



T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENZOOTİK İNTRANAZAL ADENOKARSİNOMLARDA (ENA)
VEGF VE EPCAM AKTİVİTESİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Nilay SERPİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof.Dr.Özlem ÖZMEN**

BURDUR-2016

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENZOOTİK İNTRANAZAL ADENOKARSİNOMLARDA (ENA)
VEGF VE EPCAM AKTİVİTESİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Nilay SERPİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Özlem ÖZMEN

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0311-YL-16 proje numarası ile desteklenmiştir.

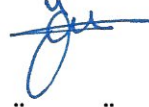
BURDUR-2016

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Nilay SERPİN tarafından *Prof. Dr. Özlem ÖZMEN* yönetiminde hazırlanan *Enzootik İntranazal Adenokarsinomlarda (ENA) VEGF ve EpCAM Aktivitesinin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi* 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
16/06/2016



Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
MAKÜ Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Zafer Özyıldız
MAKÜ Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Şima ŞAHİNDURAN
MAKÜ Veteriner Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

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 20/07/2016 Tarih ve 2016/20 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecince bilgilerini aktaran, tecrübe ve görüşlerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e ,

Yardım ve desteklerinden dolayı Sayın Doç. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a,

Araştırma sürecinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Uzman Biyolog Dilnur DİNÇOĞLU'na,

Değerli zamanını ve tecrübelerini paylaşan arkadaşım Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DOLU'ya,

Ayrıca üniversite eğitimim sürecinde ve her anımda kilometrelerce uzaktan desteğini yanımda hissettiğim, bugünlere gelmemde tartışılmaz emeği olan çok sevgili Öğrt. Ebru LALEDEMİR'e,

Eğitim ve öğretim hayatımda maddi manevi desteğini esirgemeyen, tüm zorluklarda her zaman arkamda olan aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

BEYAN

Enzootik İntranazal Adenokarsinomlarda (ENA) VEGF ve EpCAM Aktivitesinin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından 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 çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

16/06/2016


Nilay SERPIN

ONAY



Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Danışman

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	
KABUL ve ONAY	<i>ii</i>
TEŞEKKÜR	<i>iii</i>
BEYAN	<i>iv</i>
İÇİNDEKİLER	<i>v</i>
ŞEKİLLER DİZİNİ	<i>vii</i>
TABLolar DİZİNİ	<i>ix</i>
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	<i>x</i>
TÜRKÇE ÖZET	<i>xii</i>
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	<i>xiii</i>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Hayvanlarda Burun Boşluğu Morfolojisi	6
2.2. Enzootik İntranazal Adenokarsinom	7
2.3. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	10
2.4. EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule)	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM	12
3.1. Örneklerin Toplanması	12
3.2. Sitolojik İnceleme	12
3.3. Histopatolojik İnceleme	12
3.4. İmmunohistokimyasal İnceleme	13
3.5. Elektronmikroskopik inceleme	14
4. BULGULAR	15
4.1. Klinik Bulgular	15
4.2. Makroskopik Bulgular	17
4.3. Sitolojik Bulgular	19
4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular	21
4.5. Histopatolojik Bulgular	22
4.6. İmmunohistokimyasal Bulgular	25
5. TARTIŞMA	31

6. SONUÇ ve ÖNERİLER	36
7. KAYNAKLAR	37
8. ÖZGEÇMİŞ	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil numarası ve başlığı	Sayfa
Şekil 4.1. ENA'lı bir keçide gözlenen lakrimasyon.	15
Şekil 4.2. ENA'lı bir başka keçide karakteristik burun akıntısı ve ekzoftalmus tablosu.	16
Şekil 4.3. ENA'lı bir başka keçinin klinik görünümü.	16
Şekil 4.4. Burun boşluğunu tamamen doldurmuş ve septumda deviasyona sebep olmuş tümöral kitleler.	18
Şekil 4.5. Başka bir ENA'lı keçide burun boşluğunun görünümü.	18
Şekil 4.6. Taze tümör dokusundan hazırlanan tuşe preparatın Giemsa yöntemi ile boyanması sonucu görülen küme halindeki tümöral hücreler ile eritrosit ve lökositler seriden hücreler. Giemsa metodu, Bar= 100 µm.	19
Şekil 4.7. Başka bir sitolojik preparatta kübik yuvarlak şekilli tümör hücreleri, Giemsa metodu, Bar= 100 µm..	20
Şekil 4.8. Tümör hücreleri arasında yoğun yangısal hücre infiltrasyonları, Giemsa metodu, Bar= 100 µm.	20
Şekil 4.9. Tümöral hücre sitoplazmalarında retroviral yapılar, Bar=0.2µm.	21
Şekil 4.10. ENA'nın histopatolojik görünümü, tümöral kitle içinde tübüler (kalın ok) ve papiller (ince ok) yapılar, miks form, HE, Bar= 100µm.	22
Şekil 4.11. Tümör dokusundaki tübüler ve kistik yapılar (oklar), HE, Bar=100µm.	23
Şekil 4.12. Tümör hücrelerinin büyük büyütmedeki görünümü, HE, Bar=50µm.	23
Şekil 4.13. Tümör kitlesinde papiller uzantılar (oklar), HE, Bar=200µm.	24
Şekil 4.14. Tümöral etmoidal bez hücrelerinin görünümü, HE, Bar=100µm.	24
Şekil 4.15. Tümöral kitle içinde artmış EpCAM reaksiyonu, (oklar) Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=500µm.	25
Şekil 4.16. EpCAM' in tümör hücresindeki ekspresyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=100µm.	26

- Şekil 4.17.** Prolifere hücrelerde EpCAM immunoreksiyonu, (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=50µm. 26
- Şekil 4.18.** Tümöral hücrelerin EpCAM ekspirasyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=50µm. 27
- Şekil 4.19.** Başka bir tümördeki hücrelerin EpCAM ekspirasyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=50µm 27
- Şekil 4.20.** Miiks tipteki bir tümörde hücrelerin EpCAM ekspirasyonları, Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=50µm 28
- Şekil 4.21.** Tümöral hücrelerde artmış VEGF ekspirasyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=100µm. 29
- Şekil 4.22.** Bir başka ENA olgusunda tümöral hücrelerde artmış VEGF immunoreksiyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=100µm 29
- Şekil 4.23.** Miiks form ENA olgusunda tümöral hücrelerde artmış VEGF immunoreksiyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=100µm 30

TABLolar DİZİNİ

Tablo numarası ve başlığı	Sayfa
Tablo 3.1 Kullanılan antikorlar, sulandırma oranları ve hücresele yerleşimleri	14

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

/	oran
%	yüzde
µm	mikrometre
ABC	Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks
AFIP	Armed Forces Institute of Pathology
DAB	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ENA	Enzootik İntranazal Adenokarsinom
ENTV	Enzootic Nasal Tumor Virus
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
GF	Growth Factor
HIF	Hipoksi İndükleyen Faktörler
JSRV	Jaagsiekte Sheep Retro Virus
kDa	Kilodalton
KHDAK	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
PIGF	Plasental Büyüme Faktörü
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VPF	Vasküler Permeabilite Faktörü
PCR	Polimerase Chain Reaction
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	Messenger Ribonükleik Asit
ENA	Enzootik İntranazal Adenokarsinom
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HE	Hematoksilen Eozin
IHC	İmmunohistokimya
PBS	Fosfat tamponlu solüsyonu
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
flk-1	Fetal Liver Kinase-1
°C	Santigrad derece
pH	Asit ve alkali yoğunluğunun göstergesi

WHO

World Health Organization

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

Enzootik İntranazal Adenokarsinomlarda (ENA) VEGF ve EpCAM Aktivitesinin
İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi

Nilay SERPİN
Patoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

BURDUR – 2016

ÖZET

Bu çalışmada, vascular endothelial growth factor (VEGF) ve epithelial cell adhesion molecule'in (EpCAM) enzootik intranazal adenokarsinomlarda ekspresyonlarının incelenmesi amacıyla daha önce enzootik intranazal adenokarsinom teşhisi konmuş olan 25 adet keçi nasal tümör dokusu materyal olarak kullanıldı. Bu dokulara avidin-biotin peroksidaz kompleks metot uygulanarak VEGF, EpCAM immunoreaksiyonları karşılaştırılmalı olarak incelendi ve sonuçlar semikantitatif olarak değerlendirildi. İmmunohistokimyasal olarak ENA'yı oluşturan hücrelerde VEGF ve EpCAM aktivitesinde artış şekillendiği gözlemlendi. Bu sonuç, VEGF ve EpCAM'in ENA patojenezinde rol oynadığını gösterdi.

Anahtar kelimeler: enzootik intranazal adenokarsinom, immunohistokimya, VEGF, EpCAM.

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

Master of Science Thesis

**Immunohistochemical Evaluation of VEGF and EpCAM Expression in Enzoitic
Intranasal Adenocarcinoma**

**Nilay SERPIN
Department of Pathology**

**Supervisor
Prof. Özlem ÖZMEN**

BURDUR – 2016

ABSTRACT

In this research, 25 enzootic intranasal adenocarcinoma tumors tissue which were previously diagnosed were used as material in order to determine VEGF and EpCAM expressions in enzootic intranasal adenocarcinomas. The routine avidin-biotin peroxidase complex method was used for the detection of VEGF and EpCAM, in these tissues. The results were analyzed comparatively and evaluated semiquantitatively. Immunohistochemically, increase in VEGF and EpCAM expression in ENA. This result showed that VEGF and EpCAM have a role in pathogenesis of ENA.

Key words: enzootic intranasal adenocarcinomas, immunohistochemistry, VEGF, EpCAM.

1. GİRİŞ

Tümör, organizmaya ait hücrelerden herhangi birinin otonomi kazanması sonucunda bireyin kontrol mekanizmalarının etkisinden çıkıp sonsuz çoğalarak oluşturduğu, gelişmesi komşu normal dokulara göre daha hızlı, inkoordine ve neden ortadan kalktıktan sonra bile büyümesini sürdürebilen yeni doku (neoplazi) oluşumudur. Bu dokular biyolojik davranışlarına göre benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) karakterli olarak üzere iki grupta sınıflandırılır ve 'kanser' terimi malign neoplazmlar için kullanılır (34, 68).

Benign neoplaziler, bulunduğu organ içinde büyüyen, metastaz yeteneği olmayan, genellikle sınırlı üremelerdir. Bunlar çoğunlukla konakçının sağlığına zararsızdırlar ancak bazen negatif etkileri gözlenebilir. Malign tümörlerden en tipik farkı benign tümörlerin etrafının genellikle fibröz bir kapsülle çevrili olmasıdır. Malign neoplaziler ise hızla çoğalabilir ve metastaz yapabilirler, ayrıca çevre dokulara invazyonları sıktır. Tümörler hücre tipi ve biyolojik davranışlarına göre isimlendirilirler. Kanser, hücre proliferasyonunu düzenleyen genlerdeki değişimler veya malfonksiyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Tümörögenезis, lethal olmayan hücresel DNA hataları ya da değişikliklerinin sonucu oluşan çok aşamalı bir süreçtir (101, 68). Hücresel genom hasarları tümörlerin ortak oluşum sebebidir ve bu hasarların başlıca nedenleri arasında radyasyon, virüsler ve çeşitli kimyasal maddeler ile canlı etkenler sayılabilir. Kanserler genellikle bu faktörlerden kaynaklanan hücre mutasyonların kümülasyonu sonucunda oluşur (67). Mortalite sebebi olguların büyük bir kısmında primer tümör değil, metastazlardır. Karsinogenez, tümör oluşumu ve metastazları da içeren dört başlıkla basamaklandırılmış olup ve Darwinci süreci olarak tanımlanır.

Bu basamaklar sırasıyla şunlardır.

1.Primer tümör oluşumu ve büyümesi: Primer tümör oluşumunda kontrollü hücre ölümü olan apoptozis baskılanarak mitotik hücreler anormal olarak bölünür ve tümör oluşumuna sebep olan mekanizmaların şekillenmesine neden olur. Primer tümör referans bir büyüklüğe ulaştığında mutasyona uğrayan hücrelerin bölünme hızı daha da artar, bu sebeple besin ve oksijen gereksinimi artar. Artmış olan bu gereksinim sonucu hipoksi indükleyen faktörler (HIF) ile tetiklenen neovaskülarizasyon olayı başlar. HIF'ler büyüme faktörü (GF) ekspresyonuyla vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiopoetin 1 ve 2' nin sentezini uyarır (15, 79).

2.Epitel-mezenkimal transformasyon ve intravazasyon: HIF'in aktivasyonu, artan anjiogenin ekspresyonu ve pleiotropik etkileşimlerin sonucunda E-kaderin' in ekspresyonunda azalmaya sebep olur. E-kaderin' in azaltılmış ekspresyonu sonucu ise hücre-hücre adezyonu azalır ve bu durum tümör hücresinin hareket kabiliyetinin artması olarak yorumlanabilir (79, 54). Bu süreç intravazasyon olarak adlandırılır ve kanserli hücrelerin lokalizasyonuna veya metastazının başlamasına sebep olur (80).

3.Hematojen yayılma: Kanserli hücreler dolaşıma katıldığında anoikis olarak adlandırılan anormal hücre-matriks etkileşimine neden olur. Kanser hücrelerinin dolaşımdayken çoğalmadıkları düşünülür ve normal hücrelerden farklı boyut ve adezyon özelliklerine bağlı olarak kapillar bölgelerde durdurulmalarına kadar dolaşımda sirküle oldukları sanılmaktadır. Hematojen yayılma, sekonder tümör hücrelerinin sirküle olduğu lenf damarlarının bağlı olduğu lenf düğümlerinden bağımsız olarak oluşur.

4.Ekstravazasyon ve sekonder tümör oluşumu: Kapillar bölgede tutulan tümörlü hücreler endotel tabakasına tutunarak interstisyum, intersellüler boşluk ve paranşimi geçer ve hedef doku veya organa ulaşır (48, 51). Ardından bu kanserli hücreler mezenkimal-epitelyal değişime uğrayarak fenotipik yapılarını değiştirir (50).

