



T.C.

MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÖPEK TRANSMİSSİBLE VENEREAL TÜMÖRLERİNDE
MMP-2 VE MMP-7 AKTİVİTESİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ**

Ezgi OĞUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR-2017

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÖPEK TRANSMİSSİBLEVENEREAL TÜMÖRLERİNDE
MMP-2 VE MMP-7 AKTİVİTESİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ**

Ezgi OGUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0388-YL-16 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2017

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Ezgi OGUŞ tarafından *Prof. Dr. Özlem ÖZMEN* yönetiminde hazırlanan *Köpek Transmissible Venereal Tümörlerinde MMP-2 ve MMP-7 Aktivitesinin İmmunohistokimyasal Olarak Belirlenmesi* Başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Patoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi *23.05.2017*

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
MAKÜ Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Başkan

Doç. Dr. Zafet ÖZYILMAZ
MAKÜ Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Jüri

Doç. Dr. Ahmet AYDOĞAN
ÇÜ Ceyhan Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Jüri

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu *23.05. / 2017* Tarih ve *2017/13* sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa Doğa REMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecince bilgilerini aktaran, tecrübe ve görüşlerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN' e, yüksek lisans çalışmam sırasında destek olan Sayın Doç. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a, araştırma sürecinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Uzman Biyolog Dilnur DİNÇOĞLU'na, değerli zamanını ve tecrübelerini paylaşan arkadaşlarım Uzm.Vet.Hek. Hüseyin DOLU' ya ve Uzm. Arş.Gör. Nilay SERPİN'e, ayrıca üniversite eğitimim sürecinde desteklerini bir an olsun eksik etmeyen çok sevgili Yrd. Doç. Dr. Savaş Volkan GENÇ ve Yrd. Doç. Dr. Duygu MUTLUAY'a, eğitim ve öğretim hayatımda maddi manevi desteğini esirgemeyen, tüm zorluklarda her zaman arkamda olan aileme, teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİ BEYAN

Köpek Transmissible Venereal Tümörlerinde MMP-2 ve MMP-7 Aktivitesinin İmmunohistokimyasal Olarak Belirlenmesi başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlamasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

TURKÇE ÖZET	2
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	3
1. GİRİŞ	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Transmissible Venereal Tümör	5
2.2. Matris Metaloproteinazlar	6
2.3. Metaloproteinazların sınıflandırılması	7
2.4. Matris Metaloproteinaz 2 (MMP-2)	8
2.5. Matris Metaloproteinaz 7 (MMP-7)	9
3. GEREK VE YETERLİKLER	11
3.1. Özetleme Teşni	11
3.2. Histopatolojik Yöntem	12
3.3. İmmunohistokimyasal Yöntem	13
4. BULGULAR	14
4.1. Makroskopik Bulgular	14
4.2. Histopatolojik Bulgular	16
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	16
4.3.1. MMP-2 İmmunohistokimyasal Bulgular	18
4.3.2. MMP-7 İmmunohistokimyasal Bulgular	22
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	28
7. KAYNAKLAR	29
8. ÖZETÇİMİZ	31

ONAY

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
Danışman

23.05.2017

Ezgi OĞUŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	<i>i</i>
KABUL ve ONAY	<i>ii</i>
TEŞEKKÜRLER	<i>iii</i>
BEYAN	<i>iv</i>
İÇİNDEKİLER	<i>v</i>
ŞEKİLLER DİZİNİ	<i>vi</i>
TABLolar DİZİNİ	<i>vii</i>
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	<i>viii</i>
TÜRKÇE ÖZET	<i>ix</i>
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	<i>x</i>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Transmissible Venereal Tümör	5
2.2. Matriks Metalloproteinazlar	6
2.3. Metalloproteinazların sınıflandırılması	7
2.4. Matriks Metalloproteinaz 2 (MMP- 2)	8
2.5. Matriks Metalloproteinaz 7 (MMP- 7)	9
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	11
3.1. Örneklerin Toplanması	11
3.2. Histopatolojik Yöntem	12
3.3. İmmunohistokimyasal Yöntem	12
4. BULGULAR	14
4.1. Makroskobik Bulgular	14
4.2. Histopatolojik Bulgular	16
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	18
4.3.1. MMP-2 immunohistokimyasal bulguları	18
4.3.2. MMP-7 immunohistokimyasal bulguları	22
5. TARTIŞMA	25
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	28
7. KAYNAKLAR	29
8. ÖZGEÇMİŞ	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil numarası ve başlığı	Sayfa
Resim 3.2.1: Dokuların trimlenip kasetlere alınması	12
Resim 4.1.1: Dişi bir köpekte vulvada şekillenmiş bir TVT olgusu.	14
Resim 4.1.2: Bir erkek köpekte peniste şekillenmiş TVT olgusu	15
Resim 4.1.3: Arşivdeki bir tümörün formaldehit tespiti sonrası görünümü	15
Resim 4.2.1: Tümöral kitlenin histopatolojik görünümü (ok başları ve hiperemik damarlar (oklar), HE, Bar= 200µm.	16
Resim 4.2.2: Tümöral kitlenin yakından görünümü, hücre kümeleri arasındaki bağ doku demetleri (oklar) HE, Bar= 100µm.	17
Resim 4.2.3: Tümöral kitle (ok başları) ve çevresindeki yangısal hücre infiltrasyonları (oklar), HE, Bar= 100µm.	17
Resim 4.2.4: Tümör hücrelerinin büyük büyütmedeki görünümü, mitotik figürler (oklar) HE, Bar= 50µm.	18
Resim 4.3.1.1: Tümöral kitlede artmış MMP-2 immunoreaksiyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100 µm.	19
Resim 4.3.1.2: Tümöral hücrelerde şiddetli MMP-2 ekspresyonunun (oklar) büyük büyütmedeki görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100 µm.	19
Resim 4.3.1.3: Artmış MMP-2 reaksiyonunun (oklar) yakından görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.	20
Resim 4.3.1.4: Bir başka tümördeki MMP-2 immunoreaksiyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.	20
Resim 4.3.1.5: Artmış MMP-2 immnoreaksiyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.	21
Resim 4.3.1.6: Primer antikor konulmayan MMP-2 negatif kontrol, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.	21
Resim 4.3.2.1: Transmissible venereal tümörde MMP-7 immunoreaksiyonu, pozitif hücreler (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100 µm.	22
Resim 4.3.2.2: Üst resimdeki MMP-7 pozitif hücrelerin (oklar) yakından görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.	23
Resim 4.3.2.3: Bir başka tümördeki MMP-7 pozitif hücrelerin (oklar) görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm	23
Resim 4.3.2.4: Diğer bir tümördeki MMP-7 pozitif hücrelerin (oklar) görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.	24
Resim 4.3.2.5: Primer antikor konulmayan MMP-7 negatif kontrol, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100 µm.	24

TABLolar DİZİNİ

Tablo numarası ve başlığı

Sayfa

Tablo 2.3.1.MMP enzimlerinin substrat özgülüğüne göre sınıflandırılması

8



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

/	: Oran
%	: Yüzde
µm	: Mikrometre
cm	: Santimetre
DAB	: Diaminobenzidine
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
ECM	: Ekstrasellüler matriks yıkımı
GF	: Büyüme faktörü
HE	: Hematoksilen eozin
HIF	: Hipoksi indükleyici faktör
IHC	: İmmunohistokimya
kDa	: Kilodalton
mm	: Milimetre
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MMP-1	: Matriks metalloproteinaz -1
MMP-2	: Matriks metalloproteinaz – 2
MMP-7	: Matriks metalloproteinaz - 7
MMP-9	: Matriks metalloproteinaz – 9
MMP 11	: Matriks metalloproteinaz -11
MMP-14	: Matriks metalloproteinaz – 14
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MT-MMPs	: Membran tipi Matrix metalloproteinazlar
PBS	: Fosfat tamponlu solüsyon
RNA	: Ribonükleik asit
TVT	: Transmissible venereal tümör
TIMP	: Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
UK	: Birleşik krallık
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

Köpek Transmissible Venereal Tümörlerinde MMP-2 ve MMP-7
Aktivitesinin İmmunohistokimyasal Olarak Belirlenmesi

Ezgi OGUŞ

Patoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR – 2017

ÖZET

Bu çalışmada, matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve matriks metalloproteinaz-7'in (MMP-7) köpeklerde Transmissible Venereal Tümörlerde (TVT) ekspresyonlarının incelenmesi amacıyla daha önce teşhis konulmuş olan 20 adet tümör dokusu materyal olarak kullanıldı. Bu dokulara streptavidin-biotin peroksidaz kompleks metot uygulanarak MMP-2, MMP-7 immunoreaksiyonları karşılaştırılmalı olarak incelendi ve sonuçlar semikantitatif olarak değerlendirildi. İmmunohistokimyasal olarak TVT'yi oluşturan hücrelerde MMP-2 ve MMP-7 aktivitesinde artış şekillendiği gözlemlendi. Bu sonuç, MMP-2 ve MMP-7'in TVT patojenezinde önemli bir rol oynadığını gösterdi.

Anahtar kelimeler:Transmissible venereal tümör, immunohistokimya, MMP-2, MMP-7.

**Mehmet Akif Ersoy University
Institute of Health Science**

Master of Science Thesis

**Immunohistochemical Determination of MMP-2 and MMP-7
Expression in Transmissible Venereal Tumor in Dogs**

Ezgi OGUŞ

Department of Pathology

Supervisor

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR – 2017

ABSTRACT

In this study previously TVT diagnosed 20 dogs tissues were used as material for to examine MMP-2 and MMP-7 expressions. Streptavidin-biotine-peroxidase technique was used for these tissue for MMP-2 and MMP-7 expressions were comparatively examined and results were evaluated semiquantitatively. Immunohistochemically, MMP-2 and MMP-7 activity were increased in TVT cells. This result showed that MMP-2 and MMP-7 in TVT pathogenesis.

Key words: Transmissible venereal tumor, immunohistochemistry, MMP-2, MMP-7.

1.GİRİŞ

Tümör, canlıda hücrelerin otonomi kazanması ile kontrolsüz bir şekilde durmaksızın çoğalarak oluşturduğu, normal dokulara göre gelişmesi daha hızlı ve neden ortadan kaldırıldıktan sonra dahi çoğalmasını sürdürebilen yeni bir doku (neoplazi) oluşumudur (11). Hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu şekillenen kanser, kötü huylu tümörleri ifade eden bir terimdir. Hücrede sinyal iletimi, hücre döngüsünün ve apoptozisin düzenlenmesi gibi işlemlerde anahtar görev üstlenen pek çok proteinin işlevi ilk defa hücrenin bu kontrolsüz çoğalmasına sebep olan normal olmayan aktiviteleri nedeniyle tanımlanabilmiştir (4). Oluşan bu yeni dokular biyolojik davranışlara göre malign (kötü huylu) veya benign (iyi huylu) karakterli olmak üzere iki grupta sınıflandırılırlar (11,18). Bulunduğu organ içinde kısıtlı bir şekilde büyüyen iyi huylu tümörler, çoğunlukla sınırlı üremelerdir. Bunlar bazen konakçıda bazı fonksiyonların bozulmasına neden olsalar bile negatif etkileri çoğunlukla azdır. Kötü huylu tümörlerin ise en belirleyici özelliği hızlı bir şekilde büyümesi, çevre dokulara invazyonu ve özellikle uzak dokulara metastaz yapmalarıdır. Tümörler kendilerini meydana getiren hücre tipi ve biyolojik davranışlarına göre isimlendirilirler. Tümörögenезis, öldürücü olmayan hücrese DNA hataları ya da değışikliklerin sonucunda oluşan çok aşamalı bir süreçtir (28,45). Hücrese genom hasarları tümörlerin ortak meydana geliş sebebidir ve bu oluşan hasarların başlıca nedenleri arasında çeşitli kimyasallar, virüsler, radyasyona maruz kalma ve canlı etkenler sayılabilir. Genellikle kanserler bu faktörlerden kaynaklanan hücre mutasyonlarının şekillenmesiyle oluşmaktadır (27). Tümörlerde ölüm oranının büyük kısmı, primer tümörden çok metastazların görülmesi sebebiyle şekillenmektedir. Karsinogenez, tümör oluşumu ve metastazları dahi kapsayan dört başlıkla basamaklandırılmış olup bu durum Darwinci süreci olarak tanımlanmaktadır (8).

