

**NKUBAP.10.GA.16.068**

**Dişi Köpeklerde Transmissible Venereal Tümörün Vinkristin Sülfat ile Tedavi  
ncesi ve Sonrası Matriks Metalloproteinaz-2 ve Matriks Metalloproteinaz-9  
Enzimlerinin Varlığının Immunohistokimyasal Yöntemle Araştırılması**

**Yürütücü: Yrd.Dođ.Dr.Sevda İNAN**

**Araştırmacılar: Dođ.Dr.M. Özgür ÖZYİĞİT**

**Prof. Dr. Deniz NAK**

**2018**

## ÖNSÖZ

Transmissible venereal tümör (TVT) farklı ülkelerde dişi ve erkek başı boş gezen ve seksüel yönden aktif olan köpekler arasında görülmektedir. Tümöral hastalık daha çok çiftleşme ile bulaşmasına rağmen, enfekte genital organların koklanması veya yalanması durumlarında da medyana gelir. TVT'nin makroskopik görünümü, sitolojik vaginal smear ve klinik bulgular bu tümöral durumu şüphe ettirse de, kesin teşhis olarak histopatolojik veya elektron mikroskobu gibi ileri yöntemlerin uygulanması gerekir.

TVT olgularının ilk aşamasında kitle ufak olarak gözlenebilir ama tedavi edilmediği takdirde tümörün çapı büyüyerek metastaz gösterme eğilimi gösterir. Bu nedenle tanı konulduktan sonra en kısa zamanda vinkristin sülfat ile tedavi edilerek tümör regreseye uğratılmalıdır. Tümörün çapı, inatçılığına bağlı olarak 2-8 hafta içerisinde tedavi gerçekleşmektedir.

Matriksmetaloproteinazlar kısaltılmasıyla MMP'ler yaklaşık 28'e yakın enzimden oluşan endopeptidazlardır. Geçmişten günümüze kadar hem kanser çalışmalarında hem de vücudun fizyolojik durumlarında MMP'lerin rolleri incelenmiştir. Farklı kanser çalışmalarında MMP'ler; tümörün invazyonu, metastazı, prognozu ve diyagnostik bakımdan araştırılmış ve normal dokuya göre enzim seviyelerinde farklılıklar gözlemlenmiştir.

MMP-2 ve MMP-9 enzimlerin varlığı köpeklerin farklı tümörlerinde bildirilmiştir. Fakat köpeklerde gözlenen tümörler açısından MMP-2 ve MMP-9'un varlığı tam olarak aydınlatılamamıştır ve daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışma Namık Kemal Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan alınan 2016/05-05 onay numara izni ile dişi köpeğe ait tümöral doku materyali temini gerçekleştirilmiştir. Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından NKUBAP.10.GA.16.068 proje numarası ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	i
İNGİLİZCE ÖZET.....	ii
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
Transmissible Venereal Tümör (TVT).....	2
Matriks Metalloproteinazlar (MMP).....	3
Matriks Metalloproteinazlar ve Kanser.....	4
GEREÇ VE YÖNTEM.....	5
Hayvan Materyali.....	5
Histopatoloji ve Tedavi.....	5
İmmunohistokimyasal Boyamalar.....	6
İmmunohistokimyasal Skorlama.....	6
İstatistik Analizler.....	7
BULGULAR.....	7
Makroskobik Bulgular.....	7
Mikroskobik Bulgular.....	7
İmmunohistokimyasal Bulgular.....	8
İstatistiksel Bulgular.....	10
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	10
KAYNAKLAR.....	12
EKLER.....	17

## TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1. TVT lezyonlarının histopatolojik bulguları ,Hematoksilen- eozin boyama, x200 büyütme.....	7
Şekil-2. Hiperkromatik çekirdekli anaplastik TVT hücreleri, hematoxilen eozin, x400 büyütme.....	8
Şekil-3. TVT tanısı konulan tümöral dokularda MMP-2 enziminin varlığı, intrasitoplazmik ve perinükleer pozitif boyanma (oklar), Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, x200 büyütme.....	9
Şekil-4. TVT tanısı konulan tümöral dokularda MMP-9 enziminin varlığı, intrasitoplazmik ve perinükleer pozitif boyanma (oklar), Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, x200 büyütme.....	9
Tablo-1. Mevcut Çalışmada Kullanılan Antikor Bilgileri.....	17
Tablo-2. MMP-2 ve MMP-9 immunohistokimyasal boyanma medyan değerleri.....	17
Tablo-3. MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin immunohistokimyasal boyanma pozitif sayıları ve yüzdeleri.....	17

## ÖZET

Bu çalışma Namık Kemal Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulundan alınan 2016/05-05 onay numara izni ile dişi köpeğe ait tümöral doku materyali temini gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'na ve Tekirdağ bölgesinde serbest olarak çalışan özel veteriner hekim kliniklerine gelen, 30 adet, 2-12 yaşları arasında, spontan Transmissible Venereal Tümöre sahip dişi köpeklerin vinkristin sülfat tedavisi öncesi ve sonrasında Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilen ve vestibulum bölgesinden alınan tümöral dokular kullanıldı. Tümöral dokular bir gece boyunca tespit edildi. Rutin doku takip işlemi uygulandı ve hematoksil-eozin ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopunda incelenerek histopatolojik bulguları kaydedildi. TVT tanısı konulan dokular, tedavi öncesinde ve sonrasında MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığını karşılaştırmak amacıyla immunohistokimyasal yöntemle boyandı. Edilen veriler sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırma yapıldı.

Köpeklerle tedavi süresince ticari mama ve önlerinde serbest su verildi. Tedavi amacıyla vinkristin sülfat (Vincristine DBL, Mayne Pharma Pty Ltd, Avustralya) 0.025 mg/kg dozunda 10 ml serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra intravenöz yolla yavaş enjeksiyon şeklinde kullanıldı. Tedavi süresince her tedaviden önce hematolojik değerler kontrol edildi. Tedaviye tümörler tamamen gerileyene veya maksimum 7 haftaya kadar devam edildi.

Sonuçlara göre TVT tanısı konulan tümöral dokuların tedavi öncesi ve sonrasında MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin immunohistokimyasal olarak boyanma oranı ve şiddeti bakımından istatistiksel fark saptanmamıştır. Ancak MMP-2 enzimi tedavi sonrasında, öncesine göre medyan değeri düşük dikkati çekmiştir.

Vinkristin sülfat ile tedavi öncesi ve sonrası MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığını gösteren çalışma bulunmadığı için literatüre yeni bir bilgi katacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Immunohistokimyasal, MMP-2, MMP-9, Vinkristin sülfat, Transmissible Venereal Tümör

## ABSTRACT

This study was carried out the tumoral tissues of female dog with approval number 2016 / 05-05 from Namik Kemal University Experimental Animals Local Ethics Committee. Before and after treatment, tumor tissues obtained 2-12 years old, 30 female dogs with spontaneous Transmissible Venereal Tumor, were taken from the vestibulum region which came to private veterinary clinics in Tekirdağ region and Uludag University, Veterinary Faculty, Department of Obstetrics and Gynecology. Tissues were fixed overnight. Routine tissue process was performed. The slides were stained with hematoxylin eosine, examined under light microscope and the histopathological findings were recorded. The tissues diagnosed with TVT were stained immunohistochemically for comparing the presence of MMP-2 and MMP-9 enzymes before and after treatment. Statistical comparison was made between the groups.

During the treatment, commercial dog food and free water were given. Vincristine sulfate (Vincristine DBL, Mayne Pharma Pty Ltd, Australia) was administered weekly with 10 ml physiologic saline at a dose of 0.025 mg / kg, via slow intravenous injection. During the treatment hematological values were controlled. The treatment was continued until the absence of tumors or continued for up to 7 weeks.

There was no statistical difference in the immunohistochemical staining rate and severity of MMP-2 and MMP-9 enzymes before and after treatment. However, after treatment, the median value of MMP-2 enzyme was lower than before.

There is no study about showing the presence of MMP-2 and MMP-9 enzymes before and after treatment with vincristine sulphate, so the literature is expected to provide new information.