Kanser hem beşeri hekimlik hem de veteriner hekimlikte günümüzde de önemini koruyan bir araştırma konusudur. Kanser konusundaki çalışma ve projeler en fazla desteklenen ve ilgi çekenler arasındadır.

Kanser ile ilişkilendirilen viral etkenler, onkogenез mekanizmaları ile hücrelerin kontrolsüz ve anormal şekilde büyümesine neden olmaktadır. Kansere neden olan viruslar, DNA ve RNA virusları arasında yer almakta olup, bütün RNA tümör virusları, retrovirus familyasında yer almaktadır (90).

Reptiller ve maymunlarda dahil olmak üzere birçok omurgalı hayvanda oluşan tümörler viral etiyolojilidir. Bazı insan kanserlerinin etiyolojisinde de spesifik virüsler yer alır. Tümör oluşumuna sebep olan virüslerin neden olduğu neoplastik transformasyonu açıklayıp anlayabilmek için hücre kültür sistemleri geliştirilmiş olup transformasyona uğramış hücreler genellikle morfolojik farklılıkları ve büyüme gereksinimleri incelenerek normal hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Normal bir doku kültürü hücresi, tümör virüsü tarafından transformasyona uğratıldığında gözlenen ortak özelliklerin bazıları şu şekilde sıralanabilir:

1.Plazma zarıyla ilgili değişiklikler

- a) Metabolit taşınımında artma
- b) Hücre dışı proteolizisi arttıran plazminojen aktivatör miktarının artması

c) Plazma zarındaki morfolojik değişiklikler

2.Yapışma değişiklikleri

a)Yüzeyle adezyon özelliklerinin azalması ve bu sebeple yuvarlak bir yapıya dönüşmesi

b) Aktin filamentlerinin geniş ve büyük bağlantı organizasyonu yapamaması

c) Hücre dışı fibrinonektin deposunda azalma

3.Büyüme ve bölünme anormallikleri

a) Alışılmamış seviyede yüksek hücre dansitesi için büyüme artışı

b) Serum growth faktörlerine gereksinimlerinin azalması

c) Katı yüzeylere bağlanma gereksiniminin azalması

d) Duyarlı hayvanlara enjekte edildiğinde tümörögenezi başlatmaları (10).

Virüslerin hücre büyüme ve bölünmesini iki farklı mekanizma ile kontrol ettiği bilinmektedir. Bunlardan ilki viral DNA'nın konakçı genomundaki hücresel genlere penetre olarak genlerin yapı ve ekspresyonlarında değişime sebep olmasıdır. Dięeri ise çoğu tümör virüslerinde olduğu gibi normal konakçı hücrelerinin neoplastik transformasyonundan sorumlu olan bir ya da daha fazla onkogen taşımasıdır (43).

Şimdiye kadar tanımlanmış olan Retrovirüs onkogenlerinin yarısının protein kinaz aktivitesine sahip oldukları kanıtlanmıştır. Onkogenler ya aktivite düzeylerini arttırarak ya da gen ürünlerinin fonksiyonlarını değiştirerek hücrelerde genetik hasarların oluşmasına neden olurlar (7).

Kanserin biyokimyasal belirteçleri; çeşitli metabolitlerin yanı sıra DNA, mRNA ve bazı protein yapıları olabilirler. Ayrıca apoptozis, anjiogenezis ve

proliferasyon da kanserde biyobelirteçler olarak kullanılabilir. Bu belirteçler tümörün kendisi veya diğer dokular tarafından sentezlenebilir. Belirteçler organizmanın sıvılarında, doku veya hücre dizilerinin içinde bulunabilir. Klinik olarak bu belirteçlerin kullanım amaçları oldukça çeşitlidir ve aşağıdaki 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 hormon, enzim, glikoprotein, onkofetal antijen, monoklonal immünoglobulin, reseptör, onkogen, plasental protein, karbonhidrat ve supresör gen yapılarında olabilirler. Tüm bunların yanında mikro düzeydeki sıralanma değişimler de belirteç görevi üstlenebilir (58).

Enzootik intranazal adenokarsinom (ENA) dünyada hemen hemen her ülkede küçük ruminantlarda görülen kronik, bulaşıcı ve tümöral bir hastalıktır. Burunda etmoidal mukoza bezlerinden köken alır ve burun boşluğunu doldurur. Klinik olarak solunum güçlüğü, göz-burun akıntısı ve ileri vakalarda burun kemiklerinde perforasyonlarla karakterize olur. Entansif koyun-keçi yetiştirilen bölgelerde önemli ekonomik kayıplara yol açan bir hastalıktır. İlk olarak 1953'te Cohrs tarafından rapor edildikten sonra Avusturya, Yeni Zelanda ve Büyük Britanya dışındaki koyun yetiştiriciliğinin yapıldığı tüm ülkelerde görülmüştür (25,

87). Hastalık genellikle sürüye enfekte hayvanların sokulmasıyla bulaşır. Enfekte sürülerde hastalığın prevalansı çoğunlukla %0.5-2 civarındadır ancak %15'lere kadar yükselebileceği de bildirilmiştir (87). Canlı hayvanlarda tanı nazal kavitenin kaudal kısmındaki neoplazilerin fiberoptik endoskopi ile veya x-ray muayenesinde gösterilmesiyle konulabilir (73). Henüz ENA'nın klinik teşhisi için uygun bir laboratuvar testi bulunamamıştır (13). Teşhisi doğrulamanın en kolay ve güvenilir yolu ölü veya ötenazi edilen bir hayvanın nekropsisi ve histopatolojik incelemesidir (22).

Bu çalışmada, koyun ve keçilerde doğal olarak şekillenmiş enzootik intranazal adenokarsinomlarda immunohistokimyasal olarak VEGF ve EpCAM ekspresyonlarının incelenmesi ve bu belirteçlerin tümörün patogenezindeki rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hayvanlarda Burun Boşluğu Morfolojisi

Solunum sisteminin yüze ait bölümünü oluşturan burun boşluğu yüzün ön bölümünde bulunan ve septum nasi ile ikiye ayrılan bir boşluktur. Boşluğun ön kısmında nares adı verilen burun delikleri arkada konha nasalis'e açılır (33, 36, 37). Konha nasalis burun boşluğu lateralindeki lamina basalisten orijin alan kıvrımlı kemiklerinin üzerinin burun mukozası tarafından örtülmesi ile şekillenir (6, 36, 72). Üzerindeki mukoza solunum havasını temizler, nemlendirir ve ısıtır (37). Konhalar

yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla konha nasalis dorsalis, konha nasalis media ve konha nasalis ventralis olmak üzere 3 tanedir (3, 33, 36, 76).

Konhalar solunan hava içinde bulunan ve akciğerlere zararlı olabilecek maddelerin alveollere ulaşmasını engeller. Bu nedenle normal çalışan bir burun boşluğu solunum sistemi enfeksiyonlarının oluşmasında en önemli bariyerleri oluşturur (21).

2.2. Enzootik İntranazal Adenokarsinom

Enzootik nazal adenokarsinom (ENA), koyun ve keçilerin nazal kavitelerindeki etmoidal mukozanın neoplastik üremesi ile karakterize bulaşıcı ve viral bir hastalıktır. ENA, koyun pulmoner adenomatozis virusu ile yakın ilişkili bir retrovirus tarafından oluşturulur (89). Hastalığa, genetik olarak koyun Jaagsiekte hastalığı virusu (JSRV) ile çok yakın benzerliği olan betaretrovirus grubundan enzootik nazal tümör virusu (ENTV) sebep olur (19). Virus benzeri partiküller neoplastik dokudan ilk kez Yonechi ve arkadaşları tarafından 1978 yılında hastalığın ilk rapor edilışinden ve viral etiyolojili olduğu hipotezinin üzerinden yıllar geçtikten sonra gösterilebilmiştir (19, 84). ENTV'nin, koyunlarda enfeksiyon oluşturan ENTV-1 ve keçilerde enfeksiyon oluşturan ENTV-2 olmak üzere 2 alt tipi bulunmaktadır (19, 74). ENTV'nin tam sekansı belirlenmiştir ve bu sekans datasına göre tip B ve D retrovirus olarak sınıflandırılmıştır (19, 20). Tümörler, genel olarak hücre proliferasyonunu düzenleyen genlerdeki bozukluklar nedeniyle oluşmaktadır. Onkojenik retroviruslar, hücre proliferasyonunu uyaran onkogenlere sahiptirler (101). Retroviruslarda, 30'dan fazla onkogen tanımlanmıştır (97). Bütün onkojenik RNA virüsleri, retrovirus familyasına dahildir (45).

ENA dünyada hemen hemen her ülkede görülen bir hastalıktır. İlk olarak 1953'te Cohrs tarafından rapor edildikten sonra Avusturya, Yeni Zelanda ve Büyük Britanya dışındaki koyun yetiştiriciliğinin yapıldığı tüm ülkelerde görülmüştür (25, 87).

Hastalık horizontal olarak ve genellikle solunum yoluyla bulaşır. ENA, deneysel olarak koyunlarda neoplastik doku homojenatlarının intranazal ve intrasinuzoidal inokülasyonu ve doğal enfekte keçilerin nazal eksudatları ile bulaştırılabilmektedir (18, 23).

Hastalık genellikle sürüye enfekte hayvanların sokulmasıyla bulaşır. Enfekte sürülerde hastalığın prevalansı çoğunlukla % 0.5-2 civarındadır ancak % 15'lere kadar yükselebileceği de bildirilmiştir (87). ENA'nın farklı koyun ve keçi ırkından oluşan sürülerde aynı prevalansa sahip olması, cinsiyet ve ırk eğiliminin olmadığını göstermektedir (23, 25, 66).

ENA genellikle 2 yaşın üstündeki hayvanlarda gözlenmektedir (87). Ancak 9-12 aylık koyunlarda da ENA raporları mevcuttur (25, 102). En yaşlı ENA olgusu ise 9 yaşındaki bir koyundan bildirilmiştir (31). Hastalık klinik olarak genellikle purulent veya serömüköz burun akıntısı, dispne, horlama öksürme, hapşırma, ağızdan soluk alık verme ve daha az sıklıkla ise ekzoftalmus ve kafatası kemiklerinde deformasyonlarla seyrederek (23, 25, 73, 81, 102). Lakrimasyon, konjunktivitis, fasiyal asimetri, kafa sallama gibi bulgular da bildirilmiştir (31, 70, 81, 103, 104). Kronik nazal akıntıya bağlı olarak burun deliklerinin çevresinde depigmentasyon ve alopesi görülebilir (87). Enfekte hayvanlarda anoreksi, progresif bir zayıflama ve ilk klinik belirti görülmesinden sonra 90 gün içinde Pasteurella ve diğer komplikasyonlara bağlı olarak ölüm görülür (23, 25, 66, 73, 102).

Hastaların kafatası radyografisinde nazal kavitenin kaudalinde unilateral veya bilateral radiopak kitleler genellikle gözlenir (23, 31, 69, 73, 103). Tümör oluşumunun başlangıcında kitleler milier çıkıntılar tarzında görünür ve sonrasında her iki nazal kaviteyi tıkayabilen, farinkse paranazal sinuslara, kafatası boşluklarına doğru büyüeyebilen ve çevre dokulara baskı yapabilen polip benzeri nodüler yapılar şekillenir (4, 23, 25, 27, 29, 31, 44, 66, 102).

Canlı hayvanlarda tanı nazal kavitenin kaudal kısmındaki neoplazilerin fiberoptik endoskopi ile veya x-ray muayenesinde gösterilmesiyle konulabilir (73). Henüz ENA'nın klinik teşhisi için uygun bir laboratuvar testi bulunamamıştır (74). Teşhisi doğrulamanın en kolay ve güvenilir yolu ölü veya ötenazi edilen bir hayvanın patolojik muayenesidir. Neoplazi kafatasının sagittal kesitinin patoanatomik muayenesinde, gri-beyaz renkte, yumuşaktan serteye kadar değişebilen, nazal kavitenin kaudalini tek veya çift taraflı olarak tıkamış şekilde kolaylıkla fark edilebilir. ENA teşhisini doğrulamak için histopatolojik muayene gereklidir (87). Disekte parçalardan ENA virusünü ayırabilmek için birkaç laboratuvar metodu vardır. Western Blotting metodu ile enfekte hayvanların neoplastik dokularında ve nazal eksudatta virus tespit edilebilir (25, 73). Koyun pulmoner adenomatozisine karşı oluşan primer antikorlar kullanılarak, neoplastik hücrelerin apikal bölgelerinde pozitif immunohistokimyasal reaksiyon tespit edilmiştir (25). Çapları 80-100 nm aralığında olan karakteristik viral partiküller elektron mikroskopuyla neoplastik dokuda gösterilebilir (23, 25, 66). ENT virusü in-vitro koşullarda üretilmediği için hücre kültüründe virus izolasyonu uygulanabilir değildir (20).

