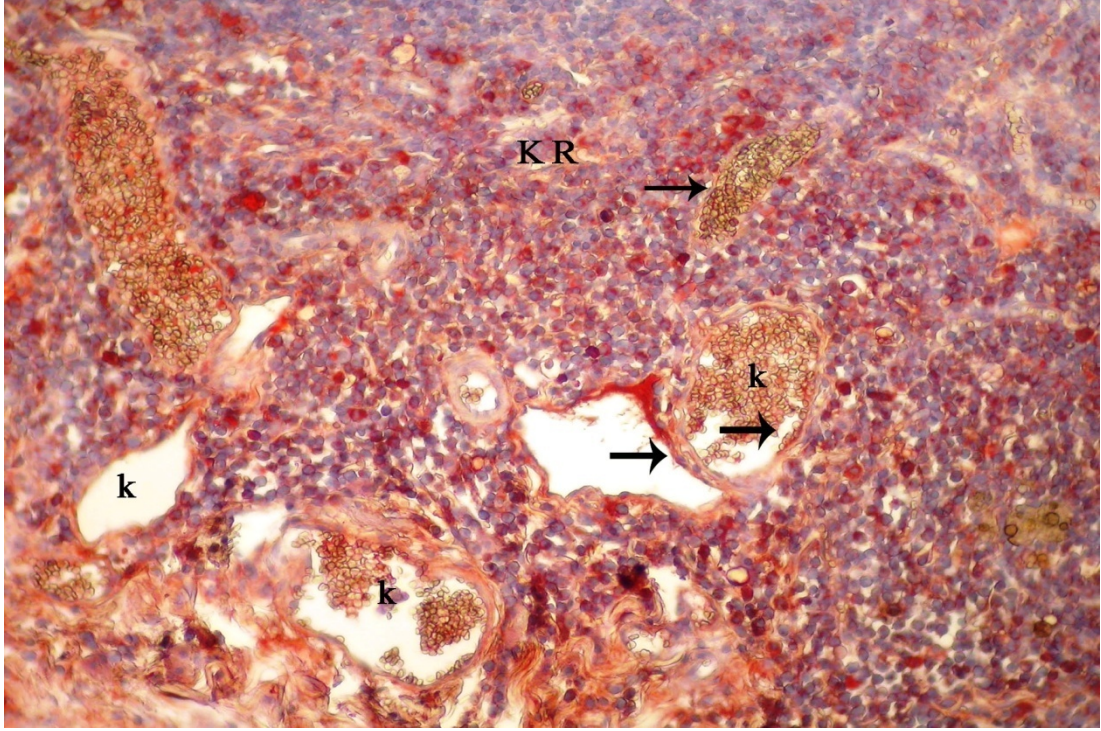
Bütün gruplar için kullanılan negatif kontrollerde immunreaksiyon görülmedi (Şekil 4.5). ErbB-1, erbB-2, erbB-3, erbB-4 ve ER DAB kromojenle, VEGF, VEGI, Flt-1, Flt-4 ve Flk-1 ise AEC kromojen ile boyandı. İncelenen bütün gruplarda intramammar lenf düğümünün korteksinde yerleşmiş olan bazı hücrelerde ve kapillarların endotelinde zayıftan kuvvetliye doğru değişen derecelerde pozitif immunreaksiyonlar izlendi (Şekil 4.6, 7).



Şekil 4.5. İmmunohistokimyasal boyanmanın görülmediği negatif kontrol, A: alveol, K: duktus laktiferus, YD: yağ doku, Gill Haematoksilen X10



Şekil 4.6. Meme lenf düğümünün korteksinde yerleşen bazı hücrelerde ve damar endotelindeki EGFR/erbB1 lokalizasyonu, LD: lenf düğümü, KR: korteks, k: kan damarı, endotel hücresi (ok), X40

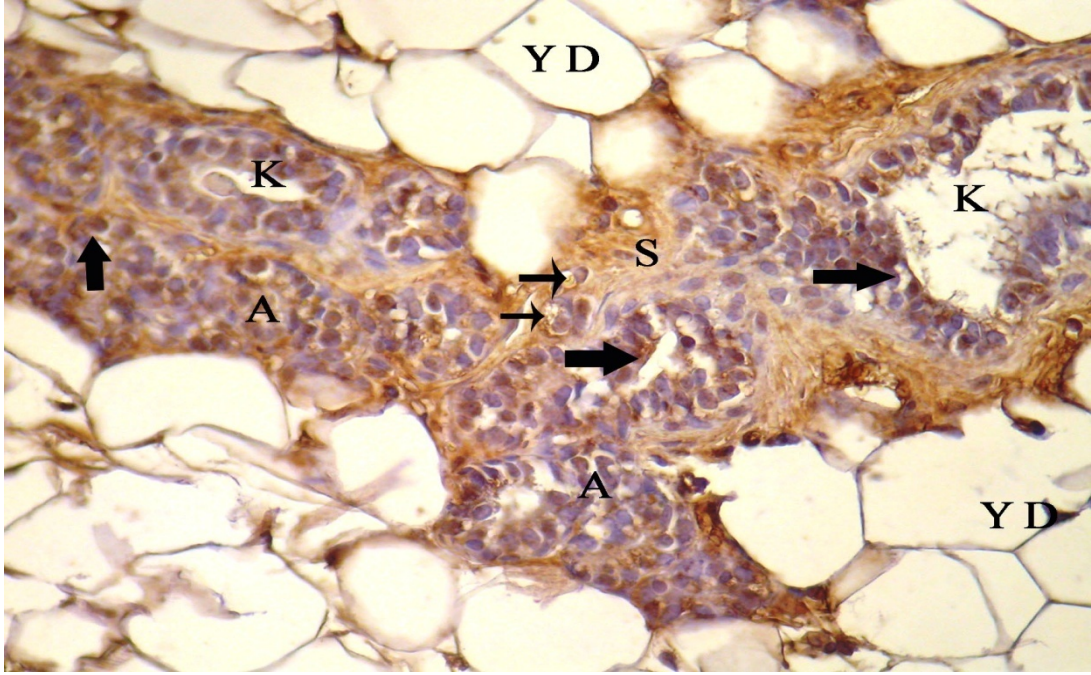


Şekil 4.7. Meme lenf düğümünün korteksinde yerleşen bazı hücrelerde ve damar endotelindeki VEGF lokalizasyonu, KR: korteks, k: damar, endotel hücreleri (ok), X40.

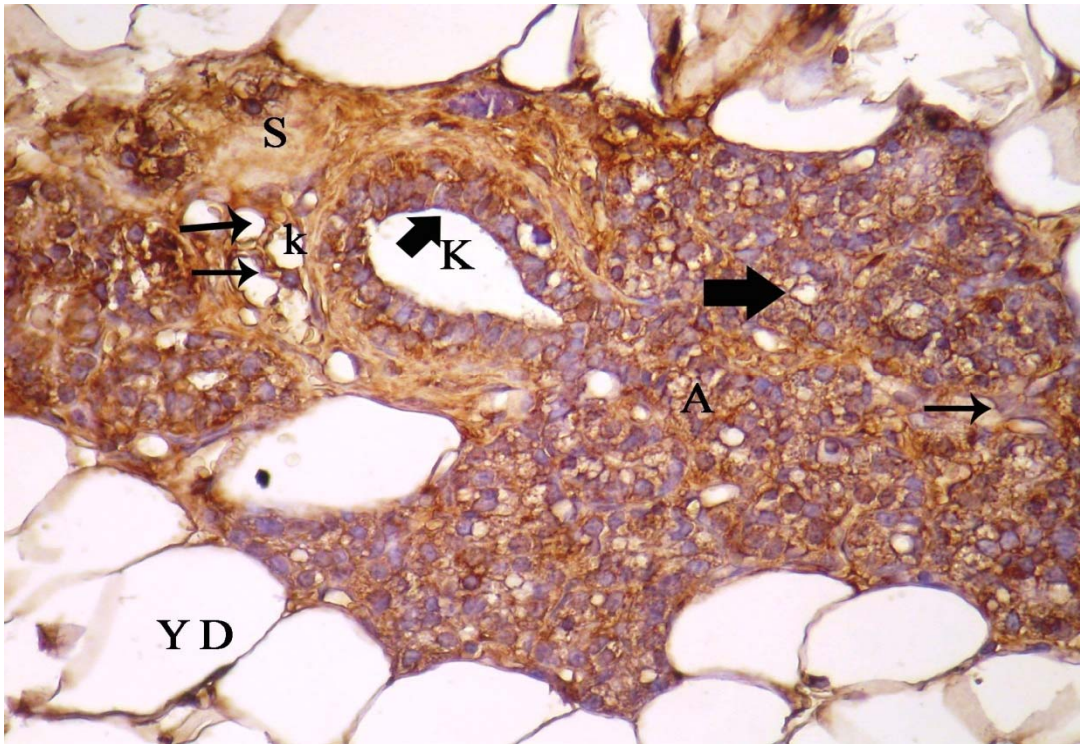
Gebelikte meme:

Gebeliğin 7., 14. ve 21. günlerinde erbB1, erbB2, erbB3 ve erbB4 immunreaktivitesinin meme alveol ve kanallarını örten epitel hücreleri, bağdoku, meme yağ dokusu ve miyoepitel hücrelerinin membran, sitoplazma ve çekirdeklerinde lokalize olduğu görüldü.

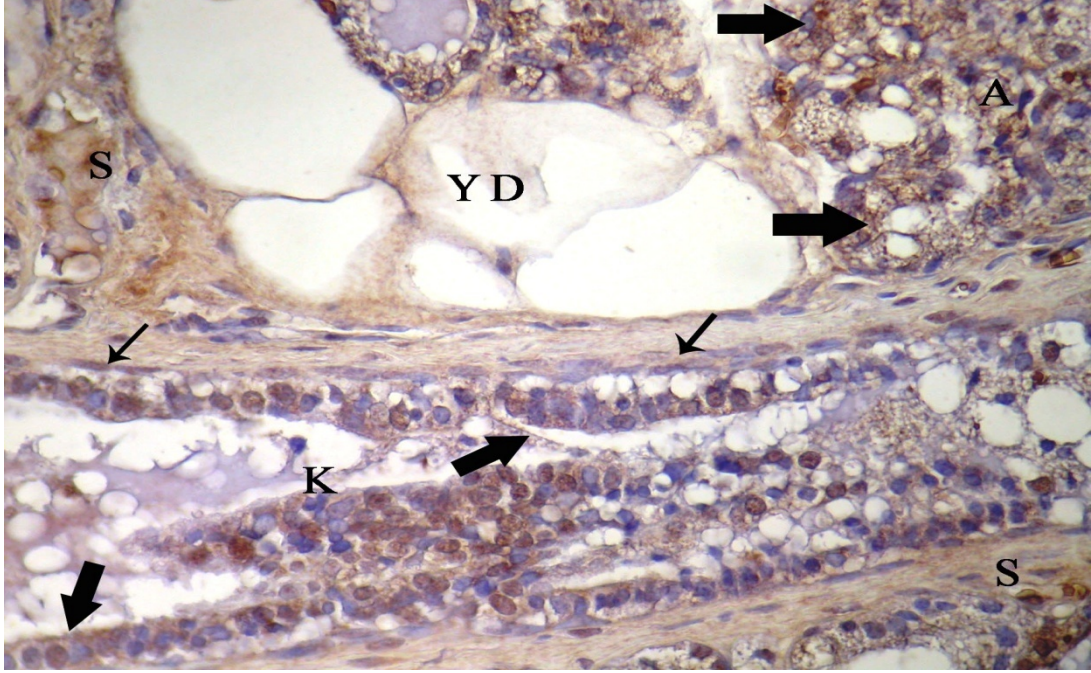
Gebeliğin 7. ve 14. günlerinde kanal ve alveol epitel hücrelerinde, bağdoku, yağ doku ve miyoepitel hücrelerinin güçlü erbB1 ve erbB2 immunreaksiyonu gösterdiği saptandı (Şekil 4.8, 9). Ancak, gebeliğin 21. gününde ErbB1 immunreaksiyonunun alveol epitel hücreleri, bağdoku, yağ doku ve miyoepitel hücrelerinde özellikle belirgin biçimde azaldığı ve daha çok kanal epitel hücrelerinde yoğunlaştığı dikkati çekti (Şekil 4.10).



Şekil 4.8. Gebeliğin 14. günündeki sıçan memesinde erbB1 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ dokusu, S: bağdoku, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endoteli (ince ok), X20

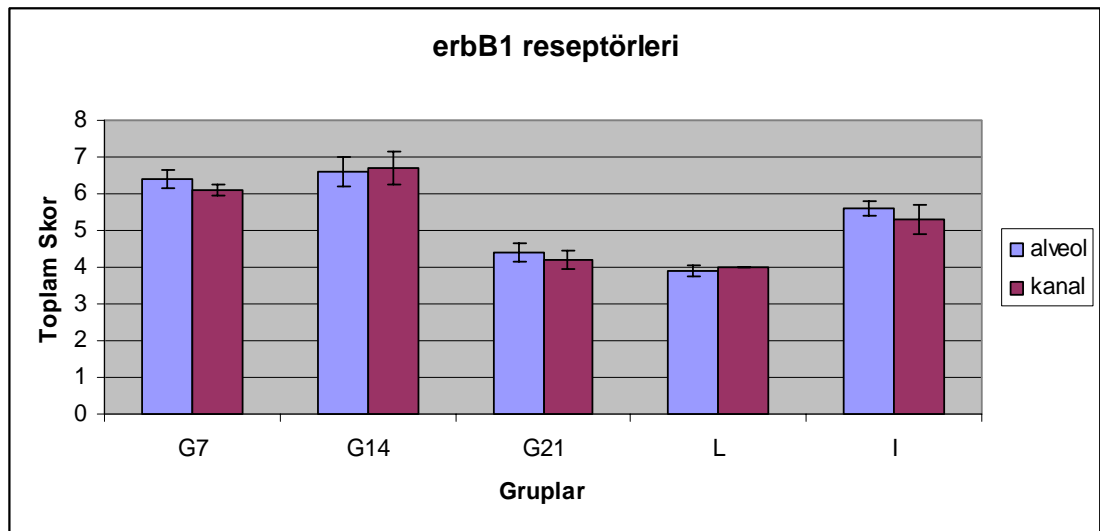


Şekil 4.9. Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde erbB2 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, S: bağdoku, k: kan damarı, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endoteli hücresi (ince ok), X40



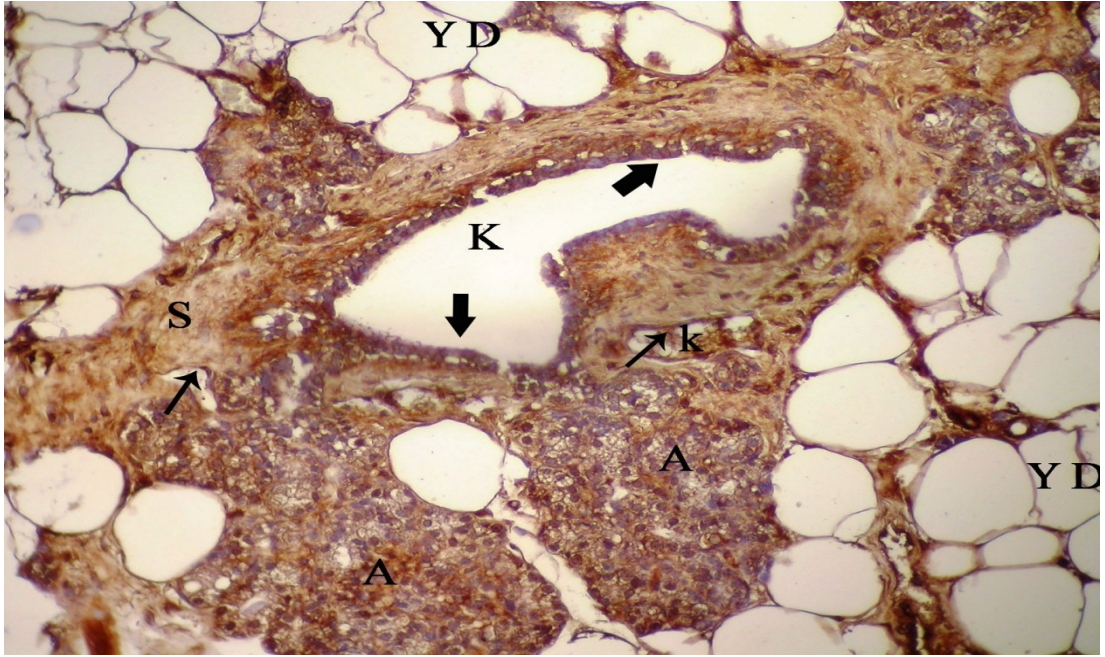
Şekil 4.10. Gebeliğin 21. günündeki sıçan memesinde erbB1 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ dokusu, S: bağdoku, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endotelini (ince ok), X40

Gebeliğin her bir dönemi için, alveol ve kanal epitel hücrelerindeki erbB1 toplam skoru istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gebeliğin 21. günü ile gebeliğin 7. ve 14. günleri arasındaki farklılığın önemli ($p < 0,05$), gebeliğin 7. ve 14. günleri arasındaki farklılığın ise önemsiz ($p > 0,05$) olduğu tespit edildi (Grafik 4.1).

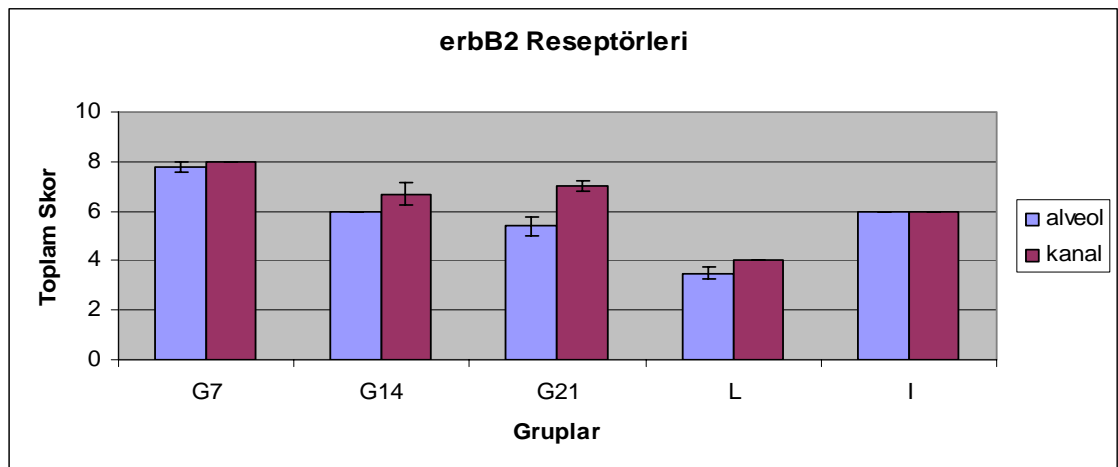


Grafik 4.1. Sıçan memesinde EGFR/erbB1 reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru

ErbB1'in aksine, erbB2 immunoreaksiyonu gebeliğin 14. ve 21. günlerinde alveol ve kanal epitel hücrelerinin apikal ve lateral membranlarında kuvvetli olarak izlendi (Şekil 4.11) Alveol ve kanal epitel hücrelerindeki erbB2 toplam skorunun gebeliğin 7. günü ile gebeliğin 14. ve 21. günleri arasında farklılık taşıdığı ($p<0,05$), gebeliğin son iki döneminin ise istatistiksel açıdan farksız ($p>0,05$) olduğu görüldü (Grafik 4.2).

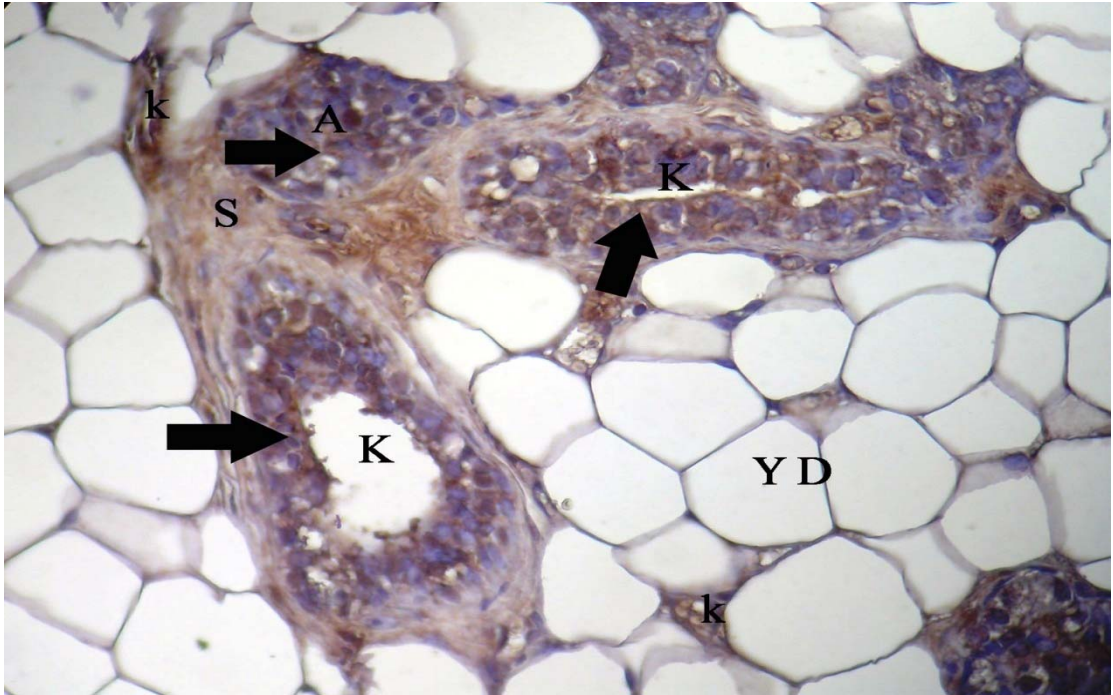


Şekil 4.11. Gebeliğin 14. gününde sıçan memesinde erbB2 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ dokusu, k: kan damarı, kanal epitel (kalın ok), damar endoteli hücresi (ince ok), X20

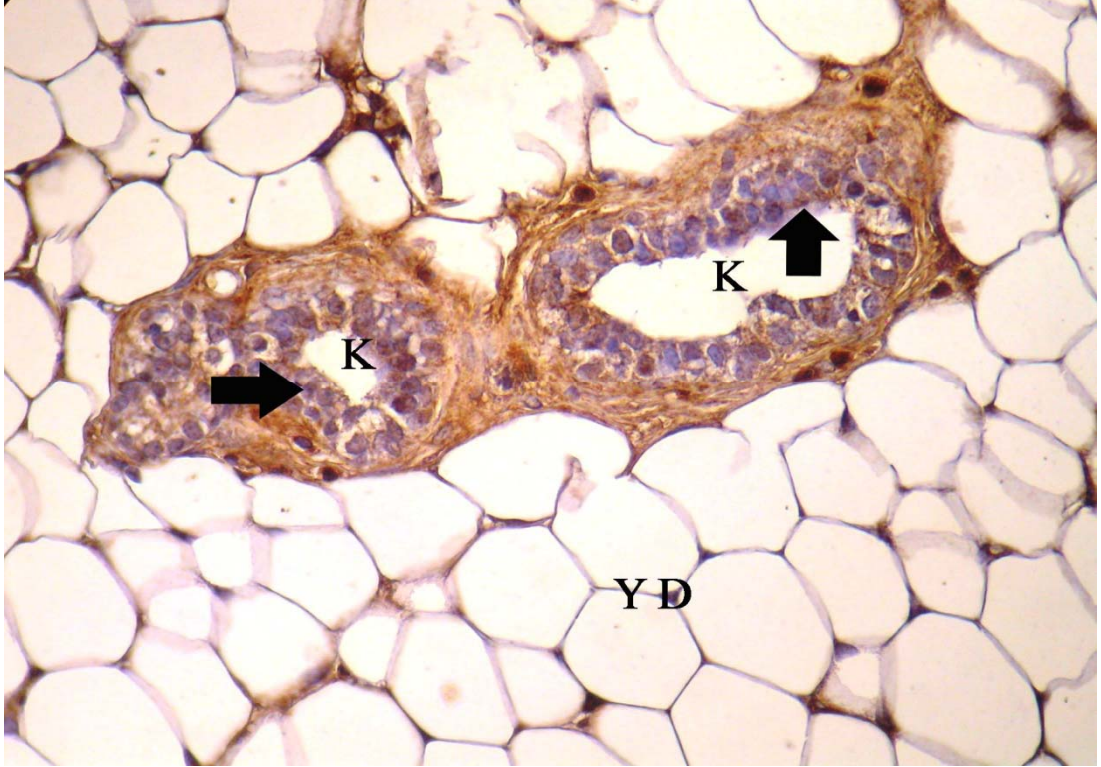


Grafik 4.2. Sıçan memesinde erbB2 reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru

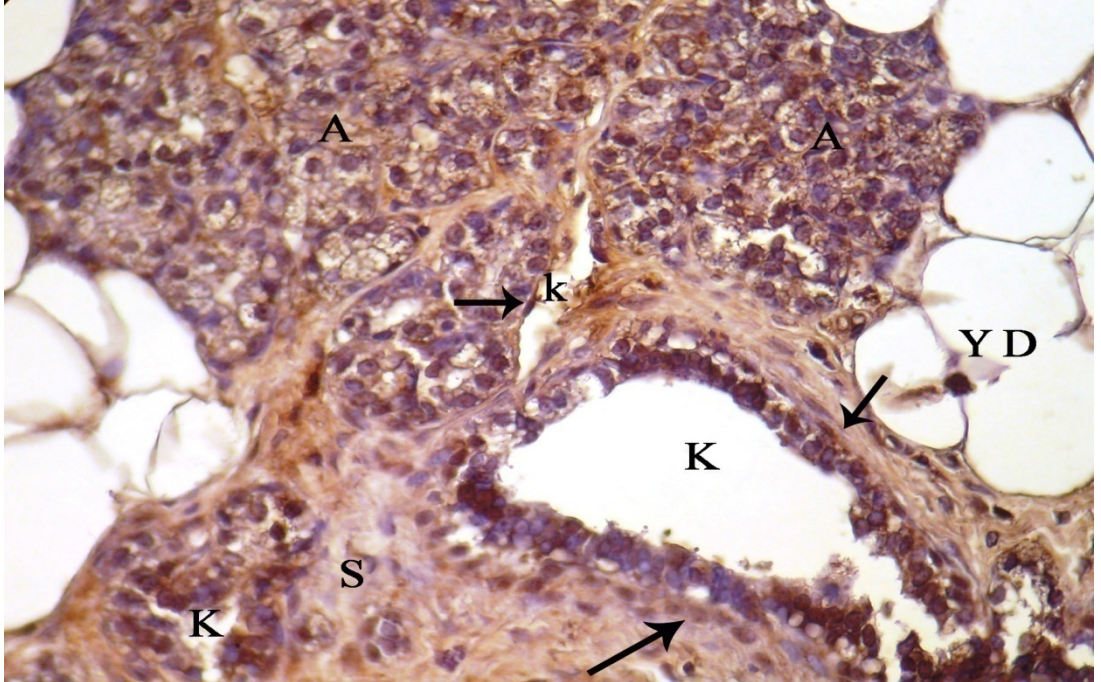
ErbB3 ve erbB4 immunoreaktivitesinin gebeliğin 7. gününde alveol ve kanal epitel hücrelerinde zayıf, miyoepitel ile yağ hücrelerinde ise orta yoğunlukta olduğu (Şekil 4.12, 13) saptandı. Gebeliğin 14. ve 21. günlerinde alveol ve kanalları örten epitel hücreleri ile bağdoku ve miyoepitel hücrelerinde reaksiyon yoğunluğunun arttığı dikkati çekti (Şekil 4.14, 15). Ancak gebeliğin her üç dönemi arasında erbB3 ve erbB4 immunreaksiyonunda anlamlı farklılığın olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Grafik 4.3, 4).