Bu basamaklar sırasıyla Şu Őekildedir.

1.Primer tümör oluşumu ve büyümesi: Primer tümörün meydana geliŐinde kontrollü hücre ölümü baskılanarak mitotik hücreler normal olmayan Şekilde bölünür ve daha sonra tümör oluşturan mekanizmaların oluŐmasına sebep olur. Primer tümör belirli bir büyüklüğe eriŐtiĐinde DNA'sı deĐiŐen hücrelerin bölünme hızı daha da artmaktadır ve bu sebeple besin ve oksijen gereksiniminde arttığı bildirilmiştir. Artan bu gereksinim sonucu hipoksi indükleyici faktör (HIF) ile tetiklenen neovaskülarizasyon olayı baŐlatılır. HIF'ler büyüme faktörü (GF) ekspresyonuyla vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiopetin 1 ve 2'nin sentezini uyarmaktadırlar (8,35).

2.Epitel-mezenkimal transformasyon ve intravazasyon: Pleiotropik etkileŐimler,artan anjiogenin ekspresyonu ve HIF'lerin aktivasyonu sonucunda E-kaderinin ekspresyonunda azalmaya sebep olmaktadır. E-kaderinin azaltılan ekspresyonu sonucunda hücre-hücre adezyonu azalır ve bu daha sonra tümör hücresinin hareket yeteneğinin artmasına neden olmaktadır (22, 35). Bu durum ise intravazasyon olarak adlandırılır ve kanserli hücrelerin metastazının baŐlamasına sebep olmaktadır (37).

3.Hematojen yayılma: Sekonder tümör hücrelerinin geŐtiĐi lenf damarlarının bağlı olduğu lenf düğümlerinden bağımsız olarak oluşmaktadır. Yapısı deĐiŐmiŐ kanserli hücreler dolaŐıma katıldığında anormal hücre-matriks etkileŐimine sebep olmaktadır. Kanser hücreleri dolaŐımdayken çoğalmazlar, normal olan hücrelerden farklı boyut ve adezyon özelliklerine bağlı olarak kapillar kısımlarda durdurulmalarına kadar dolaŐımda sirküle olmaktadır (16).

4.Ekstravazasyon ve sekonder tümör oluşumu: Kapillar kısımda tutulan tmrl hücreler endotel tabakaya tutunarak interstisyum, intersellüler boŐluk ve parenkimi geŐip sonrasında hedef doku veya organa ulaşmaktadır (14,19). Daha sonra bu kanserli hücreler mezenkimal-epitelyal deĐiŐime uğrayarak fenotipik yapılarını deĐiŐtirirler (16).

Hem beŐeri hekimlik hem de veteriner hekimlikte ve günümüzde de önemini koruyan kanser ciddi bir araştırma konusudur. Kanser konusundaki çalışma ve projeler en fazla desteklenen ve ilgi çekenler arasında yer almaktadır.

Kanserle ilişkili olan onkogenez mekanizmaları, viral etkenlerle hücrelerin kontrolsüz ve anormal şekilde büyümesine neden olmaktadır. DNA ve RNA virusları kansere sebep olan viruslar arasında yer almaktadırlar ve bütün RNA tümör virusları, retroviruslar ailesinde yer almaktadır (41).

Kanserde biyokimyasal belirleyiciler, farklı metabolitlerin yanı sıra DNA, mRNA ve bazı protein yapıları olabilmektedir. Dahası apoptozis, anjiogenezis ve proliferasyon da kanserde biyokimyasal belirteçler olarak kullanılabilir. Bu belirteçler tümörün kendisi tarafından veya diğer dokulardan sentezlenebilir. Belirteçler canlının sıvılarında, doku veya hücre dizilerinde bulunabilir. Klinik olarak bu belirteçlerin kullanım amaçları farklıdır ve şu şekilde sıralanabilir:

- 1.Kanserin sınıflandırılması
- 2.Tümörün büyüklüğünün anlaşılması
- 3.Semptomatik hastaların teşhislerindeki varyasyon durumlarında
- 4.Tedaviye verilen yanıtın analizinde
- 5.Hastalığın nüksünün tayin edilmesinde
- 6.Hastalığın ilerlemesinde prognoz indikatörü olarak
- 7.Genel popülasyonun tahmin edilmesinde

Tümör belirteçleri enzim, hormon, glikoprotein, onkofetal antijen, monoklonal immüoglobulin, reseptör, onkogen, plasental protein, karbonhidrat ve supresör gen yapılarında olabilmektedir. Bunların yanı sıra küçük çaptaki sıralanma değişimleri de belirteç görevi üstlenebilmektedir (25).

Transmissible venereal tümör (TVT) tüm dünyada köpeklerde görülen kronik, bulaşıcı ve tümöral bir hastalıktır. TVT çoğunlukla köpeklerin ekstragenital organlarında gözlenmektedir. Genellikle çiftleşme ile bulaştığı bildirilmesine rağmen enfekte genital organların yalanması veya koklanması sonucu da bulaştığı bilinmektedir. Tümöral kitleler de nodüler, düzensiz ve frajil yapılar görülmesinin yanı sıra ülserasyon da görülebilmektedir. Tümör makroskopik olarak karnabahar görünümündedir ve bazen nodüler, papiller veya multilobüler şekillerde

deolabilmektedir. Tümör özellikle köpeklerin kalabalık gruplar halinde ve serbestçe dolaşabildiği ılıman iklime sahip bölgelerde daha sık görülmektedir. Kitlelerin sitolojik incelemesinde yuvarlak, oval veya poligonal şekilli, hiperkromatik nükleuslu, eozinofilik ve vakuoler bir sitoplazma ile çekirdek sitoplazma oranının çekirdek lehine artmış hücrelerden oluştuğu görülebilir. Transmissible venereal tümörde lokal invazyon olguları yaklaşık %40'ında görülmesinin yanı sıra metastaz vakaların %5'in altında olduğu bildirilmektedir. Tümör lenf düğümleri, burun, göz, dudaklar, deri, tonsiller, göğüs, beyin, karın duvarları, uterus ve ovaryumlara metastaz yapabilir (33).

Bu çalışmada, köpeklerde doğal olarak şekillenmiş transmissible venereal tümörlerde immunohistokimyasal olarak MMP-2 ve MMP-7 enzimlerinin incelenmesi ve bu belirteçlerin tümörün patogeneziindeki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Transmissible Venereal Tümör

Transmissible venereal tümör, köpeklerin çoğunlukla eksternal nadiren internal genital organlarına yerleşen genellikle iyi huylu retikuloendotelial kökenli bir tümördür(17). Köpeklerde TVT, sticker sarkom, venereal granuloma, transmissible lenfosarkom ve kontagiöz venereal tümör adlarıyla da bilinmektedir (44). Tümör sağlıklı hayvanlara hasta olanlardan hücre nakli (çiftleşme) yoluyla aktarılmaktadır. Genellikle penis ve vagina mukozasını etkilemektedir. Tümör, küçük yaşta olan, vücut direnci zayıf ve immunsupresif köpeklerde daha agresif ve metastazik olabilmektedir. Genital yerleşiminin yanı sıra tümör, ekstragenital organlarda da %5 oranında görülebilmektedir. Bu yerleşim ya genital form ile birlikte ya da sadece ekstragenital form şeklinde olabilmektedir. Ekstragenital lokalizasyonlar koklama, yalama veya ısırma esnasında direkt temasla oluşmaktadır fakat bu lokalizasyonlara oral ve nazal boşlukta çok daha nadir rastlanılmaktadır (9).

Daha çok çiftleşme yoluyla bulaştığı bilinen TVT genç ve seksüel açıdan aktif olan hayvanlarda şekillenmektedir. Bu hastalık genellikle 2-8 yaşlı hayvanlarda görülmekte (%80) olup dişilerde (%64.5) erkeklere (%35.5) oranla daha sık meydana gelmektedir. Oluşumu konusunda günümüzde savunulan ortak görüş, TVT' nin allogenik hücrel transplantlarla meydana geldiği yönündedir. Pembeden kırmızıya kadar değişik renkte olabilen bu tümörler transplantasyondan 2-3 hafta sonra 1-3 mm çapında gözlemlenmektedir ve eğer zamanında tedavi edilmez ise 10-15 cm çapına kadar ulaşmaktadır. Özellikle büyük kitleler hemorajik, ülserli ve enfekte olabilirler. Tümör, erkek köpeklerde özellikle, glans penisin kranialinde, prepusium mukozasında veya bulbus peniste görülmektedir. Tümöral kitle genellikle prepusiumdan taşmıştır ve phimosis ile komplike olabilmektedir. Bu nedenle de üretritis, sistitis ve prostatitis ile karışabilir. Anemnez bilgileri ve klinik muayene TVT şüphesini akla getirirse bile kesin teşhis, alınan kitlenin histopatolojik muayenesi, alınan smearların incelenmesi ya da elektron mikroskopta virüs projeksiyonlarının görülmesiyle konulabilmektedir. Sitolojik incelemelerde yuvarlak ya da oval polihidral hücreler, daha çok eozinofilik vakuollü ince sitoplazma, yuvarlak hiperkromatik nükleus ile belirgin nükleolus ve çok sayıda mitotik figürler

dikkati çeker. Ayrıca çekirdek sitoplazma oranı çekirdek lehine artış göstermektedir (17).

TVT yerleşim yeri sebebiyle ilk evrelerde boyu çok küçük olduğundan fark edilmeyebilir. Büyüdükçe ve klinik bulgular belirginleştikçe fark etmek daha kolay olmaktadır. Tümörün genital organ çevresine yerleşmesi ve karnabahar görünümü tipik özelliğidir. Bununla beraber kanlı bir akıntı ve kanlı idrar görülebilir (3).

2.2.Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMP) yaklaşık olarak 28 enzimden oluşan, doku yıkımında önemli yere sahip ekstrasellüler proteazlardır. Matriks metalloproteinazlar, keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, lökositler, düz kas hücreleri, kondrositler gibi epitelyal ve mezenkimal kökenli hücreler tarafından sentezlenmektedirler. Çoğu MMP embriyogenez evresinde yaygın şekilde eksprese edilmektedir. Yetişkinlerde ise endometriyumda, plasentada, meme bezlerinin involüsyonu esnasında ve yangıda hızla eksprese edilmektedirler. Doku gelişiminde, farklılaşmasında, yeniden şekillenmede, ovulasyon, hücre göçü, anjiogenez ile tam olarak mekanizmaları bilinmese de pek çok hastalığın patolojisinde MMP'ler önemli yere sahiptirler (31).