2.3. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) 45 kDA ağırlığında, damar endotel hücrelerine spesifik olan homodimerik glikoprotein yapısında heparin bağlayıcı özellikteki büyüme faktörüdür (96, 100). VEGF ailesini oluşturan üyeler vücutta fizyolojik ve patolojik olaylarda görev alabildiğinden araştırmalara sıklıkla konu olmuştur (100). Kobay derisinde bir vasküler sızıntı başlattığı için VEGF ailesi ilk keşfedildiğinde Vasküler Permeabilite Faktörü (VPF) ismi verilmiştir (40, 77). 1989 yılında ailenin ilk anjiogenik faktörü vasküler endotelial büyüme faktörü ayrıştırılarak aileye dahil olmuştur (93). Gelişim, vaskülojenez, anjiogenez tümör oluşumu ve inflamasyon için aracı VEGF, endotel hücrelerinin çoğalmasında, göç etmesinde ve farklılaşmasında önemli rol oynar (9, 86). VEGF ailesinin VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, Plasental büyüme faktörü (PlGF) ve bir yılın zehiri olan VEGF'ü içeren (svVEGF, VEGF-F) 7 üyeden meydana geldiği yapılan çalışmalar sonucu görülmüştür. Endotelial büyüme faktörü olan VEGF Human VEGF'ü yani VEGF-A'yı ifade eder (40, 57). Anjiogenez sürecinin regülasyonunda temel faktör olarak bir çok kanser türünde fazla eksprese olduğu kanıtlanmış olan VEGF, endotel hücrelerinin aktivasyonunu sağlamanın yanı sıra endotel hücreleri için bilinen en spesifik mitojendir (12, 53, 60). VEGF'nin bağlandığı 5 tane reseptör vardır, bunlar VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-1 ve sVEGFR-2'dir (9). İlk olarak embriyogenez esnasında sentezlenen VEGF reseptör-1 (VEGFR-1, flt-1) ve VEGF reseptör-2 (VEGFR-2, flk-1, KDR) bulunmuştur. Bu reseptörlerin içerdiği amino asitlerin % 44'ü ortaktır (42). Ancak VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin sinyal özelliklerinin diğer reseptörlerden farklı olduğu bilinmektedir (82).

VEGF terimi ile genellikle VEGF-A ifade edilmektedir (88, 99). VEGF hücrenin yaşaması, endotel hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması, yeni kapillar damarların şekillenmesi, supresyon durumlarında hücresel proliferasyon için gereklidir (52, 56, 62). VEGF extraselüler hücre yıkımını uyaran metalloproteazlar, ürkinaz ve doku tipi plazminojeni aktive ederek invazyon ve metastazı kolaylaştırır.

2.4. Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM)

Epitel hücre adezyon molekülü kolon, prostat, meme kanseri ve diğer epitelyal karsinomlarda yüksek düzeyde eksprese edildiği ispatlanmış bir yüzey molekülüdür. EpCAM çok sayıda klinik araştırmada antikor tedavisi hedefi olmuştur. Yapılan çalışmaların birinde EpCAM, mRNA, ekspresyonu real time – PCR ile ölçülmüş ve primer ve metastatik meme kanserinde EpCAM ekspresyonununun 100-1000 kat arttığı gözlenmiştir (75). EpCAM kalsiyumdan bağımsız homotipik hücreler arası adezyon molekülü olarak görev yapar. EpCAM'in de diğer adezyon molekülleriyle ortak olarak hücre prognozu, transformasyon ve diğer biyolojik özellikleri belirlemede önemli bir rolü mevcuttur. EpCAM intraselüler olarak sentezlendiğinde hücre-hücre adezyonu, hücre agregasyonu ve hücre saçılımının önlenmesi aşamalarında yapışma özelliğini sergiler (8).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada materyal olarak, 2010-2015 yılları arasında Burdur, Antalya, Isparta ve Denizli illerinden rutin teşhis amacıyla Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilen ve enzootik intranasal adenokarsinom teşhisi konmuş toplam 24 adet keçi ve 1 koyuna ait bloklanmış tümör dokuları ile nekropsi yapılan keçilerden toplanan örnekler kullanıldı. Kontrol olarak rutin nekropsilerde enzootik intranasal adenokarsinom bulunmayan 5 adet keçiden alınan normal burun dokusu örnekleri değerlendirildi.

3.2. Sitolojik İnceleme

Sitolojik inceleme için nekropsi esnasında normal lamlar üzerine taze tümör dokusundan tuşe preparat hazırlandı. Lamlar hava akımında kurutulduktan sonra metil alkolde tespit edildi ve Giemsa yöntemi ile boyandı. Üzeri lamel ile kapatılan lamlar ışık mikroskopunda incelendi. Sitolojik preparatlar histolojik preparatlar ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.3. Histopatolojik İnceleme

Bloklanmış tümör dokusu örneklerinden 5 µm kalınlığında normal ve Poly-L-lysin'li (Thermo Scientifica Menzel-Glaser) lamlara seri Leica RM 2155 mikrotom ile alındı. Normal lamlara alınan kesitler, hematoksilin ve eozin (HE) ile boyandı (63). Poly-L-lysin'li lamlara alınan kesitler ise immunohistokimyasal incelemeler için kullanıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus CX451) incelendi. Mikroskopik dijital fotoğraflamalar morfometrik incelemeler

için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo) kullanıldı.

3.4. İmmunohistokimyasal İnceleme

İmmunohistokimyasal incelemeler için Poly-L-lysin'li lamlara alınan kesitlere Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) metodu uygulandı. Çalışmada kullanılan kitler Abcam Firmasından (İngiltere) temin edildi. Sekonder kit olarak Expose Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB detection IHC Kit (ab80436) ilgili firmanın önerdiği şekilde dokulara uygulandı. VEGF için Anti-VEGF antibody [VG-1] (ab1316) ve Epcam için Anti-EpCAM antibody (ab71916) primer serumları kullanıldı. Parafin kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinize ve rehidre edildi. Testin her aşaması nemli kamarada gerçekleştirildi ve takipler arasında kesitler 3x5 dakika süreyle fosfat tamponlu solüsyonu (PBS, pH 7,2) ile yıkandı. Lamlar metanolde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 30 dakika süreyle inkübe edilerek dokuların endojen peroksidaz aktivitesi engellendi. Kesitler, spesifik olmayan antijenik bağlanmaları engellemek için, ticari %10'luk normal serumda, oda ısısında 10 dakika süreyle inkübe edildi. Sonraki adımda, lamlar VEGF ve EpCAM primer antikoları ile kaplandı ve +4 °C'de bir gece süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra lamlar, kullanıma hazır biyotinlenmiş sekonder antikor ile kaplandı ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Bunu takiben kesitler Streptavidin Peroksidaz konjugatı ile oda ısısında 15 dakika süreyle inkübe edildi ve 15 dakika DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) substratı uygulandıktan sonra işlem sonlandırıldı. Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra dokular alkol serilerinden geçirilip dehidre edildi. Ksilolde şeffaflandırılan kesitler yapıştırıcı (Entellan-Merck) ile kapatıldı. Tüm kesitlerin

aynı şartlarda ve prosedürde boyanmasından sonra sonuçlar ve dokulardaki ekspresyon yoğunlukları ışık mikroskopunda semikantitatif olarak değerlendirildi.

Kullanılan antikolar, bunların boyadığı dokular, sulandırma oranları ve hücresel yerleşimleri Tablo 3.1’de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Kullanılan antikolar, sulandırma oranları ve hücresel yerleşimleri.

Antikor	Sulandırma oranları (PBS’de)	Hücresel yerleşim
VEGF	1/100	İntrasitoplazmik
EpCAM	1/100	İntrasitoplazmik

3.5. Elektronmikroskopik inceleme

Çalışmada kullanılan örneklerden üçü Retrovirusların varlığı açısından elektron mikroskopik olarak incelendi. Bu amaçla birincil fiksatif olarak tamponlanmış gluteraldehit kullanıldı. Küçük koyu renkli bir şişelere bir miktar hazırlanan fiksatif dökülüp içine doku örnekleri atıldı. Şişelerin ağzı kapatılıp maksimum 24 saat buzdolabında (+4 °C) bekletilerek fiksasyon sağlandı. Fiksasyon sonrasında, materyaller soğuk zincirde Akdeniz Üniversitesine nakledildi. Yöntemine uygun olarak hazırlanan bloklar ultramikrotomda (Leica Ultracut R) 700 nm kalınlığında kesilerek toluidin mavisiyle boyanmış ve biyofilm olması muhtemel olan yüzey kısımları ışık mikroskopunda (Olympus BX50) incelendi. TEM’de görüntülenmesi istenilen alanlar belirlendikten sonra dokular tekrar trimlenerek ve ultramikrotomda 60 nm kalınlığında tam ince kesitleri alındı.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Nekropsisi yapılan veya arşiv kayıtları incelenen keçilerin genellikle 2 yaşın üstündeki hayvanlar olduğu gözlemlendi. Klinik olarak çoğunlukla purulent veya serömüköz burun akıntısı, dispne, horlama, öksürme, hapşırma, ağızdan soluk alıp verme ve daha az sıklıkla ise ekzoftalmus ve kafatası kemiklerinde deformasyonların olduğu dikkati çekti. Lakrimasyon, konjunktivitis, bazı keçilerde fasiyal asimetri, kafa sallama gibi bulgular da tespit edildi (Şekil 4.1-4.3). Kronik nazal akıntıya bağlı olarak burun deliklerinin çevresinde depigmentasyon ve alopesi görüldü. Enfekte hayvanlarda anoreksi, değişen düzeylerde kaşeksi gözlemlendi. Bazı hayvan sahipleri kemiklerde perforasyonlar bildirdi.



Şekil 4.1. ENA'lı bir keçide gözlenen lakrimasyon.



Şekil 4.2. ENA'lı bir başka keçide karakteristik burun akıntısı ve ekzoftalmus tablosu.



Şekil 4.3. ENA'lı bir başka keçinin klinik görünümü.

4.2. Makroskopik Bulgular

Makroskopik olarak burun boşluğunun sagittal kesitlerinde tüm hayvanlarda unilateral veya bilateral olarak nazal kavitenin etmoidal bölgesinde değişik büyüklüklerde tümöral kitleler gözlemlendi. Dokular düzensiz yapıda pembemsi beyaz renkte polipoid (1-2.5 cm uzunluğunda), sapsız (0.5-3 cm çapında) görünümde ve serömüköz eksudatla kaplı bir görünümdeydi. Çoğunlukla yumuşak kıvamlı olan kitlelerin kesit yüzlerinde sert alanlara da rastlandı. Tümöral kitlelerin kesit yüzleri genellikle homojen ve beyazımsı pembe renkliydi. Bazı hayvanlarda tümöral kitlelerde yer yer nekrotik alanlar ve yüzeylerinde fibrinopurulent eksudat dikkati çekti. Bazı olgularda tümöral kitlelerin üzeri nekrotik doku artıkları ve purulent eksudat ile kaplıydı. Hayvan sahiplerinin bazıları burunda kanamalar şekillendiğini de bildirdi ancak incelediğimiz hayvanlarda böyle bir bulgu gözlenmedi.

Birkaç olguda kemiklerde incelmeler dikkati çekti. Sadece iki olguda sinüslara invazyon görüldü ancak çalışmaya dahil olan hayvanlarda lenf düğümü veya iç organ metastazları saptanmadı. Hayvanlarda hareket etmede isteksizlik ve zayıflama, ileri dönemlerde ise kaşeksi saptandı. İştahsızlık ve tüylerde kabarma genellikle son devre bulgularındandı. (Şekil 4.4-4.5).



Şekil 4.4. Burun boşluğunu tamamen doldurmuş ve septumda deviasyona sebep olmuş tümöral kitleler.

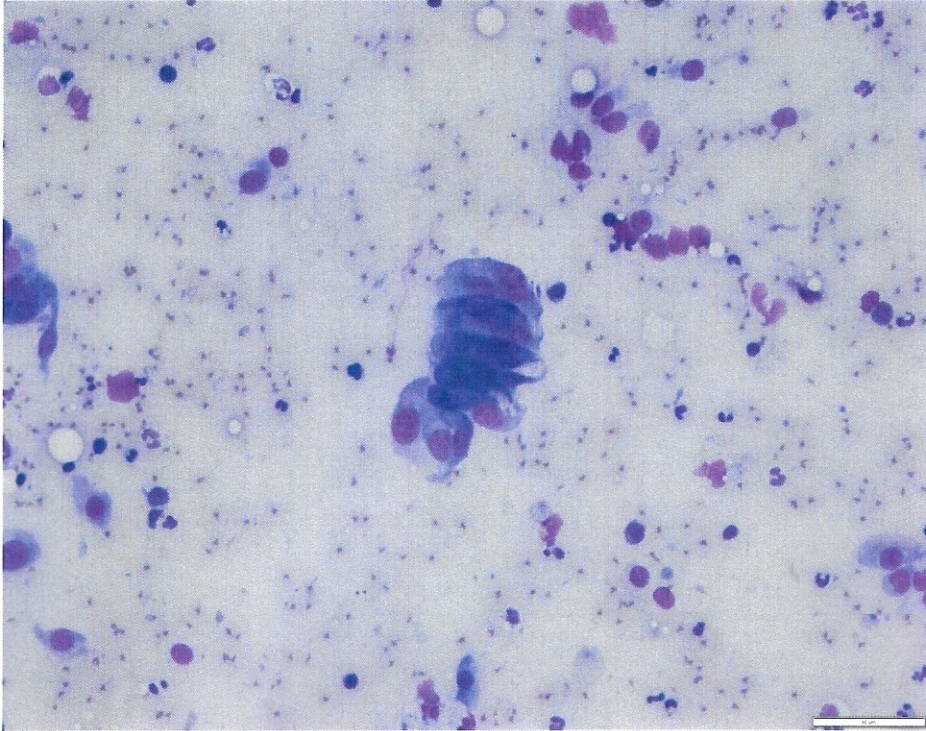


Şekil 4.5. Başka bir ENA'lı keçide burun boşluğunun görünümü

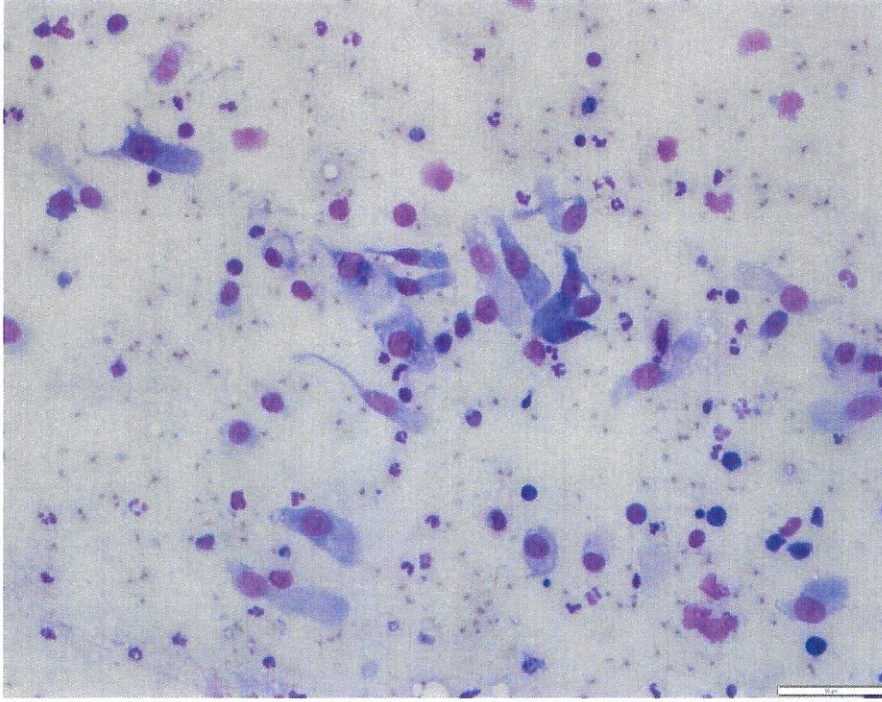
4.3. Sitolojik Bulgular

Sitolojik preparatların incelemesinde, tümöral hücrelerin genellikle gruplar halinde oldukları gözlemlendi. Hücrelerin belirgin ve veziküler çekirdekleri ile genellikle soluk bir sitoplazmalarının bulunduğu dikkati çekti. Hücreler kübik bazen prizmatik şekilli ve lateral yüzlerinden birbirine tutunmuş bir görünümdeydi. Yer yer yalancı çok katlı normal burun epitel hücreleri de gözlemlendi.