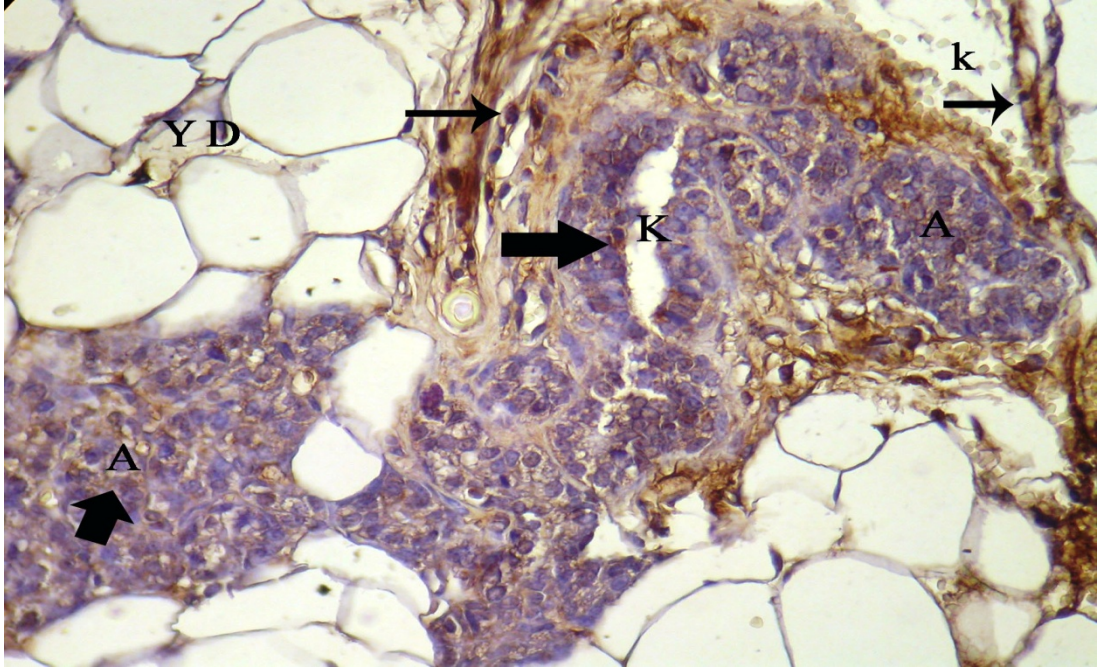
Şekil 4.12. Gebeliğin 7. günündeki sıçan memesinde erbB3 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), X40



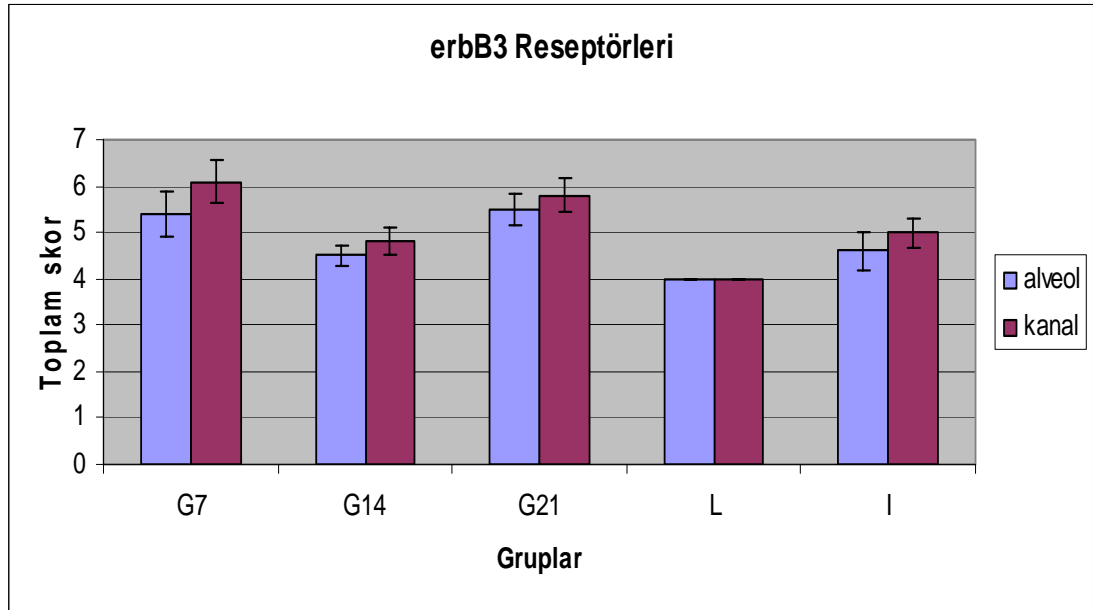
Şekil 4.13. Gebeliğin 7. günündeki sıçan memesinde erbB4 lokalizasyonu, K: kanal, YD: yağ doku, kanal epitel hücreleri (ok), X40



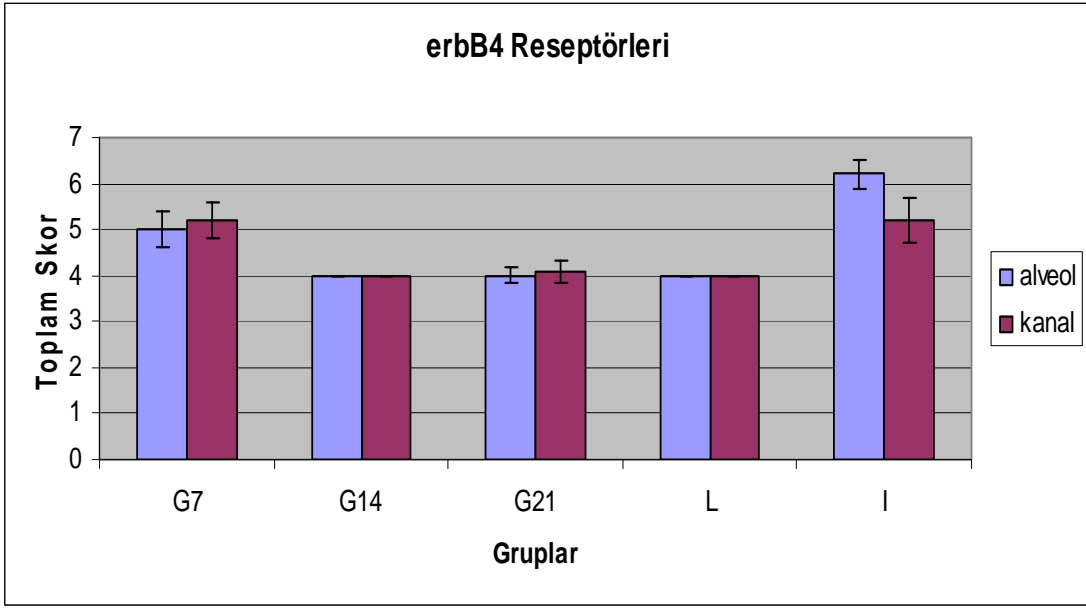
Şekil 4.14. Gebeliğin 14. günündeki sıçan memesinde erbB3 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, damar endotel ve miyoepitel hücresi (ok), X40



Şekil 4.15. Gebeliğin 21. günündeki sıçan memesinde erbB4 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücresi (kalın ok), damar endotel hücresi (ince ok), X20



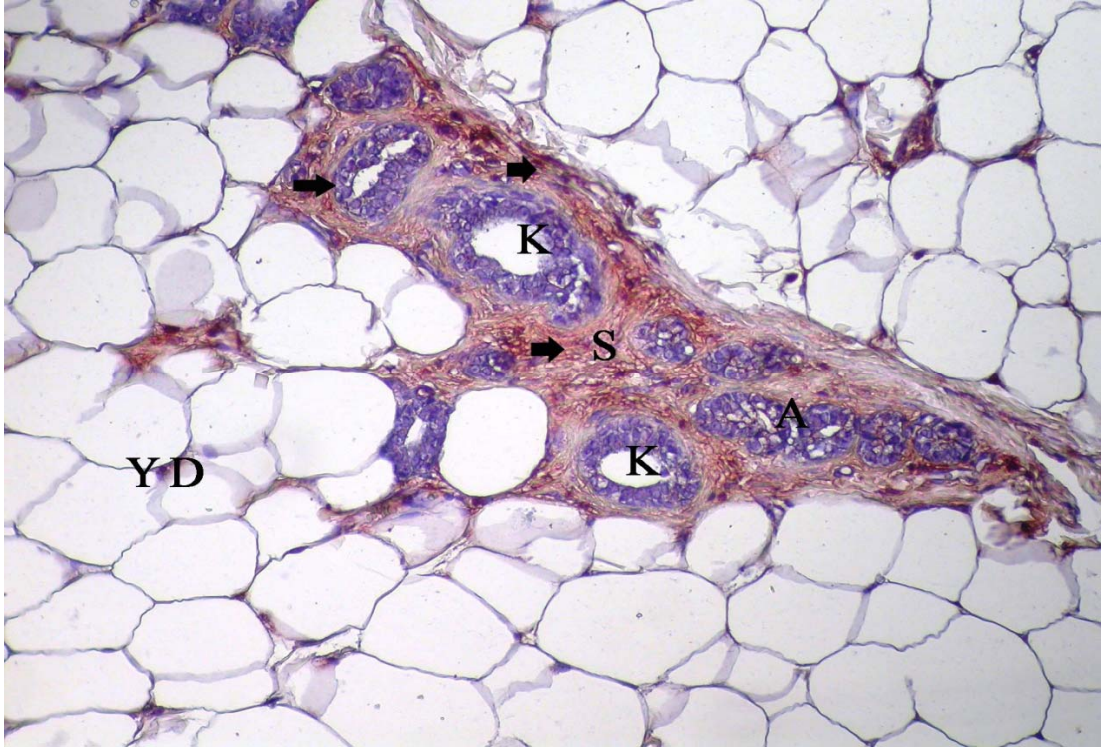
Grafik 4.3. Sıçan memesinde erbB3 reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru



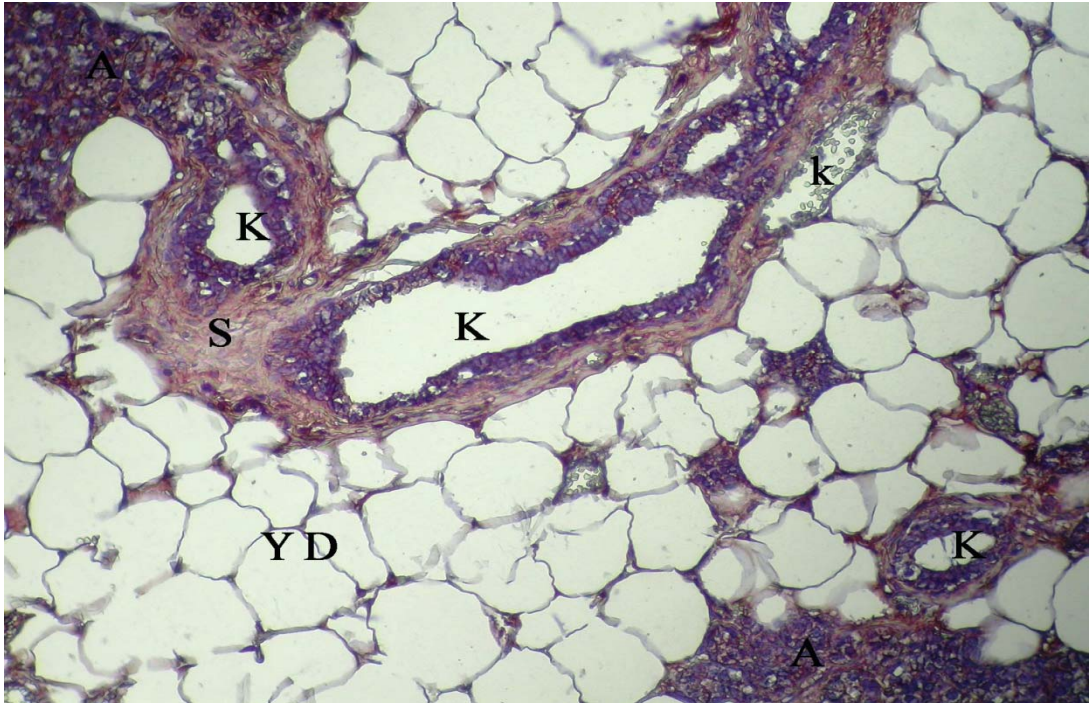
Grafik 4.4. Sıçan memesinde erbB4 reseptörlerinin immunreaksiyonu toplam skoru

İncelen tüm gebelik dönemlerindeki memede interalveoler, interlobuler ve interlober bağdokuda yerleşmiş olan kan damarlarının endotelinde de değişik yoğunluklarda olmak üzere erbB1, erbB2, erbB3 ve erbB4 pozitif reaksiyona rastlandı (Şekil 4.8-15).

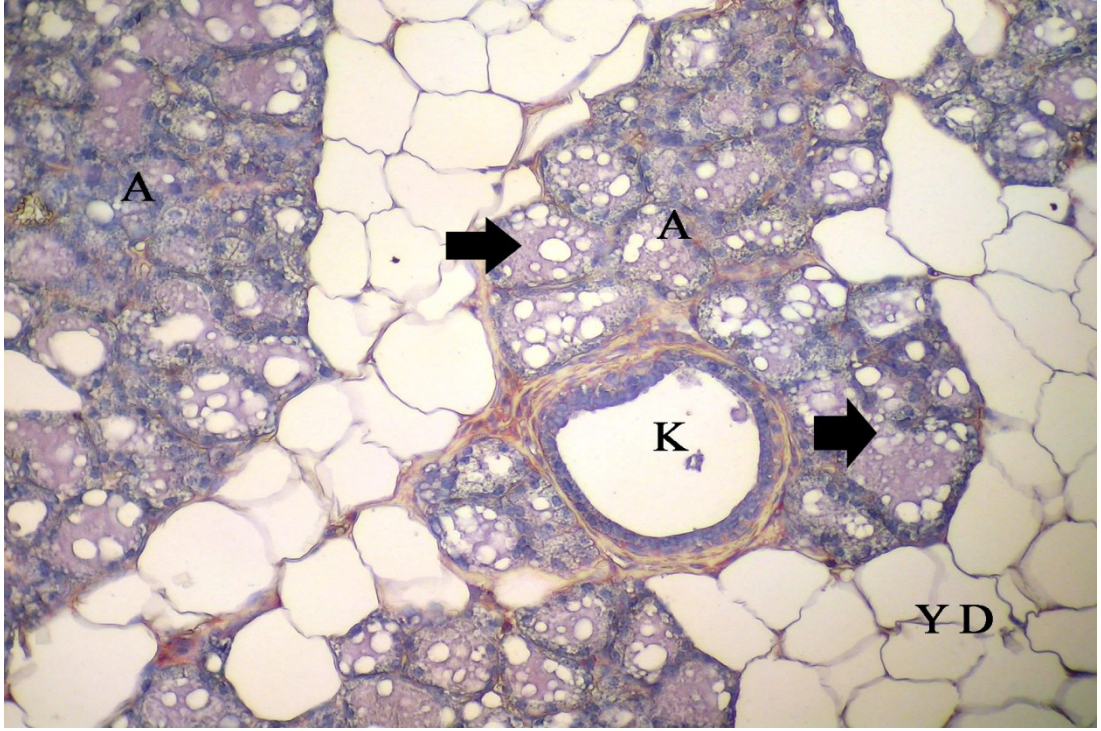
Gebeliğin her üç döneminde VEGF immunreaktivitesi, daha çok bağdoku ve damarlarda yoğunlaşmıştı. Özellikle interalveoler, interlobuler ve interlober bağdokuda yerleşmiş olan büyük çaplı damarlar ve kapillarların endotel hücrelerinin sitoplazmaları ile ekstraselüler matrikste güçlü immunreaksiyon görülürken, alveol ve kanal epitel hücrelerinde zayıf bir immunreaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.16, 17). Ayrıca mioepitel ve bazı bağdoku hücrelerinde zayıf bir VEGF immunoreaksiyonu görülürken, meme yağ dokusu hücrelerinde reaksiyona rastlanmadı (Şekil 4.16, 17). Özellikle gebeliğin 21. günündeki sıçanlarda meme alveollerinin lümeninde birikmiş olan salgı materyalindeki yoğun immunreaksiyon dikkat çekiciydi (Şekil 4.18). Gebelik dönemlerine göre epitel hücrelerdeki VEGF immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında gruplararası farklılığın önemli olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Grafik 4.5).



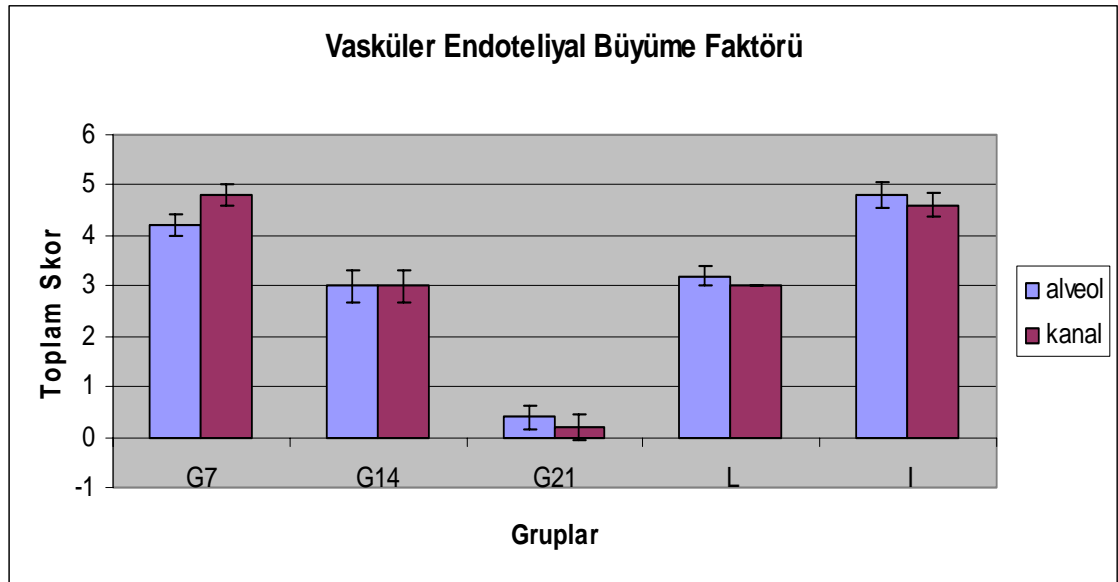
Şekil 4.16. Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde VEGF lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S:bağdoku, YD: yağ doku, ekstraselüler matriks immunreaktivitesi (ok), X20



Şekil 4.17. Gebeliğin 14. gününde sıçan memesinde VEGF lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S:bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, X20

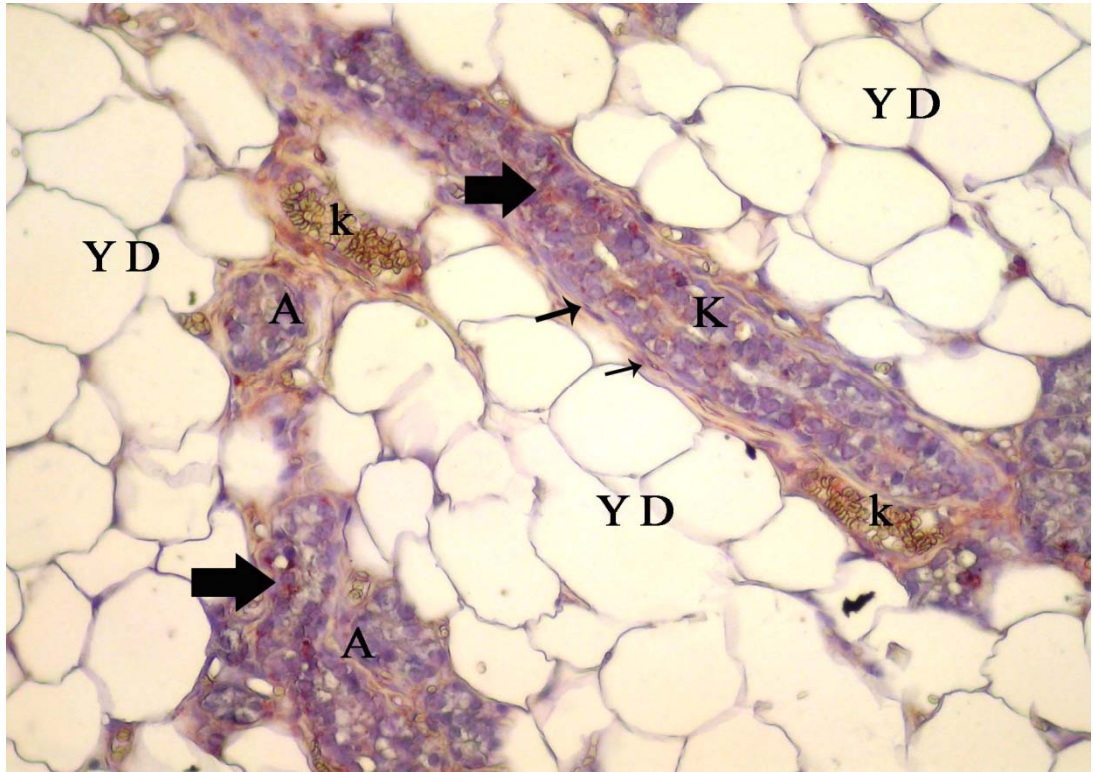


Şekil 4.18. Gebeliğin 21. gününde sıçan memesinde VEGF lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, alveollerdeki immunreaksiyon gösteren salgı materyali (ok), X20

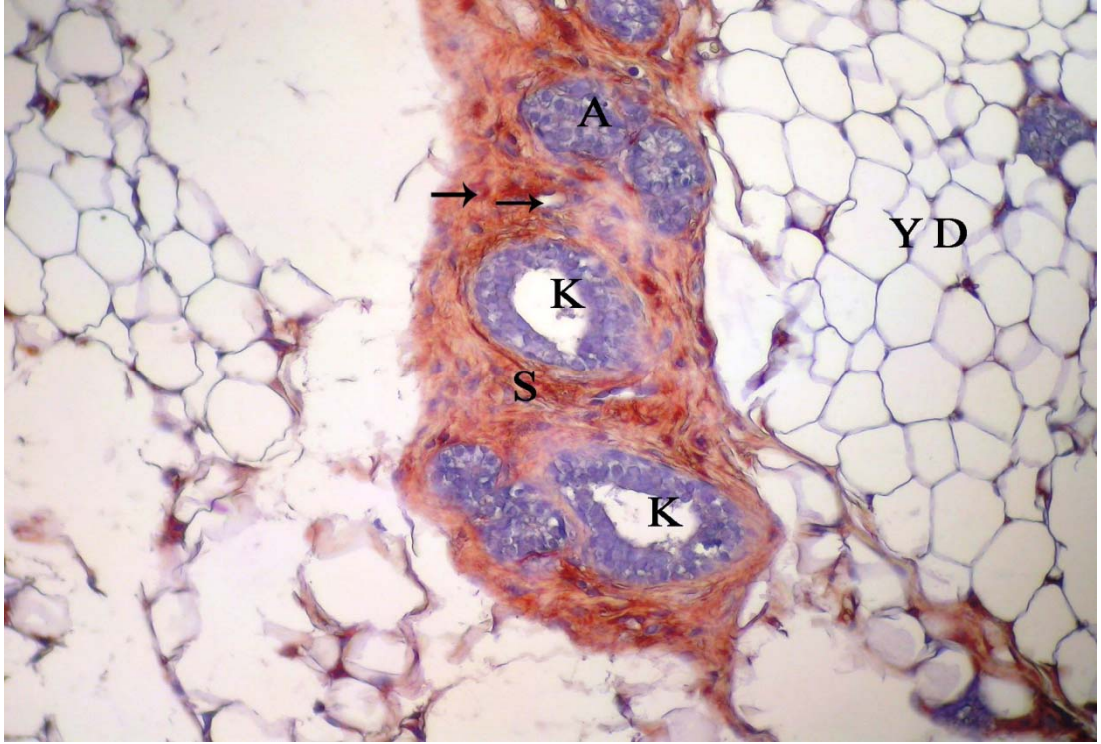


Grafik 4.5. Sıçan memesinde VEGF immunreaksiyonunun toplam skoru

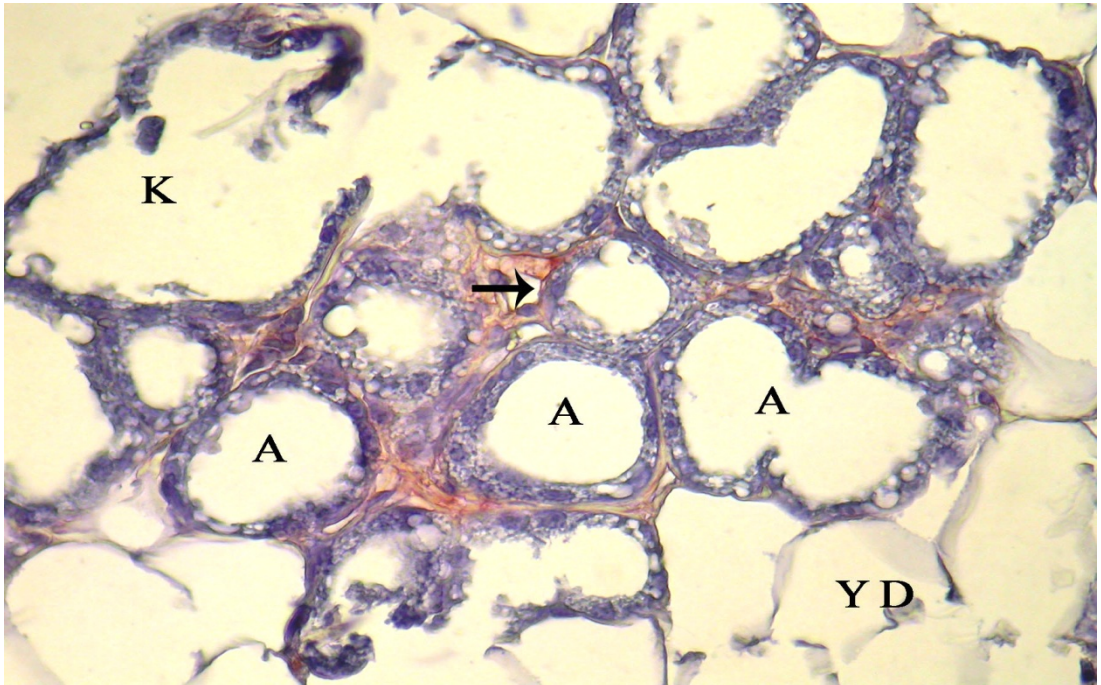
Flt1 ve flk1 immunreaktivitesinin gebeliğin 7., 14. ve 21. günlerinde alveol ve kanalları örten bazı epitel hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf, bağdoku ve meme yağ dokusu içinde yerleşmiş olan damarların endotel hücrelerinin sitoplazmalarında ise yoğun olduğu gözlemlendi (Şekil 4.19, 20). Gebeliğin üç döneminde de Flt1'in miyoepitel ve bazı bağdoku hücrelerinde, Flk 1'in ise sadece bazı bağdoku hücrelerinde kuvvetli immunreaktivite gösterdiği dikkat çekerken, meme yağ dokusu hücrelerinin her iki reseptör için negatif olduğu belirlendi (Şekil 4.19-21). Gebeliğin her üç döneminde kanal ve alveollerde immunreaksiyon gösteren epitel hücrelerinin toplam skorları karşılaştırıldıklarında aralarındaki farklılıkların flt1 için ($p<0,05$) (Grafik 4.6) istatistiksel olarak önemli, flk1 için ise önemsiz olduğu belirlendi ($p>0,05$) (Grafik 4.7).