Matriks metalloproteinazlar; matriksin ve ekstrasellüler matriksin hidrolize komponentleri olarak da gösterilmektedirler (5,12) . Günümüze kadar insanda 24 adet MMP sınıflandırılmış olup, bunların çoğu farklı etkilere sahip proteinler olarak; matriks komponentlerine yapışmaları, aktivasyon göstermek için çinko iyonuna bağlanmaları, etki göstermeden önce bölünmeyle aktivasyon ihtiyacı, aile üyeleri arasında özel aminoasit dizilerinin korunması, metalloproteinazların endojen doku inhibitörleriyle (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP)) enzimatik aktivitelerindeki azalmalarına göre tanımlanmaktadır (7, 12, 29). Bu proteinler; normal doku yapımı, büyüme ve anjiogenez gibi birçok biyolojik süreçte merkezi rol oynamaktadırlar. Ayrıca aterom, artrit, kanser ve doku ülserasyonu gibi hastalıklarda yara iyileşmesi sürecinde önemli rol üstlenmektedirler (12,43). Ekstrasellüler matriks yıkımı, değişik fizyolojik ve patolojik durumlarda şekillenebilmektedir. ESM ve bazal membran yıkımında başlıca dört grup enzim rol oynar. Bunlar

- 1- Sistein proteazlar
- 2- Aspartik proteazlar
- 3- Serin proteazlar
- 4- Metalloproteazlar'dır.

Tüm bu gruptaki proteolitik enzimlerin tümör yayılımı ve metastaz süreçlerinde görev alabilmelerine karşın, serin proteazlardan MMP'lerin daha aktif rol oynayabilecekleri ortaya konmuş bulunmaktadır (6,20,32).

MMP'ler nötral endopeptidaz enzim ailesine dahil olup, ekstrasellüler matriksin (ECM) tüm üyelerini parçalama özelliğine sahiptirler (1,32). Tamamı proenzim olarak kondrositler,osteoblastlar, fibroblastlar, endotel hücreleri, nötrofiller, makrofajlar gibideğişik hücrelerden salgılanmaktadırlar. MMP'ler, kemiğin remodelizasyonu,yara iyileşmesi, uterus ve meme dokusu fizyolojik fonksiyonları, embriyo implantasyonu, embriyogenezis,ovulasyon, laktasyon gibi fizyolojik süreçlerde yer almasına ek olarak tümör hücrelerinin invazyonu ve metastaz gibi patolojik olaylarda da rol oynamaktadırlar. Kanser olgularında ECM tümör dokusunun büyümesi ve tümör hücrelerinin yayılımına engel olmak için primer bir bariyer olarak görev yapmaktadır. Malign tümörler bu bariyeri aşmak için metalloproteazları kullanırlar (1, 32).

2.3.Metalloproteazların sınıflandırılması

Son yıllarda MMP'ler üzerine yapılan çalışmalar oldukça hızla artmış bulunmaktadır. MMP ailesinin önceden tanımlanmış 7 üyesi vardı fakat yeni keşfedilen metalloproteazların bunlara eklenmesi ile sayıları giderek arttığı görülmektedir. Son çalışmalara göre insanlarda MMP ailesi içinde en az 18 üye bulunmaktadır. Metalloproteazların farklı kişiler tarafından keşfi, oldukça karışık bir adlandırma sistemine neden olmuş ve bu nedenle MMP ailesinin üyelerinin her biri birden fazla isimle adlandırılmıştır (1).

MMP'ler substrat spesifitesine göre şu şekilde sınıflandırılabilir (1, 32, 36).

Tablo 2.3.1. MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre sınıflandırılması

Grup adı	Tanımlayıcı isim	Numara	Temel substrat
Kollajenazlar	intertisyel kollajenaz	MMP-1	Kollajen 1,2,3,7,10,jelatin,Proteoglikan(PG)
	Nötrofil kollajenaz	MMP-8	Kollajen 1,2,3,PG
	Kollajenaz-3	MMP-13	KollajenTip1,2,3, PG
	Kollajenaz-4	MMP-18	Kollajen Tip1,2,3, PG
Jelatinazlar	Jelatinaz A	MMP-2	Jelatin,kollajen 4,5,7,10,11,elastin
	Jelatinaz B	MMP-9	Jelatin,kollajen 4,5,14,elastin, PG
Stromelisinler	Stromelisin 1	MMP-3	PG,laminin, jelatin, kolajen 3,4,9,10
	Stromelisin 2	MMP-10	PG,laminin, FN, jelatin, kolajen 3,4,9,10
	Stromelisin 3	MMP-11	PG,laminin,elastin, jelatin, kollajen3,4,9,10
Membran tipi	MT1-MMP	MMP-14	Kollajen1,2,3, FN,laminin, Vitronektin
MMPler	MT2-MMP	MMP-15	Agrekan, FN,laminin, tenaksin
(MT-MMPler)	MT3-MMP	MMP-16	Kollajen 3, FN, jelatin
	MT4-MMP	MMP-17	Jelatin
	MT5-MMP	MMP-24	PG
	MT6-MMP	MMP-25	Kollajen 4, fibrin, fibronektin, jelatin

2.4.MatriksMetalloproteinaz 2 (MMP- 2)

Matriks metalloproteinazlar invazyon ve metastaz ile epitelyal mezenkimal değişim aşamasında rol almaktadırlar. MMP'ler aktivitelerinin artmasına ek olarak invazyon boyunca belli bir bölgede lokalize olmaktadır. Ekstraselüler matriksin parçalanması için MMP-2, MMP-9, MMP-14 birlikte çalışırlar (32).

Gelatinaz A olarak da bilinen MMP-2'nin latent formu 72 kDa, aktif formu 66 kDa ağırlığındadır (1, 38). Tip IV kollajeni, gelatini, ek olarak Tip V, VII, X, kollajeni, elastin ve fibronektini, laminini parçalamaktadır (13). Kolon, pankreas, mesane, prostat, deri kansinomlarında, meme ve over kanserinde ve hemen tüm kanser tiplerinde tümör stromasına lokalize olarak görülmektedir (1). Ayrıca membran tipi MMP'ler (MT-MMPs); gelatinaz A aktivasyonunda rol almakta olup, bu aktivasyon tümör hücrelerinin göçü için önemlidir(1,36).

MMP'ler vaskularizasyonda önemli role sahiptir. MMP-1 ve MMP-7 daha az oranda etkili olurken; MMP-2, MMP-9 ve MMP-14 tümör vaskularizasyonun da başlıca rol oynamaktadırlar (2,32).

Mesane kanserli hastalarda kanser belirteçlerinin büyük bir kısmı idrarda ölçülmektedir. İdrar MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri mesane kanserinin varlığı ile korele olduğu gibi kanserin derecesi ve evresi ile de korele olmaktadır.

MMP-2, 9, 15 ve 26'nın doku ekspresyonu ya da serum düzeyinin prostat kanserinde Gleason skoru ile pozitif korelasyonu olduğu ortaya konmuştur. Bunlar arasında plazma MMP-2 ve 9 düzeyleri metastatik prostat kanserlerinde önemli düzeyde artış göstermektedir. Bu iki enzimin tedaviden sonra önemli düzeyde azalma göstermesi sebebiyle tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılabilir (32).

MMP-2 ve 9'un agresif beyin kanserlerinde artış gösterdiği rapor edilmiştir. MMP-2 doku ekspresyonundaki artışla kısalmış yaşam süresi arasında negatif korelasyon bildirilmiştir. MMP-2, 9 ve 14, over kanserleri arasında en sık çalışılan belirteçler arasında bulunmaktadır. MMP-2 ile over kanseri progresyonu arasında negatif korelasyon olup, MMP-2 düzeyleri yüksek bulunan hastalarda peritoneal implant ve ölüm riskinde artış olduğu tespit edilmiştir. Pankreatik sıvıda aktif MMP-2 düzeyleri pankreatik kanserli hastalarda kronik pankreatitli hasta ve sağlıklı bireylerde yüksek düzeyde tespit edilmiştir (32).

2.5.Matriks Metalloproteinaz 7 (MMP- 7)

Ek metalloproteinaz olarak da bilinen bu molekülün latent formu 28 kDa, aktif formu 19 kDa ağırlığındadır (1, 10). Metalloproteinaz ailesinde stromelysinlerin bir alt grubu olarak bilinmekte ve gelatin, elastin, fibronektin, laminin, entaktini parçalama özelliği nedeni ile stromelysinlere benzer geni substrat spesifitesi göstermektedir. Matriks metalloproteinaz ailesinin üyesi olan MMP-7 hücre dışı matriks bileşenlerine karşı geniş bir substrat özgüllüğüneek olarak efektör fonksiyonlarını değiştirmek için çeşitli hücre yüzeyi proteinlerini parçalamaktadır. İleri klinikopatolojik evreler ve olumsuz prognoz ile yakın ilişki içinde bulunmaktadır (21).

Matrilysin (MMP-7); mide, meme, prostat ve kolorektal kanser tiplerinde artmaktadır. Tüm tümör hücrelerinde bu artış yeni oluşan hücrelerde saptanmaktadır. Kolorektal kanserde artmış matrilysin düzeyleri tümörün geç evresi ile ilişkilendirilmektedir. Bazal hücreli karsinomların malign tümörler oldukları ve sıklıkla metastaz yapmadıkları bilinmektedir ve bu tümörlerde dematrilysin düzeyinde artış olmayışı matrilysin'in tümör progresyonunda önemli rol oynadığına bir kanıttır (1). Pankreatik duktal karsinomlu hastalarda plazma ve tümör dokusu MMP-7 düzeyleri yükselmiş olup kısa sağ kalım süresi ile ilişkili olmaktadır (32).

Bu çalışmanın amacı köpeklerde TVT olgularında MMP-2 ve MMP-7 ekspresyonlarının immunohistokimyasal olarak incelenmesi bu belirteçlerin tümör gelişimi ile ilgisinin ve patogenezindeki önemini belirlemektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmamızda kullanılan TVT dokuları Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden ve çalışma süresince inceleme için getirilen tümörlerden temin edildi. Bu çalışmada değişik ırk, cinsiyet ve yaşlarda ki köpeklerden elde edilen 20 adet TVT dokusu kullanıldı.

3.2. Histopatolojik Yöntem

Teşhis için özel kliniklerden veya fakültemiz kliniklerinden getirilen tümöral kitleler %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi (resim3.2.1-4.1.3). Trimlenen tümöral doku parçaları takip kasetlerine alındı. Akarsu altında 1 saat yıkanan kasetler doku takip cihazına takıldı ve gerekli ayarlamalar yapılarak dokuların gece boyunca düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere (%70'den %100'e) geçirilerek yumuşak dokuda bulunan sularının alınması, iki adet ksilolden geçirilerek organlardaki yağın alınması ve sıcak parafinden geçirilerek doku boşluklarına parafin dolması sağlandı. Doku örneklerinin rutin patolojik takibinde Leica ASP300S model ototeknikon kullanıldı. Ertesi gün sabah dokular parafine gömülerek blokajları yapıldı. Blokların 4-5 saat soğutulmanın ardından Leica 2155 rotary mikrotomda, 5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Normal lama alınan kesitlei hematoksilin eozin ile boyandı. İmmun histokimyasal olarak MMP2 ve MMP7 aktivitesi incelenmesi için de polilizinli lamlara iki takım seri kesit alındı.

Normal lamlara çekilen doku kesitleri parafinin uzaklaştırılması için 30'ar dakika süre ile 3 ayrı ksilol serisinden geçirildi. Ardından sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik alkollerden geçirilerek dokulara su verildi. Daha sonra hematoksilinle 15 dakika ve ardından eozinle 3 dakika boyandı. Bunun ardından sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkollerden geçirilen dokuların suyu alındı. Ksilolde parlatılan dokuların üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı ve mikroskop altında incelendi.