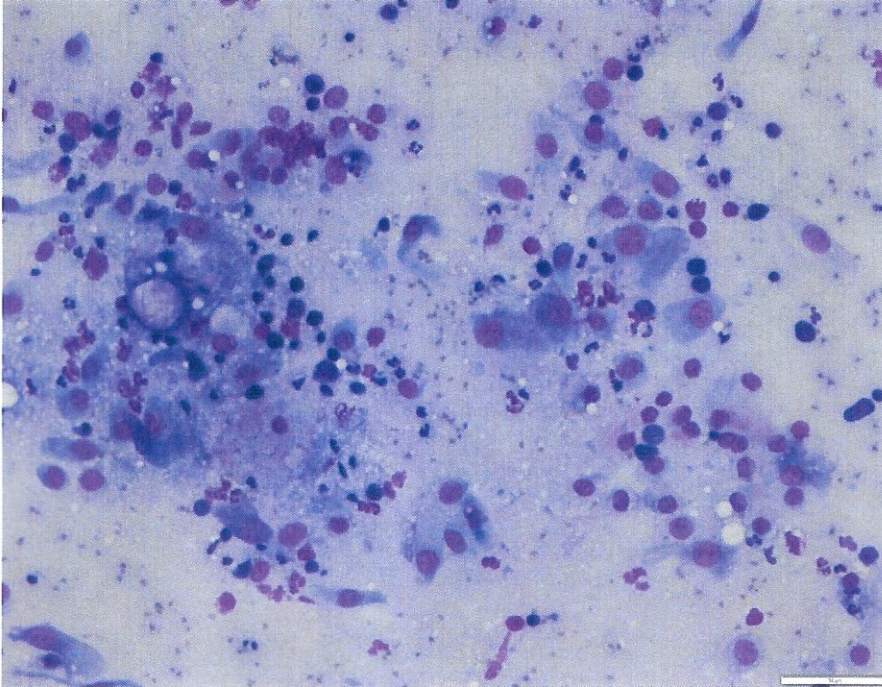
Sitolojik incelemede çok sayıda lenfosit ve nötrofilinde bulunduğu gözlemlendi. Eritrositlere de sıklıkla rastlandı. Preparat zemini yoğun mukus sebebiyle mavimsi bir renk oluşturmuştu (Şekil 4.6-4.8).



Şekil 4.6. Taze tümör dokusundan hazırlanan tuşe preparatın Giemsa yöntemi ile boyanması sonucu görülen küme halindeki tümöral hücreler ile eritrosit ve lökosit seriden hücreler. Giemsa metodu, Bar= 100 μm .



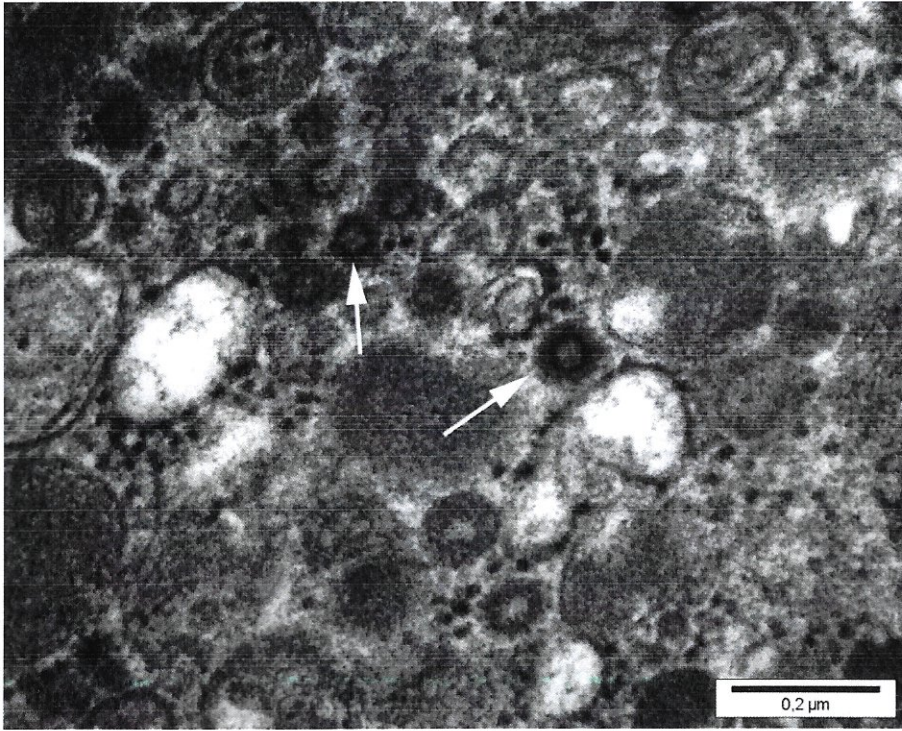
Şekil 4.7. Başka bir sitolojik preparatta kübik yuvarlak şekilli tümör hücreleri, Giemsa metodu, Bar= 100 μ m.



Şekil 4.8. Tümör hücreleri arasında yoğun yangısal hücre infiltrasyonları, Giemsa metodu, Bar= 100 μ m.

4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular

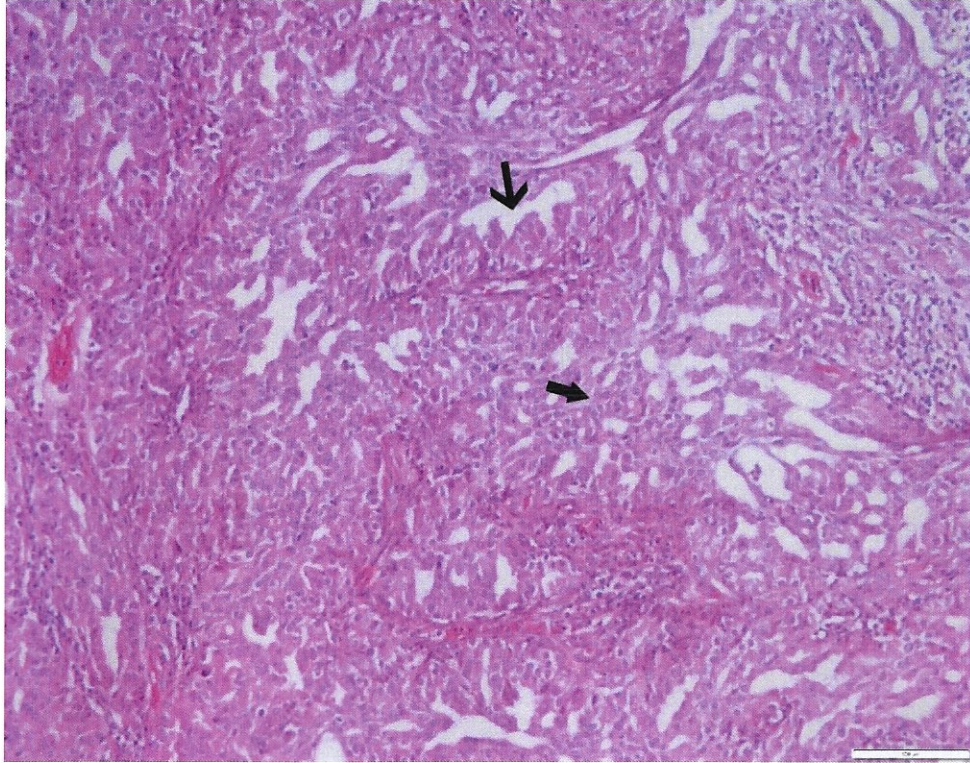
Elektron mikroskopide, neoplastik hücrelerin sitoplazmasından, boyutları 0.2-1 μm arasında değişen, elektron opak, yuvarlak, zarla çevrili karakteristik salgı granülleri gözlemlendi. Neoplastik epitel hücrelerinde vakuoller içerisinde ve apikal yüzeye yakın virüs benzeri partiküllerin olduğu görüldü. Partiküllerin çapı 10-80 nm arasında değişmekteydi ve 47 nm çapıyla ekzantrik veya merkezi yerleşimli elektron yoğun karakteristik nükleoidi bulunuyordu. Nükleoid düzensiz bir zarla çevriliydi. Çekirdekler (8-14 nm çapında) yuvarlak veya oval ve belirgin ökromatikti. Hücre sitoplazması boyutları 220-540 nm arasında değişen sayısız salgı granülleri içeren şeffaf matriksli bir yapıda olduğu tespit edildi. Çapları 70 ile 90 nm arasında değişen intrasitoplazmik küresel virüs benzeri partiküllerin varlığı elektron mikroskopik incelemelerde gösterildi. (Şekil 4.9).



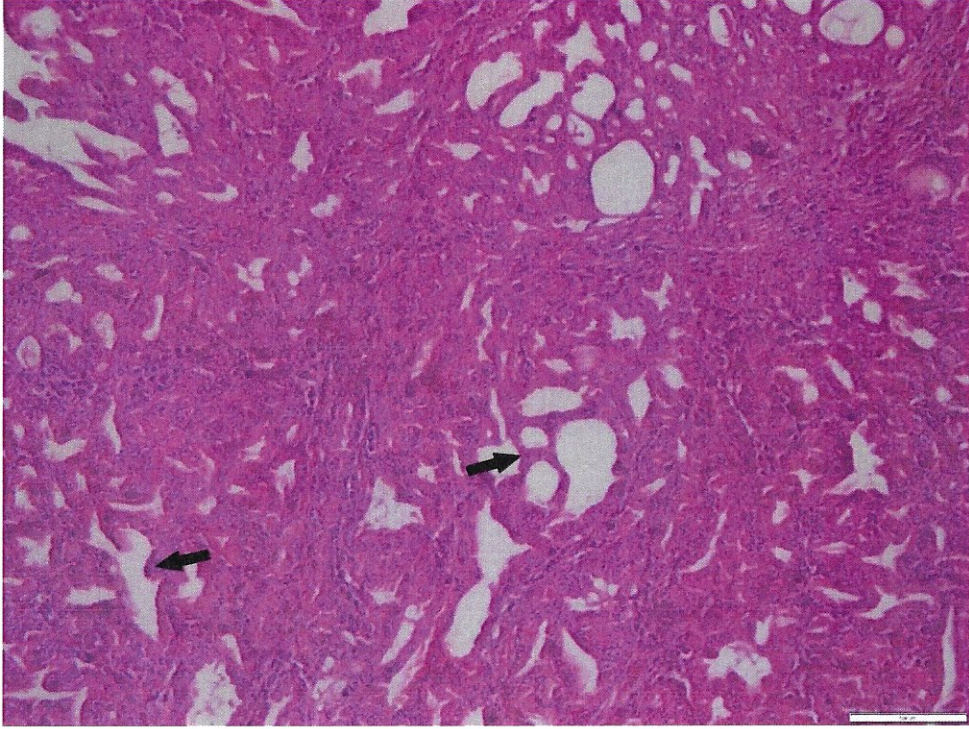
Şekil 4.9. Tümöral hücre sitoplazmalarında retroviral yapılar, Bar=0.2 μm .