**Keywords:** Immunohistochemical, MMP-2, MMP-9, Vincristine sulfate, Transmissible Venereal Tumor

## GİRİŞ

Köpeklerde Transmissible Venereal Tümör (TVT) çiftleşme yolu ile bulaşan ve kliniklere sıklıkla genital organlarda gözlenen tümör şüphesi ile gelen tümörler arasında yer alır. Seksüel yünden aktif olan, başı boş gezen köpeklerde gözlenir ve çoğunlukla eksternal genital organlara yerleşir. Tedavi edilmediği takdirde tümörün çapının büyüyerek metastaz gösterebildiği bir tümördür. Yapılan farklı çalışmalarda ve günümüze kadar farklı tedavi yöntemleri olsa da, en etkili ve tümörü geriletken Vinkristin sülfat'tır ve bir kemoterapi yöntemidir. Tümörün çapına ve regrese olmasına göre 2-8 hafta arasında tedavi yapılmaktadır. TVT'ler genellikle makroskopik olarak sınırlı, fragil yapıda, dış yüzü bazen ülserli, kırmızı renkte ve karnabahar görünümündedir.

Matriks Metalloproteinazlar (MMP) 28'e yakın enzimden oluşan, çinko taşıyan endopeptidazlardır. İnsan ve hayvan dokularının fizyolojik ve patolojik koşullarında, tümör gelişimi sırasında aktif hale gelmektedirler. MMP'ler, hücre yüzeyine etkiyen kimyasal maddeler, sıcak şoku gibi fiziksel etkenler, sitokinler ve büyüme faktörleri, viral transformasyon, onkogenler, östrojen gibi faktörler ile de etkili olmaktadır. Ekstrasellüler matriks (ESM), tümör dokusunun invazyon, metastaz yapması ve büyümesi için bir engeldir ve anaplastik hücrelerin bu bariyeri aşabilmeleri için bu enzimlere ihtiyaçları vardır.

MMP'ler uzun süredir farklı kanser ve yangısal çalışmalarda incelenerek hem insan hem de hayvan sağlığı açısından konu olmaktadır. Yapılan farklı kanser çalışmalarında farklı yöntemler kullanılarak MMP enzimlerinin varlıkları gösterilmiştir. MMP'lerin kanser mekanizmasında yer almasının nedeni bazı kanser türleri için prognoz, diyagnostik, patogenezi, invazyon, metastaz, tedavi başarısı ve postoperatif durumlarda belirleyici olmuştur.

MMP ailesinde farklı enzim türleri mevcuttur fakat köpek tümöral çalışmalarda en çok incelenen MMP-2 ve MMP-9 enzimleridir. MMP-2 ve -9'un TVT tümöründeki varlıkları gösterilmesine karşın (Akkoç ve ark., 2017) vinkristin sülfat tedavisi öncesi ve sonrasında ilişkisini sorgulayan bir çalışma yapılmamıştır. Uygulanan vinkristin sülfatın mekanizmasının daha iyi anlaşılması, tedavi öncesi ve sonrasında ekstrasellüler proteazlar ile ilişkisinin olup olmadığının istatistiksel açıdan incelenmesi ve bu enzimlerin TVT ile olan bağlantısını patogenezi yönünden olan ilişkisinin incelenmesi gerekir.

Elde edilecek bulgular doğrultusunda, literatürde ki açığı dolduracak, daha sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır. Elde edilecek sonuçlar ile uluslararası taranan kayıtlı dergilerde yayınlanabilir potansiyelinin fazla olduğu düşünülmektedir.

## GENEL BİLGİLER

### Transmissible Venereal Tümör (TVT)

Transmissible Venereal tümör (TVT) dişi ve erkek köpeklerde genellikle dış genital organlarında rastlanan, bulaşıcı neoplastik bir hastalıktır (Yang, 1988; Stockmann ve ark., 2011). TVT, infeksiyöz sarkoma, venereal granuloma, transmissible lenfosarkoma ve sticker tümörü olarak ta adlandırılır (Oruç ve ark., 2011). Köpekler arasında bulaşma çiftleşme, yalama, koklama veya deneysel yolla tümöral hücrelerin implantasyonu şeklinde meydana gelir (Stockmann ve ark. 2011; Özyiğit ve ark, 2014). TVT erkek ve dişi köpeklerde eşit sıklıkla gözlenir (Smith ve Washbourn, 1998). Kontrol altına alınamamış ve çiftleşmiş köpeklerin bulunduğu ülkelerde TVT önemli bir problem haline gelmiştir (Akkoç ve ark., 2017). Metastaz, TVT olgularının % 5'i civarında gözlenir (Nak ve ark., 2005). Köpeklerde bu tümörler; deri, deri altı bağ dokusu, nazal boşluklar, ağız çevresi, bölgesel lenf yumruları, tonsilla, gözler, beyin, hipofiz bezi, dil, dudak, meme bölgesi, karaciğer, dalak, kemik iliği, uterus, ovaryum, torasik ve abdominal visseral bölgelere metastaz gösterdiğine dair çalışmalar mevcuttur (Adams ve Slaughter, 1970; Ferreira ve ark., 2000; Placke ve ark., 1987; Moulton, 1990; Parent ve ark., 1983; Gülbahar ve Hazıroğlu, 1995; Papazoğlu ve ark., 2001; Goldschmidt ve Handrick, 2002; Nak ve ark., 2004; Park ve ark., 2006; Baştan ve ark., 2008; Özyurtlu ve ark., 2008; Oruç ve ark., 2011). TVT olgularında anemnez, klinik bulgular, tümörün yerleşim yeri ve tipik görünüşü teşhis açısından TVT şüphesi uyandırsa da, sitolojik, histopatolojik inceleme ile doğrulanması gerekir (Oruç ve ark., 2011; Özyiğit ve ark., 2014; Pir Yağcı ve Kalender, 2008, Nak ve ark., 2004). Ayrıca histokimyasal ve elektron mikroskopik çalışmalar ile de kesin tanıya gidilir (Das U ve Das AK, 2000).

Erkek köpeklerde tümör genellikle penisin kaudal bölümlerinde yer alırken, dişi köpeklerde sıklıkla vestibulum ve vagina ile bağlantılı olarak vaginanın posterior kısımlarında gözlenir (Das U ve Das AK., 2000).

TVT'ler makroskopik incelemede; karnabahar görünümde, taşkın, bazı olgularda dış yüzeyi ülserler gösterebilen, frajil yapıya sahiptirler. Mikroskopik incelemede ise veziküler hiperkromatik çekirdekli tümöral hücrelere rastlanır. Bu hücreler iri, yuvarlak, poligonal veya oval yapıdadır ve tümör parenkiminin ince bir stroma dokusu ile çevrilenen, anizositozis ve anizonükleozisin olduğu alanlar gözlenir. Mitotik figürler yoğundur (Oruç ve ark., 2011, Akkoç ve ark., 2017). Tümör büyüme gösterdikçe, rengi yoğun vaskülarizasyondan dolayı parlak kırmızı hale gelir (Das U ve Das AK., 2000).

TVT'nin sitogenetik özellikleri açısından incelendiğinde; köpeklerde somatik hücrelerde normal kromozom sayısı 78 iken, TVT'li köpeklerde bu sayı 58-59'dur (Das U ve Das AK., 2000).

TVT allogenic hücrel transplantlarla meydana geldiği ve bu tümöral hücrelerin vektör olarak rol aldığı düşünülmektedir. Bu tümörler transplantasyondan 2-3 hafta sonra görülmeye başlar ve uygun bir tedavi yapılmadığı takdirde tümörün çapları



büyümeye başlar ve kitle hemorajik, ülserli ve enfekte bir hal alır (Pir Yağcı ve Kalender, 2008).