Resim 3.2.1: Dokuların trimlenip kasetlere alınması

3.3. İmmunohistokimyasal Yöntem

Polilizinli lamlara çekilerek hazırlanan 2 ayrı seri kesit immunoperoksidaz yöntem için streptavidin-biotin-peroksidazkompleks yöntemine göre boyandı. İmmunohistokimyasal inceleme için Abcam (UK) firmasının hazır kitleri kullanıldı. Kesitler MMP-2 [Anti-MMP-2 antibody (ab110186), Abcam, 1/100 dilüsyon] ve MMP-7 [Anti-MMP-7 antibody (ab5706), Abcam, 1/100 dilüsyon] reaksiyonunun saptanması için immunohistokimyasal olarak boyandı. Bu amaçla kesitler ksilol ve dereceli alkollerden geçirilerek deparafinize ve rehidre edildi. Dokular 10 dakika süreyle suda yıkandı. Daha sonra dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla kesitler %3'lük metanoldeki hidrojen peroksit ile 20 dakika muamele edildi. Dokular 2 defa 10'ar dakika süreyle phosphate buffered saline (PBS)'de yıkandı. Daha sonra nonspesifik boyamaları önlemek amacıyla normal serumda 45 dakika süreyle tutuldu. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadan primer serumlar uygulandı ve oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Ertesi gün dokular aynı şekil ve süreyle PBS'te yıkandı, takiben streptavidin ile 30 dakika süreyle muamele edildi ve PBS'te 2 defa 10'ar dakika yıkandı. Bu işlemden sonra dokular biotinli

serum ile 30 dakika süreyle inkübe edildi. Dokular aynı şekil ve süreyle yıkandı, hazırlanmış olan DAB (3,3 diaminobenzidine) kromojen ile boyandı. Sekonder kit olarak Abcam firmasının EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kiti (ab80436) kullanıldı. Karşıt boyama amacıyla Harris hematoxilen kullanıldı ve preparatlar ışık mikroskopunda incelendi. Negatif kontrol için kesitlere primer antikor konulmadan aynı yöntemle göre boyama yapıldı.

Sonuçların fotoğraflanmasında Olympus CX41 model mikroskop ile morfolometrik inceleme ve mikrofotografi için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Köpeklerin yaşları 6 ay ile 2 yaş arasında değişiyordu. Çalışma materyalini oluşturan köpeklerin 12 tanesi dişi 8 tanesi erkekti. Tümörlerin boyutları 1x1x1 cm'den 8x5x6 cm'ye kadar değişiyordu.

Tümöral kitleler yumuşak kıvamlı ve genellikle üst yüzeylelerinin kanamalı olduğu görüldü (resim 4.1.1-4.1.2). Bazı büyük tümörlerde nekroze alanlara da rastlandı.



Resim 4.1.1: Dişi bir köpekte vulvada şekillenmiş bir TVT olgusu.



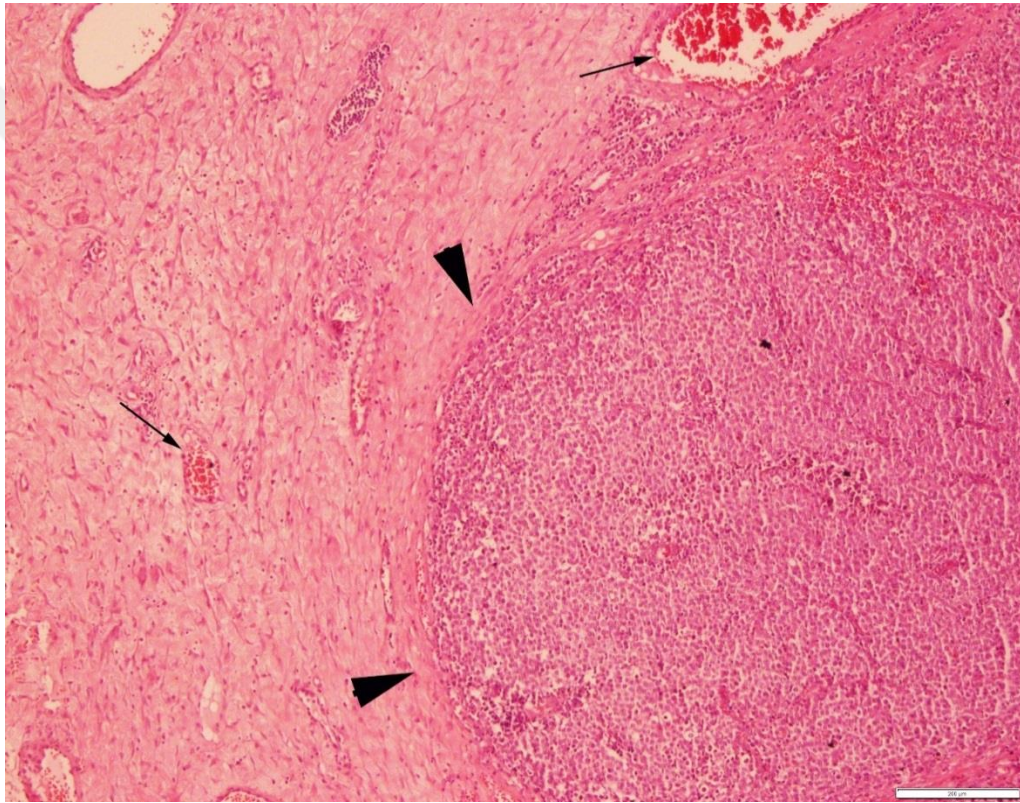
Resim 4.1.2: Bir erkek köpekte peniste şekillenmiş TVT olgusu



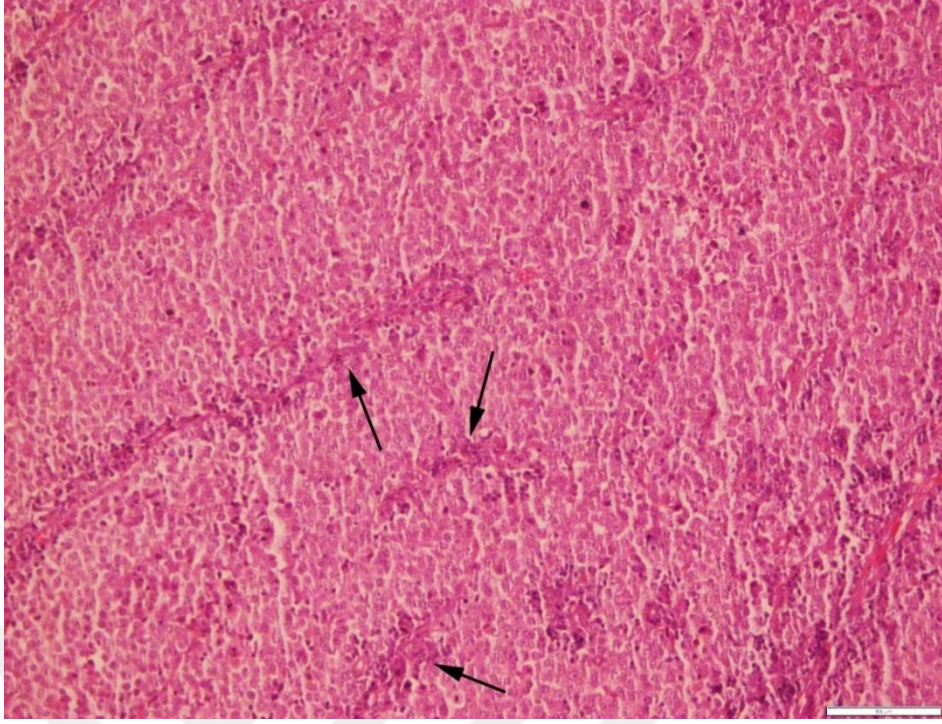
Resim 4.1.3: Arşivdeki bir tümörün formaldehit tespiti sonrası görünümü

4.2. Histopatolojik Bulgular

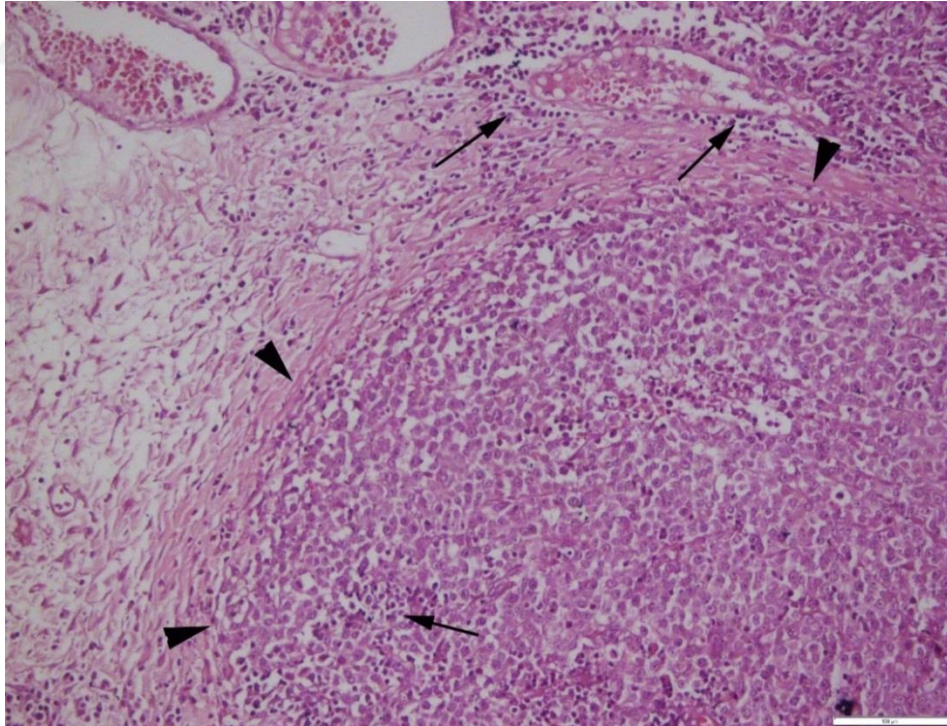
Tümörlerin mikroskopik incelemesinde tümörün oval yuvarlak şekilli, veziküler ve büyük çekirdekli hücrelerden oluştuğu görüldü. Bazı tümörlerde mitotik aktivitenin arttığı, bazı tümörlerde ise nekroz ve kanamanın ön planda olduğu dikkati çekti. Damarlar oldukça hiperemikti, özellikle küçük tümörlerde daha belirgin olmak üzere mononükleer seriden yangı hücrelerine rastlandı (Resim 4.2.1-4.2.3).



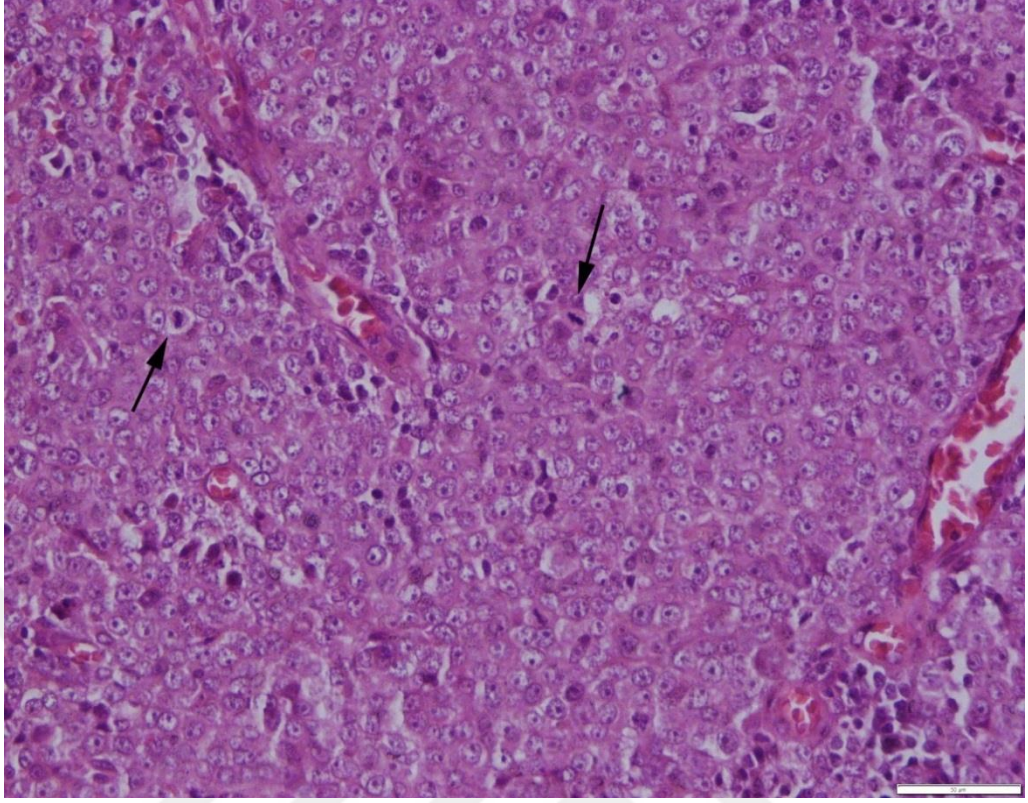
Resim 4.2.1:Tümöral kitlenin histopatolojik görünümü (ok başları ve hiperemik damarlar (oklar), HE, Bar= 200µm.