4.5. Histopatolojik Bulgular

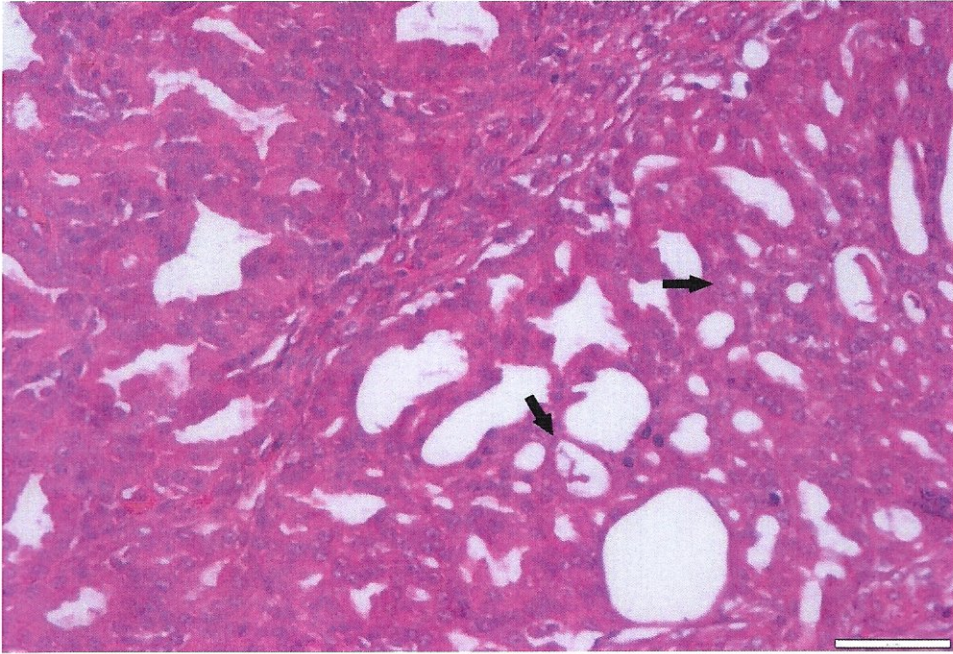
Histopatolojik olarak, ENA'lı tüm vakalarımızda benzer ve karakteristik bulgular saptandı. Olgularımız arasında tubuler, papiller ve miks tümör çeşitlerinin tümü gözlemlendi. Vakalarımızın 9 tanesi tubuler, 10 tanesi papiller ve 6 tanesi ise miks yapılı tümör olarak tanımlandı. Tümör hücrelerinin, çoğunlukla uniform yapıda, kübik şekilli, çekirdeğinin ise ovalden yuvarlağa değişen şekillerde olmasının yanı sıra nükleusunun hiperkromatik olduğu gözlemlendi. Mitotik figürler sık gözlenmedi. Olgularımızın 9 tanesinde stromada çok sayıda lenfosit, plazma hücresi ve makrofaj infiltrasyonları izlendi (Şekil 4.10-4.13).



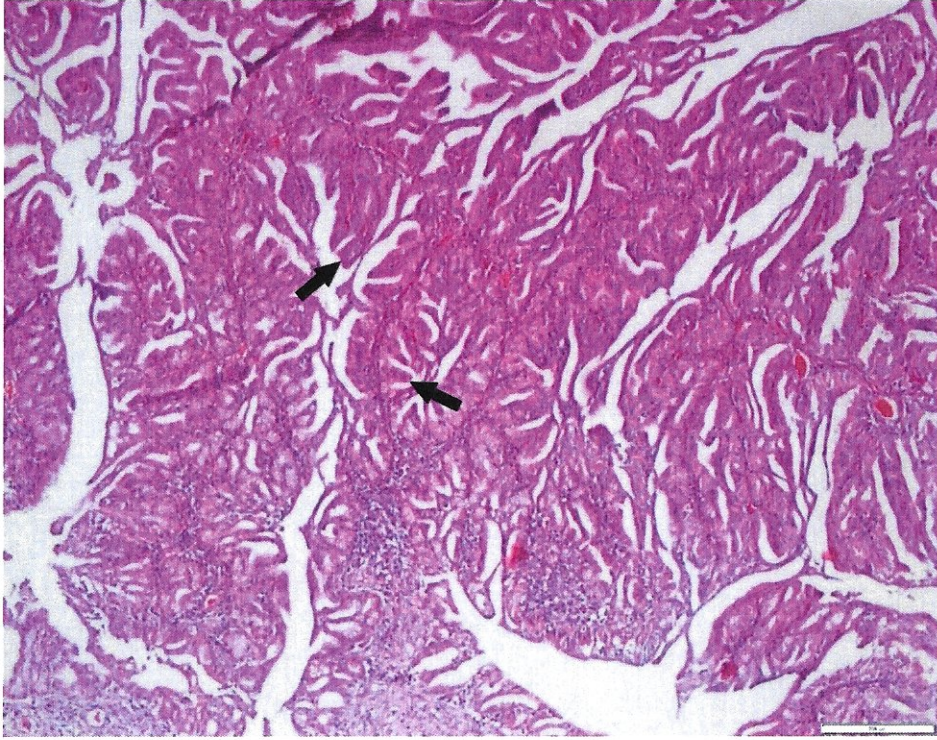
Şekil 4.10. ENA'nın histopatolojik görünümü, tümöral kitle içinde tubüler (kalın ok) ve papiller (ince ok) yapılar, mikst form, HE, Bar= 100µm.



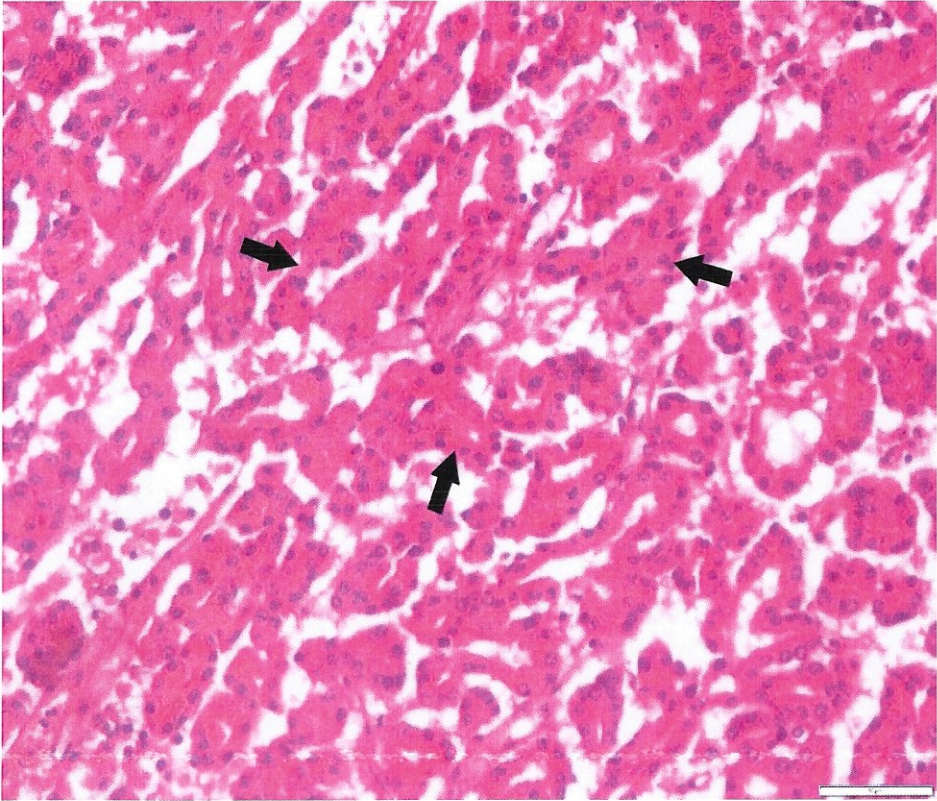
Şekil 4.11. Tümör dokusundaki tubüler ve kistik yapılar (oklar), HE, Bar=100µm.



Şekil 4.12. Tümör hücrelerinin büyük büyütmedeki görünümü, HE, Bar=50µm.



Şekil 4.13. Tümör kitlesinde papiller uzantılar (oklar), HE, Bar=200µm.

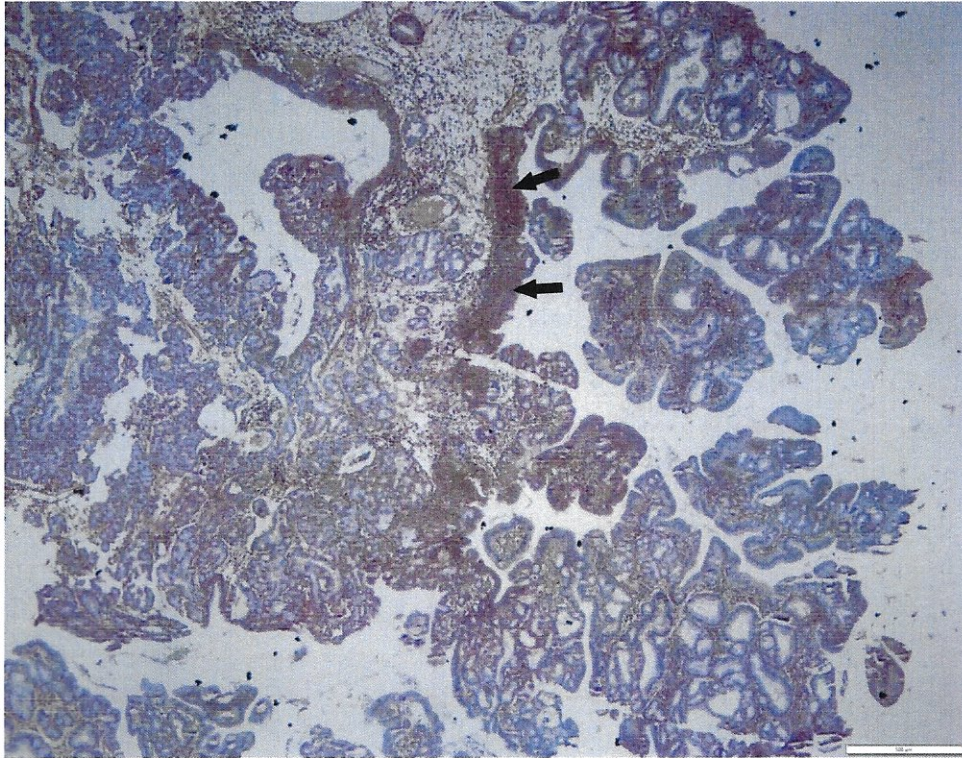


Şekil 4.14. Tümöral etmoidal bez hücrelerinin görünümü, HE, Bar=100µm.

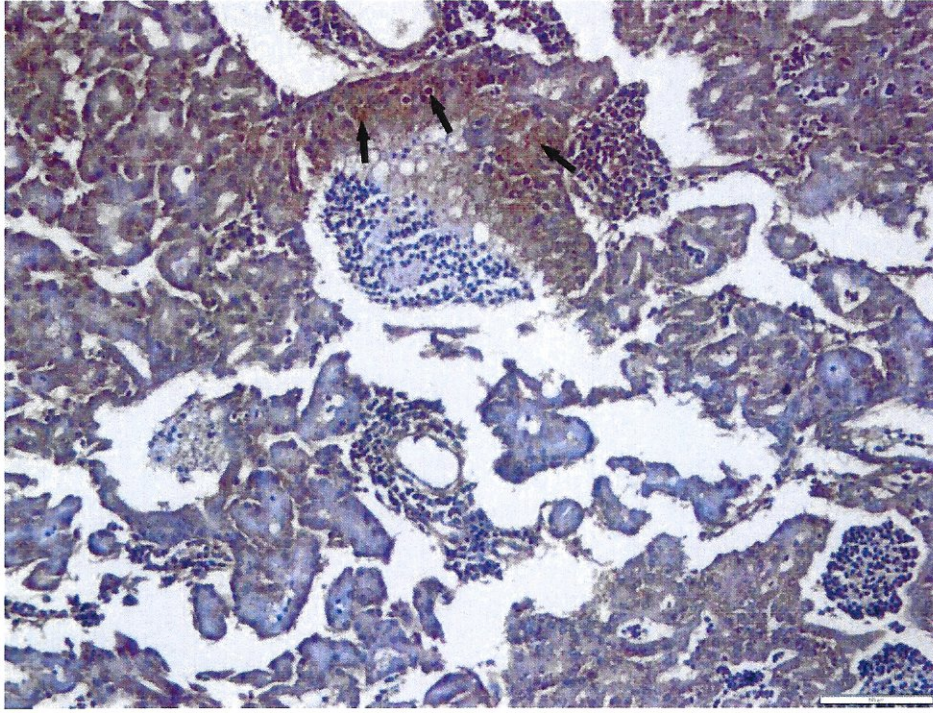
4.6. İmmunohistokimyasal Bulgular

İncelenen tümör dokularında hem VEGF hem de EpCAM aktivitesinin normal dokuya göre artış gösterdiği gözlemlendi. EpCAM aktivitesinin tümör hücrelerinin birçoğunda şiddetli bir şekilde ekspresyona edildiği, bazı tümörlerde ise hafif ve orta şiddette immunoreaksiyon verdiği dikkati çekti (Şekil 4.15-4.20).

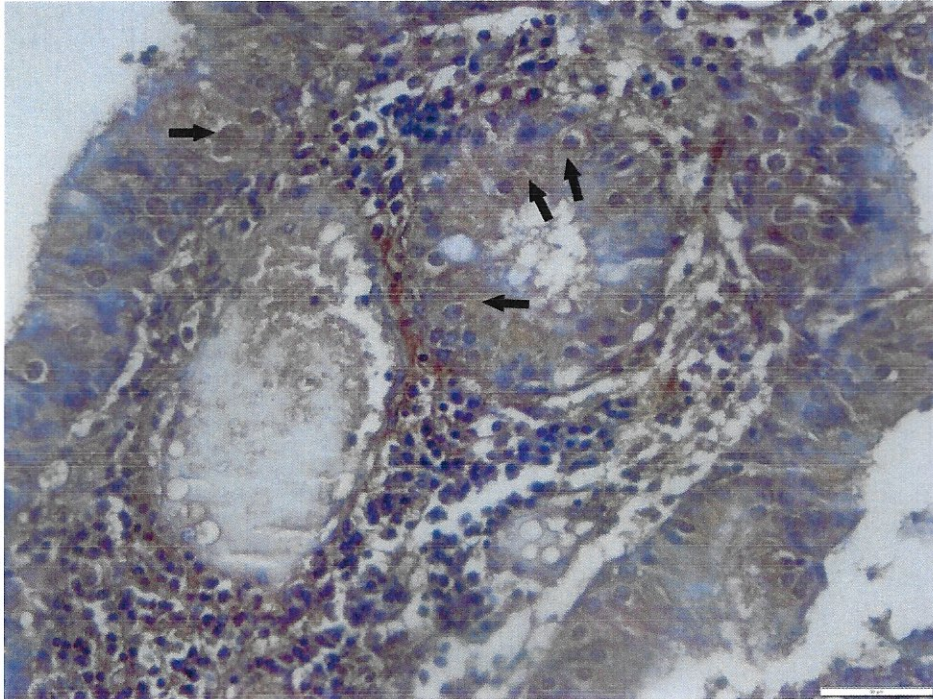
Kontrol olarak enzootik intranazal adenokarsinomu bulunmayan 5 adet keçiden alınan normal doku örneklerinde VEGF ve EpCAM ile negatif ya da zayıf immunoreaksiyon görüldü.