TVT'nin tedavisinde cerrahi, radyoterapi, immunterapi, bioterapi ve kemoterapi gibi yöntemler mevcuttur. Fakat en etkilisi ve yaygın olarak kullanılan yöntem 2 ile 8 hafta içerisinde vinkristin sülfat uygulanarak tümörün tamamen regrese uğratılmasıdır (Özalp ve ark., 2012; Pir Yağcı ve Kalender, 2008; Özyiğit ve ark., 2014; Nak ve ark., 2005). Vinkristin sülfat tedavisi ile tümörün regrese uğraması lenfositlerin, plazma hücrelerinin ve aktive olmuş makrofajların sayılarının varlığı ile ilişkilidir (Özyiğit ve ark., 2014). Vinkristin sülfat intravenöz olarak 0,025 mg/kg veya vücut yüzeyinin 0,5 ve 0,7 mg/m<sup>2</sup> dozunda haftalık uygulanır (Cohen, 1985; Özyiğit ve ark., 2014).

TVT'nin kontrolü enfekte başıboş gezen köpeklerin varlığı açısından zordur. Köpek sahipleri veya bakıcılar çiftleşme öncesi erkek ve dişinin dikkatli şekilde muayene edilmesi ve tümöral lezyonlar gözlenen hayvanların tedavilerinin gerçekleştirilmesi gerekir (Das U ve Das AK., 2000).

### **Matriks Metalloproteinazlar (MMP)**

Matriks metalloproteinazlar (MMP), yaklaşık 28 enzimden oluşan fizyolojik ve patolojik doku olaylarında görev alan ekstrasellüler proteazlardır (Soydinç ve ark., 2006; Öncel, 2012). MMP'ler çinko içeren nötral endopeptidaz enzim ailesi içerisinde yer alır ve patolojik durumlarda ESM'in tüm elemanlarını yıkma yeteneği artar (Öncel, 2012). MMP'ler ilk defa 1962 yılında Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından ifade edilmiştir (Öncel, 2012). Substrat özgüllüklerine göre sınıflandırıldığında; kollajenazlar, stromelisinler, jelatinazlar, membran tipi MMP'ler ve sınıflandırılmayan MMP'ler olarak ayrılır (Öncel, 2012; Hidalgo ve Eckhardt, 2001). Yapısal olarak ise sinyal peptit, propeptit, Zn bağlayıcı bölge içeren katalizör kısım, hemopeksin benzeri kısım ve katalizör kısmı hemopeksin benzeri kısma bağlayan prolinden zengin bölge olmak üzere sınıflandırılır (Öncel, 2012; Bourbonliou ve Stetler-Stevenson, 2010).

Matriks metalloproteinazların yapıları incelendiği zaman kendilerine özgü domainlere sahiptir ve katalitik aktivitelerini gerçekleştirebilmeleri için çinkoya bağlıdırlar. Enzimatik aktivitelerinin salınımı ve stabilitesi için kalsiyum ile çinko iyonları gerekir. MMP'ların proteolitik aktiviteleri matriks metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP) ile inhibe edilir (Nagase ve Woessner, 1999).

Tümörlerin invazyon ve metastaz aşamalarında önemli moleküllerden biri ekstrasellüler matriks (ESM) elemanlarıdır (Liotta ve ark., 1991; Öncel, 2012). ESM, organizmalara yapısal destek ile birlikte, hücre proliferasyonu, farklılaşması, migrasyonu, adezyon ve doku morfogenezisi gibi biyolojik aktivitelere sahiptir. ESM, tümöral dokunun büyümesi ve anaplastik hücrelerin yayılımını önlemek için primer bir bariyerdir. Anaplastik hücreler bu bariyeri aşmak için matriks metalloproteinazları kullanırlar (Öncel, 2012; Apakkan Aksun ve ark., 2001).

Embriyonik büyüme, doku morfogenezisi, büyümenin devamlılığı, dokuların yeniden yapılandırılması gibi fizyolojik olaylarda, yara iyileşmesi sürecinde yara kenarlarındaki reepitelizasyonu gerçekleştirmede ve vasküler fonksiyonlarda MMP'ler görev alır (Öztürk Görüroğlu, 2013).

MMP'ler; lökosit, keratinosit, fibroblast, makrofaj, kondrosit, düz kas hücresi gibi epitelyal ve mezenkimal hücreler tarafından sentezlenirler (Soydinç ve ark., 2006).

Jelatinazlar 72 kDa jelatinaz A (MMP-2) ve 92 kDa jelatinaz B (MMP-9) tip IV kollojenazlar olarak ta adlandırılır ve bu enzimler denatüre kollojenin ve bazal membranın yıkımında görev alırlar (Öztürk Görüroğlu, 2013).

## **Matriks Metalloproteinazlar ve Kanser**

Çeşitli bilimsel çalışmalar içerisinde uzun yıllardır MMP'ler ve kanserdeki rolleri araştırılmaktadır (Öncel, 2012). MMP'ler kanser çalışmalarında metastaz ve invazyon aşamalarında, anjiogenezde, apoptozisin engellenmesinde, antitümör savunma mekanizmalarında görev aldığı ve hala daha tam olarak farklı tümöral olgularda patogenezi tam olarak anlamadığı için çalışma konuları içerisinde yer almaktadır (Öncel, 2012; Kessenbrock ve ark., 2010).

Tümör hücrelerini çevreleyen fibroblastlar, infiltre immun hücreleri ve endotelial hücreler tarafından MMP'ler salınırlar ( Beltran ve ark., 2013).

Kanser dokunun gelişim aşamasında, hücrel organizasyon ve kontakt inhibisyonun kaybı meydana gelir. MMP'ler invazyon ve metastaz aşamalarında epitelyal mezenkimal değişimlerde yer alırlar. Tümörlerin progresyonunda apoptozisten kaçış mevcuttur ve MMP'ler apoptoziste pozitif ve negatif etkilere sahiplerdir (Öncel, 2012). Anaplastik hücrelerin invazyonu ve metastazı için vaskülarizasyon önemlidir. MMP-2 ve MMP-9 tümör vaskülarizasyonunda görev alırlar (Bond ve ark., 1998; Alexander ve ark., 2001; Öncel, 2012).

MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı farklı yöntemler ile (immunohistokimya, zimografi, in situ hibridizasyon,ELISA gibi) tümöral dokularda, periferik kan ve çeşitli doku örneklerinde salınımı gösterilmiştir (Varani ve ark., 2000; Gonzalez ve ark., 2008; Huang ve ark. 2014).

İnsanlardaki meme, pankreatik, akciğer, mesane, kolorektal, over, prostat ve beyin tümörleri gibi farklı kanser türlerinde MMP'ler kanserlerin erken teşhisinde ve prognozunda belirteç olarak kullanılabilirler (Öncel, 2012; Öztürk Görüroğlu, 2013). Malign özelliğe sahip tümöral dokuların saldırganlığı ve metastaz ilişkisi yönünden en fazla incelenen matriks metalloproteinazlar MMP-9 ve MMP-2 yer alır (Soydinç ve ark., 2006).

Köpeklerde meme, oronazal, meningioma, osteosarkom, kutanöz mastositom, lenfoma, hemangiosarkom, transmissible venereal tümör ve melanom gibi tümörlerde MMP-2 ve MMP-9 salınımını gösteren çalışmalar mevcuttur (Aresu ve ark., 2011; Mandara ve ark., 2009; Nakaichi ve ark., 2007; Beltran ve ark., 2013; Lana ve ark., 2000, Leibman ve ark., 2000; Gentilini ve ark., 2005; Docampo ve ark., 2011, Murakami ve ark., 2009; Akkoç ve ark., 2017).

Köpek tümörleri ile ilgili çalışmada, kondrosarkom, fibrosarkom, osteosarkom gibi sarkomatöz tümörler ile yuvarlak hücreli tümörler ve karsinomlarda MMP-2 ve MMP-9 salınımı pozitif gözlenmiştir (Loukopoulos P ve ark., 2003).

Köpeklerde tümörler dışında, romatoid artritlerde, keratokonjunktivitis, dilate kardiyomyopatilerde MMP-2 ve MMP-9 salınımını gösteren çalışmalar elde edilmiştir (Coughlan ve ark., 1998; Wang ve ark., 2008; Chegeni ve ark., 2015).