Resim 4.2.2: Tümöral kitle mikrosobik görünümü, hücre kümeleri arasındaki bağ doku demetleri (oklar) HE, Bar= 100µm.



Resim 4.2.3: Tümöral kitle (ok başları) ve çevresindeki yangısal hücre infiltrasyonları (oklar), HE, Bar= 100µm.

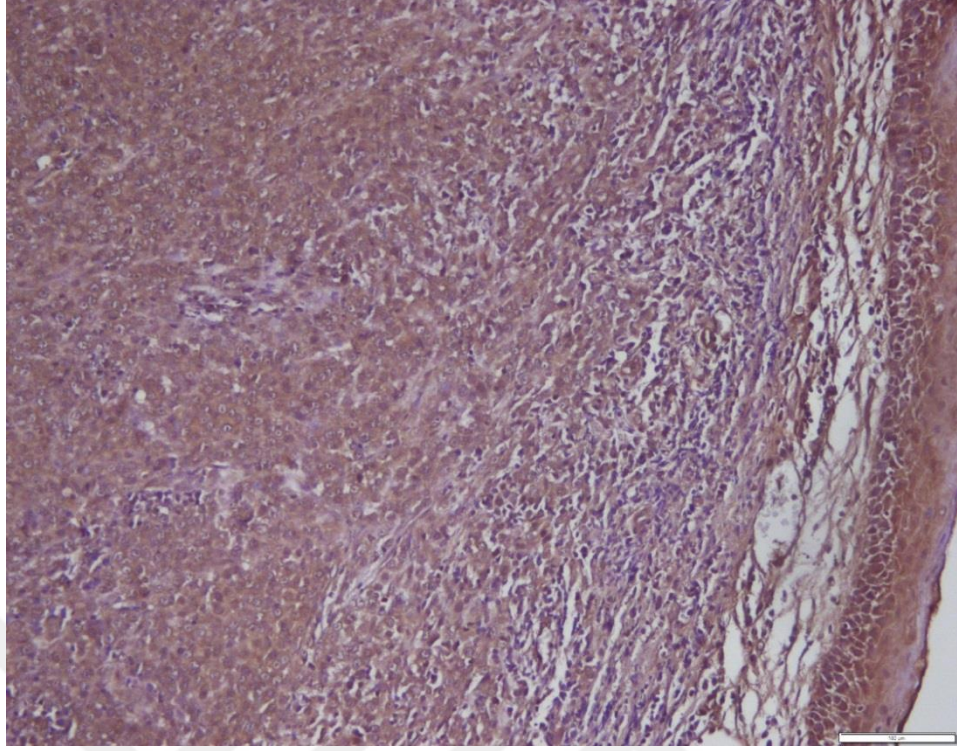


Resim 4.2.4:Tümöral hücrelerin büyük büyütmedeki görünümü, mitotik figürler (oklar) HE, Bar= 50µm.

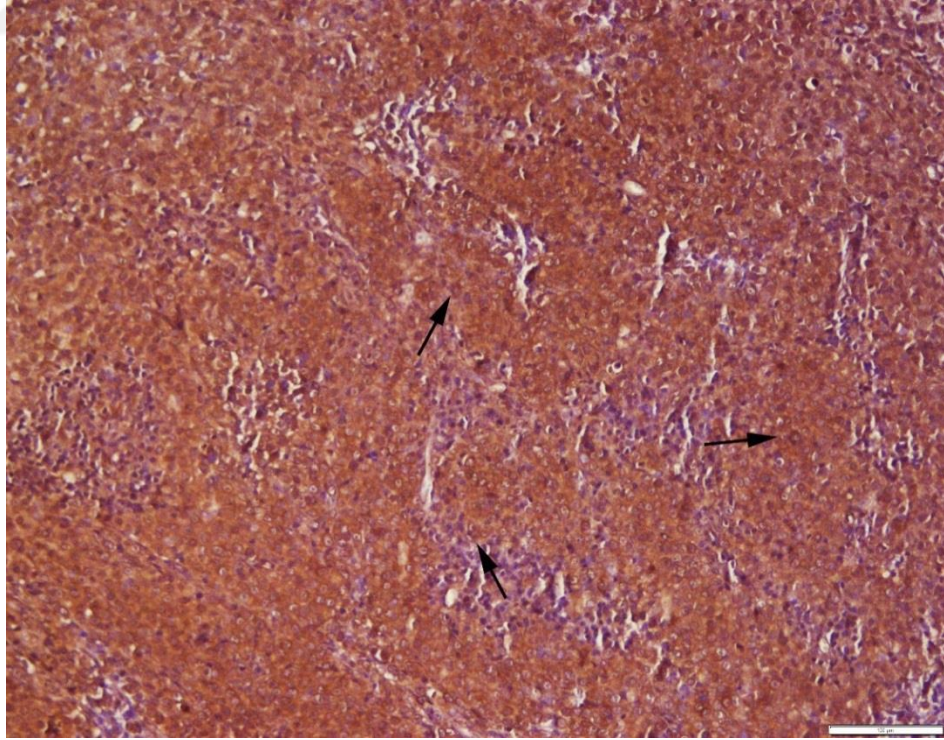
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.3.1. MMP-2 immunohistokimyasal bulguları

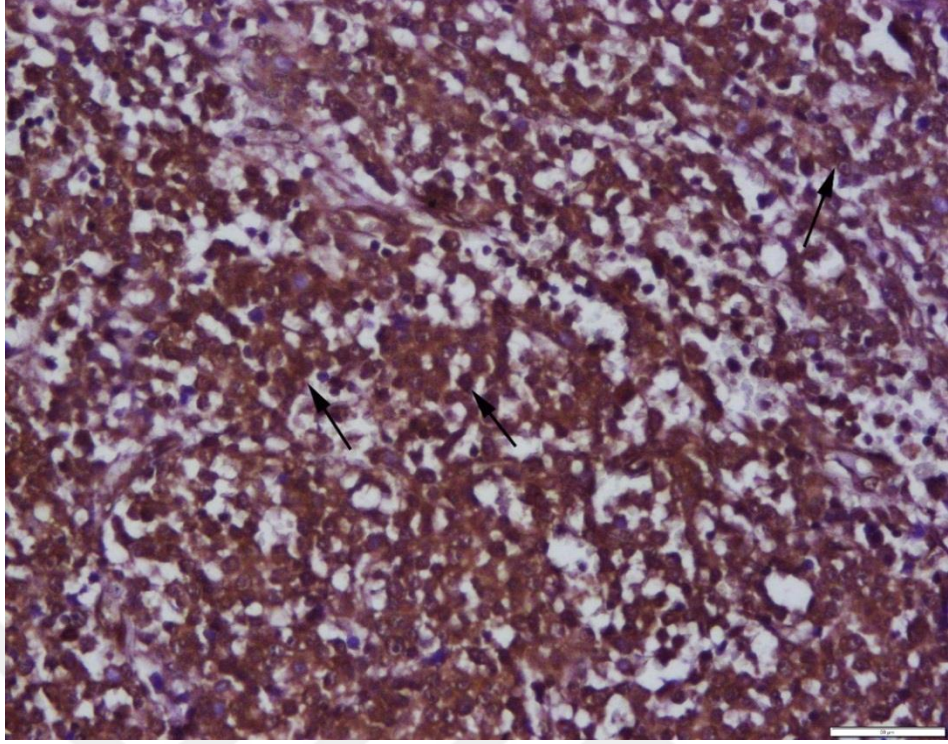
MMP-2 ile immunohistokimyasal olarak boyanan kesitlerin incelemesinde özellikle büyük kitlelerde daha belirgin olmak üzere ekspresyonun arttığı dikkati çekti. Özellikle tümöral hücreler başta olmak üzere aktivite artışına bağ doku ve tümörün üzerini kaplayan epitel hücrelerinde de rastlandı. Tümör hücrelerinde sitoplazmik olarak MMP-2 ekspresyonlarını belirgin şekilde arttığı dikkati çekti (Resim 4.3.1.1-4.3.1.5). Primer antikor damlatılmayan negatif kontrollerde ise boyanma saptanmadı (Resim 4.3.1.6).



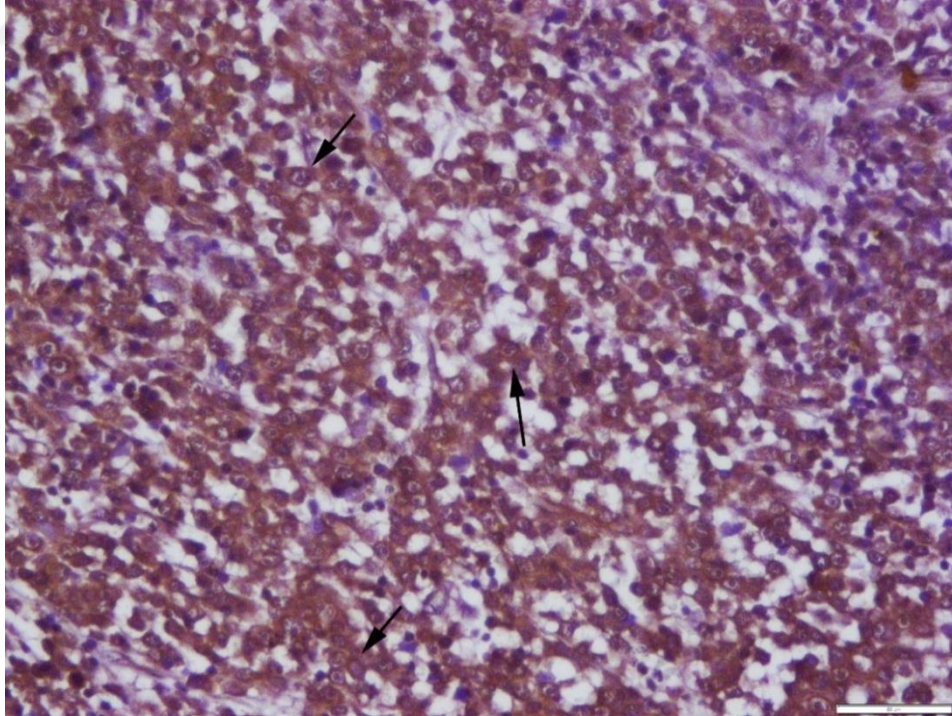
Resim 4.3.1.1:Tümöral kitlede artmış MMP-2 immunoreaksiyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100 μ m.