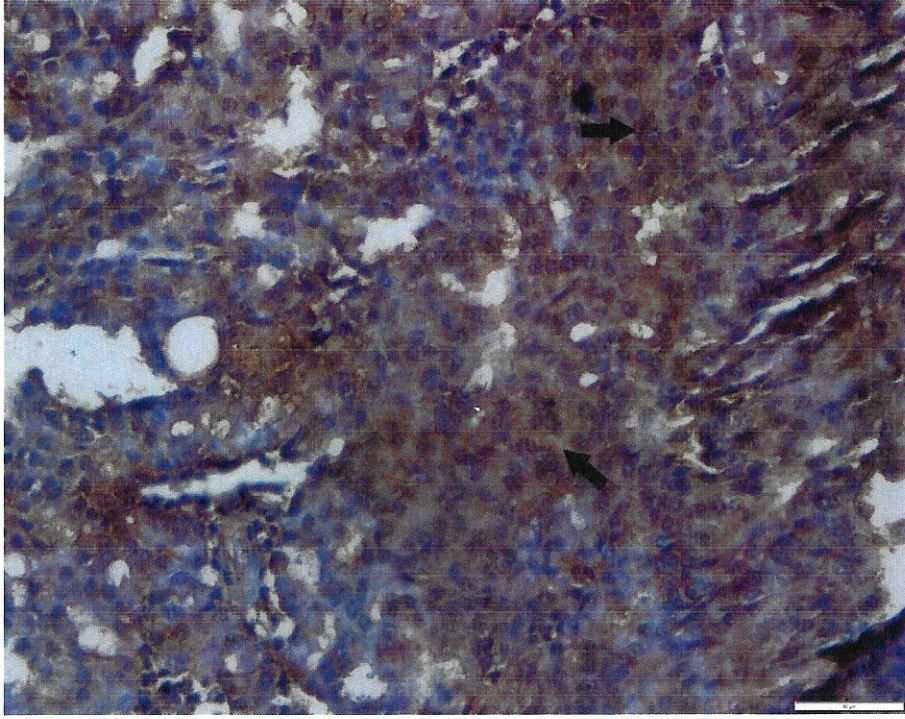
Şekil 4.15. Tümöral kitle içinde artmış EpCAM reaksiyonu, (oklar) Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=500µm.



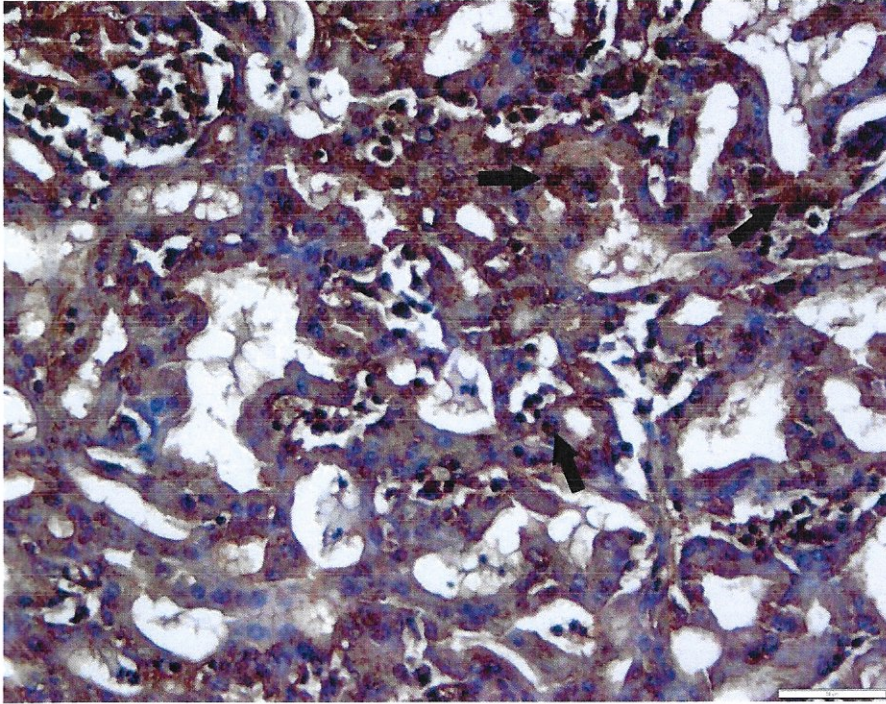
Şekil 4.16. EpCAM' in tümör hücresindeki ekspresyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=100µm.



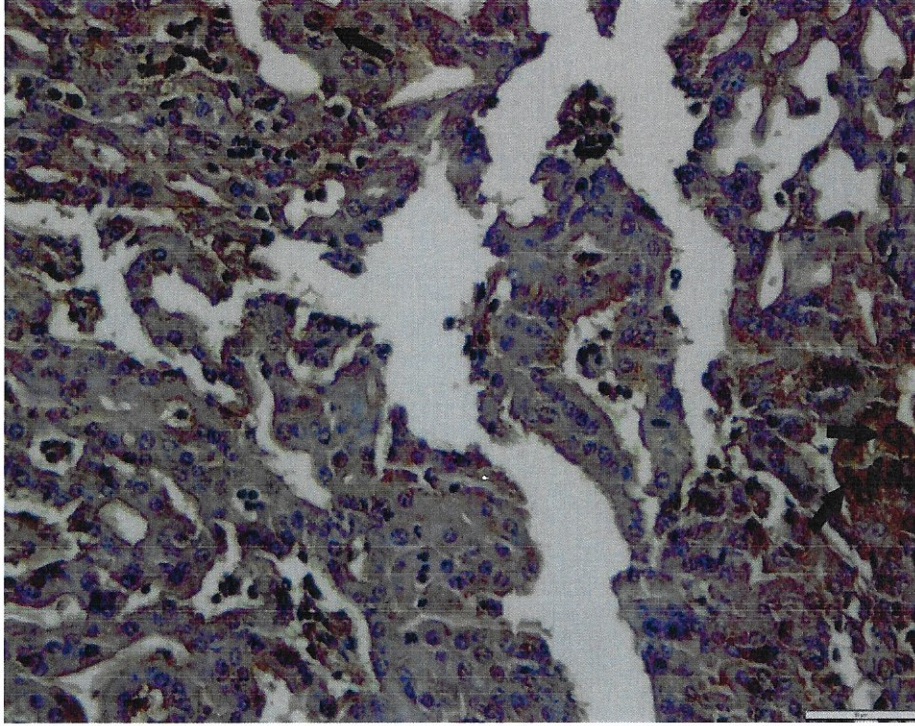
Şekil 4.17. Prolifere hücrelerde EpCAM immunoreksiyonu, (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=50µm.



Şekil 4.18. Tümöral hücrelerin EpCAM ekspirasyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=50µm.



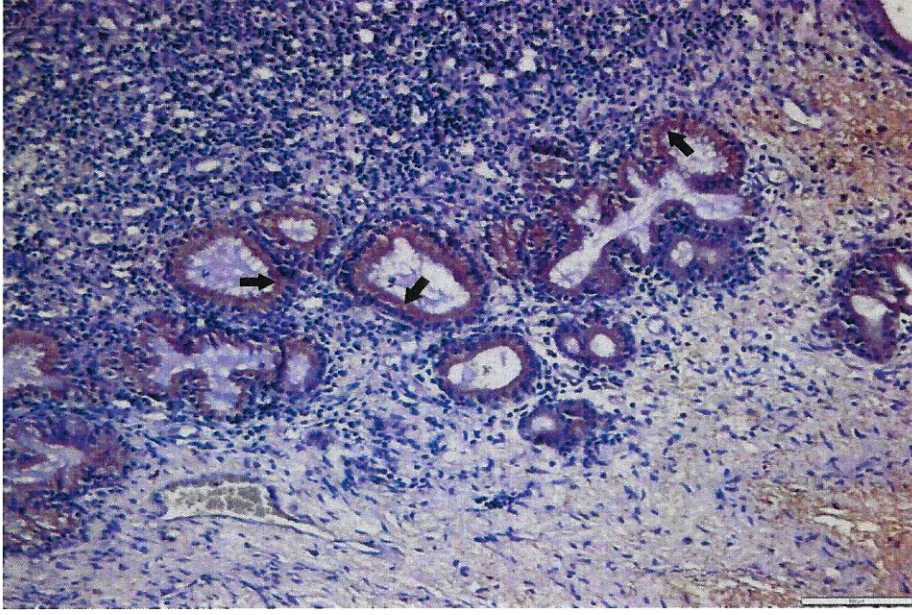
Şekil 4.19. Başka bir tümördeki hücrelerin EpCAM ekspirasyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=50µm



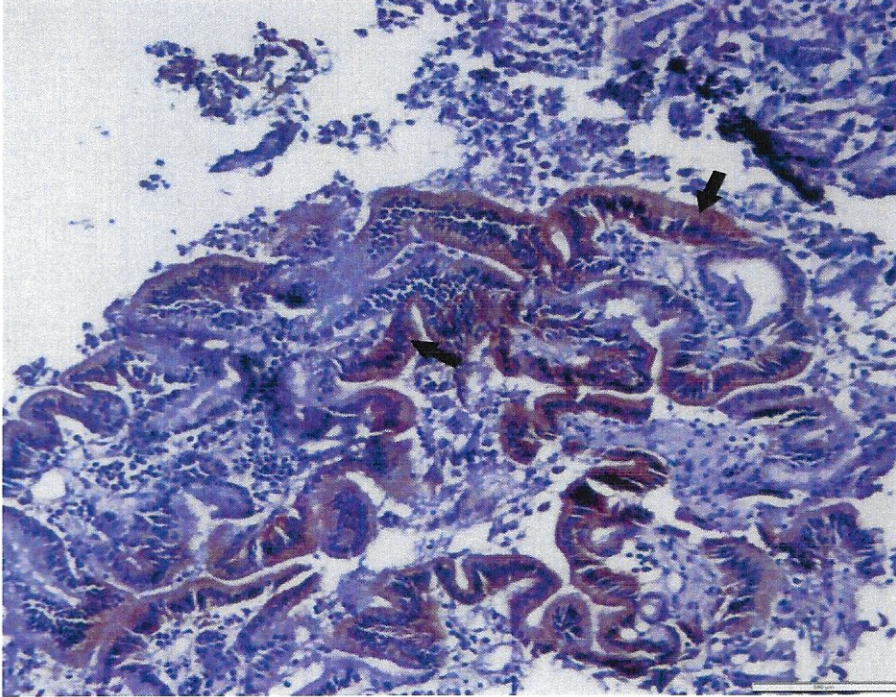
Şekil 4.20. Miks tipteki bir tümörde hücrelerin EpCAM ekspresyonları, Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=50µm

Bu çalışmada EpCAM ekspresyonu ile tümör tipleri arasında bir bağlantı tespit edilememiştir. EpCAM reaksiyonu genellikle hücre membranına yakın bölgelerde ve sitoplazmik olarak saptanmıştır. Normal hücrelerde çok hafif veya hiç gözlenmeyen EpCAM ekspresyonu tümoral gelişim ile ilişkili bulunmuştur.

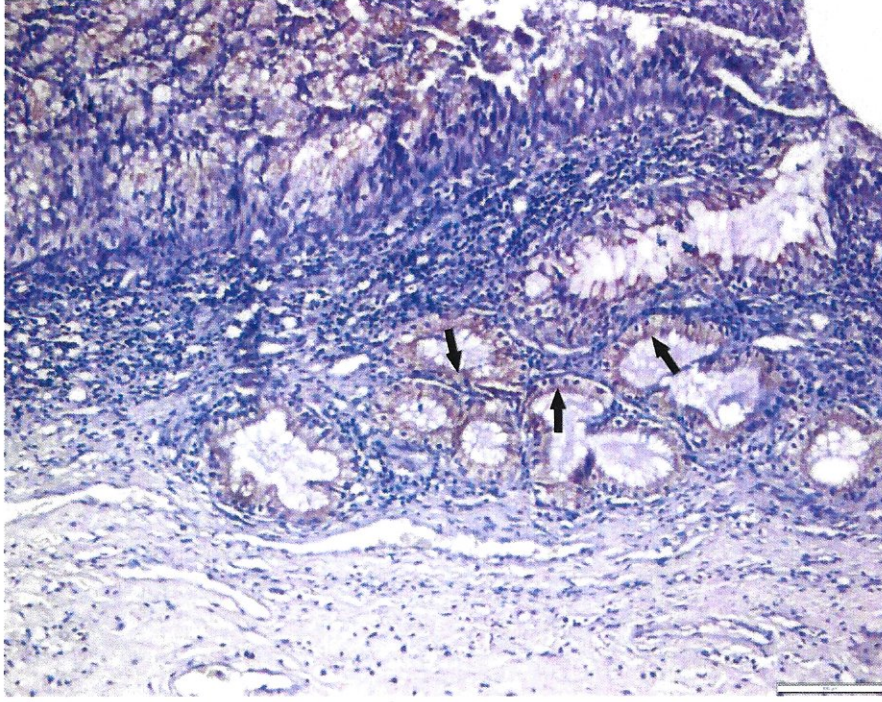
Benzer şekilde VEGF immunoreaksiyonları kontrol dokuları ile kıyaslandığında tümöral dokularda artış gösterdi. Kontrol dokularında bazı hücrelerde hafif VEGF reaksiyonu gözlenirken ENA odaklarında pek çok hücrenin ve genellikle belirgin şekilde VEGF eksprese ettikleri gözlendi. Tümoral gelişim ile VEGF arasında bir bağlantı dikkati çekti (Şekil 4.21-4.23).



Şekil 4.21. Yeni şekillenen tümöral hücrelerde artmış VEGF ekspresyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=100µm.