MMP-2 ve MMP-9 ile ilgili yapılan tümöral çalışmalar göstermektedir ki, anaplastik hücrelerin metastaz özellikleri ile ilişkili olarak bu enzimlerin salınımları artmaktadır. Lenf veya kan damarları aracılığı ile metastazın olabilmesi için tümöral hücrelerin MMP-2 ve MMP-9 ile bazal membranı yıkımlaması gerekir. Hem insan hem de köpeklerde gözlenen tümöral olgularda MMP salınımı ve tümörün lokal invazyonu ve metastazı arasında bağlantı mevcuttur (Akkoc ve ark., 2017).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hayvan Materyali

Bu çalışma Namık Kemal Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan alınan 2016/05-05 onay numara izni ile dışı köpeğe ait tümöral doku materyali temini gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'na ve Tekirdağ bölgesinde serbest olarak çalışan özel veteriner hekim kliniklerine gelen, 30 adet, 2-12 yaşları arasında, spontan Transmissible Venereal Tümöre sahip dışı köpeklerin vinkristin sülfat tedavisi öncesi ve sonrasında Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilen ve vestibulum bölgesinden alınan tümöral dokular kullanıldı.

Gruplar sırasıyla ;

1. Grup: İlk Vinkristin sülfat Uygulamasından önce vestibulum bölgesinden alınan tümöral dokular (tedavi öncesi)
2. Grup: Vinkristin Sülfat tedavisi gören dışı köpeklerden vestibulum bölgesinden alınan tümöral dokular (tedavi sonrası)

### Histopatoloji ve Tedavi

Histopatolojik inceleme amacıyla 1. ve 2. grup tümöral dokular bir gece boyunca % 10 tamponlu formaldehit solüsyonuna konuldu. Alkol-ksilol içeren rutin doku takip işlemi uygulandı ve sonrasında parafine gömüldü. Parafine bloklanan tümöral dokular mikrotomda 3 mikron kalınlığında kesilerek hematoksilin eozin ile boyandı. Boyanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus, cx41) incelenerek mikroskobik görüntüleri ve histopatolojik bulguları kaydedildi. Histopatolojik görüntüler kameram gen2 programı ile fotoğrafları çekildi. Histopatolojik transmissible venereal tümör tanısı konulan doku örnekleri MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığını değerlendirmek ve tedavi öncesinde ve sonrasında karşılaştırmak amacıyla immunohistokimyasal yöntemle

incelemek için 3 mikron kalınlığında kesitler lizinli lamlara alındı. Elde edilen veriler sonucunda gruplar arasında karşılaştırma yapıldı.

Köpeklere tedavi süresince ticari mama ve önlerinde serbest su verildi. Tedavi amacıyla vinkristin sülfat (Vincristine DBL, Mayne Pharma Pty Ltd, Avustralya) 0.025 mg/kg dozunda 10 ml serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra intravenöz yolla yavaş enjeksiyon şeklinde kullanıldı (Ozyigit ve ark., 2014). Tedavi süresince her tedaviden önce hematolojik değerler kontrol edildi. Tedaviye tümörler tamamen gerileyene veya maksimum 7 haftaya kadar devam edildi. Her vinkristin sülfat uygulaması öncesinde vestibulumdaki tümörün boyutu klinik ve makroskobik olarak değerlendirildi.

### **İmmunohistokimyasal Boyamalar**

İmmunohistokimyasal boyamalar standart streptavidin- biotin peroksidaz tekniği uygulanarak gerçekleştirildi (Loukopoulos ve ark., 2003, Akkoç ve ark., 2017). Transmissible venereal tümör tanısı konulan tümöral dokular 3 mikron kalınlığında lizinli lama çekilerek etrafındaki fazla parafinin uzaklaşması amacıyla 2 saat etüvde bekletildi. MMP-2 ve MMP-9 immün boyamalar Leica marka bond-max model tam otomatik immunohistokimya ve in situ hibridizasyon cihazında gerçekleştirildi. Lizinli lamlar deparafinizasyon işlemi uygulandı. Deparafinizasyondan sonra dokulardaki antijeni açığa çıkarmak amacıyla Bond ER Solüsyonu içerisinde 100 santigrat derecede 20 dakika antigen retrieval işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem sonrasında endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için lizinli lamlar peroksidaz block içerisinde 11 dakika bekletildi. Lizinli lamlar üzerine ticari MMP-9 (ab38898, abcam) ile MMP-2 (SAB2108458, Sigma) antikolar 1/100 oranında sulandırılarak 30 dakika uygulandı. Antikor ile ilgili bilgiler Tablo-1'de verilmiştir. Bu aşama sonrasında 8 dakika post primere maruz bırakıldı. Lizinli lamlar 8 dakika polymer solüsyonundan geçirildi. 8 dakika Dab solüsyonuna maruz bırakılarak hematoksilen ile preparatlar 10 dakika boyunca boyandı. Lamlar 5'er dk süre ile 70, 80 ve 90 derecelik alkol ve 5 dk x 2 defa 100 derecelik alkolden ve 10 dk x 2 defa ksilolden geçirildikten sonra dokular Entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda (Olympus, cx41) immunohistokimyasal boyama değerlendirildi. Negatif kontrol olarak primer ticari antikolar yerine PBS uygulandı.

### **İmmunohistokimyasal Skorlama**

MMP-2 ve MMP-9 primer antikoları ile doku örneklerinin boyaması sonrasında tüm preparatlar ışık mikroskop (Olympus, cx41) altında incelendi. Tümör hücrelerindeki sitoplazmik boyanma oranı ve şiddeti 40'luk objektifte farklı 4 alan seçilerek değerlendirildi. Boyanma oranı semikantitatif olarak şu şekilde derecelendirildi (Jimenez ve ark., 1999). Negatif (-)= tümör hücrelerinin % 5'den azında boyanma, 1+ = tümör hücrelerinin % 5-20'unda boyanma, 2+ = tümör hücrelerinin % 20-50'sinde boyanma; 3+ = tümör hücrelerinin % 50-90'inde boyanma, 4+ = tümör hücrelerinin % 90'inden fazlasında boyanma. Boyanma şiddeti de şu şekilde derecelendirildi (Freitas ve ark., 1999). Negatif (-) =boyanma yok, + = soluk, 2+= orta dereceli, 3+ = güçlü.

Boyanma oranı ve şiddeti kaydedilen lizinli lamlardan farklı alanlar ışık mikroskobunda (olmpus, cx41) belirlenerek, kameram gen2 programı aracılığı ile fotoğrafları çekildi.

## İstatistik Analizler

İstatistik analizler IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp,USA) programında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler sonucunun istatistiksel değerlendirilmesinde Wilcoxon testi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar olup olmadığı ve medyan (minimum-maksimum) değerleri hesaplanarak ilgili tablo-2 ve 3' te gösterilmiştir.