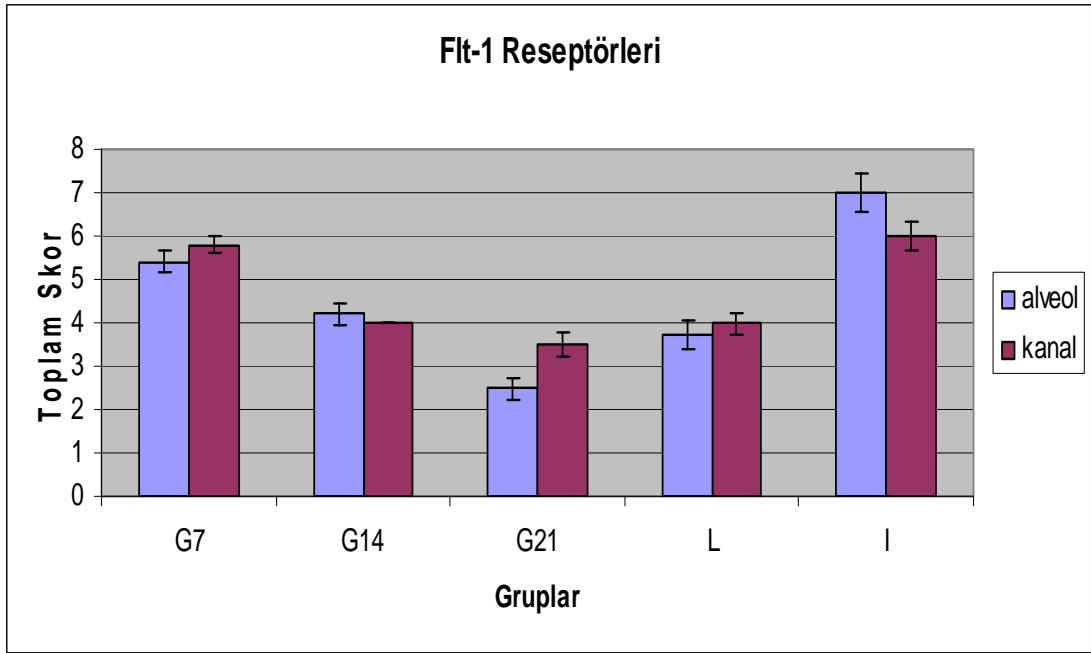
Şekil 4.19. Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde VEGFR-1 (flt1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ dokusu, k: kan damarı, alveol ve kanal epitelinde boyanma (kalın ok), miyoepitel ve bağdoku hücrelerinde immunreaktivite (ince ok), X20



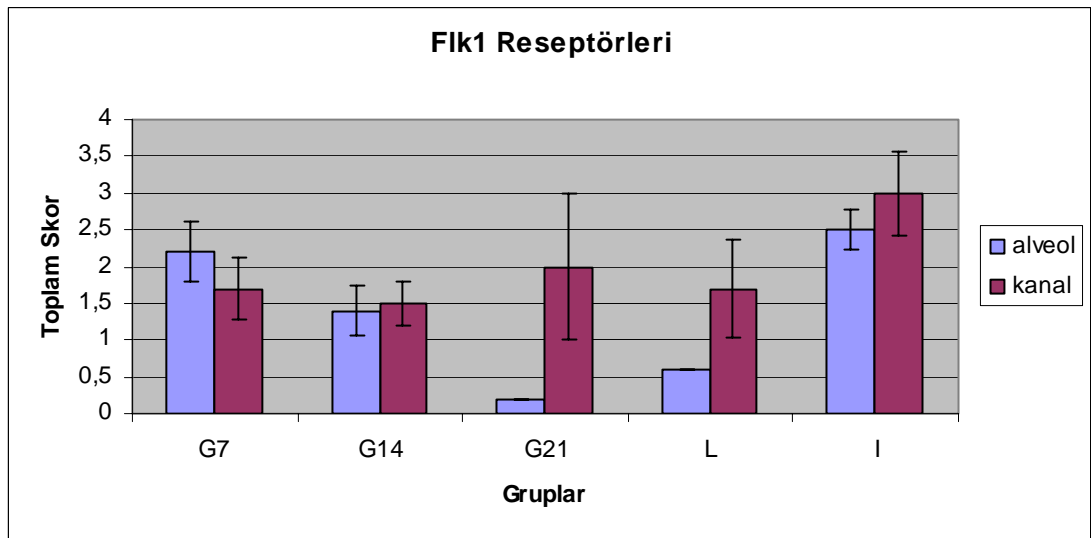
Şekil 4.20. Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde VEGFR-2 (flk1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, S: bağdoku,) damar endotel hücrelerinde immunreaktivite (ok), X40



Şekil 4.21. Gebeliğin 21. gününde sıçan memesinde VEGFR-2 (flk1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, damar endotel hücrelerinde immunreaktivite (ok), X40

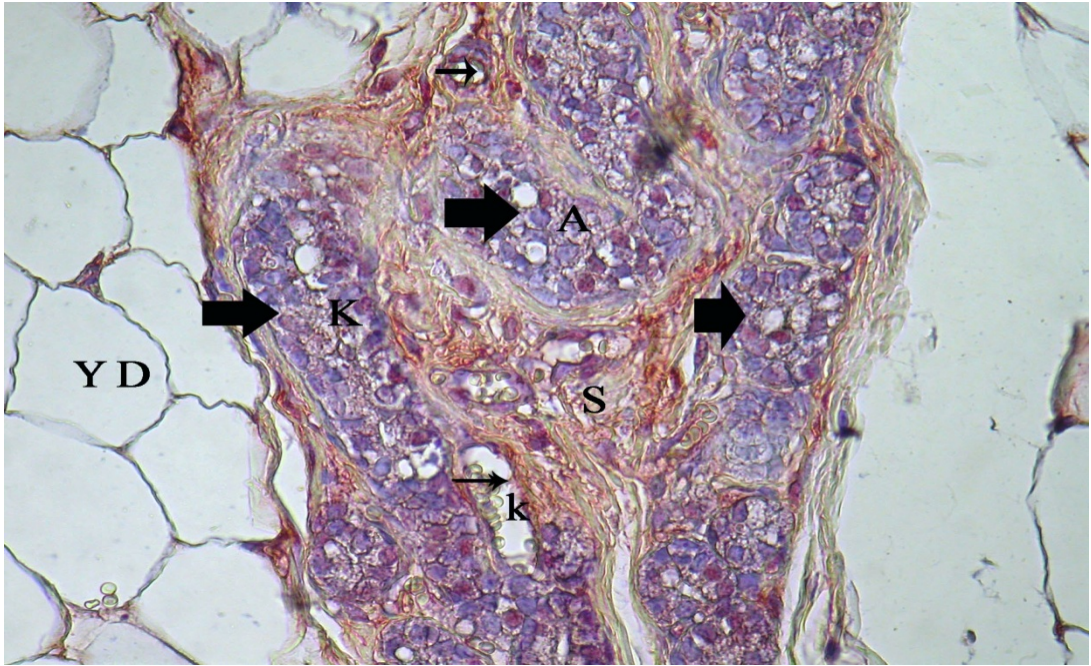


Grafik 4.6. Sıçan memesinde VEGFR-1 (FIt1) reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru

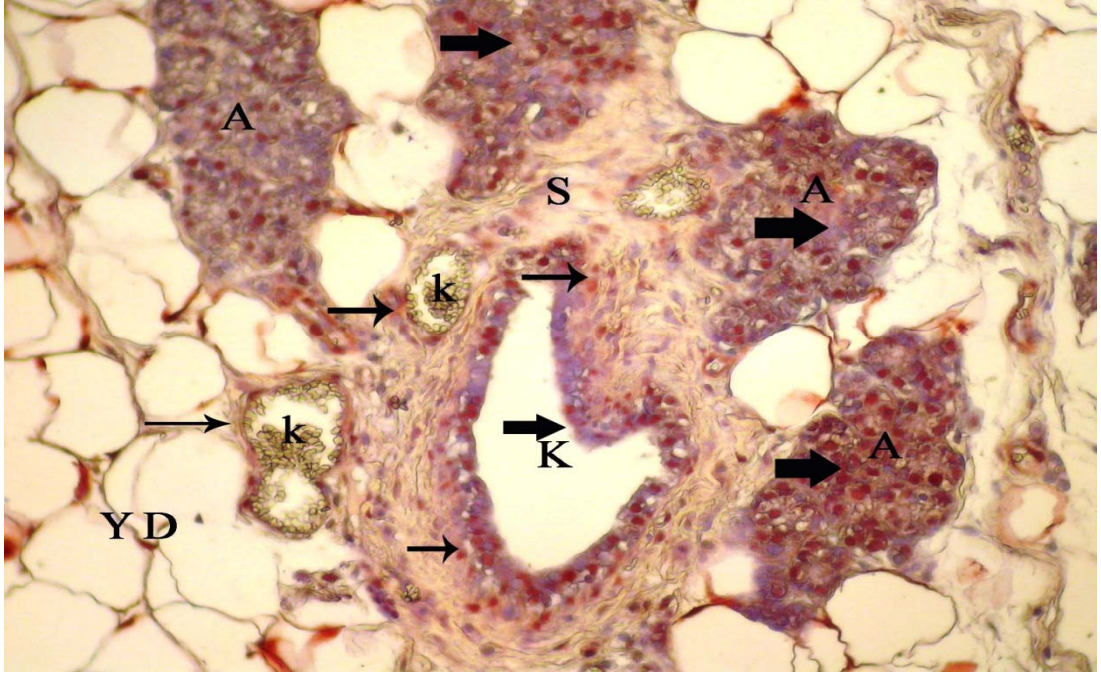


Grafik 4.7. Sıçan memesinde VEGFR-2 (FIt1) reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru

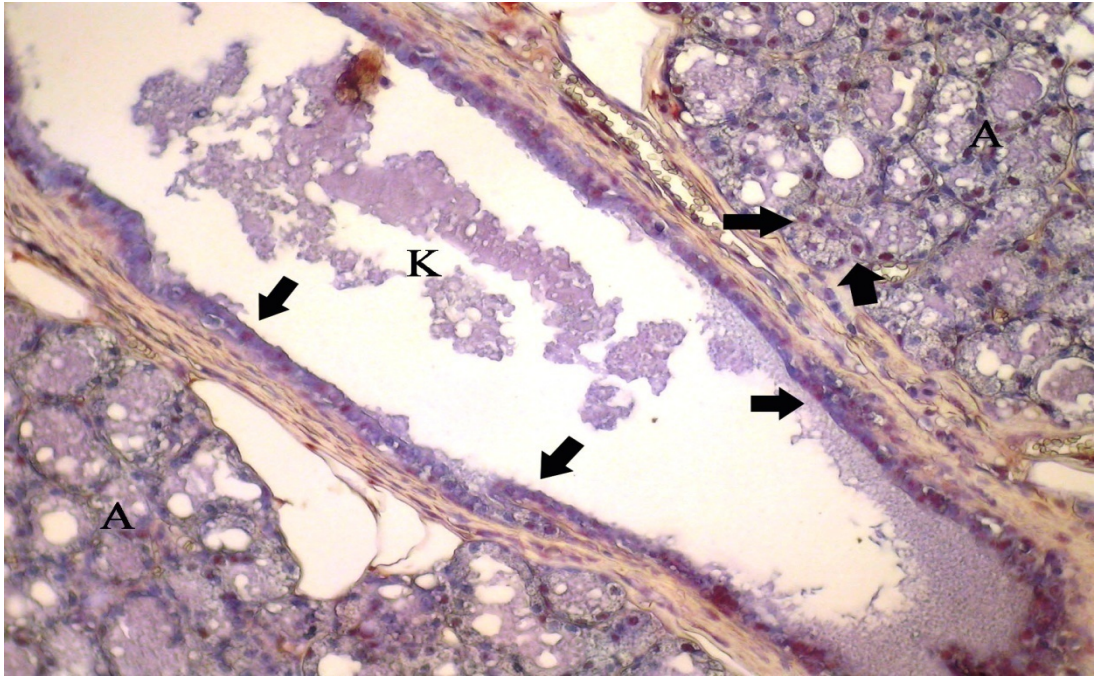
Gebeliğin 7. ve 14. günlerinde Flt4 immunreaktivitesi alveol ve kanal epitel hücrelerinin membran ve sitoplazmalarında, bağdoku ve meme yağ dokusu içinde yerleşmiş olan damarların endotel hücrelerinin sitoplazmaları lokalize idi. Alveol epitel hücrelerinde güçlü, kanal epitel hücrelerinde ise değişen yoğunluklarda immunreaksiyon vardı. Özellikle alveol ve kanallar etrafında yerleşen küçük çaplı kapillar, venül ve lenf damarlarının endotel hücrelerinin sitoplazmalarındaki immunreaksiyonun kuvvetli olması dikkate değerdi (Şekil 4.22, 23). Gebeliğin 21. gününde flt4 immunoreaktivitesinin bazı alveollerde birkaç epitel hücrelerinde, kanallarda ise çok sayıdaki epitel hücrelerinde pozitif olduğu görüldü (Şekil 4.24). Ayrıca gebeliğin her üç döneminde miyoepitel, meme yağ dokusu ile bazı bağdoku hücrelerinin de kuvvetli pozitif olduğu saptandı. (Şekil 4.22-24). Flt4 immunreaktivitesinin gebeliğin 7. ve 14. günleri arasında istatistiksel açıdan önemsiz ($p>0,05$), gebeliğin 21. günü ile bu iki dönem arasında ise anlamlı ($p<0,05$) bir farklılık taşıdığı tespit edildi (Grafik 4.8).



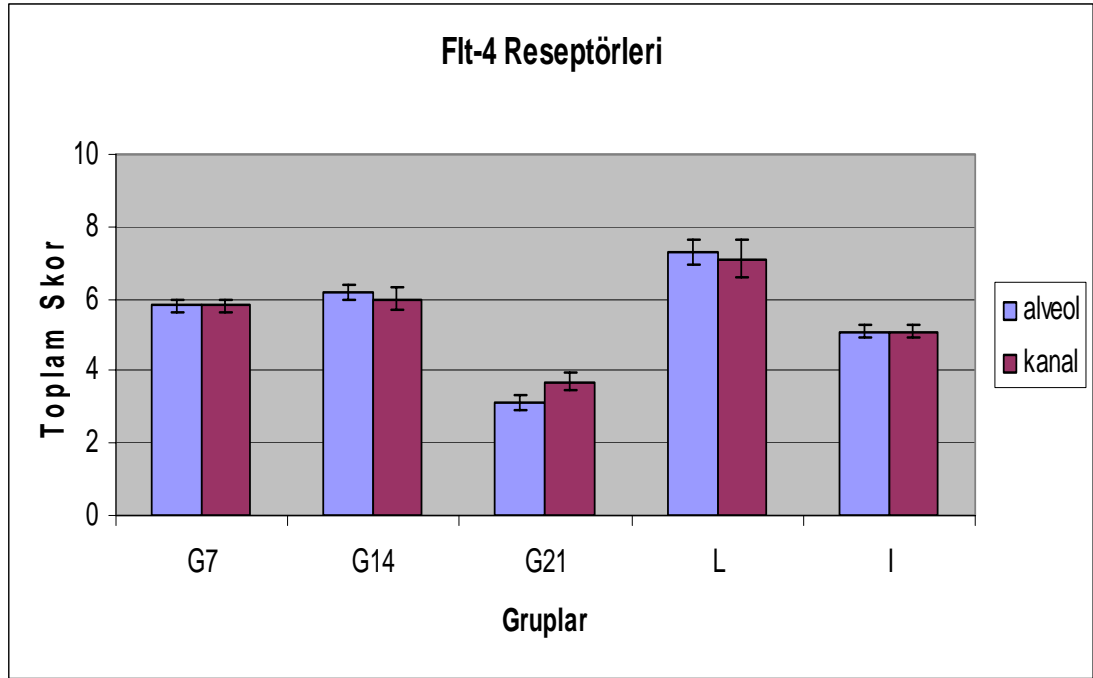
Şekil 4.22. Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde VEGFR-3 (flt4) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücrelerinde boyanma (kalın ok), damar endotel hücrelerinde immunreaktivite (ince ok), X40



Şekil 4.23. Gebeliğin 14. gününde sıçan memesinde VEGFR-3 (flt4) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaktivite (kalın ok), endotel, bağdoku ve miyoepitel hücrelerinde immunreaktivite (ince ok), X40

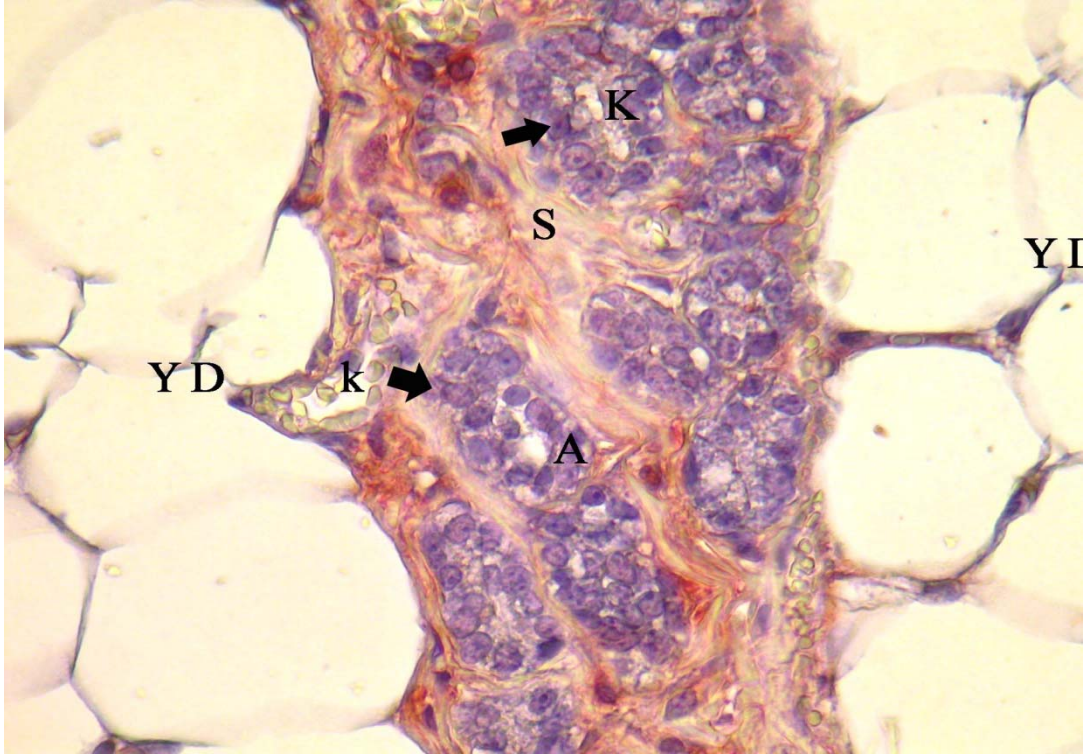


Şekil 4.24. Gebeliğin 21. gününde sıçan memesinde VEGFR-3 (flt4) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaktivite (ok), X20

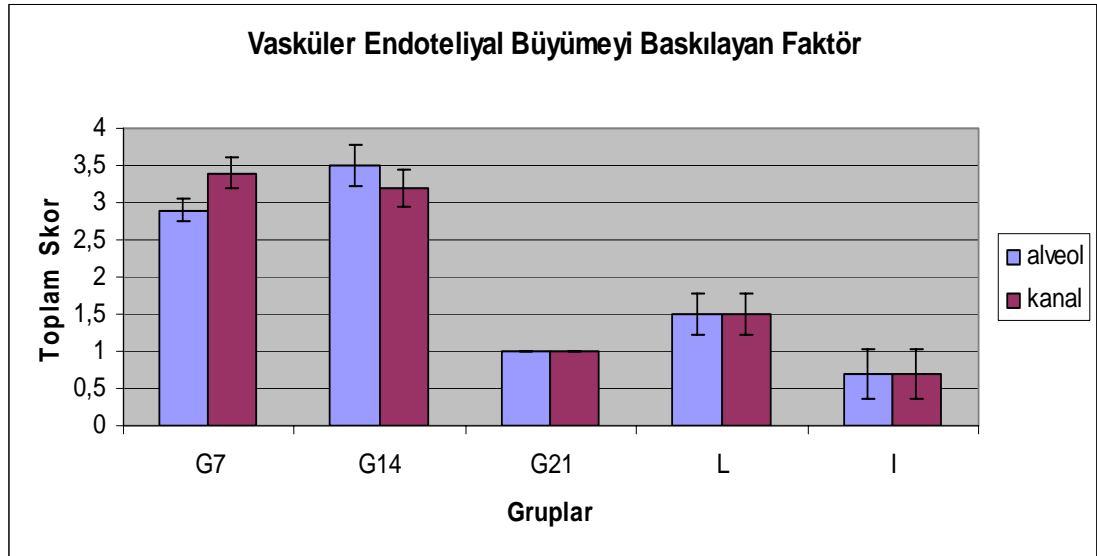


Grafik 4.8. Sıçan memesinde VEGFR-3 (Flt4) reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru

VEGI'nın gebelik süresince alveol ve kanal epitel hücrelerinde zayıf bir reaksiyon gösterdiği, pozitif immunreaksiyonun özellikle küçük çaplı damarların endotel hücrelerinin sitoplazmaları ile ekstraselüler matriks ve bazı bağdoku hücrelerinin sitoplazmalarında olduğu belirlendi (Şekil 4.25). VEGI immunreaktivitesi gebelik dönemlerine göre değerlendirildiğinde, gebeliğin 21. günü ile gebeliğin ilk iki dönemi arasındaki farklılıklar önemli ($p < 0,05$) iken, gebeliğin 7. ve 14. günleri arasındaki farklılık önemsiz ($p > 0,05$) bulundu (Grafik 4.9).

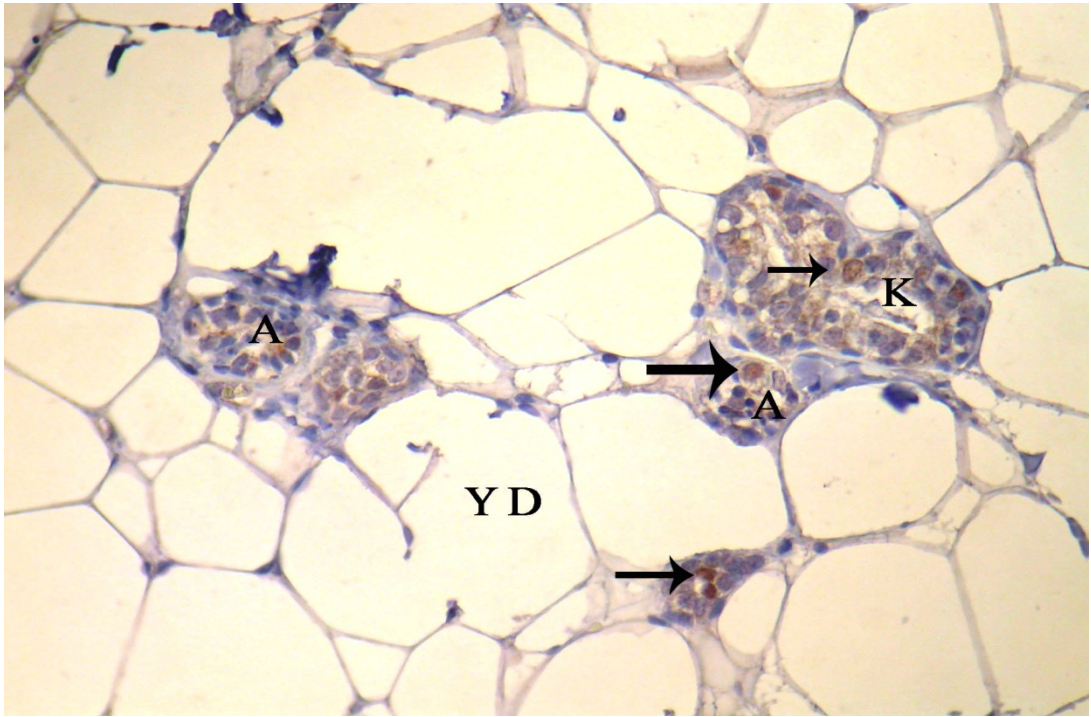


Şekil 4.25. Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde VEGI lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaksiyon (ok), X40

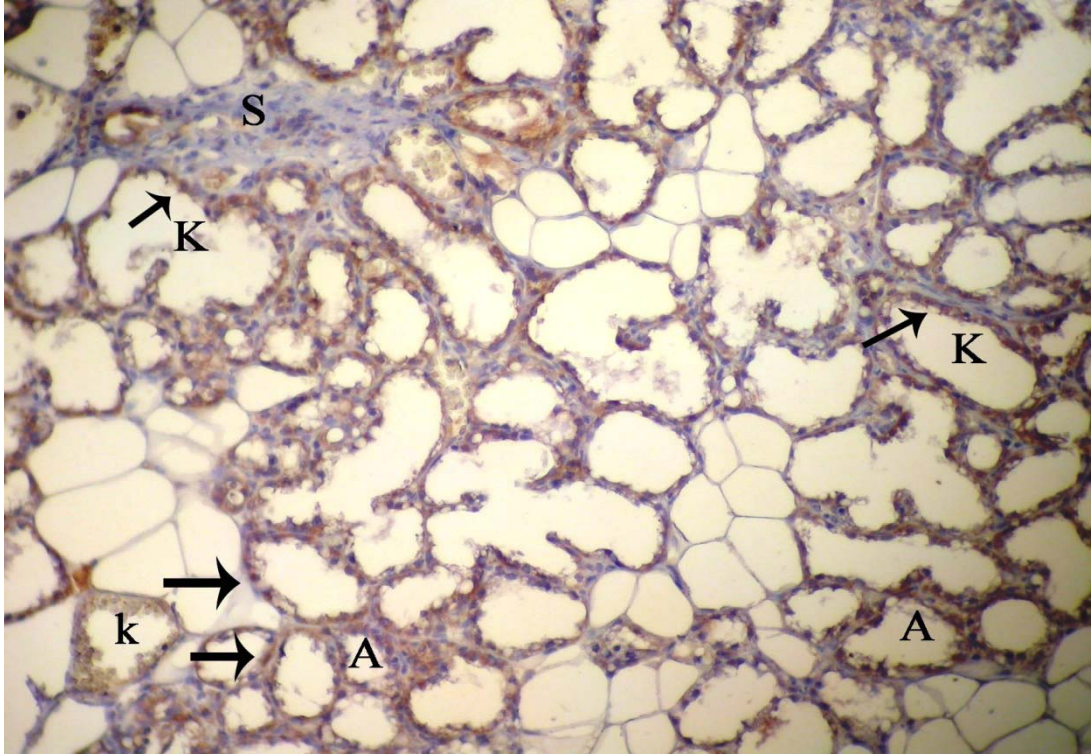


Grafik 4.9. Sıçan memesinde VEGI immunreaksiyonunun toplam skoru

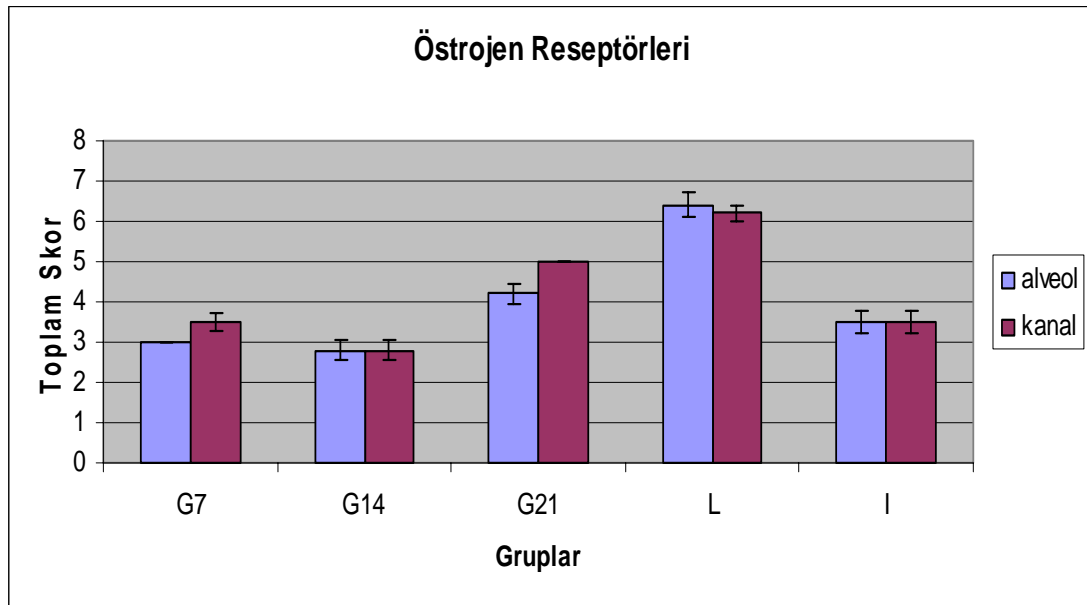
ER immunreaktivitesinin sadece meme alveol ve kanal epitel hücrelerinde lokalize olduğu görüldü. Gebeliğin 7. gününde birkaç epitel hücresinde pozitif immunreaksiyon görülürken (Şekil 4.26), gebeliğin 21. gününde immunreaksiyon gösteren hücrelerin sayının arttığı belirlendi (Şekil 4.27). ER'nin total boyanma skorları karşılaştırıldıklarında gebeliğin 7. ve 14. Günleri arasındaki farklılığın anlamsız ($p>0,05$), gebeliğin 21. günü ile gebeliğin ilk iki dönemi arasındaki farklılıkların ise anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı (Grafik 4.10).