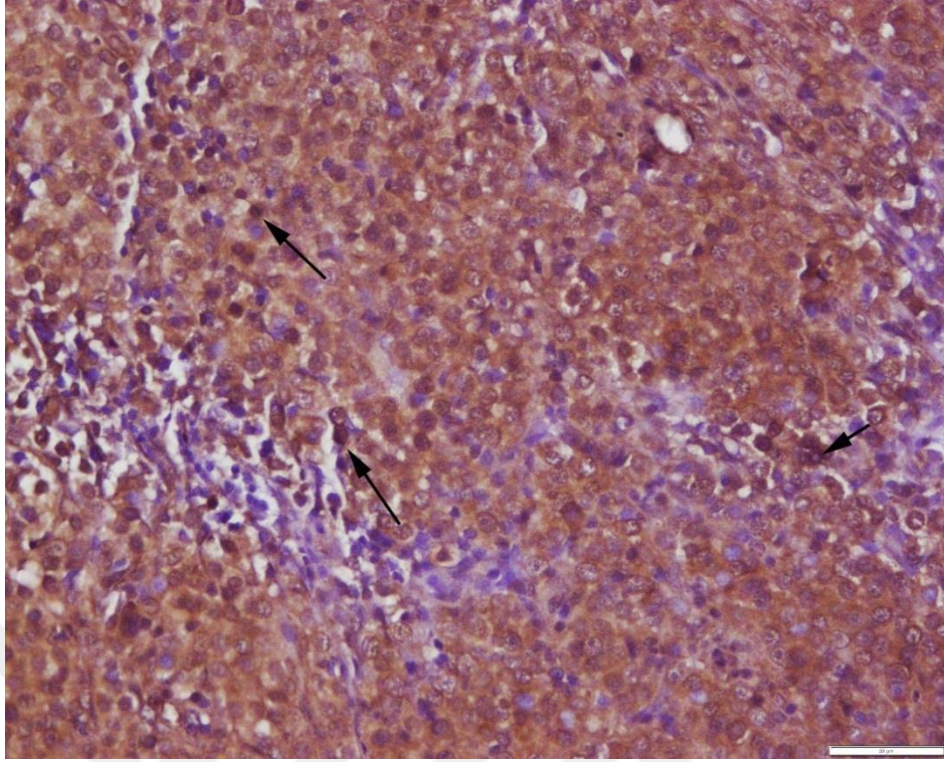
Resim 4.3.1.2:Tümöral hücrelerde şiddetli MMP-2 ekspresyonununun (oklar) büyük büyütmedeki görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100 μ m.



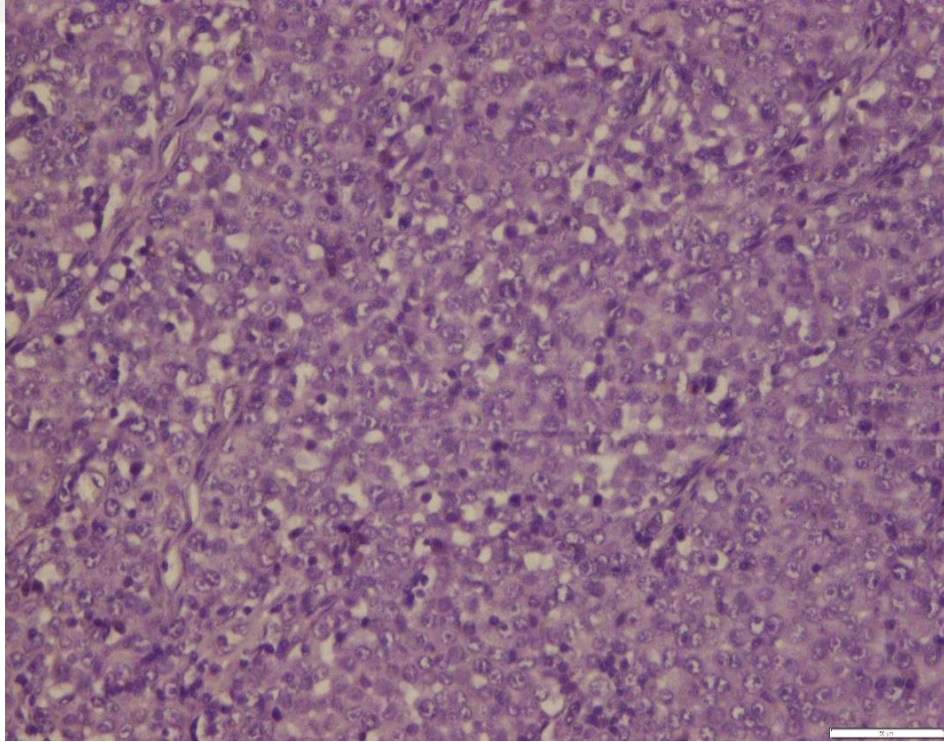
Resim 4.3.1.3: Artmış MMP-2 reaksiyonunun (oklar) yakından görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.



Resim 4.3.1.4: TVT, MMP-2 immunoreaksiyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.



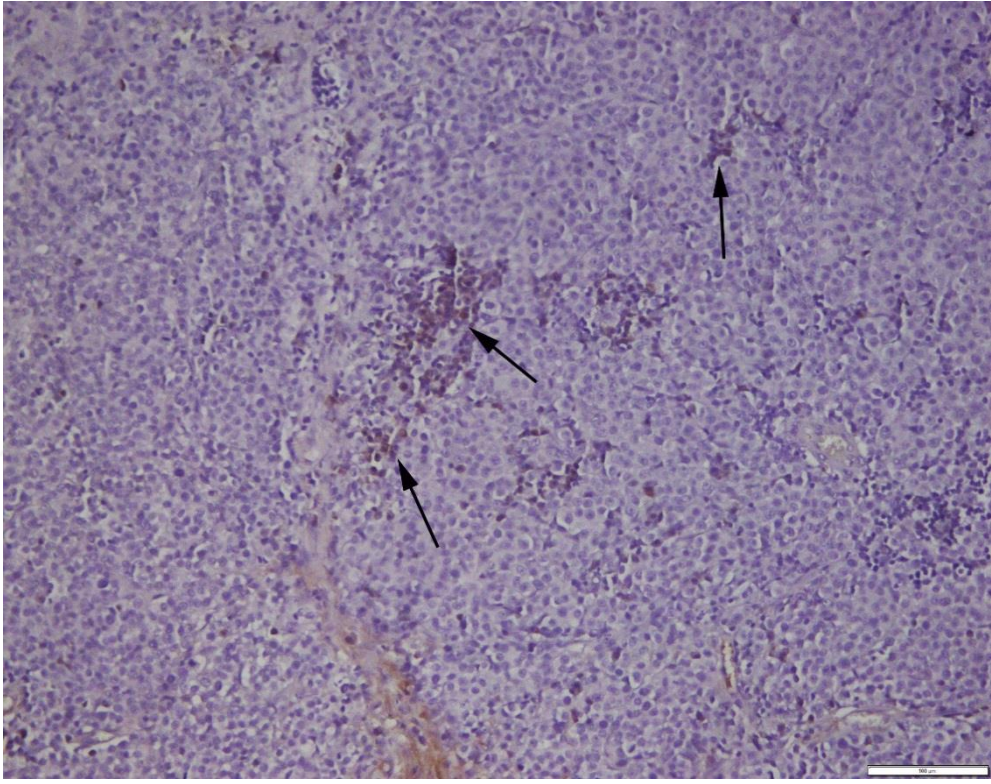
Resim 4.3.1.5: Artmış MMP-2 immnoreaksiyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 μ m.



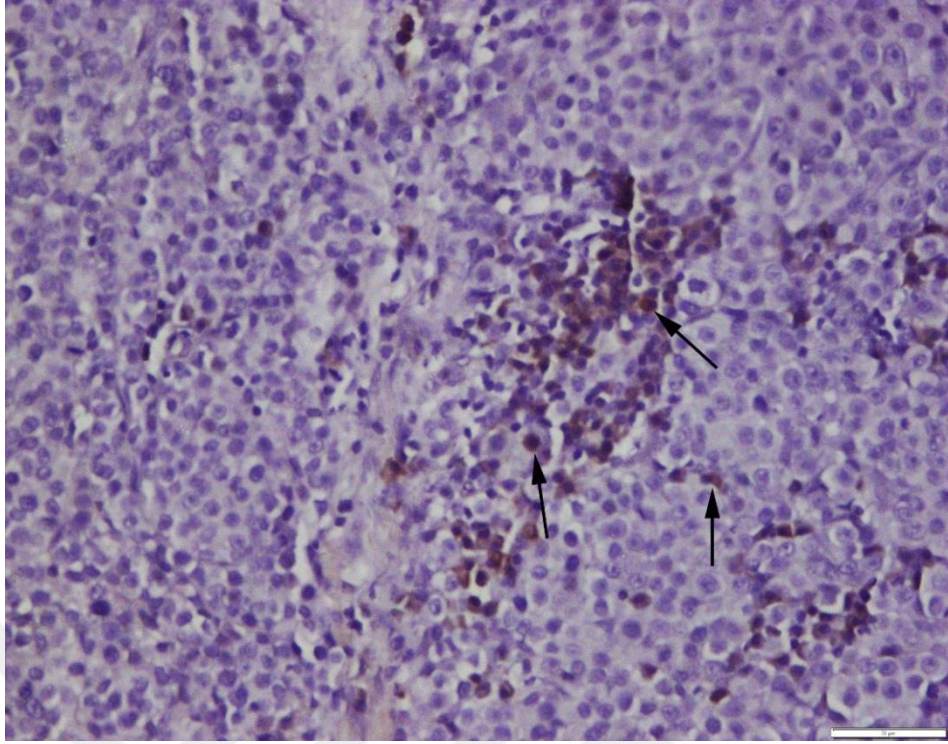
Resim 4.3.1.6: Primer antikor konulmayanMMP-2 negatif kontrol, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 μ m.

4.3.2. MMP-7'nin immunohistokimyasal bulguları

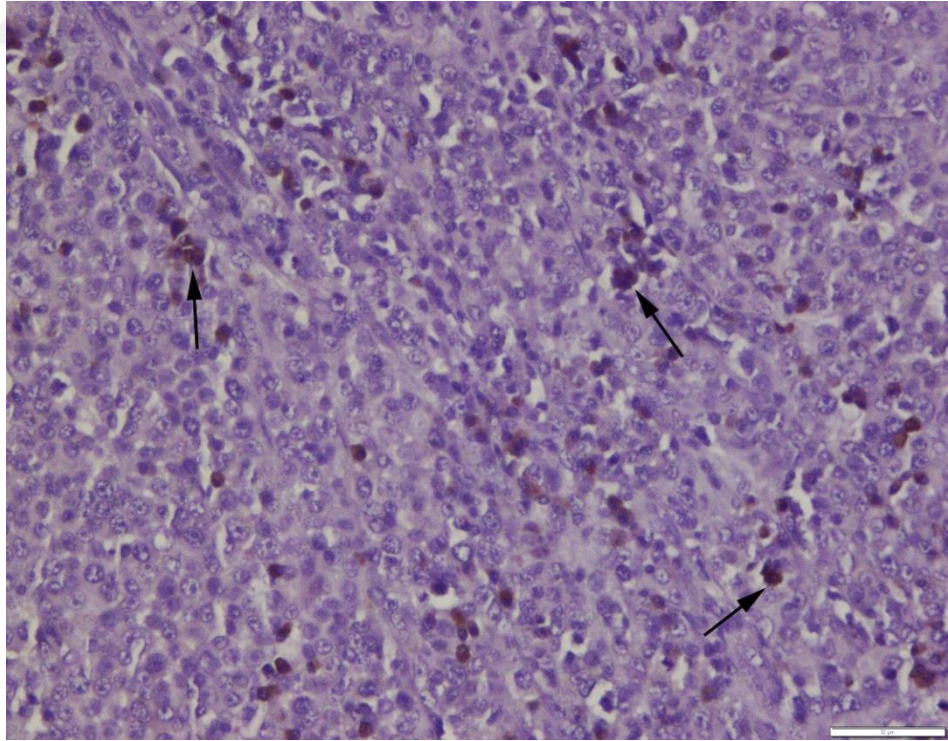
Tümöral kitleden alınan kesitlerin MMP-7 ile boyanmasında özellikle büyük kitlelerde aktivitenin arttığı dikkati çekti. Özellikle bazı tümöral hücreler ve bazı yangısal hücrelerde MMP-7 ekspresyonlarının arttığı görüldü. Ekspresyonun homojenite göstermediği yer yer daha fazla olduğu saptandı (Resim 4.3.2.1-4.3.2.4). Primer antikorun kullanılmadığı negatif kontrollerde boyanma gözlenmedi (Resim 4.3.2.5).