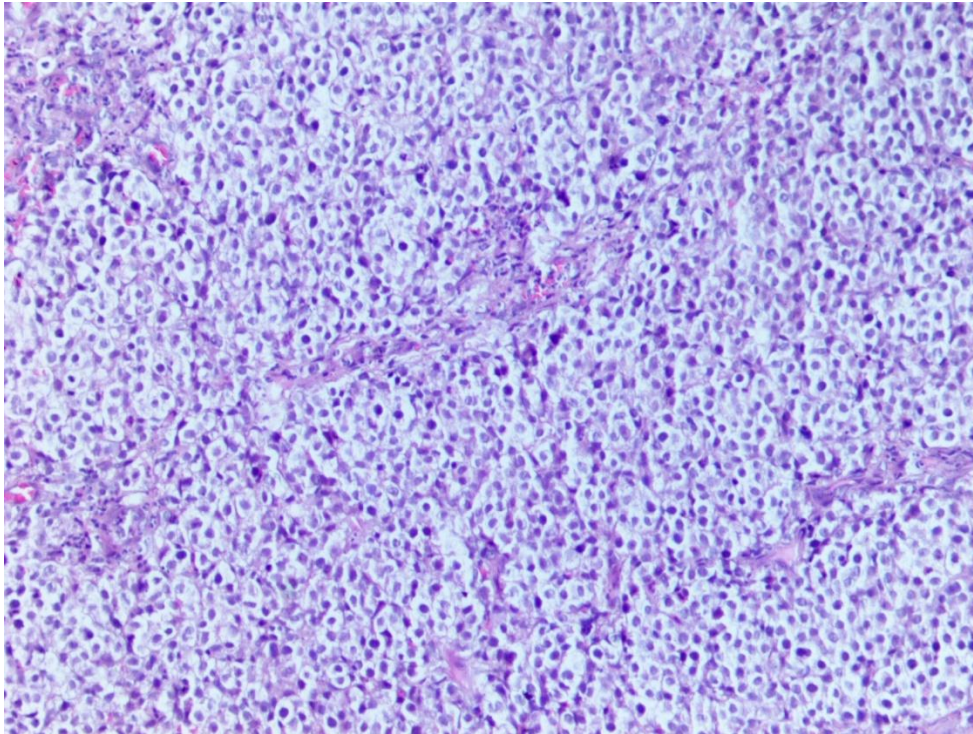
## BULGULAR

### Makroskobik Bulgular

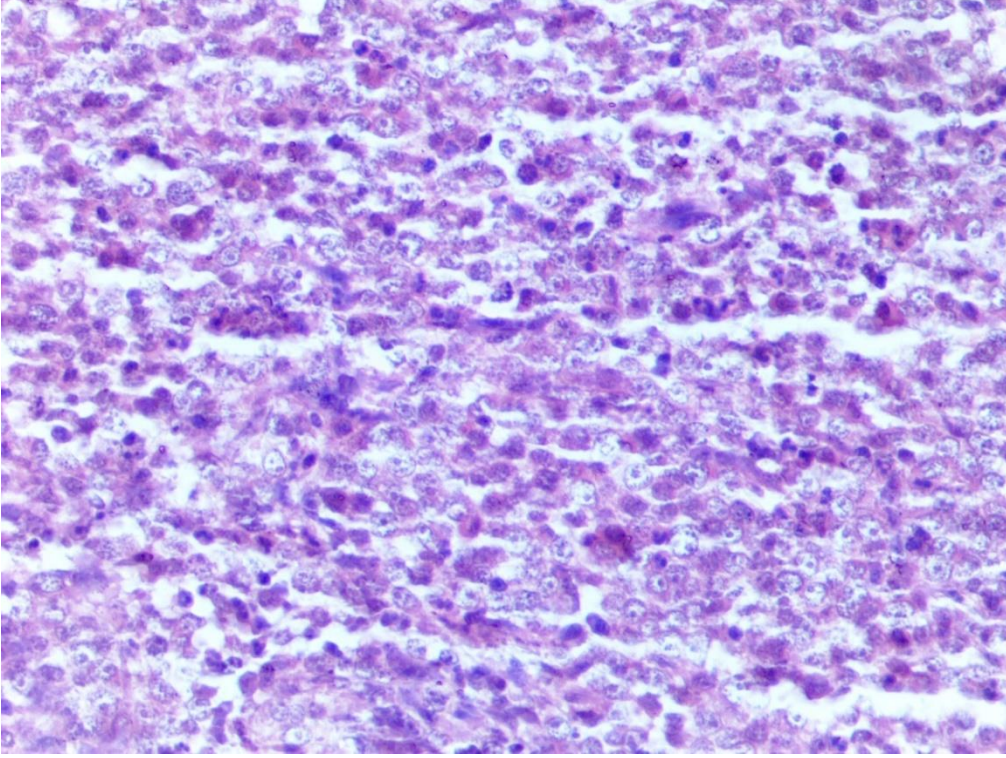
30 adet, 2-12 yaşları arasında, Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilen ve vestibulum bölgesinden alınan tümöral dokuların makroskobik incelemesinde vulvadan taşkın, kırmızı renkli, frajil yapıda, dış yüzü ülserli, karnabahar görünümünde ve 0.5-6 cm değişen ebatlarda olduğu gözlemlendi. Tüm tümöral dokuların 2-7 hafta vinkristin sülfat uygulaması sonrasında tümörlerin tamamen regrese oldukları dikkat çekti.

### Mikroskobik Bulgular

Kitlenin histopatolojik incelemesinde, ince bir stroma dokusu ile çevrili, yuvarlak şekilli anaplastik hücrelere rastlandı. Tümöral hücrelerin belirgin olmayan sitoplazmik membrana sahip granüler sitoplazma ve yuvarlak iri hiperkromatik çekirdekleri oldukları dikkati çekti. Tümöral hücreler arasında anizositozis ve anizonükleozis belirgin olarak gözlemlendi. Mitozun farklı aşamalarındaki mitotik figürlere yoğun miktarda alanda rastlandı. Histopatolojik bulgular şekil-1 ve şekil-2'de gösterilmiştir.



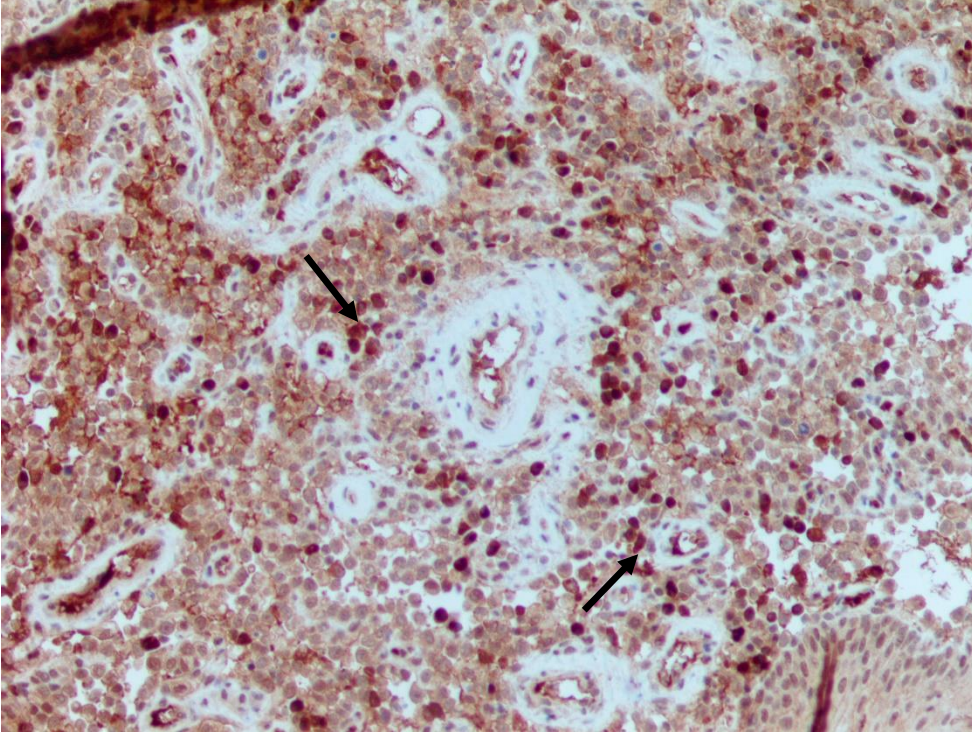
Şekil-1.TVT lezyonlarının histopatolojik bulguları ,Hematoksilen- eozin boyama, x200 büyütme.



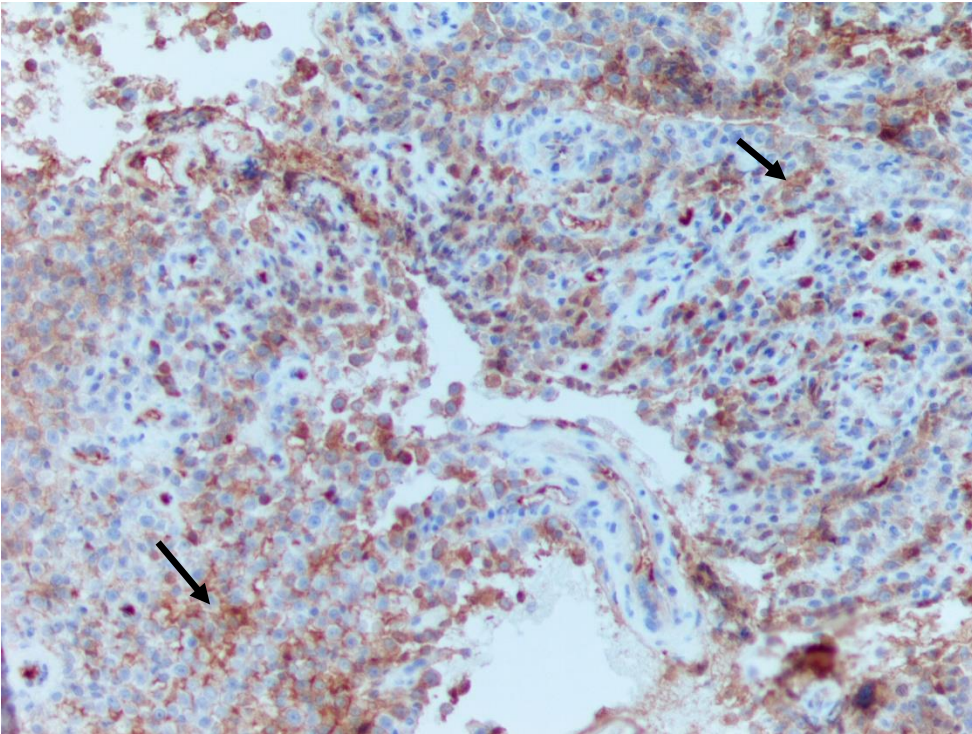
Şekil-2. Hiperkromatik çekirdekli anaplastik TVT hücreleri, hematoksilen eozin, x400 büyütme.