Şekil 4.26. Gebeliğin 7. gününde sıçan memesinde ER lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, immunreaktive alveol ve kanal epitel hücreleri (ok), X40



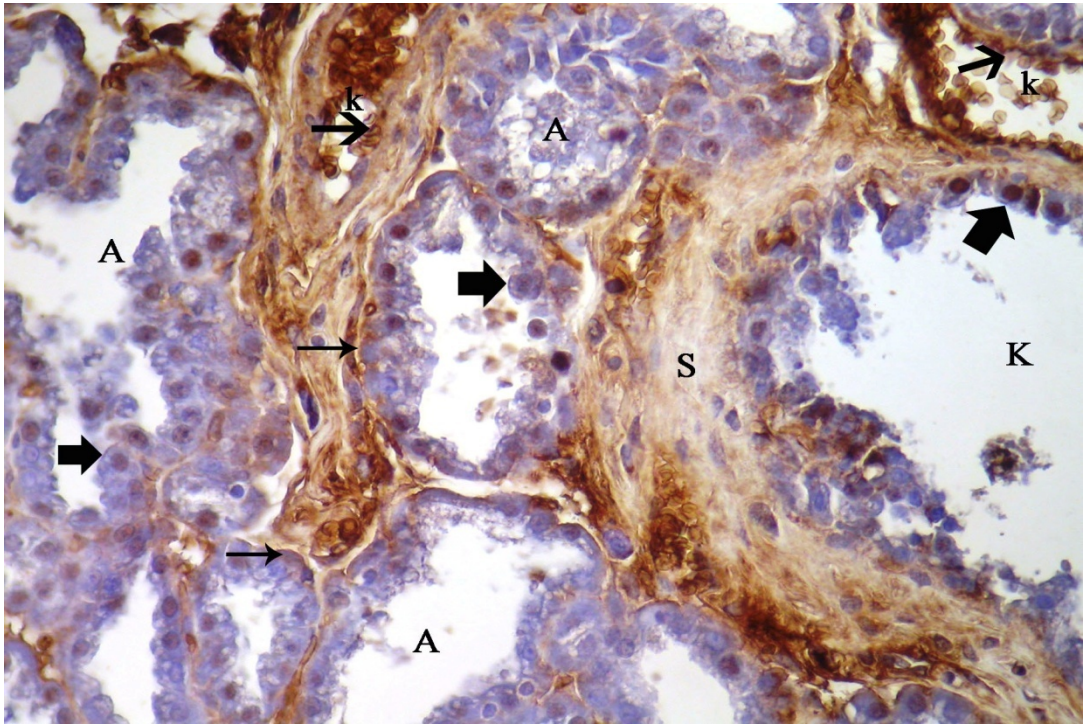
Şekil 4.27. Gebeliğin 21. gününde sıçan memesinde ER lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdokü, k: kan damarı, immunreaksiyon gösteren alveol ve kanal epitel hücreleri (ok), X10



Grafik 4.10. Sıçan memesinde östrojen reseptörlerinin immunreaksiyonunun toplam skoru

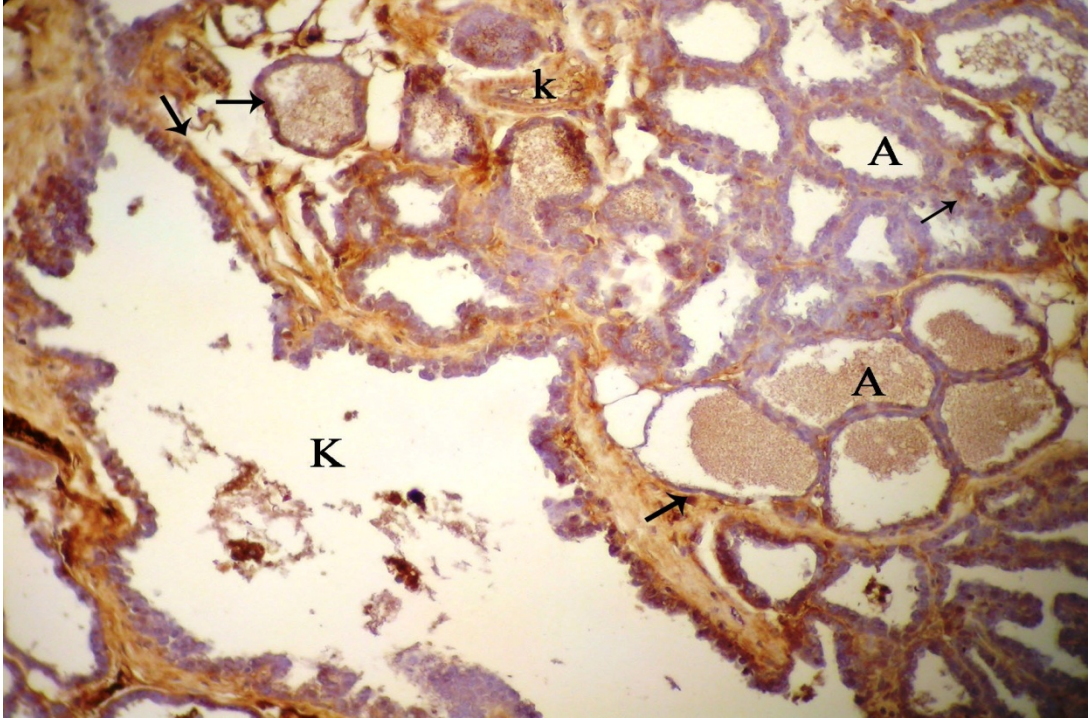
Laktasyon döneminde meme:

Laktasyon döneminde, erbB1, erbB2, erbB3 ve erbB4 immunreaktivitesi alveol ve kanal epitel hücreleri, bağdoku ve meme yağ dokusu hücreleri ile miyoepitel hücrelerinin ve kan damarlarının endotel hücrelerinin membran, sitoplazma ve çekirdeklerinde görüldü. Alveol ve kanal epitel hücrelerinde genel olarak hücrelerinin apikal membranı ile sınırlı olmak üzere zayıf bir reaksiyon gözlenirken, miyoepitel ve bağdoku hücreleri ile endotel hücrelerindeki immunreaksiyon daha kuvvetli olarak izlendi (Şekil 4.28-30).

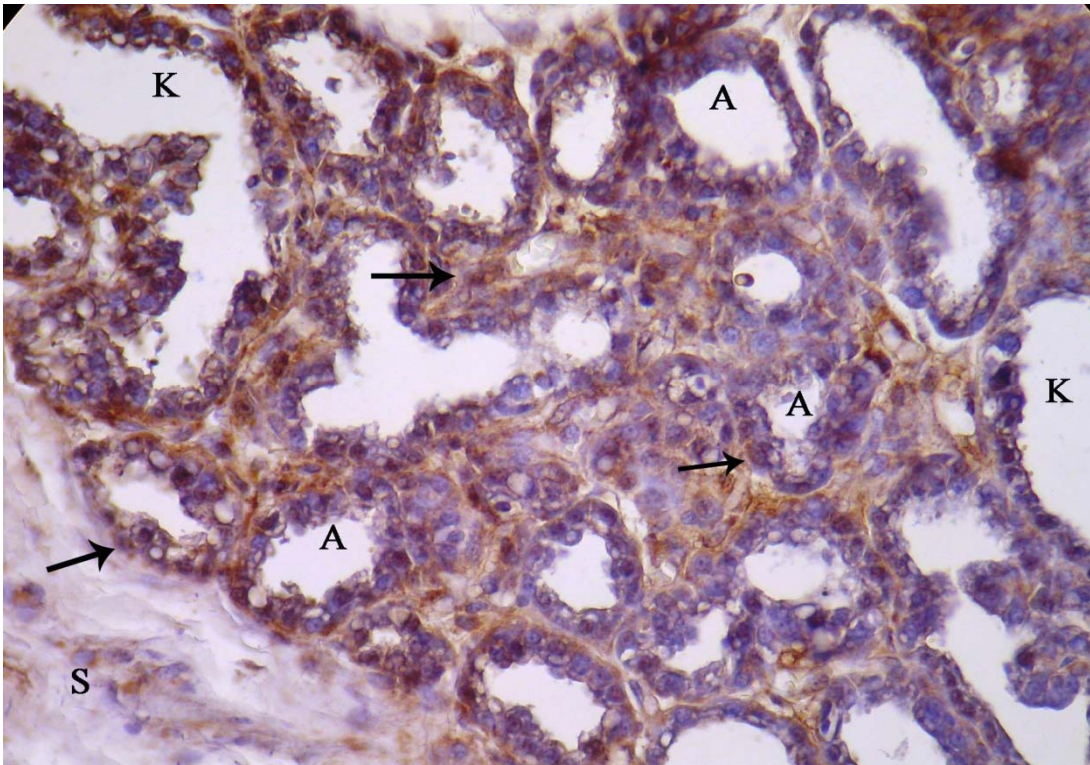


Şekil 4.28. Laktasyon döneminde sıçan memesinde erbB1 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endoteli ve miyoepitel hücreleri (ince ok), X40

Laktasyon dönemindeki erbB1 immunreaktivitesi gebelik dönemleri ile karşılaştırıldığında, laktasyon ile gebeliğin 7. ve 14. günleri arasındaki farklılıkların önemli ($p < 0,05$), laktasyon ile gebeliğin son dönemi arasındaki farklılığın ise önemsiz olduğu görüldü ($p > 0,05$) (Grafik 4.1).



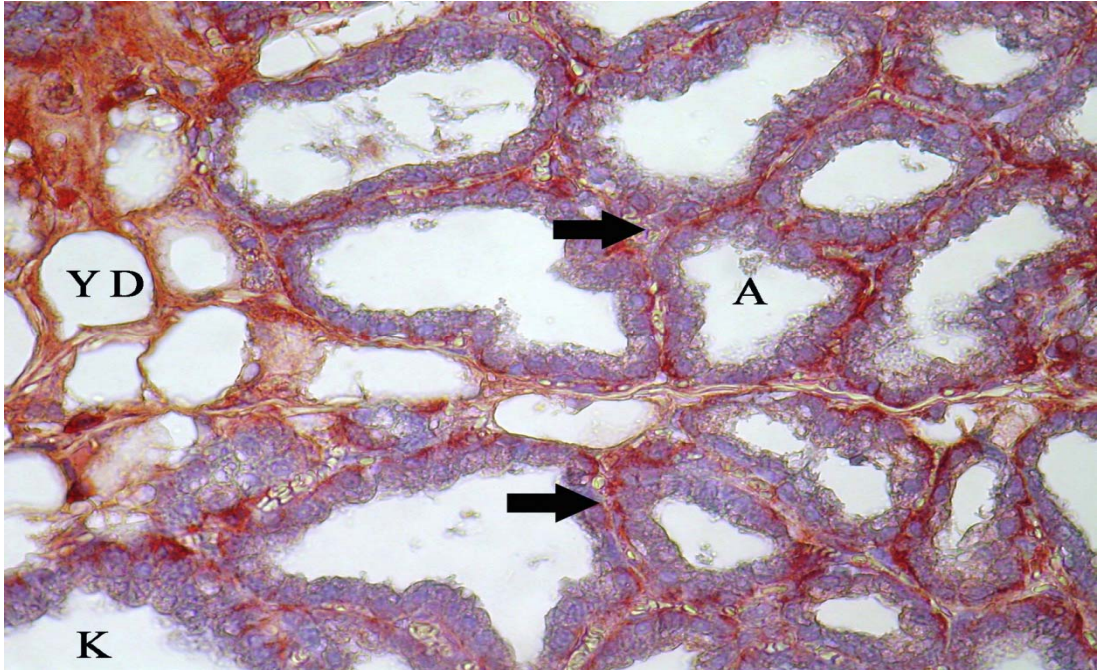
Şekil 4.29. Laktasyon döneminde sıçan memesinde erbB3 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, k: kan damarı, miyoepitel hücreleri (ok), X10



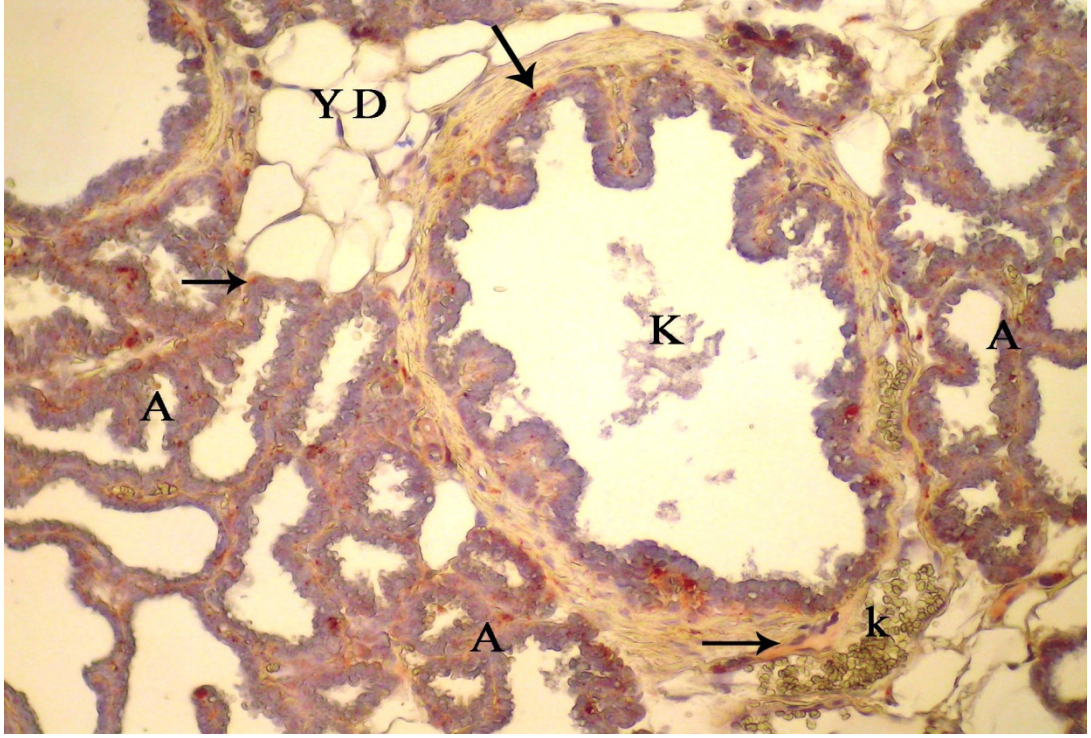
Şekil 4.30. Laktasyon döneminde sıçan memesinde erbB4 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, miyoepitel hücresi (ok), X40

Laktasyon dönemindeki erbB2 immunreaktivitesinin gebeliğin her üç döneminden anlamlı olarak farklı ($p<0,05$) olduğu belirlendi (Grafik 4.2). Laktasyon dönemi ile gebeliğin 7. günündeki erbB3 ve erbB4 pozitif epitel hücrelerinin toplam skorları arasındaki farklılık önemli ($p<0,05$), laktasyonla gebeliğin 14. ve 21. günleri arasındaki farklılıklar ise önemsiz ($p>0,05$) bulundu (Grafik 4.3, 4).

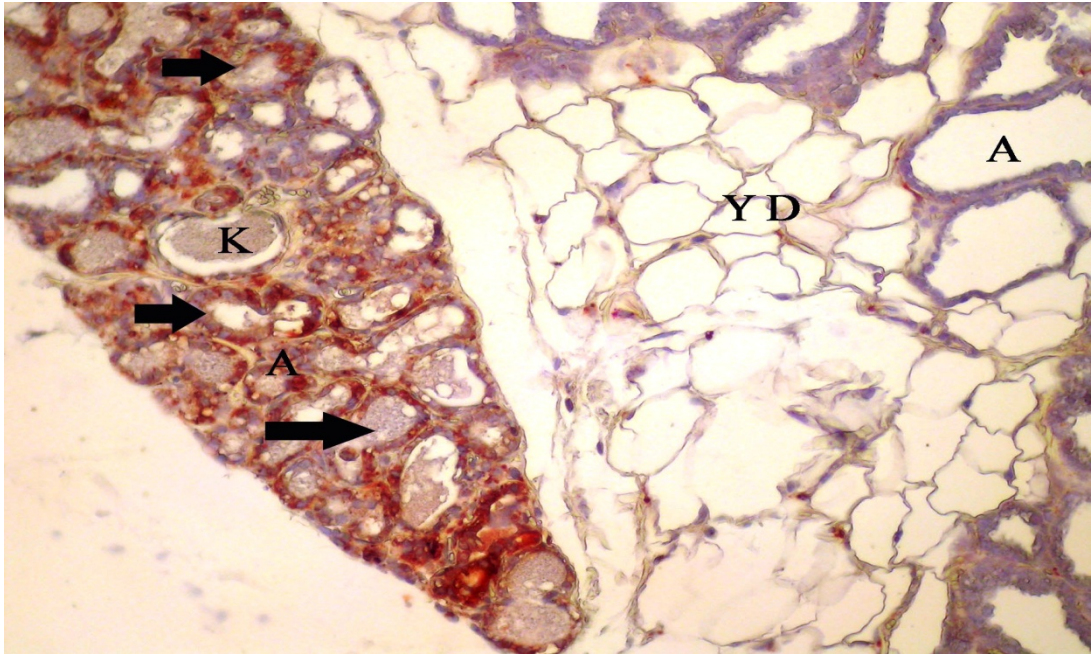
Laktasyon döneminde VEGF ve flt1 immunreaksiyonlarının alveol ve kanal epitel hücrelerinde değişik yoğunluklar olduğu saptandı (Şekil 4.31, 32). Özellikle lümenlerinde salgı bulunan bazı alveol epitel hücrelerinin sitoplazmalarında kuvvetli flt1 immunreaktivitesi dikkat çekti. Kanallarda ise sadece birkaç epitel hücresinde pozitif reaksiyon görüldü (Şekil 4.33). Ayrıca VEGF (Şekil 4.34) ve flt1 (Şekil 4.32) immunreaktivitesinin interalveoler, interlober ve meme yağ dokusu içinde yerleşen damarların endotelinde ve media katmanında da pozitif olduğu, özellikle ekstraselüler matrikste ve miyoepitel hücrelerinde laktasyona bağlı olarak reaksiyon yoğunluğunun arttığı gözlemlendi. Laktasyon dönemindeki VEGF pozitif immunreaksiyon gösteren epitel hücre skorunun, gebeliğin üç döneminden (Grafik 4.5), flt1 total skorunun ise sadece gebeliğin 7. günündeki total skordan farklı olduğu ($p<0,05$) (Grafik 4.6) belirlendi.



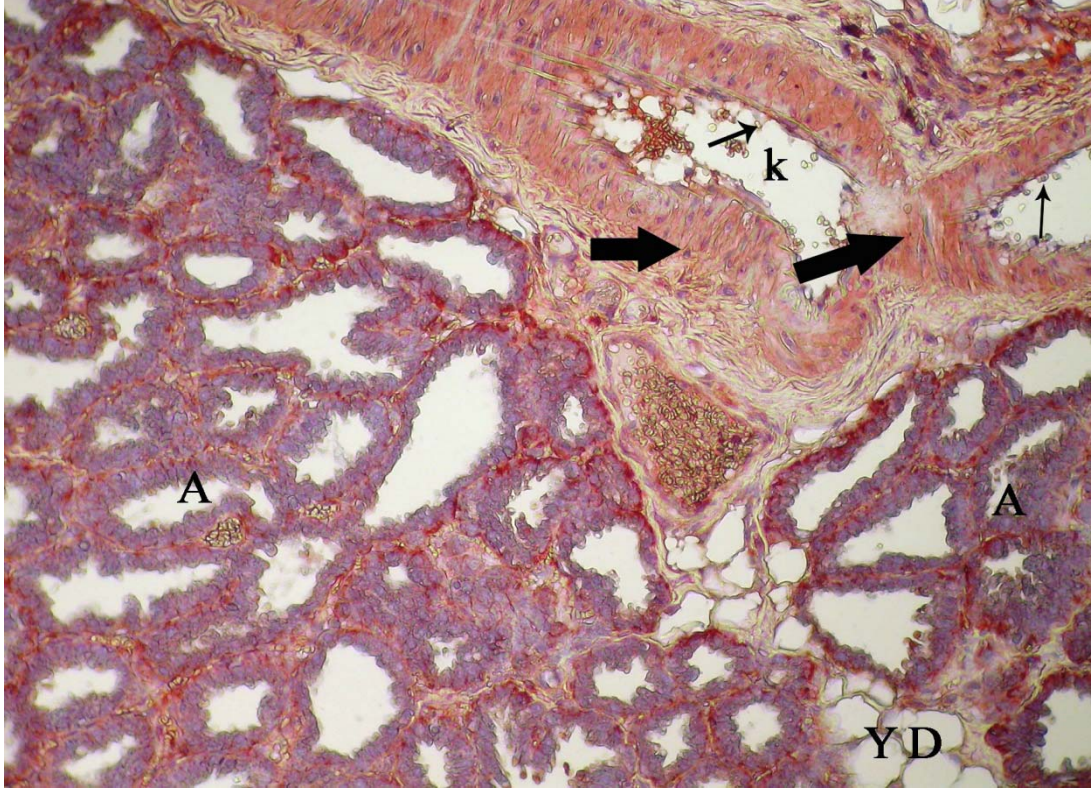
Şekil 4.31. Laktasyon döneminde sıçan memesinde VEGF lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, ekstraselüler matrikste immunreaktivite (ok), X40



Şekil 4.32. Laktasyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-1 (flt1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, k: kan damarı, miyoepitel ve bağdoku hücrelerinde immunreaksiyon (ok), X20

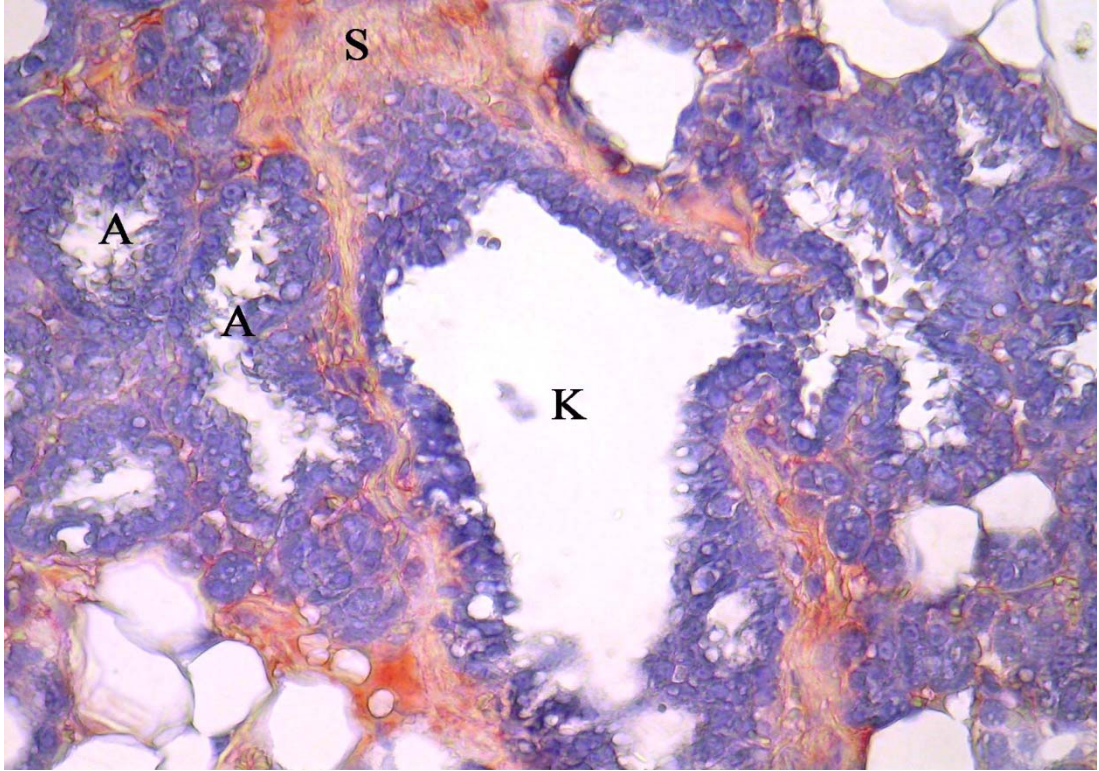


Şekil 4.33. Laktasyon döneminde sıçan memesinde içleri salgı ile dolu alveol ve kanallarda VEGFR-1 (flt1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, alveol ve kanal epitelinde immunreaksiyon (ok), X20



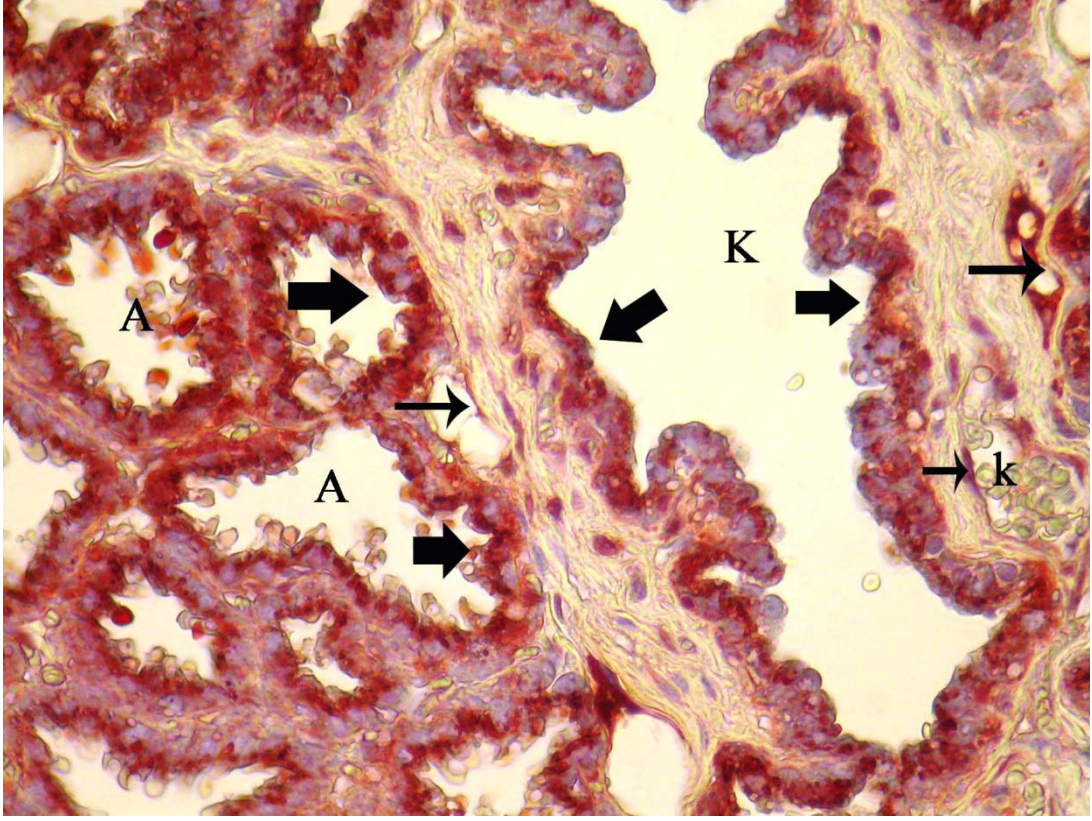
Şekil 4.34. Laktasyon döneminde sıçan memesinde damarlarda VEGF lokalizasyonu, A: alveol, YD: yağ doku, kan damarında media katmanındaki immunreaktivite (kalın ok), damar endotel hücresi (ince ok), X20

Laktasyon döneminde Flk1 reaksiyonu bağdoku ve meme yağ dokusuna yerleşmiş olan damarların endotel hücrelerinin sitoplazmalarında yerleşmiş olup, lop ve lopçuklar arasındaki bazı bağdoku hücreleri ile bazı alveol ve kanalların epitel hücrelerinde de zayıf bir immunreaksiyon vardı. Miyoepitel ve meme yağ dokusu hücrelerinde ise boyanma yoktu (Şekil 4.35). Gebelik ve laktasyon dönemlerine ilişkin total skorlar karşılaştırıldıklarında tüm gruplar arasındaki farklılıklar önemsiz bulundu ($p>0,05$) (Grafik 4.7).