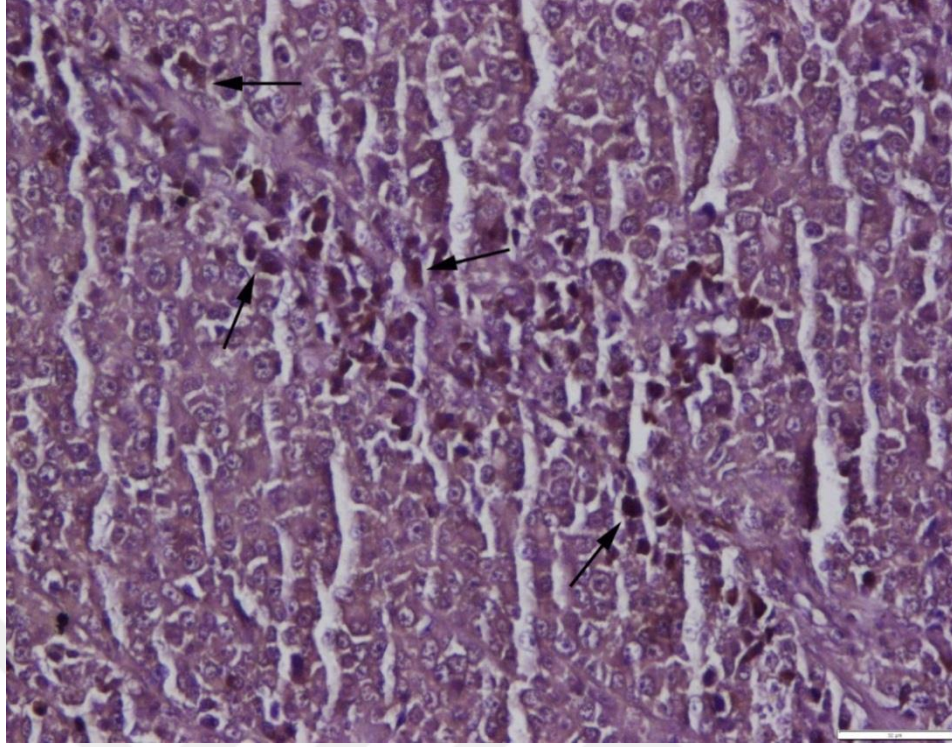
Resim 4.3.2.1: Transmissible venereal tümörde MMP-7 immunoreaksiyonu, pozitif hücreler (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100 μ m.



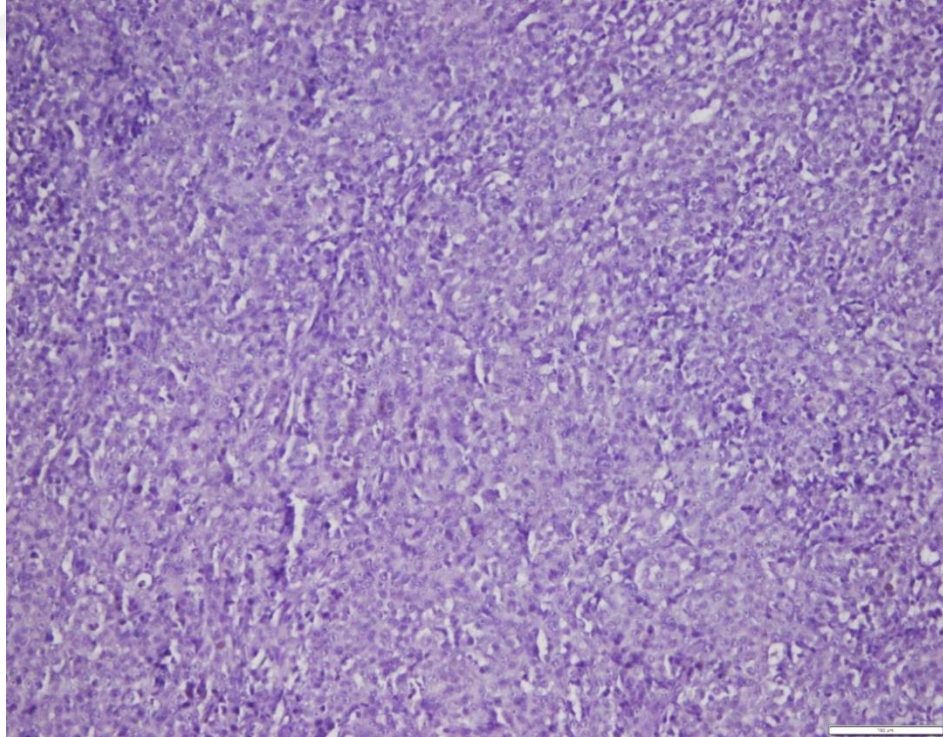
Resim 4.3.2.2: Üst resimdeki MMP-7 pozitif hücrelerin (oklar) yakından görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 μ m.



Resim 4.3.2.3: MMP-7 pozitif hücrelerin (oklar) görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 μ m.



Resim 4.3.2.4: MMP-7 pozitif hücrelerin (oklar) görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 50 µm.



Resim 4.3.2.5: Primer antikor konulmayanMMP-7 negatif kontrol, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar= 100 µm.

5. TARTIŞMA

Tümörler son yıllarda insanlarda olduğu gibi hayvanlarda da artma eğilimindedir. Tümörlerin şekillenmesi ve tedavileri ile ilgili çalışmalar hızla artmaktadır. İnsanlar, kedi ve köpek gibi hayvanları evlerinde pet hayvanı olarak gitgide artan bir ilgi ile beslemektedirler. Bu sebeple hayvan hastalık ve tümörleri de yaygın şekilde incelenmekte ve sebepleri ile patogenezi araştırılmaktadır. Bu çalışma da köpeklerde sık karşılaşılan bir tümör olan TVT'de MMP-2 ve MMP-7 aktivitesinin belirlenmesi ve bu markırların patogenezdaki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

TVT, bulaşma ve çiftleşme sırasında genital mukoz membranlarının teması ile oluşan tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşayan sokak köpeklerinde yaygın olarak gözlenen bulaşıcı bir neoplastik hastalıktır (9,17,23). Genellikle penis ve vagina mukozasını etkilemektedir (9,23). Çoğunlukla genç köpeklerde (2-5 yaşlı) görülmesinin sebebi seksüel olarak daha aktif oldukları içindir, her ırk köpekte de hastalık penis ve preputiumda görülmektedir. (23,32,34,42). Sunulan çalışmada, TVT olgularına sadece genital organlarda rastlanmış ve dişilerde vagina ve vulva ile erkeklerde penis ve prepusyum en yaygın etkilenen organlar olmuştur. Kitle boyutlarının 1x1x1 cm'den 8x5x6 cm'ye kadar değişmekte olduğu görülmüştür. Tümöral kitleler yumuşak kıvamlıydı ve genellikle üst yüzeyleri kanamalıydı. Özellikle büyük tümörlerde kitle içinde nekroze alanlara da rastlandı. İncelenen kitleler bu özellikleri ile klasik bilgiler ile uyum gösterdi.

Yapılan bir çalışmada, dişi genital sistem içerisinde meme tümörlerinin %71,23 ile birinci sırada, vulva-vagina tümörleri de %27,77 ile ikinci sırada yer aldığı bildirilmiştir (18). Dişi genital sistemdeki en önemli tümörlerden bir TVT'dir (18). İncelenen bir diğer çalışmada, 89 köpeğin 15'inde (%16,8) dişi genital sistemde, 16'sında (%18) erkek genital sistemde olmak üzere toplam 31 olguda TVT belirlediklerini ve bu köpeklerin %67,7'sinin 6 yaşın altında olduğunu bildirilmiştir (39). TVT saptadıkları köpeklerin %75'inin 6 yaşın altında olduğunu rapor etmişlerdir (40). Gülçubuk ve Gürel'in çalışmalarında ise; 73 dişi genital sistem tümöründen 15'inin (%20,4), 5 erkek genital sistem tümöründen 3'ünün (%60) TVT olduğunu saptamışlardır. Yine aynı çalışmada TVT saptanan hayvanların %56,25'inin 6 yaşın altında olduğu belirlenmiştir. Erkek genital sistemdeki TVT

oranı %60 olarak bildirilmiş olmasına rağmen bunun yanıltıcı bir oran olduğu belirtilmiştir. Bu durumun vaka sayısının düşük olmasından ve çoğu klinisyenin erkek köpeklerdeki bu tür üremelerin TVT olduğuna karar verip patolojik incelemeye gerek görmemelerinden kaynaklandığı da yine bu çalışmada belirtilmiştir (18). Sunulan çalışmada Anabilim Dalımıza gelen 20 adet tümör dokusu incelenmiştir. Burdur'da köpek beslemenin nispeten yaygın olmaması ve TVT olgularının genellikle Fakülteye getirilmeden özel kliniklerde basit tedavi yöntemleri ile tedavi edilmesine rağmen bu oran yüksek görülmektedir. Çalışma materyalini oluşturan köpeklerin 12 tanesi dişi 8 tanesi erkekti. Köpeklerin yaşları 6 ay ile 2 yaş arasında değişiyordu. Bu bulgularda klasik bulgularla uyum göstermiştir.

MMP'ler; yıkımdan sorumlu birçok ekstrasellüler matriks proteini ile organogenez, büyüme ve doku dönüşümü sırasında uyum içinde çalışan bir enzim grubudur. MMP'lerin yetişkin dokudan salınımı ve aktivasyonu kısıtlıdır, fakat istenmeyen doku yıkımına neden olan yangısal hastalıklar, tümör gelişimi ve metastaz gibi çeşitli doku patolojilerinde önemli bir yükselme izlenmektedir. Matriks metalloproteinazları; matriksin ve ekstrasellüler matriksin hidrolize komponentleri olarak da gösterilmektedirler. Şu ana kadar insandaki 24 adet MMP tanımlanmış, 26 adet iyi tanımlanmış üye rapor edilmiştir. Bu çalışmada TVT'lerde MMP-2 ve MMP-7 aktivitesi araştırılmış ve her iki belirteçinde artış gösterdiği saptanmıştır (30).