### **İmmunohistokimyasal Bulgular**

Vestibulum bölgesinden alınan tedavi öncesi ve sonrası tümöral dokular immunohistokimyasal olarak boyanma sonrası ışık mikroskopunda değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda tümöral hücrelerin intrasitoplazmik ve perinükleer olarak ticari MMP-2 ve MMP-9 antikorları ile boyanma gösterdikleri dikkati çekmiştir. Boyanmanın varlığı ilgili şekil-3 ve 4 'te gösterilmiştir. Tedavi öncesi tümöral dokularda MMP-2 varlığı 30 dokudan 26 pozitif 4 negatif, tedavi sonrası ise 30 dokudan 28 pozitif, 2 negatif boyanma gözlenmiştir. Tedavi öncesi tümöral dokularda MMP-9 varlığı 30 dokudan 28 pozitif, 2 negatif, tedavi sonrası ise 30 dokudan 23 pozitif, 7 negatif boyanma saptanmıştır. Boyanma pozitiflik değerleri ve yüzdeleri ile medyan değerleri tablo-2 ve 3'de verilmiştir.



Şekil-3. TVT tanısı konulan tümöral dokularda MMP-2 enziminin varlığı, intrasitoplazmik ve perinükleer pozitif boyanma (oklar), Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, x200 büyütme.



Şekil-4. TVT tanısı konulan tümöral dokularda MMP-9 enziminin varlığı, intrasitoplazmik ve perinükleer pozitif boyanma (oklar), Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, x200 büyütme.

## İstatiksel Bulgular

Çalışmada, MMP-2 ve MMP-9 ile boyanan tümöral dokuların tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki ilgili değerleri sırasıyla Tablo-2 ve 3'te gösterilmiştir. Boyanma oranı ve şiddetinde tedavi öncesi ve sonrasında Transmissible venereal tümör dokularında istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ( $P > 0.05$ ). İmmun boyamalar sonucunda tedavi öncesi MMP-2 medyan (minimum-maksimum) 3.00 (0.00-4.00), tedavi sonrası 2.50 (0.00-4.00) olarak saptanmıştır. MMP-9 ise tedavi öncesi 1.00 (0.00-4.00), tedavi sonrası ise 1.00 (0.00-4.00) olarak tespit edildi. İstatistiksel fark olmasa da, MMP-2 enzim varlığının tedavi sonrasında medyan değerini düşürdüğü gözlemlendi. Tedavi öncesi MMP-2 (%) pozitifliği %86.6, MMP-9 (%) pozitifliği % 93.3 iken, tedavi sonrası MMP-2 %93.3, MMP-9 ise % 76.6 olarak saptanmıştır.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma, dişi köpeklerde spontan meydana gelmiş Transmissible Venereal tümörün vinkristin sülfat uygulanması öncesi ve sonrasında tümöral dokuda meydana getirdiği histopatolojik değişiklikler sonucunda MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı immunohistokimyasal gösterilmesi amaçlanarak bilime yeni bir yaklaşım amaçlanmıştır. MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığının tedavi öncesi ve sonrasında karşılaştırılarak istatistiksel açıdan farkın olup olmaması hedeflenmektedir.

Transmissible Venereal tümör (TVT) köpek transmissible venereal sarkom olarak ta bilinen, dişi ve erkek köpeklerde genellikle dış genital organlarında rastlanan neoplastik bir hastalıktır (Yang 1988; Stockmann ve diğ. 2011). Köpekler arasında bulaşma çiftleşme, yalama, koklama veya deneysel yolla tümöral hücrelerin implantasyonu şeklinde meydana gelir (Stockmann ve diğ. 2011; Özyiğit ve ark., 2014). Çalışmamızda verilen literatür bilgilerine uyumlu olarak, dişi köpeklerin vestibulum bölgesinde yer alan ve çiftleşme yoluyla bulaşma göstermiş tümöral olgular değerlendirildi.

TVT tümörlerinin tedavisinde en etkili yöntem Vinkristin sülfat olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir ve 2 ile 8 hafta içerisinde uygulanarak tümörün tamamen regrese uğratılmıştır. Tedavide başarı oranı % 90 ile % 100 arasındadır (Özalp ve ark., 2012; Pir Yağcı ve Kalender, 2008; Özyiğit ve ark., 2014; Nak ve ark., 2004). Mevcut çalışmada, literatürlere uyumlu olarak TVT tanısı konulan dişi köpeklere vinkristin sülfat (Vincristine DBL, Mayne Pharma Pty Ltd, Avustralya) 0.025 mg/kg dozunda 10 ml serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra intravenöz yolla yavaş enjeksiyon şeklinde kullanıldı. Tümöral dokular 7 haftaya kadar regrese oldukları gözlemlendi.

Oruç ve arkadaşları (2011) ile Akkoç ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmalarda makroskobik olarak karnabahar görünümde, taşkın, bazı olgularda dış yüzeyi ülserler gösterebilen, frajil yapıya sahip TVT olgularına rastlamışlardır. Mikroskobik incelemede ise, veziküler hiperkromatik çekirdeklere sahip, yuvarlak-oval yapıda, mitotik figürün yoğun olduğu, ince bir stromal doku ile çevrili anizonükleozis ve anizositozisin olduğu alanlar bildirmişlerdir. Çalışmamızda literatürlere uyumlu



makroskopik ve mikroskopik özelliğe sahip ve klinik muayenede TVT şüphe ettiren 30 tümöral doku değerlendirilmiştir.

MMP'ler hem fizyolojik ve hem de patolojik doku yıkımında görev alan ve yaklaşık 28 üyeden oluşan ekstrasellüler enzimlerdir (Soydinç ve ark., 2006). Ekstrasellüler matriks (ESM), tümör dokusunun büyümesi, tümör hücrelerinin invazyonu ve metastazını engelleyen bir çeşit bariyerdir ve kanser hücreleri bu bariyeri aşabilmeleri için matriks metalloproteinazlara gereksinim duyarlar (Apakkan Aksun ve ark., 2001). MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı farklı yöntemler uygulanarak (immunohistokimya, zimografi, in situ hibridizasyon, ELISA gibi) tümöral dokularda, periferik kan ve doku örneklerinde gösterilmiştir (Varani ve ark., 2000; Gonzalez ve ark., 2008; Huang ve ark., 2014). Çalışmamızda tedavi öncesi ve sonrası TVT olgularında MMP-2 ve MMP-9 antikorumları ile immunohistokimyasal olarak pozitiflik saptanmıştır.

Loukopoulos ve arkadaşları (2003) ve Akkoç ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmalarda, tümöral olgularda MMP-2 ve MMP-9 antikorumları ile intrasitoplazmik boyama elde etmişlerdir. Literatürler ile uyumlu olarak TVT dokularında intrasitoplazmik ve perinükleer boyamalar gözlenmiştir.