Şekil 4.22. Miks formdaki bir ENA olgusunda tümöral hücrelerde artmış VEGF immunoreaksiyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=100µm



Şekil 4.23. Başka bir ENA olgusunda tümöral hücrelerde artmış VEGF immunoreaksiyonu (oklar), Streptavidin biotin peroksidaz metot, Bar=100µm

Bu çalışmada EpCAM ve VEGF immunoreaksiyonlarının sadece tümöral bez hücrelerinde değil aynı zamanda intertisyel doku hücrelerinde de arttığı dikkati çekti. Bu sonuçlar ENA'nın malign karakterini desteklemektedir. Ülkemizde son yıllarda sıkça gözlenmeye başlayan bu hastalığın ileride koyun-keçi yetiştiriciliğinde önemli bir problem olabileceğini düşündürmektedir.

5. TARTIŞMA

Enzootik nazal adenokarsinom (ENA), ülkemizde ilk kez 2010 yılında rapor edilmiş olup, Burdur ve çevresinde sık gözlenen bir hastalık olma konumuna gelmiştir (98). Hastalık kronik seyirli ve genellikle pek incilemesi yapılmayan burun boşluğunu yerleşmesi sebebiyle teşhisi saha Veteriner Hekimleri tarafından atlanmakta ve muhtemelen bu sebepten dolayı insidas konusunda bilgiler yetersizdir. Ancak Anabilim Dalımız laboratuvar verileri incelendiğinde hastalığın insidensinin özellikle keçi yetiştiriciliği yapılan bölgemizde hiçte az olmadığı görülmektedir. Hastalığın üzerinde önemle durulmamasının bir sebebi de sürüde salgınlar şeklinde seyretmemesi zaman zaman birkaç hayvanın ölmesine sebep olan kronik seyirinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak hastalığın sürüde önemli ekonomik kayıplara yol açtığı görülmekte ve dikkatler son yıllarda bu hastalık üzerine yoğunlaşmaktadır. Teşhis ettiğimiz 25 olgudan 24'ünün keçilere ait olması yöremizde keçi üretiminin yaygınlığından kaynaklamakta olup hastalığın koyun süreleri içinde potansiyel bir tehlike olabileceği gözden uzak tutulmamalıdır.

Tip 1 transmembran proteini olan EpCAM epitel hücrelerinin bazolateral kenarında lokalize olan epitelyal bir adezyon molekülüdür. Araştırmalar EpCAM'ın hücre ilişkileri ve proliferasyonunda önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Proteinin kromozom üzerindeki yerleşimi 2p16.3'tür. EpCAM'in kolorektal, meme, mide, prostat, over, akciğer kanseri gibi insan epitel doku kaynaklı kanserlerinde fazlaca ekspresyona olduğu bilinmektedir. Monoklonal antikorla işaretlenebilip tespit edilen insan tümör ilişkili keşfedilmiş ilk proteindir ve bunun sonucu olarak yapılan monoklonal antikor tedavilerinde hedef olarak da ilk olarak kullanılan protein olmuştur (5,75). EpCAM ekspresyonu primer bazı kanserlerde iyi prognoz bazı kanser tiplerinde ise kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Meme pimer kanserinde

EpCAM ekspresyonu azalan hasta sağ kalımı ile ilişkilendirilirken kolorektal kanserlerde artan sağ kalım ile ilişkilendirilir (64). EpCAM kromofob ve toplayıcı duktus renal hücreli kanser türünde önemli bir prognostik markır olduğu görülmüştür (49). İn vivo ve in vitro ortamlarda yürütülen çalışmalarda EpCAM ekspresyonu meme kanserinin çevre dokulara yayılımı ile ilişkisi saptanmıştır (17, 26, 91). Çalışmamızı oluşturan ENA olgularında EpCAM aktivitesi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ENA'da EpCAM aktivitesinin tümör dokusunda arttığını ve bu proteinin ENA patojenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

VEGF, insanlarda 8 ayrı formda bulunur, bunlar 121, 145, 165, 189 ve 206 aminoasidin homodimerik glikoproteinidir ve VEGF ailesi VEGF-A, -B, -C, -D, -E ve plasenta büyüme faktörünü içinde barındırır (71, 83). VEGF ağırlığı 34-42 kilodalton arasında değişen, glikozlanmış makrofajlar, endotelial hücreler ile düz kas hücreleri ve tümör hücreleri tarafından sentezlenen heparin bağlamalı bir glikoproteindir (39). VEGF'nin organizmadaki işlevleri aşağıda gösterildiği gibi sıralanabilir :

1. Endotelial hücre proliferasyonunu stimülasyonu
2. Vasküler geçirgenliği artırma
3. Endotel bağımlı vazodilatasyon regülasyonu
4. Lökosit kinetiği regülasyonu
5. Fizyolojik ve patolojik anjiogenez (41, 71).

Anjiyogenik faktörlerin en önemlisi VEGF' nin ekspresyonu akciğer ve kolon kanseri gibi birçok kanser türünde gözlenmektedir (14). Konuyla ilgili birçok çalışma olmasına rağmen VEGF' nin çoğu kanser tipindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır (65, 92). Çalışmamızda ENA dokularında VEGF

immunoreaksiyonu artmış olup bu artışın VEGF'nin tümörögenizisteki rolü ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

Tümör anjiyogenezinin en önemli belirteçlerinden biri olan VEGF'nin tümör oluşumu ile paralellik gösterdiği bildirilmiştir (11, 16, 35). Çalışmalarda plateletlerdeki VEGF miktarı tümörün anjiyogenik potansiyelini yansıtmaktadır (85). Yapılan bir araştırmada, kolon ve meme kanserli hastalarda kemoterapi sonrasında tedavi yanıtı ile serum VEGF düzeylerindeki azalma arasında paralel bir ilişki bulunmuşken, mide kanserli hastalarda tedavi yanıtı ile serum VEGF azalması arasında bir ilişki gözlemlenmemişlerdir. Kolon kanserli hastalarda VEGF azalmasını tedavi ile ilişkilendirmiş olup, meme ve mide kanserli hastalarda tedavi yanıtı ile VEGF'yi ilişkilendirememişlerdir (2). Başka bir araştırmada anemi ve VEGF arasında istatistiksel olarak bir ilişki bulunmuşlardır (28). Yapılan araştırmalarda baş-boyun, serviks, kolon ve küçük hücreli akciğer kanseri hastalarından oluşan gruplarda da aynı sonuca ulaşılmıştır ve bu durum hipoksinin VEGF ekspresyonunu stimüle ettiği şeklinde ifade edilmiştir (32). Bunun yanı sıra lokal ve lokal ileri kolorektal kanserli vakalar üzerine olan bir çalışmada ise VEGF'nin çok değişkenli analizde sağkalımın üzerine etkili olduğu bildirilmiştir (59). Çalışmamız ölü hayvan materyalleri üzerinde yapıldığı için VEGF ile klinik prognoz arasında bir bağlantı kurulamamıştır. Ancak VEGF'nin bu hastalarda dokuda artışı ENA'lı sürülerde bu konudaki çalışmaların önünü açmıştır. ENA'lı hayvanlarda serum veya burun akıntılarında VEGF düzeyleri arasında ilişki bulunup bulunmadığı incelenerek bu konuda bilgi edinilmesine gerek vardır.

Toomey ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada opere edilen KHDAK (küçük hücre dışı akciğer kanseri) hastalarının büyük kısmında VEGF'nin eksprese olduğunu fakat VEGF ekspresyonu ile sağkalım, tümör boyutu, nodal tutulum ve

içilen sigara miktarı, cinsiyet ve tümör histolojisi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Buna benzer yapılan başka bir çalışmada ise tümör dokusundaki küçük damar yoğunluğu ve VEGF ile hayatta kalma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı bulunamamıştır (95).

Yapılan diğer çalışmalarda solid tümörlerde tümörün büyümesi, invazyonu ve metastaz yeteneği ile VEGF seviyesi arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Araştırmalarda meme, akciğer, prostat, kolorektal, safra kesesi ve karaciğer gibi solid tümörlerin çoğunda VEGF seviyesinin yükselmiş olmasının kötü prognoz ile ilişkili olabileceği açıklanmıştır (1, 30, 78). Başka bir çalışmada insan meme tümörlerinde iyileşme ile tümör VEGF ekspresyonu arasında korelasyon bulunmuştur (46). Benzer bir çalışmada, VEGF ekspresyonu ile anjiogenik aktivitenin arttığını tespit etmişlerdir (47, 61). Bir çalışmada ise göğüs kanseri olan hastalardaki VEGF ekspresyonunun belirleyici bir faktör olduğunu bildirmişlerdir (94). Başka bir çalışmada belirgin lenf düğümü tutulumu olan hastalara ait tümör örneklerinde artmış VEGF ekspresyonu rapor edilmiştir (38). Benzer bir çalışmayla Tamura ve arkadaşları lenf nodu metastazı ile VEGF seviyelerini ilişkilendirilmiştir (55).

Çiftlik hayvanlarında hastalık veya tümör teşhisleri ile hayatta kalım sürelerinin incelenmesi pratik bir uygulama değildir. Asıl amaç özellikle ENA gibi kronik ve bulaşıcı hastalıkların erken teşhisi ve hastanın sürüden uzaklaştırılması esasına dayanır. Çalışmamız EpCAM ve VEGF'nin ENA şüpheli sürülerde bu amaca hizmet edebilecek moleküller arasında olabileceğini göstermiştir.

Koyun ve keçilerin enzootik intranasal adenokarsinomları tüm dünyada artan prevalansa sahip, etmoidal türbinatadan köken alan invaziv, düşük metastaz gösteren tümöral bir hastalıktır (22, 24, 45). Sunulan çalışmada enzootik

intranazal adenokarsinom teşhisi konan toplam 24 adet keçi ve 1 koyuna ait bloklanmış tümör dokusu örneklerinde histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler yapılarak VEGF ve EpCAM ekspresyonları değerlendirildi. Enzootik intranazal adenokarsinom teşhisi konan tümör dokularında artmış VEGF ve EpCAM ekspresyonu gözlemlendi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada, enzootik intranazal adenokarsinomlarında patojenezinde EpCAM ve VEGF immunoreaktivitelerinin önemli rolü olduğu teyit edildi.

Bu sonuçlar, koyun ve keçilerin enzootik intranazal adenokarsinomlarının erken teşhis ve değerlendirmesinde potansiyel hedef molekülü olarak EpCAM ve VEGF kullanımı konusunda daha ileri çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

7. KAYNAKLAR

1. **Akbulut H, Altuntas F** (2002): Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. *Cytokine*, **20**, 184-90.
2. **Aktaş SH** (2010): Kemoterapinin kolon kanseri, meme kanseri ve mide kanserinde VEGF düzeylerine etkisinin in vivo ve in vitro incelemesi. (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
3. **Alsafy MAM, El-Gendy SAA, Abumandour MMA** (2014): Computed tomography and gross anatomical studies on the head of One-Humped Camel (*Camelus dromedarius*). *The Anatomical Record*, **297**, 630-42.
4. **Aydoğan A, Halgür M, Özmen Ö** (2013): The expression of caspase-3, caspase-7, caspase-9 and cytokeratin AE1/AE3 in goats with enzootic nasal adenocarcinoma: An immunohistochemical study. *Veterinary Medicine*, **58**, 417-21.
5. **Baeuerle PA, Gires O** (2007): EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Brit J Cancer*, **96**, 417-23.
6. **Bahadır A, Yıldız H** (2010): *Veteriner Anatomi.*, Ezgi Kitabevi, Bursa.
7. **Baldwin RW** (1976): Role of immunosurveillance against chemically induced rat tumors. *Transplant Rev*, **28**, 62-74.
8. **Basak S, Speicher D, Eck S, Wunner W, Maul G, Simmons MS, Herlyn D** (1998): Colorectal carcinoma invasion inhibition by CO17-1A/GA733 antigen and its murine homologue. *J Natl Cancer I* **90(9)**, 691-7.
9. **Bikfalvi A** (2004): Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochem Pharmacol*, **68**, 1017-21.
10. **Blood CH, Zetter BR** (1990): Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochem et Biophys Acta*, **1032**, 89-118.
11. **Broll R, Erdmann H, Duchrow M, Oeverman E, Schwandner O, Markert U, Bruch HP, Windhovel U** (2001): Vascular endothelial growth factor (VEGF)- a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer?. *Eur J Surg Onco*, **27**, 37-42.

12. **Bruns CJ, Liu W, Davis DW, Shaheen RM, McConkey DJ, Wilson MR** (2000): Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer*, **89(3)**, 488-99.
13. **Butel J S** (2000): Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis, Oxford J Press*, **21**,405-26.
14. **Carmeliet P** (2005): VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, **69**, 4-10.
15. **Carmeliet P, Jain RK** (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407(6801)**, 249–57.
16. **Chin KF, Greenman J, Gardiner E, Kumar H, Topping K, Monson, J** (2000): Pre-operative serum vascular endothelial growth factor can select patients for adjuvant treatment after curative resection in colo rectal cancer. *Br J Cancer*, **83**, 1425-31.
17. **Cimino A, Halushka M, Illei P, Wu X, Sukumar S, Argani P** (2010): Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is overexpressed in breast cancer metastases. *Breast Cancer Res Tr*, **123**,701-8.
18. **Cohrs P** (1953): Infectiose adenopapillome der riechschleimhaut beim Schaf. *Berl Münch Tierarztl*, **66**, 225-8.
19. **Cousens C, Minguijon E, Dalziel RG, Ortin A, Garcia M, Park J, Gonzales L, Sharp JM, De las Heras M** (1999): Complete sequence of enzootic nasal tumor virus, a retrovirus associated with transmissible intranasal tumors of sheep. *J Virol*, **73**, 3986-93.
20. **Cousens C, Minguijon E, Garcia M, Ferrer LM, Dalziel RG, Palmarini M** (1996): PCR-based detection and partial characterization of a retrovirus associated with contagious intranasal tumors of sheep and goats. *J Virol*, **70**, 7580-3.
21. **Çiftçi MK, Ortatatlı M** (2015):*Veteriner Sistemik Patoloji*, Konya, sf.115.
22. **De las Heras M, Ortín A, Cousens C, Minguijón E, Sharp J.M** (2003): Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep and goats, *Curr Top Microbiol Immunol*, **275** , pp. 201–223.
23. **De las Heras M, Garcia de Jalon JA, Minguijon E, Gray EW, Dewar P, Sharp JM** (1995): Experimental transmission of enzootic intranasal tumors of goats. *Vet Pathol*, **32**, 19-23.