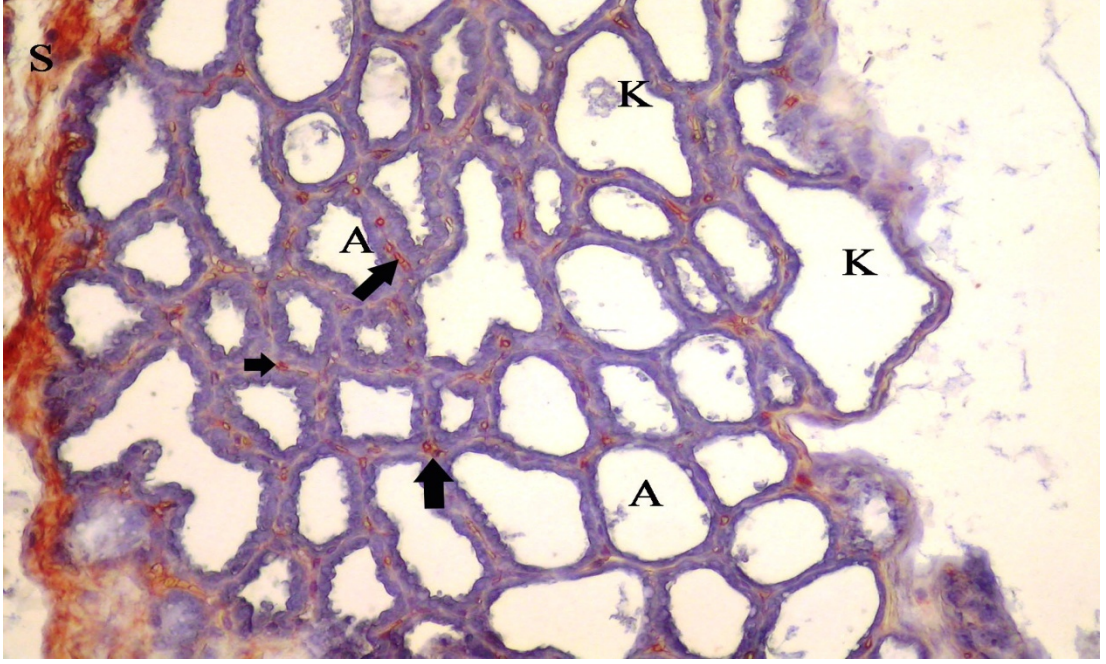
Şekil 4.35. Laktasyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-2 (flk1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, X40

Laktasyon döneminde flt4 immunreaktivitesi, alveol ve kanal epitel hücreleri, kan ve lenf damarlarının endotel hücreleri ile miyoepitel, yağ ve bağdokusu hücrelerinin sitoplazma ve membranında dikkati çekti. Özellikle alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaksiyon apikal sitoplazma ve membranda yoğunlaşmıştı (Şekil 4.36). Laktasyon dönemi ile gebeliğin üç dönemi kıyaslandığında aradaki farklılıkların önemli olduğu ($p<0,05$) belirlendi (Grafik 4.8).



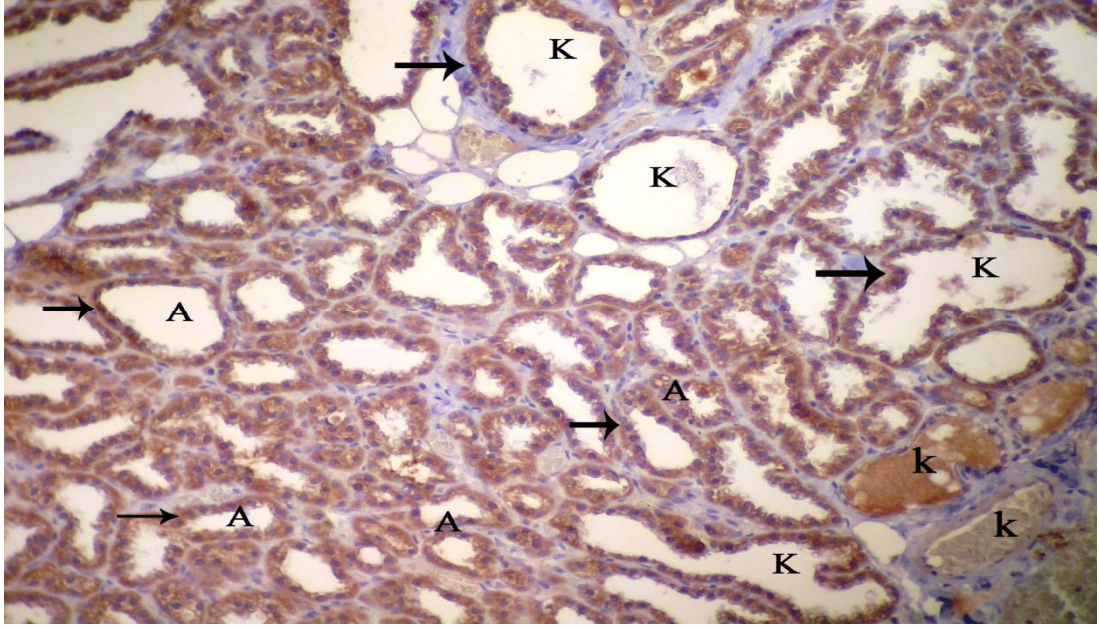
Şekil 4.36. Laktasyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-3 (flt4) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaktivite (kalın ok), endotel, bağdoku ve miyoepitel hücrelerinde immunreaktivite (ince ok), X40

Laktasyon döneminde VEGI immunreaktivitesi yalnızca kanal ve alveoller çevreleyen bağdokuda ve damarlarda görüldü. Alveol ve kanal epitel hücreleri, miyoepitel hücreleri ve meme yağ dokusu hücrelerinde boyanma mevcut değildi (Şekil 4.37) ve istatistiksel olarak da gebelik dönemlerine ilişkin skorlardan anlamlı olarak farklı bulundu ($p < 0,05$) (Grafik 4.9).



Şekil 4.37. Laktasyon döneminde sıçan memesinde VEGI lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, interalveolar bölgede immunreaktive kapillar damarlar (ok), X10

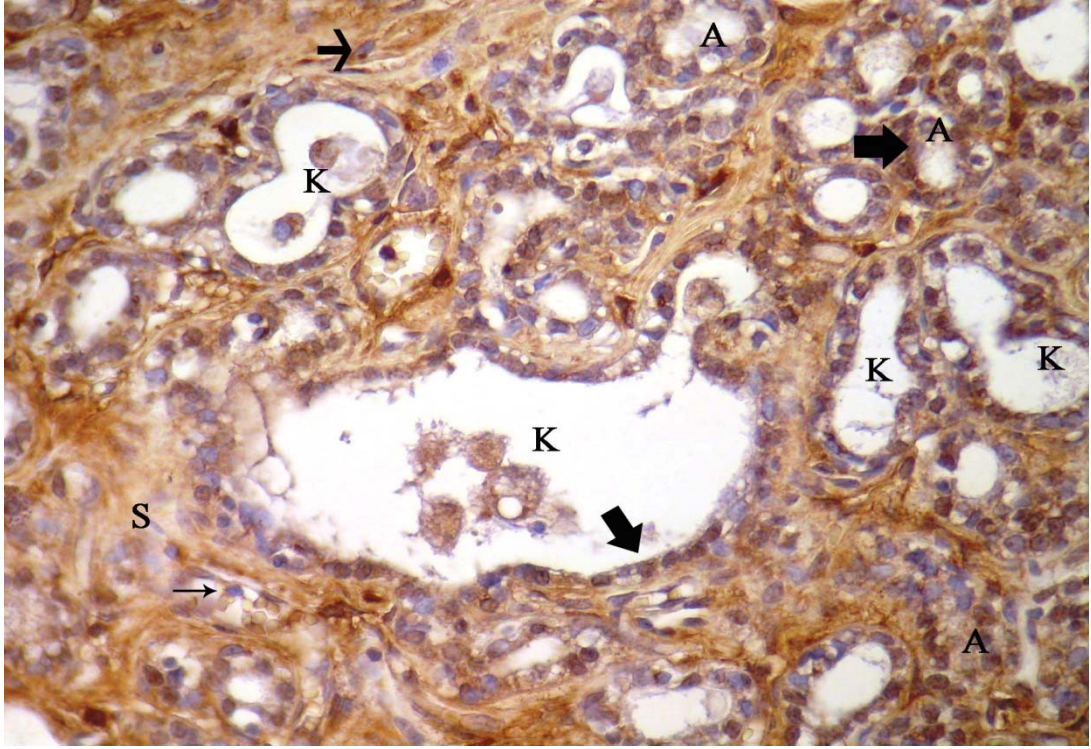
ER immunoreaktivitesi laktasyon döneminde kanal ve alveol epitellerinin hemen hemen tamamında oldukça kuvvetli idi. Miyoepitel ve bağdoku hücreleri ile damar endotel hücrelerinde boyanma yoktu (Şekil 4.38). Gebelik ve laktasyon dönemlerine ilişkin total skorlar karşılaştırıldıklarında tüm farklılıkların önemli olduğu ($p<0,05$) (Grafik 4.10) tespit edildi.



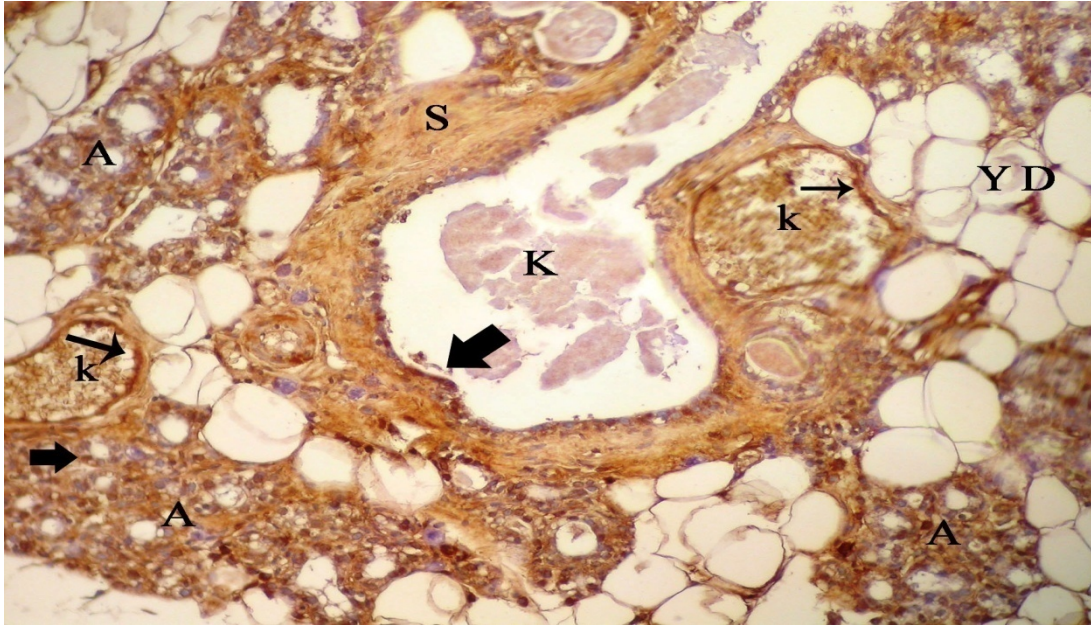
Şekil 4.38. Laktasyon döneminde sıçan memesinde ER lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, k: kan damarı, immunreaktive alveol ve kanal epitel hücreleri (ok), X10

İnvolyon döneminde meme:

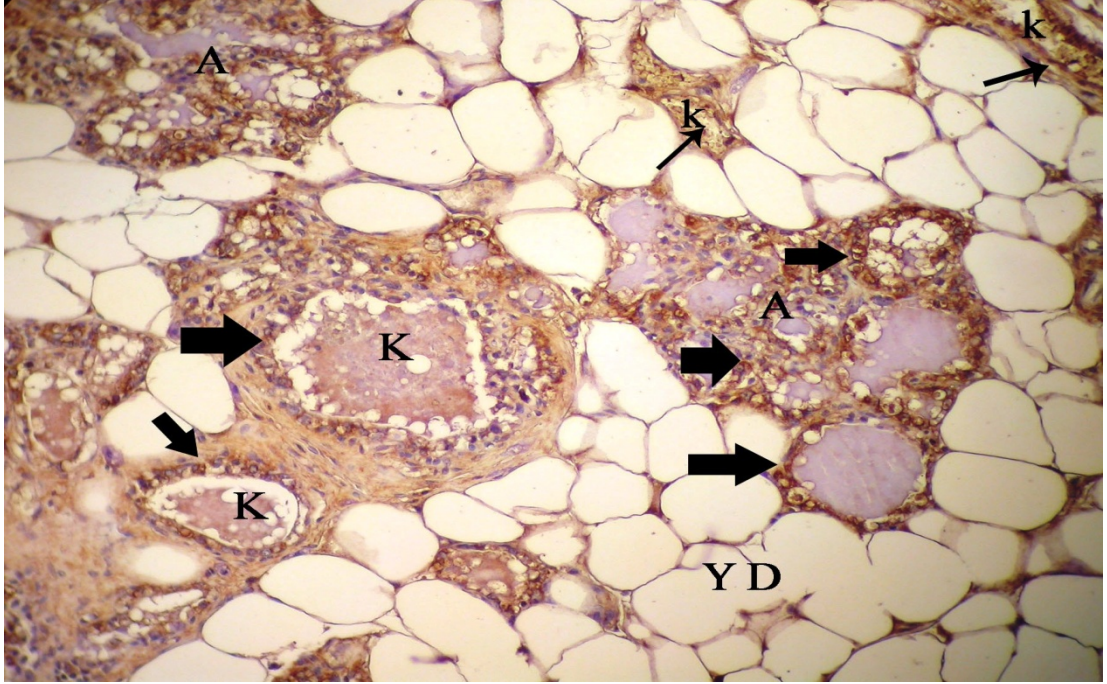
İnvolyon döneminde alveol ve kanal epitel hücrelerinde erbB1 ve erbB2 immunreaktivitesi zayıfken (Şekil 4.39, 40), erbB3 ve erbB4 ise daha yoğun olarak gözlemlendi (Şekil 4.41, 42). Bağdoku, mioepitel ile kan damarlarının endotel hücrelerinde ise erbB1, erbB2, erbB3 ve erbB4 için değişik yoğunluklarda immunreaksiyonlar saptandı (Şekil 4.39-42). İnvolyon döneminde, erbB1 pozitif reaksiyon gösteren alveol epitel hücreleri total skorları ile gebeliğin 7. ve 14. günlerine ait skorlar arasındaki farklılıkların önemsiz ($p>0,05$), ancak involüsyon ile gebeliğin 21. günü ve laktasyon dönemleri arasındaki farklılıkların ise önemli ($p<0,05$) olduğu saptandı. Kanal epitel hücrelerine ilişkin skorların tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamsız farklılık taşıdığı ($p>0,05$) görüldü (Grafik 4.1). İnvolyon döneminde alveol ve kanal epitel hücrelerinde erbB2 immunreaksiyonu gebeliğin 7. ve 21. günleri ve laktasyon dönemiyle karşılaştırıldığında farklılığın önemli ($p<0,05$), gebeliğin 14. Gününüyle karşılaştırıldığında ise farklılığın önemsiz ($p>0,05$) olduğu belirlendi (Grafik 4.2). İnvolyon dönemindeki erbB3 immunreaktivitesinin diğer dönemlerden farksız ($p>0,05$) (Grafik 4.3), erbB4 immunreaktivitesinin ise laktasyon dönemindekinden farklı ($p<0,05$), gebeliğin gebeliğin üç dönemindekinden ise farksız ($p>0,05$) olduğu tespit edildi (Grafik 4.4).



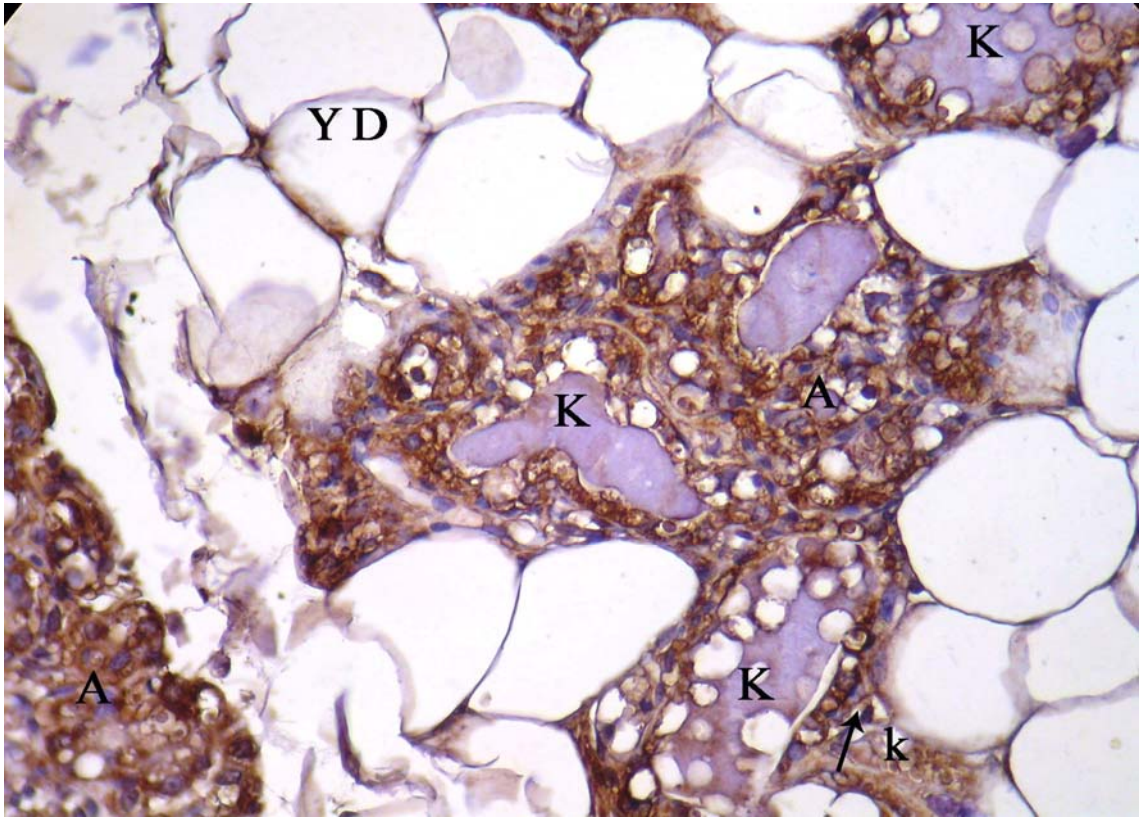
Şekil 4.39. İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde erbB1 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endoteli ve bağdoku hücresi (ince ok), X20



Şekil 4.40. İnvölüsyon döneminde sıçan meme bezinde erbB2 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, k: kan damarı, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endoteli hücresi (ince ok), X10

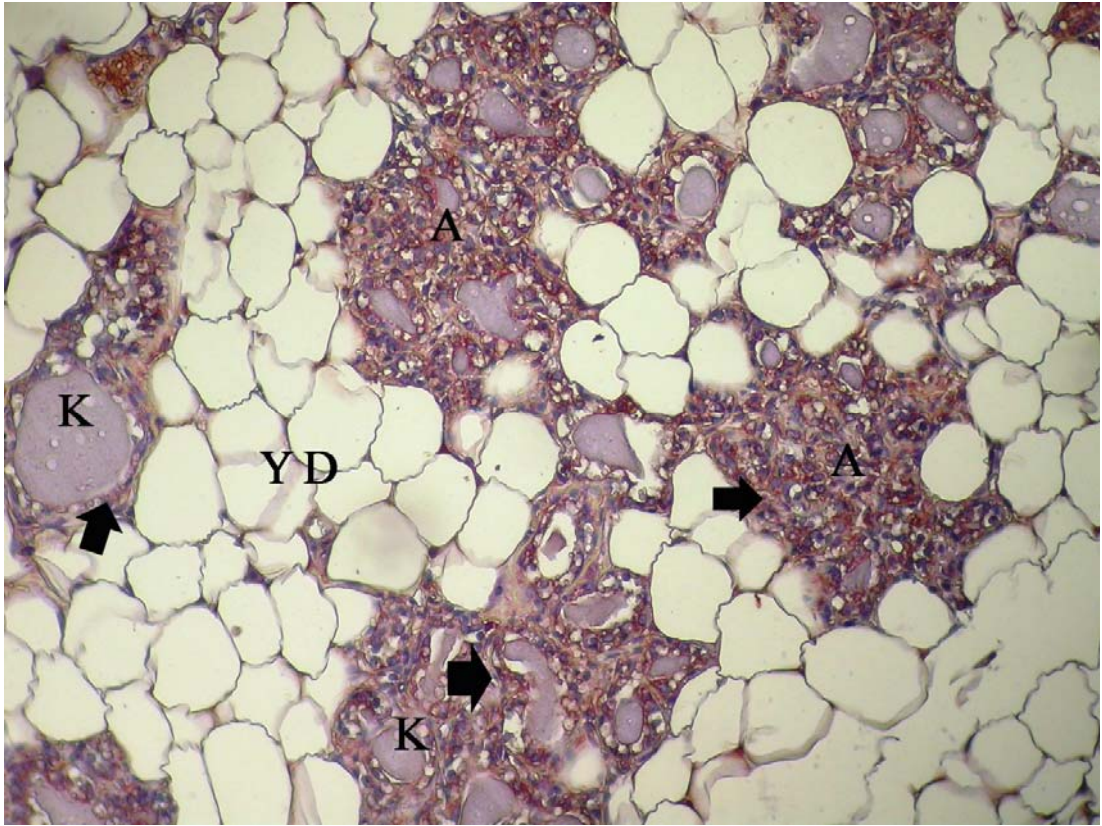


Şekil 4.41. İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde erbB3 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, k: kan damarı, alveol ve kanal epiteli (kalın ok), damar endotel hücresi (ince ok), X10

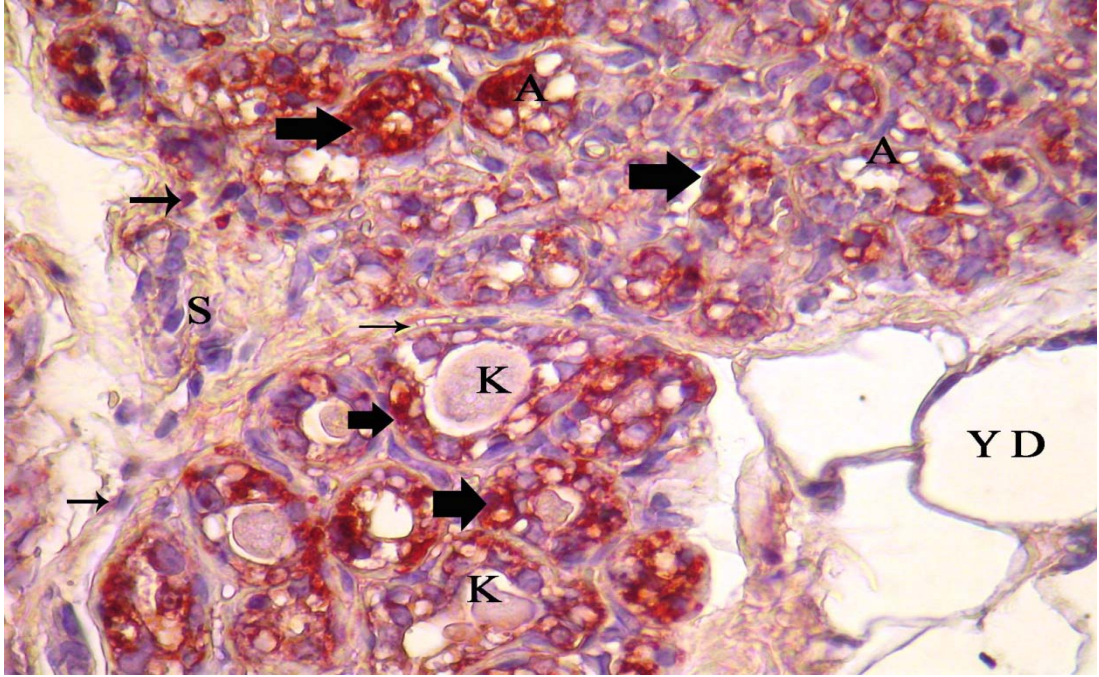


Şekil 4.42. İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde erbB4 lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, k: kan damarı, damar endotel hücresi (ok), X40