İnsanlar üzerinde operasyon öncesi ve sonrası tümöral bir çalışmada, MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı karşılaştırılmış ve her iki enzim diyagnostik açıdan önemli olduğu bildirilmiştir (Smigielski ve ark., 2013). Giantin ve arkadaşları (2012), köpeklerin mast hücreli tümörlerinde yaptıkları çalışmada, MMP-2 ve MMP-9 enzimlerini saptamışlar ve histolojik derecelendirmeye göre bu enzimlerin varlıklarının arttığını bildirmişlerdir.

Loukopoulos ve arkadaşları (2003) köpek tümörleri ile ilgili yaptıkları immunohistokimyasal boyama çalışmasında, 27 olgudan 9'unda MMP-2 pozitif, 28 tümöral dokudan 9'unda MMP-9 varlığının pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Aresu ve arkadaşları (2011), 35 adet köpek meme tümörü olgusunda, immunohistokimyasal olarak MMP-2 enziminin varlığı kötü huylu tümörlerin % 67,5 tümöral hücrelerde, %32,5 ise fibroblastlarda, iyi huylu tümörlerde ise %88,6 tümöral hücreler, % 11,4 ise fibroblast hücrelerinde bildirmiştir. Aynı çalışma da, MMP-9 enziminin varlığı, kötü huylu tümörlerde % 89,4 tümöral hücreler, % 10,6 fibroblast hücreleri, iyi huylu tümörlerde ise % 84, 1 tümöral hücreler, % 15,9 ise fibroblast hücrelerinde saptamışlardır. Mandara ve arkadaşları (2009) köpek ve kedi meningioma tümörlerinde 51 olgudan 30'unda (% 58,8), MMP-9 ise 51 olgudan 49'unda (% 98) pozitif boyanma saptamışlardır. Çalışmamızda, tedavi öncesi tümöral dokularda MMP-2 varlığı 30 dokudan 26 pozitif 4 negatif, tedavi sonrası ise 30 dokudan 28 pozitif, 2 negatif boyanma gözlenmiştir. Tedavi öncesi tümöral dokularda MMP-9 varlığı 30 dokudan 2 negatif, tedavi sonrası ise 30 dokudan 23 pozitif, 7 negatif boyanma saptanmıştır. Tedavi öncesi MMP-2 (%) pozitifliği %86.6, MMP-9 (%) pozitifliği % 93.3 iken, tedavi sonrası MMP-2 %93.3, MMP-9 ise % 76.6 olarak saptanmıştır.

Papparella ve arkadaşları (2002), köpek meme tümörleri olgularında MMP-2 immunohistokimyasal boyamalar sonucunda karsinomların histolojik alt tipleri ve derecelendirilmesinde istatistiksel olarak önemli bir fark bildirmemişlerdir.

Murakami ve arkadaşları (2009), köpeklerde spontan meydana gelmiş hemangiosarkom olgularında, MMP-2 immun boyama yoğunluğunu 83 olgudan 23

tanisini artı 1, 60 tanesini iki artı şeklinde saptamışlardır. MMP-9 immün boyama yoğunluğunu ise 83 olgunun tamamını negatif olarak bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada, tedavi öncesi MMP-2 medyan (minimum-maksimum) 3.00 (0.00-4.00), tedavi sonrası 2.50 (0.00-4.00) olarak saptanmıştır. MMP-9 ise tedavi öncesi 1.00 (0.00-4.00), tedavi sonrası ise 1.00 (0.00-4.00) olarak tespit edildi.

TVT'nin kontrolü enfekte başıboş gezen köpeklerin varlığı açısından zordur. Köpek sahipleri veya bakıcılar çiftleşme öncesi erkek ve dişinin dikkatli şekilde muayene edilmesi ve tümöral lezyonlar gözlenen hayvanların tedavilerinin gerçekleştirilmesi gerekir (Das U ve Das AK., 2000). Bu nedenle vinkristin sülfat ile tedavi öncesi ve sonrasında MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı ileriki çalışmalar için değerli bir bilgi kaynağı olacaktır.

### KAYNAKLAR

1. Adams EW, Slaughter LJ. A canine venereal tumor with metastasis to the brain. *Pathol Vet.* 7(6):498-502, 1970.
2. Akkoc A, Nak D, Demirer A, Şimşek G. Immunocharacterization of matrix metalloproteinase-2 and matrixmetalloproteinase-9 in canine transmissible venereal tumors. *Biotechnic & Histochemistry*, 92(2):100-106, 2017.
3. Alexander CM, Selvarajan S, Mudgett J, Werb Z. Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *J Cell Biol.* 152(4):693-703, 2001.
4. Apakkan Aksun S, Bayındır O, Ozmen D. Metalloproteinazlar, İnhibitörleri Ve İlişkili Fizyolojik Ve Patolojik Durumlar. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 21: 332–342, 2001.
5. Aresu L, Giantin M, Emanuela M, Vascellari M, Castagnaro M, Lopparelli R, Zancanella V, Granato A, Garbisa S, Arico A, Bradaschia A, Mutinelli F, Dacasto M. *BMC Veterinary Research*, 7:33, 2011.
6. Baştan A, Baki Acar D, Cengiz M. Uterine and Ovarian Metastasis of Transmissible Venereal Tumor in a Bitch. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 32(1): 65-66, 2008.
7. Beltran E, Matiasek K, De Risio L, de Stefani A, Feliu-Pascual AL, Matiasek LA. Expression of MMP-2 and MMP-9 in benign canine rostromental meningiomas is not correlated to the extent of peritumoral edema. *Vet Pathol.* 50(6):1091-8, 2013.
8. Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.* 435(1):29-34, 1998.
9. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol.* 20(3):161-8, 2010.
10. Chegeni S, Khaki Z, Shirani D, Vajhi A, Taheri M, Tamrchi Y, Rostami A. Investigation of MMP-2 and MMP-9 activities in canine sera with dilated cardiomyopathy. *Iran J Vet Res.* 16(2): 182–187, 2015.

11. Cohen D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. *Adv Cancer Res.* 43:75-112, 1985.
12. Coughlan AR, Robertson DH, Bennett D, May C, Beynon RJ, Carter SD. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine rheumatoid arthritis. *Vet Rec.* 143(8):219-23, 1998.
13. Das U, Das AK. Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet Res Commun.* 24(8):545-56, 2000.
14. Docampo MJ, Cabrera J, Rabanal RM, Bassols A. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and membrane-type 1 matrix metalloproteinase in melanocytic tumors of dogs and canine melanoma cell lines. *Am J Vet Res.* 72(8):1087-96, 2011.
15. Ferreira AJ, Jaggy A, Varejão AP, Ferreira ML, Correia JM, Mulas JM, Almeida O, Oliveira P, Prada J. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. *J Small Anim Pract,* 41(4):165-8, 2000.
16. Freitas S, Meduri G, Le Nestour E, Bausero P, Perrot Applanat M. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biology of Reproduction,* 61: 1070-1082, 1999.
17. Gentilini F, Calzolari C, Turba ME, Agnoli C, Fava D, Forni M, Bergamini PF. Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs. *Leuk Res.* 29(11):1263-9, 2005.
18. Giantin M, Aresu L, Benali S, Aricò A, Morello EM, Martano M, Vascellari M, Castagnaro M, Lopparelli RM, Zancanella V, Granato A, Mutinelli F, Dacasto M. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. *J Comp Pathol.* 147(4):419-29, 2012.
19. Gonzalez LO, Corte MD, Vazquez J, Junquera S, Sanchez R, Vina A, Rodriguez JC, Lamelas ML, Vizoso F. Study Of Matrix Metalloproteinases And Their Tissue Inhibitors In Ductal In Situ Carcinomas Of The Breast. *Histopathology,* 53: 403-415, 2008.
20. Gülbahar MY, Hazıroğlu R. Bir Köpekte ekstragenital metastazlı transmissible venereal tümör olgusu. *Ankara Üniv. Vet. Fak.Derg.,* 42, 441-444, 1995.
21. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst.* 93(3):178-93, 2001.
22. Huang J, Ang L, Liu MQ, Hu HG, Wang J, Zou Q, Zhao Y, Zheng L, Zhao M, Wu ZS. Serum And Tissue Expression Of Gelatinase And Twist In Breast Cancer. *European Review For Medical And Pharmacological Sciences,* 18: 2662-2669, 2014.
23. Jimenez RE, Z'graggen K, Hartwig W, Graeme-Cook F, Warshaw AL, Fernandez Del Castillo C. Immunohistochemical characterization of pancreatic tumors induced by dimethylbenzanthracene in rats. *American Journal of Pathology,* 154: 1223-1229, 1999.

24. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 141(1):52-67, 2010.
25. Lana SE, Ogilvie GK, Hansen RA, Powers BE, Dernell WS, Withrow SJ. Identification of matrix metalloproteinases in canine neoplastic tissue. *Am J Vet Res*. 61(2):111-4, 2000.
26. Leibman NF, Lana SE, Hansen RA, Powers BE, Fettman MJ, Withrow SJ, Ogilvie GK. Identification of matrix metalloproteinases in canine cutaneous mast cell tumors. *J Vet Intern Med*. 14(6):583-6, 2000.
27. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 64(2):327-36, 1991.
28. Loukopoulos P, Mungall BA, Straw RC, Thornton JR, Robinson WF. Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet Pathol*. 40(4):382-94, 2003.
29. Mandara MT, Pavone S, Mandrioli L, Bettini G, Falzone C, Baroni M. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in canine and feline meningioma. *Vet Pathol*. 46(5):836-45, 2009.
30. Moulton JE. Tumors in domestic animals. 3.th edition, University of California Press, Los Angeles, London, 1990, 498-502.
31. Murakami M, Sakai H, Kodama A, Yanai T, Mori T, Maruo K, Masegi T. Activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane type 1-MMP and abnormal immunolocalization of the basement membrane components laminin and type IV collagen in canine spontaneous hemangiosarcomas. *Histol Histopathol*. 24(4):437-46, 2009.
32. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 274(31):21491-4, 1999.
33. Nak D, Mısırlıoğlu D, Nak Y, Seyrek-İntaş K, Tek HB. Bir köpekte meme metastazlı transmissible venereal tümör olgusu. *Vet. Bil.Derg.*, 20, 1:99-102, 2004.
34. Nak D, Nak Y, Cangul IT, Tuna B. A clinico-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumor in dogs. *J.Vet.Med*. 52, 366-370, 2005.
35. Nakaichi M, Yunuki T, Okuda M, Une S, Taura Y. Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors. *Res Vet Sci*. 82(2):271-9, 2007.
36. Oruç E, Sağlam YS, Cengiz M, Polat B. Bir Köpekte Bulaşıcı Venereal Tümör Meme Metastazının İnce İğne Aspirasyonu İle Sitolojik Teşhisi ve Vincristine Sülfat İle Tedavisi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil.Derg*, 6(1):63-69, 2011.
37. Ozyigit MO, Nak D, Aksit H, Ozturkoglu Inan S, Sımsek G, Uzabacı E, Nak Y, Seyrek K. The effects of vincristine sulfate on expression of galectin-3, Bcl-2 and carbohydrate structures specific for EEL, GSL-1 and RCA-1 lectins in bitches with naturally occurring canine transmissible venereal tumor. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 38(3),331-338, 2014.

38. Ozalp GR, Zik B, Bastan A, Peker S, Ozdemir-Salci ES, Bastan I, Darbaz I, Salar S, Karakas K. Vincristine modulates the expression of Ki67 and apoptosis in naturally occurring canine transmissible venereal tumor (TVT). *Biotech Histochem.*, 87:325-330, 2012.
39. Öncel M. Matriks Metalloproteinazlar ve Kanser. *Eur J Basic Med Sci.* 2(3): 91-100, 2012.
40. Öztürk Görüroğlu Ö. Matriks Metalloproteinaz Enzim Ailesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi . Archives Medical Review Journal.* 22(2):209-220, 2013.
41. Özyurtlu N, Bademkiran S, Özkan Ü, Yıldız F, İçen H. Dişi bir köpekte Transmissible Venereal Tümörün abdominal ve subkutan inguinal bölgeye metastazı. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.* 1 (2): 48-51, 2008.
42. Papazoglou LG, Koutinas AF, Plevraki AG, Tontis D. Primary intranasal transmissible venereal tumour in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.*, 48(7):391-400, 2001.
43. Papparella S, Restucci B, Paciello O, Maiolino P. Expression of matrix metalloprotease-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. *J Comp Pathol.* 126(4):271-6, 2002.
44. Parent R, Teuscher E, Morin M, Buyschaert A. Presence of the canine transmissible venereal tumor in the nasal cavity of dogs in the area of dakar (senegal). *Can Vet J.* 24(9):287-8, 1983.
45. Park MS, Kim Y, Kang MS, Oh SY, Cho DY, Shin NS, Kim DY. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. *J Vet Diagn Invest.*,18(1):130-3, 2006.
46. Pir Yagci I, Kalender H. Bir erkek köpekte transmissible venereal tümör (TVT) olgusunun vincristine sulphate ile sağaltımı. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 14:105-108, 2008.
47. Placke ME, Hill DL, Yang TJ. Cranial metastasis of canine transmissible venereal sarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A,* 34(2):125-32, 1987.
48. Smigielski J, Piskorz L, Talar-Wojnarowska R, Malecka-Panas E, Jablonski S, Brocki M. The Estimation Of Metalloproteinases And Their Inhibitors Blood Levels In Patients With Pancreatic Tumors. *World Journal Of Surgical Oncology,* 11: 137, 2013.
49. Smith GB, Washbourn JB. Infective sarcomata in dogs. *Br.Med.J.* 2:1346-1347, 1998.
50. Soyduñç HO, Çamlıca H, Duranyılmaz D, Sağlam EK, Taş F, Yasasever V, Dalay N. Matriks metalloproteinazlar ve akciğer kanseri. *Türk Onkoloji Dergisi,* 21: 53–56, 2006.
51. Stockmann D, Ferrari HF, Andrade AL, Cardoso TC, Luvizotto MCR. Detection of the tumour suppressor gene TP53 and expression of p53, Bcl-2 and p63 proteins in canine transmissible venereal tumour. *Vet Comp Oncol.*, 9:251-259,2011.
52. Yang TJ. Immunobiology of a spontaneously regressive tumor, the canine transmissible venereal sarcoma. *Anticancer Research.*, 8, 93-95, 1988.

53. Varani J, Hattori Y, Chi Y, Schmidt T, Perone P, Zeigler ME, Fader DJ, Johnson TM. Collagelytic And Jelatinolytic Matrix Metalloproteinases And Their Inhibitors In Basal Cell Carcinoma Of Skin: Comparison With Normal Skin. *British Journal Of Cancer*, 82: 657–665, 2000.
54. Wang L, Pan Q, Xue Q, Cui J, Qi C. Evaluation of matrix metalloproteinase concentrations in precorneal tear film from dogs with *Pseudomonas aeruginosa*-associated keratitis. *Am J Vet Res*. 69(10):1341-5, 2008.

## EKLER

Tablo-1. Mevcut Çalışmada Kullanılan Antikor Bilgileri

Antijen	Kaynak	Klon	Dilüsyon	Ticari Firma
MMP-2	Tavşan	Poliklonal	1/100	Sigma, USA
MMP-9	Tavşan	Poliklonal	1/100	Abcam,

Tablo-2. MMP-2 ve MMP-9 immunohistokimyasal boyanma medyan değerleri

	Tedavi Öncesi Medyan (Minimum- Maksimum)	Tedavi Sonrası Medyan (Minimum- Maksimum)	p
MMP_2	3.00 (0.00 - 4.00)	2.50 (0.00 - 4.00)	0.896
MMP_9	1.00 (0.00 - 4.00)	1.00 (0.00 - 4.00)	0.517

Gruplar arasındaki fark önemsiz olarak saptanmıştır ( $P > 0.05$ )

Tablo-3. MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin immunohistokimyasal boyanma pozitif sayıları ve yüzdeleri

	n	MMP-2 (%) pozitif	MMP-9 (%) pozitif
Tedavi Öncesi	30	26 (% 86,6)	28 (%93,3)
Tedavi Sonrası	30	28 (%93,3)	23 (76,6)