Matriks metalloproteinazlar invazyon ve metastazda epitelyal mezenkimal değişim aşamasında rol almaktadır. MMPler aktivitelerinin artmasına ilave olarak invazyon boyunca belli bir yerde odaklanırlar (30,32). Literatürde TVT'de MMP 2 ve MMP 7 aktivitesi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma TVT'de MMP 2 ve MMP 7 aktivitesinin tümör dokusunda arttığını ve bunun TVT patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

İnsanlarda yapılan çalışmalarda MMP-2'nin kolon, pankreas, mesane, prostat, deri karsinomlarında, meme ve over kanserinde ve hemen tüm kanser tiplerinde tümör stromasına lokalize olarak arttığı bildirilmiştir (1). MMP-7'nin ise mide, meme, prostat, ve kolorektal kanserde arttığı rapor edilmiştir (26, 32). Ayrıca bir başka çalışmada da MMP-2 düzeyleri pankreatik kanserli hastalarda kronik pankreatitli hasta ve sağlıklı bireylerde yüksek tespit edilmiştir (32, 46). Pankreatik duktal karsinomlu hastalarda plazma ve tümör dokusu MMP-7 düzeylerinin yükseldiği

bildirilmiştir (24,32). Başka bir çalışma da MMP 2'nin mesane, deri kansinolarında ve over kanserinde tümör stromasına lokalize olarak izlendiği bildirilmiştir (15,32) Kanser hücrelerinin kemik üzerine etkisi incelendiğinde; tümör hücreleri ile oluşturulmuş osteoliziste metalloproteinazların önemli bir yer aldığı rapor edilmiştir. MMP 1, MMP 2 ve MMP 9 insan osteoblast hücre kültüründe saptanmıştır. Pankreas kanserinde MMP 1 üretimine bağlı olarak tip I kollajenolitik aktivite tanımlanmıştır. Bununla beraber hücre kültürlerinde farklı MMP ekspresyon paternleri tanımlanmıştır. Örneğin; invaziv duktal adenokarsinomda MMP-2 ekspresyonu intraduktal kansinomlara göre daha fazla bulunmuştur. Pankreatik ve ampullar kanserlerde immunohistokimyasal yöntemle MMP 2, MMP 7 artışı, in situ hibridizasyon çalışmaları ile MMP 2 ve MT-MMP1'in birlikte arttıkları, Northern analizleri ile MMP 2, MMP 7, MMP 11 arttığı saptanmıştır (30, 32). Bizim çalışmamızla MMP-2 ve MMP-7 aktivitesi ilk kez TVT de incelenmiş ve MMP-2 de çok belirgin, MMP-7 de ise bölgesel artışlar bulunduğu ortaya konmuştur.

Köpeklerin transmissible venereal tümörü tüm dünyada artan prevalansa sahip özellikle genç köpeklerde sıklıkla bulaşma gösteren tümöral bir hastalıktır. Sunulan çalışmada transmissible venereal tümör teşhisi konan toplam 20 adet köpeğe ait bloklanmış tümör dokusu örneklerinde histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler yapılarak MMP 2 ve MMP 7 ekspresyonları değerlendirildi. TVT teşhisi konan tümör dokularında artmış MMP 2 ve MMP 7 ekspresyonu gözlemlendi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgular TVT olgularında MMP-2 ve MMP-7'nin arttığını, MMP-2 artışının MMP-7'den daha belirgin olduğunu ve her iki markırında özellikle büyük boyutlardaki tümörlerde daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, MMP-2 ve MMP-7'nin köpeklerin TVT olgularında patogeneizde önemli bir rol oynadığını MMP-2 ve MMP-7'nin bu tümörlerde prognoz ve tedavide kullanımı konusunda daha ileri çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur..



7.KAYNAKLAR

1. **Aksun SA, Özmen D, Bayındır O** (2001): Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *T Klin Tıp Bilim.*,**21**,332-342.
2. **Alexander CM, Selvarajan S, Mudgett J, Werb Z** (2001): Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *J Cell Biol.*,**152**, 693-703.
3. **Alur İ, Tetik A, Dodurga Y, Güneş T, Gökşin İ** (2015): Biküspit aort kapak ve asendan aort anevrizmalı olgularda matriks metalloproteinaz gen polimorfizminin literatür eşliğinde değerlendirilmesi. *İzm Üniv Tıp Derg.*,**2**, 17-21.
4. **Arıcan E.** İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Erişim: <http://aves.istanbul.edu.tr/earican/dokumanlar>. 11.02.2017, 14:45.
5. **Armstrong WG** (1958): Further studies on the action of collagenase on sound and carious human dentin. *J Dent Res.*,**37**, 1001-1015.
6. **Barret AJ, Rawlings ND** (1992): Clasification of peptidases. *Biol Chem.*,**244**, 353-373.
7. **Birkedal-Hansen H** (1993): Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.*,**64**, 474-484.
8. **Carmeliet P, Jain RK** (2000): Angiogenesis in cancerandotherdiseases. *Nature*, **407**, 249-257.
9. **Çeşme H, İpek V, Akkoç A, Salcı H** (2015): Bir Köpekte Primer İntranazal Transmissible Venereal Tümör (TVT). *Uludag Univ J Fac Vet Med.*,**34**, 85-88.
10. **Ennis BW, Matrisian LM** (1994): Matrix degrading metalloproteinases. *J Neuro Oncol.*,**18**,105-109.
11. **Erer H, Kıran MM** (2009): *Veteriner Onkoloji* 4. Basım, Damla Ofset A.Ş., Konya.
12. **Erkli H, Ersöz E** (2011): Matriks metalloproteinazlar: diş dokuları ve çürük üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti Anabilim Dalı, Ankara. *Cumhuriyet Dent J.*,**14**, 246-257.

13. **Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, Neoptolemos JP** (1997): Role of Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Digestion*,**58**, 520-528.
14. **Gassmann P, Haier J** (2008): The tumor cell-host organ interface in the early onset of metastatic organ colonisation. *Clin Exp Metas.*,**25**, 171–181.
15. **Gerhards S, Jung K, Koenig F, Danilchenko D, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA** (2001): Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. *Urology*,**57**, 675-679.
16. **Gupta GP, Massagué J** (2006): Cancer metastasis: building a framework. *Cell*,**127**, 679–695.
17. **Gülbahar MY, Hazıroğlu R** (1995): Bir köpekte ekstragenital metastazlı transmissible venereal tümör olgusu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*,**42**, 441-444.
18. **Gülçubuk A, Gürel A** (2003): 1995-2000 yılları arasında İstanbul'da saptanan köpek tümörleri. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* **29**, 83-91.
19. **Hanahan D, Weinberg RA** (2000): The hall marks of cancer review. *Cell*,**100**, 57–70.
20. **Ho AT, Voura EB, Soloway PD, Watson KL, Khokha R** (2001): MMP inhibitors augment fibroblast adhesion through stabilisation of focal adhesion contacts and up-regulation of cadherin function. *J Biol Chem.*, **276**, 40215–40224.
21. **Hui Liu, Jing Huang, Benquan Wu, Yuqi Zhou, Jiaxin Zhu, Tiantuo Zhang** (2008): Matrilysin inhibits proliferation and modulates sensitivity of lung cancer cells to FasL-mediated apoptosis. *Med Oncol.*,**25**, 419–430.
22. **Kang Y, Massagué J** (2004): Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*,**118**, 277–279.
23. **Kaya M, Okumuş Z, Doğan E, Yanmaz LE, Çetin EM, Şimşek A** (2011): Köpeklerde travmatik üretral fistül, penis nekrozu ve transmissible venereal tümör olgularının skrotal üretrostomi ile sağaltımı. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.*,**8**, 63-68.
24. **Kuhlmann KF, Van Till JW, Boormeester MA, de Reuver PR, Tzvetanova ID, Offerhaus GJ, Ten Kate FJ, Busch OR, van Gulik TM, Gouma DJ, Crawford HC** (2007): Evaluation of matrix metalloproteinase 7 in plasma and

- pancreatic juice as a biomarker for pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*,**16**, 886-891.
25. **Kulasingam V, Diamandis EP** (2008): Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging Technologies. *Nat Clin Pract Oncol.*,**5**, 588-99.
 26. **Maurel J, Nadal C, Garcia-Albeniz X, Gallego R, Carcereny E, Almendro V, Mármol M, Gallardo E, Maria Augé J, Longarón R, Martínez-Fernandez A, Molina R, Castells A, Gascón P**(2007): Serum matrix metalloproteinase 7 levels identifies poor prognosis advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer.*,**121**, 1066-1071.
 27. **Misdorp W** (2002): Tumors of the Mammary Gland. Ed: Meuten DJ, *Tumors in Domestic Animals*, 4th edition, Iowa State Press, Iowa, p: 575-99.
 28. **Morris J, Dabson J** (2001): *Small Animal Oncology*. 1st Blackwell Science Ltd Iowa p: 184-191.
 29. **Nagase H, Woessner JF Jr.** (1999): Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.*,**274**, 21491-21494.
 30. **Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M**(2001): Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci.*,**114**, 111–118.
 31. **Oğuzsoydu H, Çamlıca H, Duranyıldız D, Sağlam Ek, Taş F, Yasasever V, Dalay N** (2006): Matriksmetalloproteinazlar ve akciğer kanseri. *Türk Onkol. Derg.*,**21**, 53-56.
 32. **Öncel M** (2012): Matriks Metalloproteinazlar ve Kanser. *Eur J Basic Med. Sci.*, 2, 91-100.
 33. **Özyurtlu N, Bademkiran S, Ünver Ö, Yıldız F, İçen H** (2008): Dişi bir köpekte Transmissible Venereal Tümörün abdominal ve subkutaningüinal bölgeye metastazı, *Dicle Üniv Vet Fak Derg.*,**1**, 48-51.
 34. **Papazoglu LG, Koutinas AG, Plevrakı AG, Tontıs D** (2001): Primary intranasal transmissible venereal tumor in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. *J Vet Med A.*,**48**, 391-400.
 35. **Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM** (2006): Hypoxiasignalling in cancerandapproachestoenforcetumourregression. *Nature.*,**441** (7092), 437–443.

36. **Reel B** (2006): Matriks metalloproteinaz enzimleri ve ateroskleroz. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.*,**26**, 527-537.
37. **Rhim D, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Jennifer M, Mccallister F, Reichert M, Beatty GL, Anil K, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ** (2012): EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell.*,**148**, 349-361.
38. **Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NHV** (2000): Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol.*,**84**, 654-664.
39. **Sönmez G, Özmen Ö** (1996): Bursa'da 1988-1996 yılları arasında incelenen köpek tümörleri, *Uludağ Üniv Vet Fak Derg.*,**15**, 69-76.
40. **Şenünver A, Türkaslan MT, Berah T, Yeşildere T** (1982): İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Kliniğine 1977-1980 yılları arasında getirilen dişi köpeklerde rastlanan transmissible venereal tümör olguları üzerinde çalışmalar, *İstanbul Üniv Vet Fak Derg.*,**8**, 69-76.
41. **Şevik M** (2013) : Onkojenik retroviruslar. *Selçuk Tıp Derg.*,**29**, 1-4.
42. **Varela YDM, Queiroz GF, Filgueira KD, Reis PFCC, Lima RKR** (2013): Transmissible venereal tumor in impuberal canine. *Braz J Vet Pathol.*,**6**, 123-127.
43. **Visse R, Nagase H** (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.*,**92**, 827-839.
44. **Yağcı İP, Kalender H**, (2008): Bir erkek köpekte Transmissible Venereal Tümör (TVT) olgusunun vincristine sulphate ile sağaltımı. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.*,**14**, 105-108.
45. **Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J** (2000): Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.*,**407**, 242-248.
46. **Yokoyama M, Ochi K, Ichimura M, Mizushima T, Shinji T, Koide N, Tsurumi T, Hasuoka H, Harada M** (2002): Matrix metalloproteinase-2 in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer. *Pancreas.*,**24**, 344-347.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ezgi OGUŞ
Doğum Yeri ve Yılı : Yüreğir/ADANA, 1991
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Telefon No : 05536462063
Elektronik Posta : ezgiogs@gmail.com
İletişim Adresi : Döşeme mah. Emlak Bankası Evleri
Ahmet Cevdet Yağ blv. Okyanus apt.
6/16 Seyhan/ADANA



Eğitim Durumu
Lisans : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 2015
Yüksek Lisans : MAKÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2017-Devam Ediyor