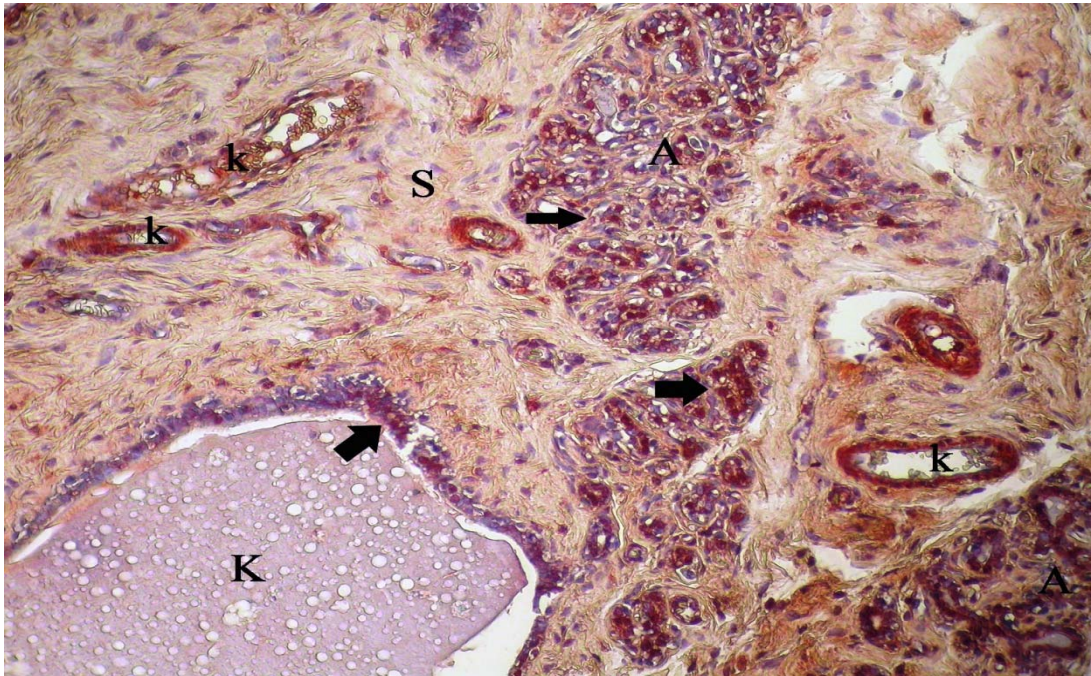
İnvolyon periyodunda VEGF, flt1 ve flt4 immunreaksiyonunun, içleri salgı materyali ile dolu olan alveol epitel hücrelerinde zayıftan kuvvetliye değişen yoğunluklarda olduğu, kanallarda ise bazı epitel hücrelerinin apikal sitoplazmalarında bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.43-45). Flk1'in ise kanal ve alveol epitel hücrelerinde zayıf bir immunreaksiyon gösterdiği belirlendi (Şekil 4.46). Ayrıca kan damarlarında endotel hücreleri, bağdoku ve miyoepitel hücrelerinde VEGF, flt1, flk1 ve flt4'ün immunpozitif reaksiyon saptandı (Şekil 4.43-46). VEGF ve flt4 immunreaktiviteyi açısından dönemler istatistiksel olarak karşılaştırıldıklarında involüsyon dönemi ile gebeliğin 7. günü arasındaki farklılığın önemsiz ($p>0,05$), involüsyon ile diğer dönemler ile arasındaki farklılıkların ise önemli olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Grafik 4.5, 8). Buna karşılık, involüsyon dönemindeki flt1 pozitif immunreaksiyonu, gebelik ve laktasyon dönemleriyle kıyaslandığında aradaki farklılıkların anlamlı ($p<0,05$) olduğu (Grafik 4.6), flk1 için ise bütün dönemlerle aradaki farklılıkların ise anlamsız ($p>0,05$) olduğu belirlendi (Grafik 4.7).



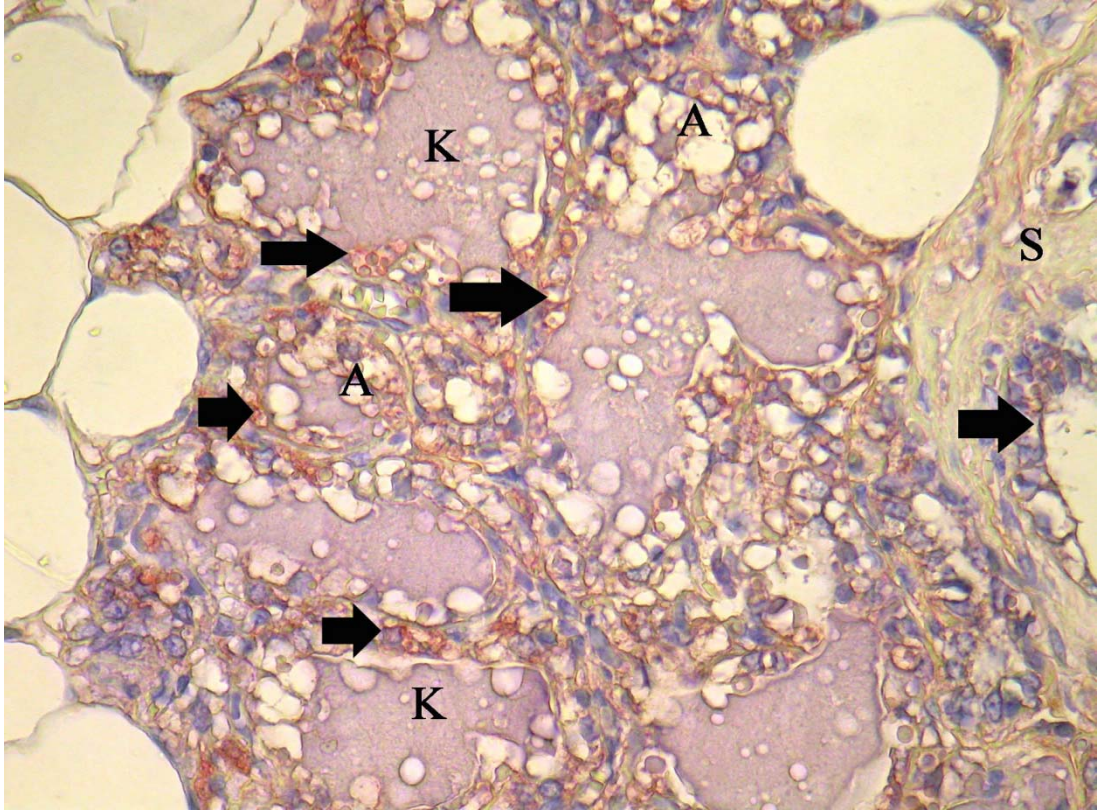
Şekil 4.43. İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde VEGF lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, alveol ve kanal epitelinde immunreaksiyon (ok), X20



Şekil 4.44. İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-1 (flt1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, S: bağdoku, alveol ve kanal epitelinde immunreaksiyon (kalın ok), damar endotel ve bağdoku hücrelerinde immunreaksiyon (ince ok), X40

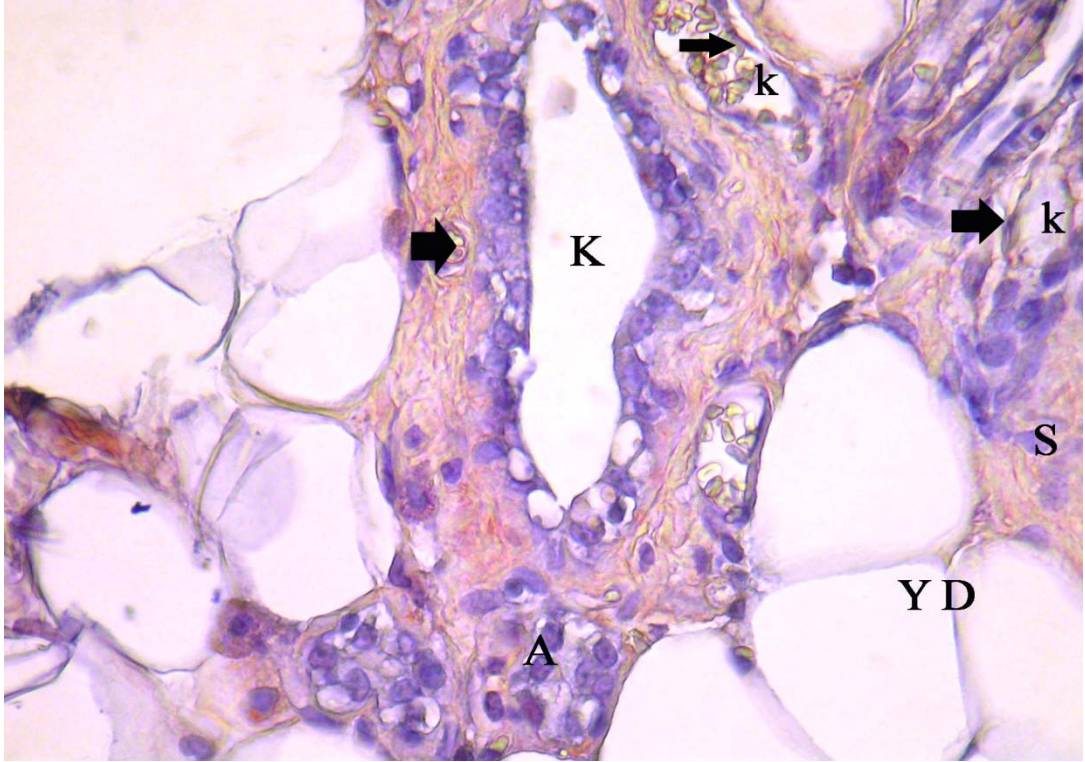


Şekil 4.45. İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-3 (flt4) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, k: kan damarı, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaksiyon (ok), 10



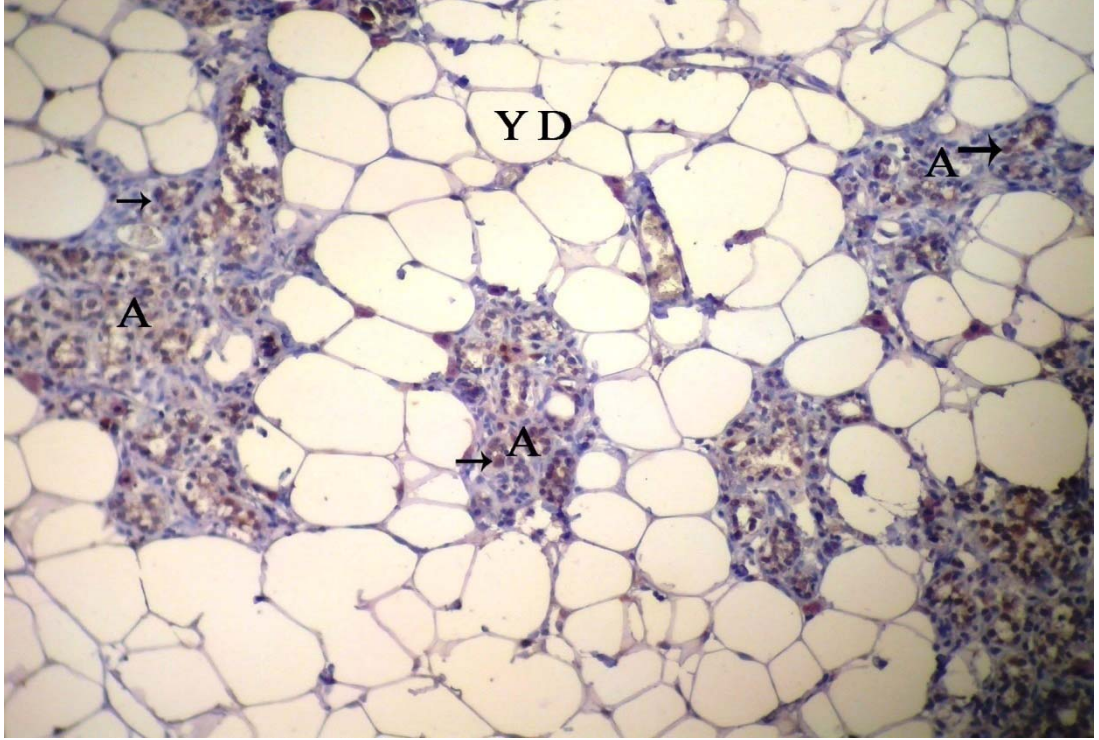
Şekil 4.46. İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde VEGFR-2 (flk1) lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdokusu, alveol ve kanal epitel hücrelerinde immunreaksiyon (ok), X40

İnvölüsyon döneminde VEGI immunreaksiyonu alveol ve kanal epitelleri ile damar endotel hücrelerinde görüldü. Özellikle bağdokuda bazı hücrelerin yoğun pozitif reaksiyonu dikkat çekti. Miyoepitel ve meme yağ dokusu hücrelerinde ise immunreaksiyon yoktu (Şekil 4.47). İnvölüsyon dönemindeki VEGI immunreaksiyonunun gebeliğin 7. Günündekinden farklı ($p < 0,05$), diğer dönemlerdekenden ise farksız ($p > 0,05$) (Grafik 4.9) olduğu tespit edildi.



Şekil 4.47. İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde VEGF lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, S: bağdoku, YD: yağ doku, immunreaksiyon gösteren damar endotel hücreleri (ok), X40

İnvölüsyon döneminde de ER immunreaksiyonu nadiren alveol ve kanal epitel hücrelerinde bulundu (Şekil 4.48). ER immunreaktivitesi dönemler itibariyle karşılaştırıldığında, involüsyon dönemi ile gebeliğin 7. ve 14. günleri arasındaki farklılıklar önemsizken ($p>0,05$), bu dönemle gebeliğin 21. günü ve laktasyon dönemi arasındaki farklılıklar önemli olarak belirlendi ($p<0,05$) (Grafik 4.10).



Şekil 4.48. İnvölüsyon döneminde sıçan memesinde ER lokalizasyonu, A: alveol, K: kanal, YD: yağ doku, immunreaksiyon gösteren alveol ve kanal epitel hücreleri (ok), X10

3.5- TARTIŞMA

Deri bezlerinin farklılaşması ile oluşan meme (süt bezleri), bağdokudan bir kapsül içinde deri ve karın duvarı arasında yerleşen, dallanmış kanallar ve tubulo-alveolar sistemden ibaret memeli dişilerin sekretör organıdır (4, 22).

Bütün memelilerde, meme gelişiminin önemli bir bölümü, gebelik sırasında gerçekleşir. Türler bağli olarak toplam meme gelişiminin %48-94' ü gebelik sırasında meydana gelir. Kemiricilerde gebelik süresince toplam meme parenşim dokusunun yaklaşık %65'i gelişir. İnek ve keçilerde allometrik meme gelişimi gebelik süresince devam eder ve memenin parenşim dokusundaki büyüme gebelik süresince katlanarak artar. İneklerde gebeliğin 3-4. ayından sonra meme kanalları daha da uzar ve alveoller oluşarak supramammar yağ kitlesi içerisinde adipoz dokunun yerini almaya başlar. Meme kanalları uzayıp büyüme pik noktaya ulaşırken, parenşimal dokular da bağdokunun yerini alır. Bu da ineklerde gebeliğin 6. ayının sonuna kadar lobuloalveolar sistemin kapsamlı gelişimine yol açar. İneklerde, gebeliğin ilk yarısında meme büyümesinin çoğunluğu kanal ve lobular yapıda olur. Gebeliğin ikinci yarısında kanal büyümesi devam eder ancak büyüme çoğunlukla lobulüalveolardır (1-3). Domuzlarda ise gebeliğin 45. gününde lobuloalveolar gelişim başlar. Kanda östrojen konsantrasyonunun artışı hem lobuler hem de alveoler büyüme aynı zamanda başlatır (3). Sunulan çalışmada sıçanlarda, inek (2, 4), koyun (2, 5), keçi (2), domuz (3) ve faredekine (6) benzer şekilde gebeliğin ilk döneminde meme yağ dokusunun bezin büyük bir bölümünü oluşturduğu ve meme alveolleri ile kanallarının bağdoku ile birlikte bu yağ dokusu içerisine yerleştiği, gebeliğin ikinci ve üçüncü dönemlerinde ise yağ dokusunun gerilediği, lop ve lopçuk yapılarının belirginleştiği, alveol ve kanal sayılarının arttığı görülmüştür. Ayrıca diğer memeli türlerindeki (2, 23-26) benzer olarak sıçanlarda gebeliğin ikinci ve üçüncü dönemlerinde duktus laktiferusların dallandığı, özellikle gebeliğin son döneminde alveollerin lümeninin salgı ile dolduğu ve her iki dönemde de lop ve lopçuklar arasındaki bağdokuda çok sayıda kan ve lenf damarının bulunduğu gözlenmiştir.

Süt sekresyonunun başlaması olarak ifade edilen laktasyon, doğum sonucu şekillenen hormonal değişimler ile başlar. Koyunlarda laktasyon döneminde memelerin %2 si gelişirken, ineklerde bu oran daha düşüktür (27, 116). Sıçan ve

farelerde ise gelişimin bu dönemde de devam ettiği bildirilmiştir (27). Bu dönemde lop ve lopçuk yapısı çok belirgindir ve gebeliğe göre bağdoku daha da gerilemiştir. Alveollerin duvarını örten epitel hücreleri, salgılanma durumlarına göre farklı görünüştedir. Tüm türlerde fonksiyon ritmine bağlı olarak tüm alveollerde ekstrüzyon değişik zamanlarda gerçekleşir. Buna göre de alveollerde salgıyla dolu yüksek prizmatik hücreler yanında, salgısını vererek yassılaştırmış hücrelere de rastlanır. Bağdoku ile çevrelenmiş olan kanallar ise tek katlı prizmatik hücreler ile örtülüdür. Bazı alveollerin lümeninde kolloidal kitle halinde ya da konsantrik yapıda kazein konkromentlerine (kazein cisimcikleri veya korpus amilaseyum) rastlanır (3, 24, 27, 116, 117). Sunulan çalışmada da, laktasyon döneminde sıçan memesinde benzer morfolojik bulgulara rastlanmıştır.

Laktasyonun sonlanmasıyla alveol epitellerinin salgılama aktivitesi durur ve involüsyon süreci başlar. İnvölüsyonun başlangıcında memede süt sekresyonunun durması ile memede hızlı değişimler meydana gelir (32-35). İnek ve keçi memesinde ise involüsyonla ilişkili değişimler süt salınımının kesilmesinden sonraki 48 saat içinde başlar (36, 41). En belirgin değişim yağ damlacıkları ile salgı veziküllerinin intraselüler birikimi sonucunda epitel hücrelerinde büyük vakuollerin oluşmasıdır (36). İneklerde bu vakuoller involüsyonun 14. gününe kadar kalıcıdır ve bazen 28. güne kadar da görülmeye devam eder (41). İnvölüsyon süresince alveollerin lümeni daralır ve interalveoler bağdokuda artış meydana gelir. Memenin hacmindeki büyük azalma involüsyonun 3. ve 7. günleri arasında meydana gelir. 28. günden sonra kollabe olan alveolar yapıların kalıntısı laktasyondakinden daha küçüktür ve dar bir lümenine sahiptir (48).

Kemiricilerin memesinde otofagositik yapıların oluşması involüsyon için karakteristiktir (42-44). Farelerde meme involüsyonu doku fonksiyonlarının hızlı kaybı, alveolar yapının dejenerasyonu ve epitel hücrelerinin yoğun yıkımı ile karakterizedir. Sıçanlarda histolojik olarak, involüsyonun 2. gününde sekretör epitel daha baskındır. Büyük kanallar, apoptotik hücre parçaları, lipidler ve bazofilik substanslarla doludur. İnvölüsyonun 4. gününde alveoler lopların hacmi azaldığı için yerini yağ hücreleri doldurmaya başlar. Lop ve lopçuklar içindeki alveoller, interalveoler bağdoku arttığı için birbirinden uzaklaşır. Bazı alveollerin lümeni de luminal sıvılar, lipid, protein ve hücre parçalarından oluşan bir sıvı ile dolar.

İnvölüsyonun özellikle 4. gününde kan ve lenf yoluyla lökosit infrasyonu gerçekleşir. İnvölüsyonun 7. gününde alveollerin hacmi azalarak çevrelerindeki bağdoku artmaya başlar. 7. günde gerilemeye başlamış alveollerin epiteli, miyoepitel hücrelerinin oluşturmuş olduğu kalın bir band ile sarılır. Bu da alveol lumeni ile bazal membran arasında fizyolojik bir bariyer oluşturur. Sonuçta involüsyon 13-14 ya da 21 günde tamamlanmış olur (3, 27). Yapılan çalışmada, involüsyon döneminin sadece 7. günü incelenmiş olup, elde edilen bulgular Masso-Welch ve ark. (27) bulguları ile örtüşmektedir.

Alveoller, meydana getirdikleri sütün salınmasına yardımcı olan miyoepitel hücreleri tarafından sarılmıştır. Bu hücrelerin kanalların etrafında da yerleştiği; kedi, köpek, domuz, koyun, inek, keçi, tavşan ve insanda da bulunduğu bildirilmiştir (116). Sıçanlarda da, miyoepitel hücrelerinin bütün dönemlerde gerek alveol gerekse kanalların duvarında belirgin olduğu dikkati çekti.

Memenin gelişimi üzerinde steroid hormonlar ile meme dokusundan salgılanan lokal büyüme faktörlerinin sinerjik etki gösterdikleri bilinmektedir. Büyüme faktörlerinin birçoğu, memede otokrin ve parakrin mediyatörler olarak mezenşimal-epitelial etkileşimde rol oynarlar. Memenin büyüme ve gelişmesi lokal olarak stromal-epitelial etkileşim yolu ile düzenlenir (7, 15). Bu yol, gelişen meme epiteli ve meme yağ dokusu arasındaki etkileşimi içerir. Meme epitel hücreleri yağ doku içinde büyür ve organize olur. Buradaki yağ dokusu epitel hücrelerinin gelişiminde etkili olan spesifik yağ asitlerini içerir (35). Kanalların bulunduğu bölgede meme stromal hücreleri erimiş kollagen içindedir. Bu şekilde de büyüyen kanallar mezenşimal büyüme ve damarlaşmayı uyararak bir yayılım gösterir (2, 3).

Bugüne kadar insanda ve bazı memeli hayvanlarda memede oluşan normal veya patolojik değişikliklerde meme epiteli ve stroması tarafından salgılanan büyüme faktörlerinin olası rolleri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Özellikle farelerde memede alveol ve kanalların gelişiminde EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) ve reseptörünün (EGFR ya da erbB-1) etkinliği ile ilgili birçok çalışmanın yapıldığı görülmüştür. İnsanlarda ise daha çok EGF, VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) ve bunların reseptörlerinin meme tümörleri ile ilişkileri araştırılmıştır (7-14).

ErbB ailesindeki reseptörlerin (EGFR/erbB1, erbB2, erbB3 ve erbB4) aktivasyonu hücre proliferasyonu, farklılaşma, hücre göçü ve farklı dokuların yaşamsal fonksiyonlarının düzenlenmesinde, yani homeostasisin sağlanmasında, ayrıca meme, sinir sistemi ile sindirim sistemi dokularında oluşan yaralanma durumlarında çeşitli cevapların şekillenmesinde rol oynar (54).

EGFR (erbB1), tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran glikoproteinleridir ve en çok epitel hücrelerinde bulunur. Ayrıca endotel, fibroblast ve düz kas hücrelerinde de reseptörler görülür (49). Özellikle kemiricilerde meme, EGF reseptör sistemi için önemli olduğuna inanılan birkaç epiteliyal dokudan biridir. EGF reseptör ligandları memede büyüme, farklılaşma ve yaşamsal faktörleri uyarmaktadır (12). Miktarı, canlının fizyolojik durumuna göre değişiklik gösterir; prepubertal hayvanlarda oldukça yüksek, erişkin dişilerde ise düşüktür. Özellikle gebeliğin başlangıcında ve ortasında arttığı, gebeliğin sonunda ve laktasyonda ise azaldığı bilinmektedir (118). Fare memesinde EGF reseptörlerinin alveoller çevresindeki stromal hücreler, yağ hücreleri, mioepitel hücreleri ile luminal epitel hücrelerinden eksprese olmaktadır. EGF'nin, çiftleşmemiş ya da gebe farelerde meme epitel hücrelerinin büyümesini uyardığı için, meme kanallarının büyümesi ve dallanmasını EGF reseptörlerine bağlanma yoluyla gerçekleştirdiği belirtilmektedir (10). Farelerde özellikle gebeliğin başlangıcında bu reseptörlerin düşük düzeylerde bulunduğu bildirilmektedir (8). İleri gebe farelerin (18 günlük) memesinde erbB ailesinin dört üyesi de belirlenmiştir. ErbB1'in hem alveol hem de kanal epitelinde yerleştiği (69), ayrıca gebelikte alveol ve kanal epitel hücrelerinin apikal membranlarında boyanmalar olduğu rapor edilmektedir (119). İneklerde ise EGFR'nin meme bezinde varlığı bildirilmesine karşılık, dağılımı hakkında herhangi bir veri bulunmamaktadır (118).

Bu çalışma, sıçanların memesinde gebelik, laktasyon ve involüsyon dönemlerinde alveol ve kanal epitel hücrelerinde EGFR'lerinin kantitatif olarak değerlendiren ilk araştırmadır. Çalışmamızda gebeliğin 7., 14., ve 21. günleri değerlendirilmiş olup, 7. gün ilk dönem, 14. gün ikinci dönem ve 21. gün ise son dönem olarak tanımlanmıştır. Diğer çalışmalarda belirtildiği gibi (8, 10, 69, 118, 119) gebe sıçanlarda alveol ve kanal epitelinde EGFR'nin değişik yoğunluklarda bulunduğu belirlenmiştir. Fenton ve ark. (8)'nin bildirdiğinin aksine, Edery ve ark.

(120)'nın bildirdiğine paralel olarak gebeliğin başlangıcında ve ortasında kanal ve alveol epitel hücrelerinde yoğun, gebeliğin sonunda ise zayıf bir boyanma belirlenmiştir. İlk iki dönem boyanma yoğunlukları önemsiz ($p>0,05$), gebeliğin son dönemiyle önceki iki dönemi arasındaki farklılığın ise önemli ($p<0,05$) olması, gebeliğin ilk iki döneminde memede alveol ve kanallarının gelişmesinde EGFR'nin etkili olduğunun, gebeliğin son döneminde ise bu etkinin azaldığının göstergesi olarak nitelendirilmiştir.