24. **De las Heras M, Garcia de Jalon JA, Sharp JMM** (1991): Pathology of enzootic intranasal tumor in thirty-eight goats, *Vet Pathol*, **28**, 474-81.
25. **De las Heras M, Minguijon E, Ortin A, Dewar P, Cebrian LM, Pascual Z, Garcia L, Garcia de Jalon JA, Sharp JM** (1998): Naturally occurring enzootic nasal tumor of sheep in Spain. pathology and associated retrovirus. *Eur J Vet Pathol*, **4**, 11-6.
26. **De las Heras M, Ortin A, Cousens C, Minguijon E, Sharp JM** (2003): Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep and goats. *Curr Top Microbiol Immunol*, **275**, 201-23.
27. **De las Heras M, Sharp JM, Ferrer LM, Garcia de Jalon JA, Cebrian LM** (1993): Evidence for a type D- like retrovirus in enzootic nasal tumor of sheep. *Vet Rec*, **132**, 441.
28. **Değirmenciöğlu S** (2011): İleri evre küçük hücreli dışı akciğör kanserli hastalarda serum vasküler endotelial büyüme faktörü, endotelin-1 ve afa kalsitonin gen ilişkili peptid düzeylerinin anjiyogenez ve prognoz üzerine etkileri. Yan Dal Uzmanlık Tezi.
29. **DeMartini JC, York DF** (1997): Retrovirus-associated neoplasms of the respiratory system of sheep and goats. Ovine pulmonary carcinoma and enzootic nasal tumor, *Vet Clin N Am Food A*, **13**, 55-77.
30. **Desruisseau S, Palmari J, Giusti C, Romain S, Martin PM, Berthois Y** (2004): Clinical relevance of Amphiregulin and VEGF in primary breast cancers. *Int J Cancer*, **111**, 733-40.
31. **Duncan JR, Tyler DE, Van der Mataten MJ, Andersen JR** (1967): Enzootic nasal adenocarcinoma in sheep. *J Am Vet Med A*, **151**, 732-4.
32. **Dunst J, Becker A, Lautenschlager C** (2002): Anemia and elevated systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Strahlenther Onkol*, **178**, 436-41.
33. **Dursun N** (2008): *Veteriner Anatomi II*, Medisan Yayınevi, Ankara.
34. **Erer H, Kiran MM** (2009): *Veteriner Onkoloji*. 4. Basım, Damla Ofset A.Ş., Konya.
35. **Erođlu A, Demirci S, Ayyildiz A, Kocaoglu H, Akbulut H, Akgul H, Elhan HA** (1999): Serum concentrations of vascular endothelial growth factor and nitrite as an

- estimate of in vivo nitric oxide in patients with gastric cancer. *Br J Cancer*, **80(10)**, 1630-4.
36. **Evans HE** (1993): *Miller's Anatomy of the Dog*, 4th edition, Saunders, China.
 37. **Evans HE, Lahunta A** (2010): *Guide to the Dissection of the Dog*, p:221-3, Saunders, China
 38. **Falkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan** (1989): Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia., *Nature*, **339**, 58-61.
 39. **Ferrara N** (1995): The regulation of blood vessels growth by vascular endothelial growth factor. *Ann N Y Acad Sci*, **752**, 246-56.
 40. **Ferrara N** (2001): Role of VEGF in regulation of physiological angiogenesis. *Am J of Physiol Cell Ph*, **280**, C1358-66.
 41. **Ferrara N, Gerber HP** (2001): The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol*, **106**, 148-56.
 42. **Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J** (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, **9**, 669-76.
 43. **Fidler IJ** (1970): Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer I*, **45(4)**, 773 -82.
 44. **Fox KA, Wootton SK, Quackenbush SL, Wolfe LL, Levan IK, Miller MW, Spraker TR** (2011): Paranasal sinus masses of Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*). *Vet Pathol*. **48**, 706-12.
 45. **Gallo RC, Reitz MS, Bast RC, Hait WN, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei III** (2010): RNA tumor viruses. In: Hong WK, editor. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 8th ed. p.279-91. Shelton Connecticut: People's Medical Publishing House.
 46. **Gasparini G, Harris AL** (1995). Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: Much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol*, **13(3)**, 7652-82.
 47. **Gasparini G** (2000): Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist*, **1**, 37-44.
 48. **Gassmann P, Haier J** (2008): The tumor cell-host organ interface in the early onset of metastatic organ colonisation., *Clin Exp Metastasis*, vol. 25, no. 2, pp. 171-81.

49. **Guinan P, Saffrin R, Stuhldreher D, Frank W, Rubenstein M** (1995): Renal cell carcinoma: comparison of the TNM and Robson stage groupings. *J Surg Oncol*, **59(3)**, 186-9.
50. **Gupta GP, Massagué J** (2006): Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, **127(4)**, 679–95.
51. **Hanahan D, Weinberg RA** (2000): The hallmarks of cancer review. *Cell*, **100 (1)**, 57–70.
52. **Huang E, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF** (1996): Activasyon of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its subunit. *J Biol Chem*, **271**, 32253-9.
53. **Inoue K, Slaton JW, Davis DW, Hicklin DJ, McConkey DJ, Karashima T** (2000): Treatment of human metastatic transitional cell carcinoma of the bladder in a murinemodel with the anti-vascular endothelial growth factor receptor monoclonal antibody DC101 and paclitaxel. *Clin Cancer Res*, **6(7)**, 2635-43.
54. **Kang Y, Massagué J** (2004): Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, **118 (3)**, 277–9.
55. **Keck PJ, Hauser SD, Krivi G** (1989): Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, **246**, 1309- 12.
56. **Kim B, Goligorsky MS** (2003): Role of VEGF in kidney development, microvascular maintenance and pathophysiology of renal disease. *The Korean J Intern Med*, **18**, 65-75.
57. **Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ** (2004): Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol*, **87**, 95-104.
58. **Kulasingham V, Diamandis EP** (2008): Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol*, **5(10)**, 588–99.
59. **Kwon KA, Kim SH, Oh SY** (2010): Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor, interleukin-6, and C-reactive protein level in colorectal cancer. *BMC Cancer*, **10**: 203.
60. **Lecouter J, Lin R, Ferrara N** (2004): EG-VEGF: a novel mediator of endocrine-specific angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Ann N Y Acad Sci*, **1014**, 50-7.

61. **Lee JS, Kim HS, Jung JJ** (2002): Expression of vascular endothelial growth factor in invasive ductal carcinoma of the breast and the relation to angiogenesis and p53 and HER-2/neu protein expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, **10**: 289-95.
62. **Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S** (1995): Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, **77**(3), 638-43.
63. **Luna GL** (1968): *Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. 3th Edition, Mcgraw Hill Book Company, U.S.
64. **Maetzel D, Denzel S, Mack B** (2009): Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*, **11**, 162-71.
65. **Mall JW, Schwenk W, Philipp AW, Meyer-Kipker C, Mall W, Muller J** (2002): Serum vascular endothelial growth factor levels correlate better with tumour stage in small cell lung cancer than albumin, neuron-specific enolase or lactate dehydrogenase. *Respirology*, **7**(2), 99-102.
66. **McKinnon AO, Thorsen J, Hayes MA, Misener CR** (1982): Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep in Canada. *Can Vet J*, **23**, 88-94.
67. **Misdorp W** (2002): *Tumors of the Mammary Gland*. Ed: Meuten DJ, Tumors in Domestic Animals, 4th edition, Iowa State Press, Iowa, p: 575-99.
68. **Morris J, Dabson J** (2001): *Small Animal Oncology*. 1st Blackwell Science Ltd Iowa p: 184-191.
69. **Moulton JE** (1978): *Tumors in Domestic Animals*. Berkley: University of California Press.; 2nd Ed. pp. 212-5.
70. **Nascimento EF, Reis R, Carvalho AU, Leite RC, Simplicio AA** (1979): Tumor etimoidal enzootico em ovinos. *Arq Esc Vet Minas Gerais*, **31**, 337-42.
71. **Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z** (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, **13**, 9-22.
72. **Nickel R, Schummer A, Seiferle E** (1979): *The Anatomy of the Domestic Animals*. Vol. 2. 216- 219, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
73. **Njoku CO, Chineme CN, Shannon D, Bida SA** (1978): Ovine nasal adenopapilloma: incidence and clinicopathologic studies. *Am J Vet Res*, **39**, 1850-2.

74. **Ortin A, Cousens C, Minguijon E, Pascual Z, Villareal MP, Sharp JM, Heras MDL** (2003): Characterization of enzootic nasal tumor virus of goats: complete sequence and tissue distribution. *J Gen Virol*, **84**, 2245-52.
75. **Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M., Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE** (2004): EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer Gene therapy. *Cancer Res*, **16**, 5818–24.
76. **Özkadif S** (2011): Yeni Zelanda tavşanlarında sinus paranasales'in multidedektör bilgisayarlı tomografi görüntülerinin üç boyutlu rekonstrüksiyonu. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
77. **Paridaens R, Merlevede W, Oosterom AT** (1999): Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: A key study an angiogenic marker *in vivo*?. *Ann Oncol*, **10**, 965- 71.
78. **Poon RT, Ho JW, Tong CS, Lau C, Ng IO, Fan ST** (2004): Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg*, **91**, 1354-1360.
79. **Pouysségur J, Dayan F, Mazure NM** (2006): Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, **441 (7092)**, 437–43.
80. **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.
81. **Rings M, Robertson JT** (1981): Nasal adenocarcinoma in a ewe. *J Am Vet Med Assoc*, **178**, 737-8.
82. **Risau W** (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-4.
83. **Robinson CJ, Stringer SE** (2001): The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*, **114**, 853–65.
84. **Rosati S, Kwang J, Tolari F, Keen J** (1996): Characterization of enzootic nasal tumor virus capsid antigen. *Vet Microbiol*, **53**, 261-9.
85. **Salven P, Orpana A, Joensuu H** (1999): Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*, **5**, 487-491.

86. **Shalaby R, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X, Breitman ML** (1995): Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature*, 376-62-6.
87. **Sharp JM, De las Heras M** (2000): *Contagious respiratory tumours*. Martin WB, Aitken ID, eds. Diseases of sheep. 3rd ed. p.184-186. Oxford: Blackwell Science.
88. **Stefanini MO, Wu FTH, Gabhann FM, Popel AS** (2008): A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. *BMC Syst Biology*, 2:77.
89. **Svara T, Gombac M, Vrecl M, Juntos P** (2006): Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep. *Slov Vet Res*, 43, (2):71-5.
90. **Şevik M** (2013): Onkojenik Retroviruslar. *Selçuk Tıp Dergisi*, 29, 1-4.
91. **Tai KY, Shiah SG, Shieh YS** (2007): DNA methylation and histone modification regulate silencing of epithelial cell adhesion molecule for tumor invasion and progression. *Oncogene*, 26, 3989-97.
92. **Tanno S, Ohsaki Y, Nakanishi K, Toyoshima E, Kikuchi K** (2004): Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3. *Lung Cancer*, 46, (1):11-9.
93. **Thomas KA** (1996): VEGF, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chemistry*, 271, 603-6.
94. **Toi M, Hoshiva S, Takayanagi T, Tominaga T** (1994): Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res*, 85, 1045-9.
95. **Toomey D, Smyth G, Condrón C** (2001): Immune function, telomerase, and angiogenesis in patients with primary, operable non-small cell lung carcinoma. *Cancer*, 92, 2648-57.
96. **Vincenti V, Cassano C, Rocchi M** (1996): Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 93, 1493-1495.
97. **Vogt VM** (1997): Retroviral virions and genomes. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. p. 27-69. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
98. **Özmen Ö, Şahinduran Ş, Haligür M, Demir N** (2010): Clinical, pathological, immunohistochemical and ultrastructural observations on Enzootic Nasal

- Adenocarcinoma in five goats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **16**(4), 633-9.
99. **Vohradsky F** (1974): Adenocarcinoma of the olfactory mucosa of sheep and pigs in Ghana. *Acta Univ Agric Fac Vet Brno*, **43**, 243-9.
100. **Wynendaele W, Derua R, Hoylaerts MF, Pawinski A, Waelkens E, Bruijn EA, Paridaens R, Merlevede W, Oosterom AT** (1999): Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: A key study an angiogenic marker *in vivo*? *Annals of Oncology*, **10**, 965- 71.
101. **Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J** (2000): Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, **407**, 242-8.
102. **Yarbro JW** (1992):Oncogenes and cancer suppressor genes. *Sem Oncol Nurs*, **8**, 30-9.
103. **Yonemichi H, Ohgi T, Fujimoto Y, Okada K, Onuma M, Mikami T** (1978): Intranasal tumor of the ethmoid olfactory mucosa in sheep. *Am J Vet Res*, **39**, 1599-1606.
104. **Young S, Lovelace SA, Hawkins WW, Catlin JE** (1961): Neoplasms of the olfactory mucous membrane of sheep. *Cornell Vet*, **51**, 96-112.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Nilay SERPİN

Doğum Yeri ve Yılı : Mersin, 1989

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Uyruđu : Türkiye Cumhuriyeti

Telefon No : 0539 634 28 97

Elektronik Posta : nserpin@mehmetakif.edu.tr

İletişim Adresi : Bağlar Mah. 1. Ayşeoğlu Pınarı. 14009 Sok. No:19
Merkez/Burdur

Eğitim Durumu

Lisans : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakóltesi, 2015

Yüksek Lisans : MAKÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2016-Devam Ediyor