İnek ve farelerde (10, 118) gebelik süresince EGFR için, miyoepitel ve yağ hücrelerinin pozitif boyandığı bildirilmiştir ancak boyanma yoğunlukları hakkında bilgi verilmemiştir. Sunulan çalışmada da, meme alveolleri ve kanallarını çevreleyen miyoepitel, yağ ve bağdoku hücreleri ile damar endotel hücrelerindeki boyanmaların gebeliğin 7., 14. ve 21. günlerinde alveol ve kanal epitel hücrelerindeki boyanmalarla paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Schroeder ve ark. (69) laktasyon döneminde EGFR'nin fare memesinde hem alveol hem de kanal epitelinde bulunduğu, Sheffield (118) de bu dönemde EGFR'nin azaldığını bildirmektedir. Ayrıca laktasyonun 2. gününde alveol epitelinde, yağ hücreleri ve kanal çevresindeki bağdokuda EGFR'nin lokalize olduğu belirtilmektedir (12). Bu çalışmada, farelerde (12, 69) olduğu gibi laktasyondaki sıçanlarda da alveoller ve kanallarda az sayıdaki epitel hücresinde boyanma görülmüştür. Bu dönemde ayrıca miyoepitel hücrelerinde zayıf, bağdoku ve kan damarlarının endotel hücrelerinde ise güçlü bir boyanma saptanmıştır. Laktasyon dönemi ile gebeliğin ilk iki döneminde boyanma yoğunlukları arasındaki farklılığın önemli ($p<0,05$), laktasyon ve gebeliğin son dönemi arasındaki farklılığın ise önemsiz ($p>0,05$) olduğu saptanmıştır. Bu bulgu EGF'nin meme hücre proliferasyonunu uyardığı ancak süt proteinlerinden kazein ve α -laktoalbumin üretimini baskıladığı bilgisini (9, 13) desteklemiştir.

Farelerde involüsyon süresince ErbB reseptörlerinin arttığı, özellikle erbB1 ve erbB2 ekspresyonunun involüsyonun 8. gününde yüksek düzeyde kaldığı, buna karşın ErbB3 ve erbB4'ün düştüğü bildirilmektedir (14). Bu reseptöre bağlanan ligandların sınırlı ekspresyonu, involüsyon süresince reseptörün aktivasyonu ve büyüme faktörlerinin involüsyon üzerinde etkilerinin olmaması, programlanmış involüsyonun şekillenmesine katkıda bulunmaz (121). Sunulan çalışmada involüsyon

dönemindeki sıçanlarda, involü olmaya başlamış alveol ve kanallardaki epitel hücrelerinin orta, bağdoku, miyoepitel ile kan damarlarının endotel hücrelerinin de değişik yoğunluklarda boyandığı belirlenmiştir. Alveol epitel hücreleri ile gebeliğin ilk iki döneminde boyanma yoğunlukları arasındaki farklılığın önemsiz ($p>0,05$), gebeliğin 21. günü ile laktasyon dönemi arasındaki farklılığın ise önemli ($p<0,05$) olduğu saptanmıştır. Buna karşılık kanal epitel hücrelerinde ise tüm gruplar arasındaki farklılığın önemsiz ($p>0,05$) olduğu görülmüştür. Bu bulgu, involüsyon süresince büyüme faktörlerinin etkili olmadıkları görüşünü (121) destekler niteliktedir.

ErbB2'nin aktive olabilmesi için erbB ailesindeki üyelerle heterodimer oluşturması gereklidir. Uygun erbB2 uyarımları hem lobuloalveoler gelişimin son aşamasında hem de laktasyonda gereklidir ve meme epitel hücre proliferasyonunu uyarır (64). ErbB2'nin gelişmekte olan kemiricilerin memesinden ekspresse olduğu, sıçan memesinde gebeliğin son döneminde ve laktasyonda diğer erbB reseptörleri ile kompleksler oluşturduğu, bu komplekslerin de memenin gelişim ve farklılaşmasına katkıda bulunduğu ifade edilmektedir. Sıçanlarda, gebeliğin son döneminde ve laktasyonda erbB2 immunreaktivitesinin zayıf olduğu ve ErbB2'nin daha çok alveol ve kanal epitel hücrelerinin apikal, lateral ve bazal yüzeylerinde lokalize olduğu bildirilmektedir (67). ErbB2'nin çiftleşmemiş farelerin memesinde stromal ve epitelial hücrelerden, gebelik ve laktasyondaki farelerde ise lobuloalveolar epitelde (65), laktasyonun 2 günündeki farelerde ise hem alveol hem de kanal epitelinde ekspresse olduğu belirtilmektedir (14).

Sunulan çalışmada, sıçanlarda gebeliğin ilk döneminde görülen yoğun immunreaksiyonun gebelik ilerledikçe kademeli olarak azaldığı, laktasyon döneminde ise birkaç epitel hücrelerinin apikal membranı, sitoplazması ve çekirdeği ile sınırlı kaldığı dikkat çekmiştir. İnvolüsyon dönemindeki boyanma yoğunluğunun ise gebeliğin 14 günü ile benzer olduğu görülmüştür. Farelerde olduğu gibi (14, 65) sıçanlarda erbB2'nin gebelik, laktasyon ve ayrıca involüsyonda lobuloalveolar epitelde görüldüğü, çiftleşmemiş farelerdekine (65) benzer şekilde bütün dönemlerde memede stroma, yağ ve miyoepitel hücrelerinden ekspresse olduğu belirlenmiştir. Price-Schiavi ve ark. (67)'nin sıçanlarda bildirdiğine benzer şekilde, gebeliğin son döneminde ve laktasyonda zayıf bir boyanma görülmüş, ancak onların bildirdiğinin

(67) aksine, boyanma birkaç epitel hücresinde apikal membranda ve sitoplazmada sınırlı olduğu saptanmıştır. ErbB2 immunreaksiyonu dönemler arasında karşılaştırıldığında gebeliğin ilk dönemi ile gebeliğin ikinci ve üçüncü dönemleri arasındaki farklılığın önemli ($p<0,05$), gebeliğin son iki dönemi arasındaki farklılıkların önemsizdi ($p>0,05$), laktasyon dönemi ile bütün dönemler arasındaki farklılıkların ise önemli oldukları tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca involüsyon dönemiyle, gebeliğin ilk ve son dönemleri ve laktasyon dönemi arasındaki farklılık önemli ($p<0,05$), buna karşılık involüsyonun, gebeliğin ikinci dönemi ile arasındaki farklılık ise önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur. Dönemler arasındaki boyanma yoğunlukları ve istatistiksel parametreler açısından erbB1'den elde edilen bulgularla erbB2'nin kısmen benzerlikler göstermesi, erbB1 ve erbB2'nin kompleks fizyolojik formasyonlar oluşturabileceğini ve bu büyüme faktörü reseptörlerinin sıçanlarda memenin fizyolojik gelişiminin düzenlenmesinde etkili olabileceğini ortaya koymuştur.

ErbB3 pubertiye yeni ulaşmış çiftleşmemiş farelerin memesinde çok düşük düzeylerde eksprese olurken, gebelik ve laktasyon süresince yüksek oranlarda salgılandığı bilinmektedir. Bu farklı ekspresyon durumları gelişen memede erbB3'ün memenin gelişim ve farklılaşmasının sonraki aşamalarında önemli olduğunu göstermektedir (7, 14, 71).

Sunulan araştırmada, sıçanlarda gebeliğin ilk döneminden itibaren alveol ve kanalların epitel hücreleri ile stromal ve mioepitel hücrelerinde erbB3 immunreaksiyon yoğunluğunun kademeli olarak arttığı belirlenmiştir. Laktasyon döneminde boyanmanın mioepitel hücrelerinde yoğunlaştığı, alveol ve kanal epitel hücrelerinde ise az sayıda ve zayıf olduğu gözlenmiştir. İnvolüsyonda döneminde ise kanal ve alveol epitel hücreleri ile stromal hücrelerde farelerde (14) bildirilenin aksine immunreaksiyonun değişik yoğunluklarda olduğu saptanmıştır. Gebeliğin ilk haftası ile laktasyon döneminde erbB3 immunreaktivitesi arasındaki farklılık önemli ($p<0,05$) iken, diğer tüm dönemler arasındaki farklılıkların önemsiz ($p>0,05$) olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu Jackson-Fisher ve ark. (71)'nin belirttiği gibi, erbB3'ün meme bezi gelişimi ve farklılaşmasının son dönemlerinde etkili olduğunun bir kanıtı olarak kabul edilmiştir.

Puberti süresince eksprese ve aktive olan EGFR ve erbB2'nin aksine, erbB4 ekspresyonu erişkin dişi farelerde güçlüdür. ErbB4 gebelik süresince yoğun olarak eksprese olmasına rağmen, daha çok epitelial farklılaşma ve sekretör aktivitenin yoğun olduğu gebeliğin son döneminde belirlenebilmek, laktasyon süresince pik noktaya ulaşmaktadır (74-76). ErbB4 düzeyinin farelerde gebeliğin başlangıcı ile ortasında benzer olduğu, gebeliğin son döneminde ise arttığı, laktasyonun 1. ve 3. günlerinde yüksek olduğu, ancak laktasyonun 12. gününde düştüğü rapor edilmiştir (75). Sunulan çalışmada, sıçanlarda gebeliğin her üç döneminde de farelerdekinden (75) farklı olarak epitel, yağ ve miyoepitel hücrelerinin aynı yoğunlukta erbB4 immunreaktivitesi gösterdiği, laktasyon dönemindeki boyanma özelliğinin ise farelerdeki laktasyonun 12 günü ile benzer olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu ErbB4'ün sekretör aktivitesinin yoğun olduğu laktasyonda etkin olduğu bilgisini (75) desteklemiştir. Schroeder ve ark. bildirdiğinin (14) aksine involüsyon döneminde ErbB4 immunreaksiyonunun yoğunluğu dikkati çekmiştir. İmmunohistokimyasal ve istatistiksel bulguların ErbB3 (14,71) ile benzer olması bu iki reseptörün birbiriyle sinerjik olarak çalıştığına bir göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Vasküler endotelial büyüme faktörü güçlü anjiyogeneze ve vasküler permabiliteye neden olan endotelial hücelere özgü bir mitojendir (81). Temel anjiyojenik faktör olmasının yanı sıra, VEGF'ye maruz kalan damarlarda endotel hücreleri arasında fenestrasyon, veziküler organeller ve transsellüler bağlantı oluşumuna olanak sağlayarak vasküler permeabiliteyi artırma özelliğine de sahiptir. VEGF, aktivitesini üç reseptör ile gerçekleştirir: Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1/KDR) ve VEGFR-3 (flt-4)'dür. Bunlardan VEGFR-1 ve R-2 endotel hücreleri, VEGFR-3 ise lenf damarları üzerinde bulunur (7, 81).

VEGF immunreaktivitesi insan ve primatların memesinde terminal kanalların epitel hücrelerinde görülür. Düşük miktardaki VEGF proteini ve VEGF mRNA (189, 165 ve 121 aminoasit izoformları) insanlarda memenin bağdokusundaki kan damarları ve bağımsız hücrelerle birlikte kanal epitel hücrelerinde sitoplazmik boyanmalar şeklinde lokalize olur. Endotel hücrelerinde mitozu uyaran VEGF gebelik süresince artar. VEGF'nin post-pubertal dönemdeki kemiricilerin

memesinden de eksprese olduğu ve laktasyon süresince miktarca arttığı da bildirilmektedir (78, 79, 83-85).

Bu çalışmada da, sıçanlarda gebeliğin her üç döneminde, fare (19, 20), sıçan (81) ve insanlardakine (21) benzer şekilde VEGF immunreaksiyonunun daha çok bağdoku elemanları ile damarların endotel hücrelerinde yoğunlaştığı, çok az sayıdaki alveol ve kanal epitel hücrelerinde zayıf boyanmanın olduğu tespit edilmiştir. Gebe farelerde VEGF immunreaktivitesinin epitel hücrelerinde orta yoğunlukta, ancak yağ hücreleri ve bağdoku elemanlarında yüksek yoğunlukta olduğu bildirildiği halde (19,20) bu çalışmada gebe sıçanların meme dokusundaki yağ hücrelerinde boyanma saptanmamıştır. Kantitatif değerlendirmelerde de alveol ve kanal epitel hücrelerdeki boyanma skoru her üç grup arasında da önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Bu bulgular ışığında VEGF'nin gebelik sırasında memede oluşan gelişim ve farklılaşmada önemli rol oynadığı söylenebilir.

Laktasyon dönemindeki farelerde VEGF'nin öncelikli olarak alveol epitelinde yerleştiği ve boyanmanın özellikle sekretor epitel hücrelerinin apikal membranında yoğunlaştığı bildirilmektedir (19). Sıçanlarda ise VEGF'nin laktasyon süresince kanal ve alveol epitelinde, ayrıca orta ya da büyük boy kan damarları ile birlikte kapillarlarda da lokalize olduğu ifade edilmektedir (81). Bildirilenlere benzer olarak (19-21, 81) bizim çalışmamızda da laktasyon dönemindeki sıçanlarda alveol ve kanal epitelinde yoğunluklarının arttığı ve özellikle bu reaktivitenin interalveoler bağdoku ve miyoepitel hücrelerinde yoğunlaştığı gözlenmiştir. Bu dönemdeki sıçanlarda alveol ve kanal epitel hücrelerindeki VEGF reaktivitesinin farklı yoğunluklarda olduğu, özellikle büyük çaplı kanalların epitel hücrelerinde yoğunlaştığı saptanmıştır. İnteralveoler ve kanalları çevreleyen bağdoku ile meme yağ dokusu içinde yerleşen damarların endotel hücreleri ile media katmanındaki düz kas hücrelerinde pozitif boyanmada VEGF için pozitif görülmüştür. Laktasyon dönemindeki epitel hücrelerinde boyanma skorunun gebeliğin üç döneminden de farklı ($p<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular da VEGF'nin laktasyon süresince sıçan memesindeki sekretorik aktivite üzerine etkili olduğunu gösterebilir.

İnek (122) ve sıçanlarda (81) involüsyon süresince VEGF immunreaktivitesinin alveol ve kanal epitelinde ve kan damarlarının endotel hücrelerinde bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da, sıçan (81) ve ineklerde (122)

yapılan çalışmalara benzer şekilde, involüsyon döneminde salgı materyali ile dolu olan alveol ve kanal epitel hücrelerinin apikal sitoplazmalarının zayıftan kuvvetliye değişen yoğunluklarda, interalveolar bağdoku ve meme yağ dokusunda yerleşen damarların endotelleri ile bazı bağdoku hücrelerinin güçlü şekilde VEGF immunreaktivitesi gösterdikleri saptanmıştır. İnvölüsyon dönemindeki sıçanların memesindeki VEGF immunreaktivitesinin hem alveol ve kanal epitelinde hem de interalveolar bağdoku ögelerinde gözlenmiş olması VEGF'nin memenin involüsyon sürecinde de etkin olabileceğini düşündürmüştür.

Memede kapillar damarlar kan ile alveol epiteli arasında transportu sağlar ve kan-süt bariyeri olarak ifade edilen yapıyı meydana getirir. Normal memede kapillar duvarları az sayıda, 30-55 nm'lik fenestasyonlar içerir (123, 126). Laktasyon süresince alveol çevresindeki endotel hücrelerinde sitoplazmik veziküllerin sayısı ile birlikte permeabilite de belirgin olarak artar. Bu veziküller kümeler şekillendirip daha sonrada eriyerek birbiriyle birleşir. Bazı yazarlar (126) parenşim ilişkili kapillar endotel hücrelerinin yüzeyinden uzanan mikrovillus benzeri bu çıkıntıların sayı ve uzunluklarının arttığını tanımlamışlardır. Damar permeabilitesini artıran faktör olarak bilinen VEGF (80, 127) endotel hücrelerinde morfolojik değişimlere neden olur. Yukarıda belirttiğimiz bulgularımız ışığında, laktasyon ve involüsyon süresince artan VEGF ve reseptörlerinin endotel hücrelerinde fonksiyonel değişimlere neden olup, damar permeabilitesini artırdığını söyleyebiliriz.

VEGFRs-1, 2, 3 (flt1, flk1 ve flt4) ün post-pubertal dönemde, gebe ve laktasyondaki fare (19) ve sıçanlarda (81) meme dokusunun bileşenlerinden ekspresse olduğu bilinmektedir.

Sunulan çalışmada sıçanlarda flt1 ve flk1 immunreaktivitesi gebeliğin her üç döneminde ve laktasyonda alveol ve kanal epitel hücrelerinde fare (19) ve sıçanlarda (81) olduğu gibi zayıf ve heterojen karakterde olduğu, mioepitel hücreleri ve bazı bağdoku hücrelerinde güçlü immunreaktivite görülürken, meme yağ dokusu hücrelerinde immunreaksiyonun negatif olduğu saptanmıştır. Özellikle laktasyonda gebelikten farklı olarak lümenlerinde koloidal kitle bulunan bazı alveol ve kanalların epitel hücrelerinin sitoplazmalarında flt1 immunreaksiyonunun arttığı dikkati çekmiştir. Kanal ve alveol epitel hücrelerindeki flt1 immunreaktivitesi dönemlere göre kıyaslandığında laktasyon ve gebeliğin ilk dönemi arasındaki farklılık önemli

($p < 0,05$), laktasyon ile gebeliğin 14. ve 21. günleri ile arasındaki farklılık önemsiz ($p > 0,05$) olarak tespit edilmiştir. Flk1 immunreaktivitesi için bu karşılaştırmalar yapıldığında aradaki farklılık önemsiz ($p > 0,05$) bulunmuştur. Bu bulgular gebeliğin ortalarından başlayarak laktasyonun sonuna kadar olan süreçte flt1'in (19,81), tüm dönemlerde ise flk1'in etkin olduğu bilgisini desteklemektedir. Ayrıca gebeliğin her üç dönemi ile laktasyonda bağdoku ve meme yağ dokusu içindeki damar endotellerinde yüksek düzeyde flt1 ve flk1 immunreaksiyonlarının gözlenmesi bu reseptörlerin sıçanların gebelik ve laktasyon dönemindeki etkinliğini ortaya koymaktadır.

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada involüsyonun başlangıcında flk1 immunreaktivitesinin azaldığı bildirildiği halde flt1 immunreaktivitesi hakkında bilgi bulunmamaktadır (81). Sunulan çalışmada sıçanlarda involüsyon döneminde hem flt1, hem de flk1'in meme alveol epitel hücrelerinde arttığı, özellikle alveol epitel hücrelerinde flt1 immunreaksiyonunun, flk1'e göre oldukça yoğun olduğu gözlenmiştir. Kanallarda bazı epitel hücrelerinde flt1 ve flk1 zayıftan güçlüye doğru değişen yoğunluklarda immunreaksiyon gösterirken bazı hücrelerde reaksiyon negatif, interlober, interlobuler ve interalveoler bağdokudaki kan damarlarının endotel hücrelerinde flt1 ve flk1 immunreaktivitesinin oldukça güçlü olduğu, bazı bağdoku hücrelerinin orta yoğunlukta olduğu, meme yağ dokusu ve miyoepitel hücrelerinde ise reaksiyonun negatif olduğu belirlenmiştir. İnvölüsyon süresince hem flt1 hemde flk1 immunreaktivitesinin diğer gruplardakinden anlamlı olarak farklı ($p < 0,05$) olduğu saptanmıştır. İnvölüsyon süresince alveol ve kanal epitellerinde flt1 ve flk1 immunreaksiyonlarının gözlenmesi bu reseptörlerin sıçanların involüsyon dönemindeki etkinliğinin devam ettiğini ortaya koymaktadır.

Kemiricilerde özellikle Flt4 ekspresyonunun gebelik ve laktasyonda memede çok az arttığı görülür. Sıçanlarda flt4'ün gebelik ve laktasyon süresince arttığı, involüsyonun başlangıcında ise azaldığı belirtilmektedir (81). Bizim çalışmamızda da kemiricilerde belirtildiği gibi (19, 20, 81) flt4 immunreaktivitesinin gebeliğin ilk iki döneminde alveol epitel hücrelerinde kuvvetli, kanal epitel hücrelerinde ise değişen yoğunluklarda olduğu saptanmıştır. Ayrıca gebeliğin son dönemindeki sıçanlarda belirtilenlerin aksine (19, 20, 81) flt4 immunreaksiyonu daha çok kanal epitelinde görülmüş, alveollerde ise sadece birkaç epitel hücresi pozitif reaksiyon göstermiştir.

Laktasyon ve involüsyon döneminde, flt4 immunreaktivitesinin alveol ve kanal epitel hücrelerinde kuvvetli olduğu ve epitel hücrelerinin özellikle apikal sitoplazması ve membranında yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Ancak involüsyon döneminde alveol epitel hücrelerinde reaksiyon kanal epitel hücrelerindeki kadar kuvvetli bulunmuştur. Flt4 immunreaktivitesi dönemlere göre kıyaslandığında gebeliğin ilk iki dönemi arasındaki farklılık önemsizken ($p>0,05$), gebeliğin son dönemi ile bu iki dönem arasındaki farklılık önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Laktasyon ve involüsyon dönemleri arasındaki farklılık ile bu dönemler ve gebelik dönemleri arasındaki farklılıklar da anlamlı olarak ($p<0,05$) saptanmıştır. Ayrıca flt4 immunreaktivitesinin tüm dönemlerde miyoepitel, yağ ve bağdokusu hücreleri ile küçük çaplı kapillar, venül ve lenf damarlarının endotel hücrelerinde kuvvetli olduğu belirlenmiştir.

Vasküler endotel hücre büyümesini baskılayan faktör (VEGI) anjiyogenezin spesifik bir inhibitörüdür (105). İnsanlarda birçok organın normal damarlaşmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. Meme kanserlerinde de epitel ve miyeloid tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı ifade edilmektedir (107). VEGI'nin fazla miktarda salgılanmasının kemiricilerin kolon kanser hücrelerinde tümör büyümesinde bir azalma oluşturduğu ve bu etkisinin VEGI'nin güçlü anti-anjiyogenik aktiviteye sahip olmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (105). Yapılan literatür taramalarında gerek prenatal gerekse postnatal meme gelişiminde VEGI'nin etkilerine ilişkin herhangi bir bilgiye rastlanmamış olup bu çalışma sıçanların memesinde gebelik, laktasyon ve involüsyon dönemlerinde VEGI'nin lokalizasyonuna ilişkin ilk çalışmadır.

Sıçanlarda VEGI immunreaktivitesinin, gebeliğin her üç döneminde de alveol ve kanal epitel hücrelerinde, laktasyon döneminde boyanmanın kanal ve alveollerini çevreleyen bağdoku ve damarlarda olduğu belirlenmiştir. İnvölüsyon döneminde ise oldukça zayıf olan reaksiyon alveol ve kanal epitelleri ile damar endotellerinde görülmüştür. Tüm dönemlerde miyoepitel ve meme yağ dokusu hücrelerinde ise immunreaksiyonun negatif olduğu tespit edilmiştir. VEGI immunreaktivitesi dönemlere göre kıyaslandığında gebeliğin ilk iki dönemi arasındaki farklılık önemsizken ($p>0,05$), son dönem ile bu iki dönem arasındaki farklılık önemli ($p<0,05$) olarak belirlenmiştir. Laktasyon dönemi ile diğer grupların VEGI immunreaksiyonu arasındaki farklılık da önemliyken ($p<0,05$), involüsyon

dönemindeki reaksiyonun ise gebeliğin 7. günündekinden de farklı olduğu ($p<0,05$), diğer dönemlerle arasındaki farklılıklarında önemsiz olduğu saptanmıştır ($p>0,05$). Elde edilen bulgular VEGI'nin belirtilen dönemler içinde patolojik anjiyogenezisi inhibe ettiği sonucunu düşündürmüştür.

Postpubertal dişilerde özellikle östrojen en önemli mammojenik faktördür (109). Puberti ile birlikte östrojenin kandaki konsantrasyonunun yükselmesine bağlı olarak memede reseptörleri görülür. Kemiricilerde östrojen, büyüme faktörlerinin üretimini uyarmak için stromal dokudaki reseptörleri aracılığı ile harekete geçer. İneklerde yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular da meme gelişimi üzerine östrojenin etkisinin stroma yolu ile olduğunu göstermektedir (2, 3). Gebelik süresince meydana gelen hücre büyümesi için östrojen ve progesteronun kandaki konsantrasyonun artması gereklidir. Lobuloalveoler gelişme gebelik süresince meme hacminde önemli bir artışa neden olur. Progesteron gebelik süresince yüksektir. Buna karşın östrojen gebeliğin son döneminde artar. Bu da meme hacmindeki büyük artışla aynı döneme denk gelir (110, 111). Laktasyonda meme östrojen reseptörlerine sahipken, progesteron reseptörlerine sahip değildir. Bundan dolayı da gebeliğin ilk yarısında meme büyümesinin büyük bir kısmını kanallar sisteminin büyümesi ve lopçuk şekillenmesi oluşturur. Gebeliğin ikinci yarısından itibaren ise kanal büyümesi devam eder ancak büyümenin çoğunluğu lobuloalveolar sistemde meydana gelir. ER'nin memede insanlarda luminal epitel hücreleri, miyoepitel ve stromal hücreler ile fibroblastlarda, maymunlarda epitel ve miyoepitel hücreleri ile fibroblastlarda, farelerde kanal epitel hücreleri, yağ ve stromal hücrelerde, ineklerde ise epitel ile bazı yağ hücreleri ve fibroblastlarda lokalize olduğu rapor edilmektedir (113).

Sunulan çalışmada da sıçanlarda, insan, maymun, fare ve ineklerde belirtildiği gibi (109, 112, 113) gebeliğin 7. gününde genelde birkaç alveol ve kanal epitel hücresinde ER immunreaktivitesi görülürken, gebeliğin 21. günde daha çok alveol epitel hücrelerinde olmak üzere pozitif hücre sayısının arttığı tespit edilmiştir. ER immunreaktivitesi dönemlere göre karşılaştırıldığında gebeliğin ilk iki dönemi arasındaki farklılık önemsiz ($p>0,05$), son dönemle bu iki dönem arasındaki farklılık ise önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Bu bulgu gebeliğin son döneminde ER'nin miktarının arttığı bilgisiyle (110,111) örtüşmektedir. Sıçanlarda laktasyon döneminde

kanal ve alveol epitel hücrelerinin hemen hemen tamamında oldukça güçlü bir ER immunreaktivitesi saptanmış ve bu reaktivitenin diğer gruplardakinden farklı ($p<0,05$) olduğu görülmüştür. Bu bulgumuzda laktasyon dönemindeki memenin ER'lerine sahip olduğu bilgisini desteklemektedir (110,111). İnvolyon döneminde ise çok az sayıdaki alveol ve kanal epitel hücresinde ER immunreaktivitesi gözlenmiş, gebeliğin ilk iki dönemi ile karşılaştırıldığında aralarındaki farklılığın önemsiz ($p>0,05$), gebeliğin son dönemiyle arasındaki farklılığın önemli ($p<0,05$) olduğu bulunmuştur. Bizim bu bulgularımız da involüsyon süresince ER'nin dolayısıyla östrojenin etkinliğinin (109) azaldığını gösterebilir. Çalışmamızda sıçanlarda memenin farklı gelişim dönemlerinde insan, maymun, fare ve ineklerdekinden (109, 112, 113) farklı olarak meme bağdokusu ve yağ dokusu hücreleri ile miyoepitel hücrelerinde ve damar endotellerinde ER'nin bulunmadığı saptanmıştır. Bu da östrojenin etkisinin memede stromal dokudaki reseptörler aracılığıyla gerçekleştirdiğini bildiren çalışma (113) ile çelişmektedir.

3-6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bütün bu bulgular; memenin farklı dönemlerinde ve farklı bölgelerinde değişik oranlarda lokalize olan ErbB, VEGF ve reseptörleri ile östrojen reseptörlerinin, meme epitelinin büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde fizyolojik bir rol oynayabileceğini güçlü bir şekilde desteklemiştir. Özellikle EGF ve benzeri ligandlar yoluyla aktive olan EGFR/erbB1 ve erbB2 reseptörlerinin gebelik süresince memenin lobulo-alveoler gelişiminde, buna karşılık heregulin ve neurogulin gibi ligandlar yoluyla aktive olan erbB3 ve erbB4'ün ise alveol ve kanal epitel hücrelerinin şekillenmesinde ve farklılaşmasında önemli olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca hormonal ve epiteliyal-stromal uyarımların etkisi altında VEGF ve reseptörlerinin gebelikte yeni damarların oluşumunu arttırarak yeni alveol ve kanalların şekillenmesine aracılık edebileceği, laktasyon süresince de vasküler permeabilityyi arttırarak gerekli olan moleküllerin alveollere geçişini sağlayıp süt proteinlerinin sentezine yardımcı olabileceği kanısına varılmıştır. İnvölüsyon döneminde, erbB reseptörleri, VEGF ve reseptörleri için pozitif immunreaktivitenin varlığı, involüsyon da alveol ve kanal epitel hücrelerinde apoptozis yoluyla gerçekleşen dejenerasyon ve yoğun yıkımlanma dikkate alındığında, bu reseptörlerin meme dokusunun rejenerasyonunu yeniden sağladığı ve vasküler permeabilityyi arttırarak immun sistem hücrelerinin meme dokusuna geçişine aracılık etmek suretiyle patojenlerden kaynaklanacak enfeksiyonlara karşı memenin korunmasına aracılık edebileceğini düşündürmüştür. Bütün dönemlerde damarlarda saptanan VEGI immunreaktivitesi ve VEGI'nın fonksiyonu birlikte değerlendirildiğinde ise VEGI'nın patolojik anjiogenesisin baskılanmasında rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Çalışmadan elde edilen immunohistokimyasal ve kantitatif verilerin, Veteriner pratiğe katkıda bulunacağı, bütün türlerde meme hastalıklarının teşhisi ve tedavisi ile bundan sonra sığınarlarda yapılacak çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

4. KAYNAKLAR

1. Reece W.O. Physiology of Domestic Animals. Newyork/USA, 2004, Cornell university press., 710-711.
2. Hurley W.L. "Mammary Development-postpubertal". [http:// www. classes. ansci. edu](http://www.classes.ansci.edu). 27.03.2008.
3. Solaman D. "Biology of the Mammary Gland". [http:// www. mammary. nih. gov](http://www.mammary.nih.gov). 27.03.2008.
4. Bařtan A. İneklerde Meme Hastalıkları, Ankara, 2002, şahin matbaası, 1-2.
5. Dinç A. Evcil Hayvanlarda Memenin Deri Hastalıkları, Dolaşım Bozuklukları ve Operasyonları. Konya, 1995 1-2.
6. "Involution of the Mouse Mammary Gland". [http:// www. profreg. medscape. com](http://www.profreq.medscape.com). 27.03.2008.
7. Sebastian J, Richards RG., Walker MP et al. Activation and Function of the Epidermal Growth Factor Receptor and erbB-2 during Mammary Gland Morphogenesis. *Cell Growth & Differentiation* 1998; 9: 777-785
8. Fenton SE, Sheffield LG. Prolactin Inhibits Epidermal Growth Factor (EGF)-Stimulated Signaling Events in Mouse Mammary Epithelial Cells by Altering EGF Receptor Function. *Molecular Biology of the Cell* 1993; 4: 773-780.
9. Taketani Y, Oka T. Biological Action of Epidermal Growth Factor and Its Functional Receptors in Normal Mammary Epithelial Cells. *Proc. NatL Acad. Sci. USA* 1983; 80: 2647-2650.
10. Wiesen JF, Young P, Werb Z et al. Signaling Through the Stromal Epidermal Growth Factor Receptor is Necessary for Mammary Ductal Development. *Development* 1999; 126: 335-344.
11. Snedeker SM, Brown CF, Diaugustine RP. Expression and Functional Properties of Transforming Growth Factora and Epidermal Growth Factor During Mouse Mammary Gland Ductal Morphogenesis. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 276-280.
12. Luetteke NC, Qiu TH, Fenton SE et al. Targeted İnactivation of the EGF and Amphiregulin Genes Reveals Distinct Roles for EGF Receptor Ligands in Mouse Mammary Gland Development. *Development* 1999; 126: 2739-2750.

13. Taketani Y, Oka T. Possible Physiological Role of Epidermal Growth Factor in the Development of the Mouse Mammary Gland During Pregnancy. Elsevier Biomedical 1983; 152: 2.
14. Schroeder JA, Lee DC. Dynamic Expression and Activation of ERBB Receptors in the Developing Mouse Mammary Gland. Cell Growth & Differentiation 1998; 9: 451-464.
15. Klijn JGM, Berns PMJJ, Schmitz PIM et al. The Clinical Significance of Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) in Human Breast Cancer: A Review on 5232 Patients. The Endocrine Society 1992; 13: 1.
16. Cunha GR. Role of Mesenchymal-Epithelial Interactions in Normal and Abnormal Development of the Mammary Gland and Prostate. Breast Cancer Research 1994; 1030-1044.
17. Rajkumar T. Growth Factors and Growth Factor Receptors in Cancer. Current sci. 2001; 81: 535-541.
18. Atalay G, Cardoso F, Awada A et al. Novel Therapeutic Strategies Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Family and its Downstream Effectors in Breast Cancer. Ann. Oncol. 2003; 14: 1346–1363.
19. Hovey RC, Goldhar AS, Baffi J et al. Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Epithelial and Stromal Cells during Mouse Mammary Gland Development. Mol. Endocrinol. 2001; 15: 819–831.
20. Rossiter H, Barresi C, Ghannadan M et al. Inactivation of VEGF in Mammary Gland Epithelium Severely Compromises Mammary Gland Development and Function. The FASEB J. 2007; 21: 3994-4004.
21. Nishimura S, Maeno N, Matsuo K et al. Human Lactiferous Mammary Gland Cells Produce Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Express the VEGF Receptors, Flt-1 and KDR/Flk-1. Cytokine 2002; 18: 191–198.
22. Salomon DS, Bianco C, Santis MD. Cripto: A Novel Epidermal Growth Factor (EGF)-Related Peptide in Mammary Gland Development and Neoplasia. BioEssays 1999; 21:61–70.
23. Dellmann DH.: Textbook Veterinary Histology, 1993 By Lea &Febiger, Fourth Edition., 165-167.
24. Tanyolaç A.: Özel Histoloji, Ankara, 1993: 71-72.

25. Aughey E, Frye LF.: Comparative Veterinary Histology, 2001 Manson publishing Ltd: 105-107.
26. Narendran R 2, Hacker RR, Batra TR et al. Hormonal Induction of Lactation in the Bovine: Mammary Gland Histology and Milk Composition. *J. Dairy sci.* 1974; 57: 1334-1340.
27. Masso-Welch PA, Kathleen MD, Nannette CSC et al. A Developmental Atlas of Rat Mammary Gland Histology. *J Mammary Gland Biol.* 2000; 5: 165-185.
28. Silberstein GB. Postnatal Mammary Gland Morphogenesis. *Microsc. Res. Techniq.* 2001; 52: 155–162.
29. Hassa, O., Aşti, RN.: Embriyoloji. Ankara, 1997, 104.
30. Carlson BM.: Patten's Foundations of Embryology. New York, 1998 McGraw-Hill, 875-876.
31. Tucker HA. Factors Affecting Mammary Gland Cell Numbers. *J. Dairy Sci.* 1969; 52: 720.
32. Hurley WL, Rejman JJ. β -Lactoglobulin and A-Lactalbumin in Mammary Secretions During the Dry Period: Parallelism of Concentration Changes. *J Dairy Sci* 1986; 69: 1642-1647.
33. Hurley WL. Mammary Function During the Nonlactating Period; Enzyme, Lactose. Protein Concentrations, and Ph of Mammary Secretions. *J Dairy Sci* 1987; 70: 20-28.
34. Hurley WL, Warner GJ, Grummer RR. Changes in Triglyceride Fatty Acid Composition of Mammary Secretions During Involution. *J Dairy Sci* 1987; 70: 2406-2410.
35. Rejman JJ, Hurley WL, Bahr JM. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Bovine Lactoferrin and A 39-Kilodalton Protein Found in Mammary Secretions During Involution. *J Dairy Sci* 1989; 72: 555-560.
36. Hurley, W.L. Mammary Gland Function During Involution. *J. Dairy Sci.* 1989; 72: 1637-1646.
37. Strange R, Li F, Saurer S, Burkhardt A, Friis RR. Apoptotic Cell Death and Tissue Remodelling During Mouse Mammary Gland Involution. *Development* 1992; 115: 49-58.

38. Walker NI, Bennett RE, Kerr JFR. Cell Death by Apoptosis During Involution of the Lactating Breast in Mice and Rats. *Am. J. Anat.* 1989; 185: 19-32.
39. Quarrie LH, Addey CVP, Wilde CJ. Local Regulation of Mammary Apoptosis in the Lactating Goat. *Biochem. Soc. Trans.* 1994; 22: 178.
40. Wilde CJ, Addey CVP, Li P, Fernig DG. Programmed Cell Death in Bovine Mammary Tissue During Lactation and Involution. *Exper. Physiol.*, 1997; 82: 943-953.
41. Holst BD, Hurley WL, Nelson DR. Involution of the Bovine Mammary Gland: Histological and Ultrastructural Changes. *J Dairy Sci* 1987;70:935-944.
42. Helminen HJ, Ericsson JLE. 1968a. Studies on Mammary Gland Involution. II. Ultrastructural Evidence for Auto- and Heterophagocytosis. *J. Ultrastruct. Res.* 25: 214.
43. Helminen HJ, Ericsson JLE. 1968b. Studies on Mammary Gland Involution. II. Alterations Outside Auto- and Heterophagocytic Pathways for Cytoplasmic Degradation. *J. Ultrastruct. Res.* 25: 228.
44. Helminen HJ, Ericsson JLE. 1971. Effects of Enforced Milk Stasis on Mammary Epithelium, with Special Reference to Changes in Lysosomes and Lysosomal Enzymes. *Exp. Cell Res.* 68: 411.
45. Wellings SR, DeOme KB. Electron Microscopy of Milk Secretions in the Mammary Gland of the C3H/CrGl Mouse. III. Cytomorphology of the Involuting Gland. *J. Natl. Canc. Inst.* 1963; 30: 241.
46. Walker NI, Bennett RE, Kerr JFR. Cell Death by Apoptosis During Involution of the Lactating Breast in Mice and Rats. *Am. J. Anat.* 1989; 185: 19-32.
47. Richards RC, Benson GK. Ultrastructural Changes Accompanying Involution of the Mammary Gland in the Albino Rat. *J. Endocrinol.* 1971; 5:127.
48. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26:239-257.

49. Ciğer S. “Yara iyileşmesi ve büyüme faktörleri”. [http:// www. dermaneturk. com](http://www.dermaneturk.com). 27.03.2008.
50. Kırıçoğlu CE, Öztürk C, Köktürk N. Küçük Hücreli Dişi Akciğer Kanserinde Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü ve İnhibitörlerinin Yeri. *Solunum* 2003; 5: 146-152.
51. Bazley LA, Gullick WJ. The Epidermal Growth Factor Receptor Family. *Endocr-Relat Cancer* 2005; 12: 17–27.
52. Canbay E. Meme Kanseri Hücrelerinde HER2 Reseptör Antikoru Pertuzumab (2C4 Omnitarg)’ın Fokal Adezyon Kinaz Üzerine Etkisi. Uzmanlık tezi, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2006.
53. Cowing BE, Saker KE. Polyunsaturated Fatty Acids and Epidermal Growth Factor Receptor/Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Mammary Cancer. *J. Nutr.* 2001; 131: 1125–1128.
54. Xian CJ. Roles Of Epidermal Growth Factor Family in the Regulation of Postnatal Somatic Growth. *Endoc. Rev.* 2007; 28: 284-296.
55. Eccles SA. The Role of c-erbB-2/HER2/neu in Breast Cancer Progression and Metastasis. *J Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2001; 6: 393-405.
56. Hunter T. Signaling. *Cell* 2000; 100:113-27.
57. DiAugustine RP, Richards RG, Sebastian J. EGF-Related Peptides and Their Receptors in Mammary Gland Development. *J Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1997; 2: 109-117.
58. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular Systems Biology*, 2005; 14: 1-17.
59. Carpenter G, Cohen S. Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 7709-7712.
60. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in Gastric Cancer: A New Prognostic Factor and a Novel Therapeutic Target. *Annals of Oncology* 2008; 19: 1523–1529.
61. Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. ErbB-2 Amplification Inhibits Down-regulation and Induces Constitutive Activation of Both ErbB-2 and Epidermal Growth Factor Receptors. *J Biol. Chemist.* 1999; 274: 8865–8874.

62. Garcia I, Vizoso F, Martin A et al. Clinical Significance of the Epidermal Growth Factor Receptor and HER2 Receptor in Resectable Gastric Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2003; 10: 234–241.
63. Kumar R, Shepard HM, Mendelsohn J. Regulation of Phosphorylation of the c-erbB-2/HER2 Gene Product by a Monoclonal Antibody and Serum Growth Factor(s) in Human Mammary Carcinoma Cells. *Mol. Cell. Biol.* 1991; 11: 979-986.
64. Millanta F, Calandrella M, Citi S et al. Overexpression of HER-2 in Feline Invasive Mammary Carcinomas: An Immunohistochemical Survey and Evaluation of Its Prognostic Potential. *Vet Pathol* 2005; 42:30–34.
65. Jones FE, Stern DF. Expression of Dominant-Negative Erbb2 in the Mammary Gland of Transgenic Mice Reveals A Role in Lobuloalveolar Development and Lactation. *Oncogene* 1999; 18: 3481-3490.
66. Jackson-Fisher AJ, Bellinger G, Ramabhadran R et al. ErbB2 is Required for Ductal Morphogenesis of the Mammary Gland. *PNAS* 2004; 101: 17138–17143.
67. Price-Schiavi SA, Andrechek E, Idris N et al. Expression, Location, and Interactions of ErbB2 and its Intramembrane Ligand Muc4 (Sialomucin Complex) in Rat Mammary Gland During Pregnancy. *J. Cell. Physiol.* 2005; 203: 44–53.
68. Srinivasana R, Levertontb KE, Sheldonc H et al. Intracellular Expression of the Truncated Extracellular Domain of C-ErbB-3/HER3. *Cell. Signal.* 2001; 13: 321-330.
69. Stern DF. ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 Duet in Mammary Development and Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008; 13:215–223.
70. Srinivasan R, Benton E, McCormick F et al. Expression of the c-erbB-3/HER-3 and c-erbB-4/HER-4 Growth Factor Receptors and Their Ligands, Neuregulin-1 a, Neuregulin-1 b, and Betacellulin, in Normal Endometrium and Endometrial Cancer. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 2877–2883.
71. Jackson-Fisher AJ, Bellinger G, Breindel JL et al. ErbB3 is Required for Ductal Morphogenesis in the Mouse Mammary Gland. *Breast Cancer Res.* 2008; 10: 1-12.

72. Penington DJ, Bryant I, Riese DJ. Constitutively Active ErbB4 and ErbB2 Mutants Exhibit Distinct Biological Activities. *Cell Growth & Differentiation* 2002; 13: 247–256.
73. Muraoka-Cook RS, Feng SM, Strunk KE et al. ErbB4/HER4: Role in Mammary Gland Development, Differentiation and Growth Inhibition. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008; 13:235–246.
74. Long W, Wagner KU, Kent Lloyd KC et al. Impaired Differentiation and Lactational Failure of Erbb4-Deficient Mammary Glands Identify ERBB4 As an Obligate Mediator of STAT5. *Development* 2003; 130: 5257-5268.
75. Jones FE, Welte T, Fu XY et al. ErbB4 Signaling in the Mammary Gland is Required for Lobuloalveolar Development and Stat5 Activation during Lactation. *J Cell Biol.* 1999; 147: 77–87.
76. Tidcombe H, Jackson-Fisher A, Mathers K et al. Neural and Mammary Gland Defects in Erbb4 Knockout Mice Genetically Rescued from Embryonic Lethality. *PNAS* 2003; 100: 8281–8286.
77. Kärpänen, T. Lymphatic vessels in health and disease: Role of the VEGF-C/VEGFR-3 Pathway and the Transcription Factor FOXC2, Academic dissertation, University of Helsinki Haartman Institute and Biomedicum.
78. Güllü İ. Anjiojenez ve antianjiojenik tedaviler. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non-Hodgkin Lenfoma 2004; 34-39.
79. Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A et al. Vascular Endothelial Growth Factor C and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Expression in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Head Neck* 2003; 25: 464–474.
80. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, et al. Regulation of Microvascular Permeability by Vascular Endothelial Growth Factors. *J. Anat.* 2002; 200: 581–597.
81. Pepper MS, Baetens D, Mandriota SJ et al. Regulation of VEGF and VEGF Receptor Expression in the Rodent Mammary Gland During Pregnancy, Lactation, and Involution. *Dev. Dynam.* 2000; 218: 507–524.
82. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M et al. Anti-angiogenic therapy: Rationale, Challenges and Clinical Studies. *Angiogenesis* 2002; 5: 237-256.

83. Hiratsuka S, Kataoka Y, Nakao K et al. Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) Is Involved in Guidance of VEGF Receptor-Positive Cells to the Anterior Portion of Early Embryos. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25: 355–363.
84. Hiratsuka S, Kataoka Y, Nakao K et al. Membrane Fixation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Ligand-Binding Domain is Important for Vasculogenesis and Angiogenesis in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25: 346–354.
85. Bouis D, Kusumanto Y, Meijer C et al. A Review on Pro- and Anti-Angiogenic Factors As Targets of Clinical Intervention. *Pharmacological Res.* 2006; 53: 89–103.
86. Woolard J, Wang WY, Bevan HS et al VEGF165b, an Inhibitory Vascular Endothelial Growth Factor Splice Variant: Mechanism of Action, In Vivo Effect on Angiogenesis and Endogenous Protein Expression. *Cancer Res* 2004; 64: 7822-7835.
87. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M et al. Spatially Restricted Patterning Cues Provided by Heparin-Binding VEGF-A Control Blood Vessel Branching Morphogenesis. *Genes Dev.* 2002; 16: 2684-2698.
88. Restucci B, Papparella S, Maiolino P et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol* 2002; 39:488–493.
89. Shibuya M. Structure and Dual Function of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (Flt-1). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001; 33: 409-420.
90. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal Transduction by VEGF Receptors in Regulation of Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312: 549-560.
91. Hattori K, Heissig B, Wu Y et al. Placental Growth Factor Reconstitutes Hematopoiesis by Recruiting VEGFR1(+) Stem Cells from Bone-Marrow Microenvironment. *Nat Med* 2002; 8: 841-849.
92. Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y et al. Revascularization of Ischemic Tissues by Plgf Treatment, and Inhibition of Tumor Angiogenesis, Arthritis and Atherosclerosis by Anti-Flt1. *Nat Med* 2002; 8: 831-840.

93. Shibuya M. Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis. *J Biochem. Mol. Biol.* 2006; 39: 469-478.
94. Kabrun N, Buhring HJ, Choi K et al. Flk-1 Expression Defines a Population of Early Embryonic Hematopoietic Precursors. *Development* 1997; 124: 2039-2048.
95. Shalaby F, Ho J, Stanford WL et al. A Requirement for Flk1 in Primitive and Definitive Hematopoiesis and Vasculogenesis. *Cell* 1997; 89: 981-990.
96. Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C et al. The Adaptor Protein Shb Binds to Tyrosine 1175 in Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-2 and Regulates VEGF-Dependent Cellular Migration. *J Biol Chem* 2004; 279: 22267-22275.
97. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B et al. Activation of Nitric Oxide Synthase in Endothelial Cells by Akt-Dependent Phosphorylation. *Nature* 1999; 399: 601-605.
98. Ebos JM, Bocci G, Man S et al. A Naturally Occurring Soluble form of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Detected in Mouse and Human Plasma. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 315-326.
99. Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M et al. Ligand-induced Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (VEGFR-3) Heterodimerization with VEGFR-2 in Primary Lymphatic Endothelial Cells Regulates Tyrosine Phosphorylation Sites. *J Biol Chem* 2003; 278: 40973-40979.
100. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K et al. Vascular Endothelial Growth Factor C is Required for Sprouting of the First Lymphatic Vessels from Embryonic Veins. *Nat Immunol* 2004; 5: 74-80.
101. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J et al. Tumorassociated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002; 161: 947-956.
102. Valtola R, Salven P, Heikkila P et al. VEGFR-3 and Its Ligand VEGF-C are Associated with Angiogenesis in Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* 1999; 154: 1381-1390.

103. Le Bras B, Barallobre MJ, Homman-Ludiye J et al. VEGF-C is a Trophic Factor for Neural Progenitors in the Vertebrate Embryonic Brain. *Nat Neurosci* 2006; 9: 340-348.
104. Orlandini M, Spreafico A, Bardelli M et al. Vascular Endothelial Growth Factor-Dactivates VEGFR-3 Expressed in Osteoblasts Inducing Their Differentiation. *J Biol Chem* 2006; 93: 11675-11680.
105. Xiao Q, Hsu CY, Chen H et al. Characterization of Cis-Regulatory Elements of the Vascular Endothelial Growth Inhibitor Gene Promoter. *Biochem. J.* 2005; 388: 913–92.
106. Yao J-J, Zhang M, Miao X-H et al. Isoform of Vascular Endothelial Cell Growth Inhibitor (VEGI72–251) Increases Interleukin-2 Production by Activation of T Lymphocytes. *Acta Bioch. Bioph. Sin.* 2006; 38: 249–253.
107. Metheny-Barlowa LJ, Lib L-Y. Vascular Endothelial Growth Inhibitor (VEGI), an Endogenous Negative Regulator of Angiogenesis. *Ophthalmology* 2006; 21: 49-58.
108. LJ Chew, Pan H, Yu J et al. A Novel Secreted Splice Variant of Vascular Endothelial Cell Growth Inhibitor. *The FASEB* 2002; 16: 742-744.
109. Ciarloni L, Mallepell S, Brisken C. Amphiregulin is an Essential Mediator of Estrogen Receptor a Function in Mammary Gland Development. *PNAS* 2007; 10: 45455–5460.
110. Brisken C, Park S, Vass T et al. A Paracrine Role for the Epithelial Progesterone Receptor in Mammary Gland Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 5076–5081.
111. Kariagina A, Aupperlee MD, Haslam SZ. Progesterone Receptor Isoforms and Proliferation in the Rat Mammary Gland during Development. *Endocrinology* 2007; 148:2723–2736.
112. Hyder SM. Sex-steroid Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer. *Endocr.-Relat. Cancer* 2006; 13: 667–687.
113. Connor EE, Meyer MJ, Li RW et al. Regulation of Gene Expression in the Bovine Mammary Gland by Ovarian Steroids. *J. Dairy Sci.* 2007; 90: 55–65.

114. Mudduwa LKB. Quick Score of Hormone Receptor Status of Breast Carcinoma: Correlation with the Other Clinicopathological Prognostic Parameters. *Indian J Pathol. Microbiol.* 2009; 52: 159-163.
115. Detre S, Sacconi Jotti S, Dowsett M. A “quickscore” Method for Immunohistochemical Semiquantitation: Validation for Estrogen Receptor in Breast Carcinomas. *J Clin Pathol* 1995; 48: 876-879.
116. Çolak A, Liman N, Maraşlı Ş et ve ark. Koyunlarda Hormonlarla Laktasyon İndüksiyonu: I. Meme Dokusunun Histolojik Gelişimi ve Laktasyon Performans İlişkisi. *Kafkas Üniv. Veteriner Fak. Derg.* 1996; 2: 77-85.
117. Smith KL, Schanbacher FL. Hormone Induced Lactation in the Bovine. I. Lactational Performance Following Injections of 17 β -Estradiol and Progesterone. *J. Dairy Sci.* 1973; 56: 738.
118. Sheffield LG. Hormonal Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Content and Signaling in Bovine Mammary Tissue. *Endocrine* 1998; 139: 4568-4575.
119. Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM et al. Transgenic MUC1 Interacts with Epidermal Growth Factor Receptor and Correlates with Mitogen-activated Protein Kinase Activation in the Mouse Mammary Gland. *J Biol. Chem.* 2001; 276: 13057–13064.
120. Edery M, Pang K, Larson L et al. Epidermal Growth Factor Receptor Levels in Mouse Mammary Glands in Various Physiological States. *Endocrinology* 1985; 117:405–411.
121. Stern DF. ErbBs in Mammary Development. *Exp. Cell Res.* 2003; 284: 89–98.
122. Dallard BE, Ruffino V, Heffel S, Calvinho LF. Effect of a Biological Response Modifier on Expression of Growth Factors and Cellular Proliferation at Drying Off. *J. Dairy Sci.* 2006; 90: 2229–2240.
123. Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch H et al. High Affinity VEGF Binding and Developmental Expression Suggest Flk-1 as a Major Regulator of Vasculogenesis and Angiogenesis. *Cell* 1993; 72: 835–846.
124. Shibuya M. Role of VEGF-FLT Receptor System in Normal and Tumor Angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1995; 67: 281–316

125. Zangani D, Darcy K, Masso-Welch PA et al. Multiple Differentiation Pathways of Rat Mammary Stromal Cells in Vitro: Acquisition of a Fibroblast, Adipocyte or Endothelial Phenotype is Dependent on Hormonal and Extracellular Matrix Stimulation. *Differentiation* 1999; 64: 91–101.
126. Matsumoto M, Nishinakagawa H, Kurohmaru M et al. Pregnancy and Lactation Affect the Microvasculature of the Mammary Gland in Mice. *J Vet Med Sci* 1992; 54: 937–943.
127. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M et al. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029–1039.



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Hakan SAĞSÖZ

Doğum tarihi : 06.03.1979

Doğum yeri : Kars

İlköğretim : Atatürk İlköğretim Okulu, Kars, 1987

Ortaöğretim : Kağızman Lisesi, Kars, 1997

Lisans : Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Kayseri, 2002

Yüksek Lisans: Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Histoloji ve Embriyoloji, 2005

Sürekli Adres: Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Diyarbakır

Telefon ve e-posta : 0262 4543723, hsagsoz@yahoo.com,

Yüksek Lisans Tezi: Bıldırcınlarda Postnatal Dönemde Özofagus Epitelinin Kantitatif Histomorfolojik Gelişimi ve Özofagus Bezlerinin Histokimyasal Özellikleri. (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Narin LİMAN)

Katıldığı Kurslar:

- 1) İleri Işık Mikroskopik Teknikleri, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 2006
- 2) Deney Hayvanlarının Biyolojik Araştırmalarda Kullanımı Kursu, Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin PAYZIN Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DÜSAM), 2006.