



Malignant Meme Tümörlü Köpeklerde Plazma IGF-2 Konsantrasyonu ve Tümör Dokusundaki Ekspresyonu

Elvan ANADOL¹, Nilgün GÜLTİKEN², Gül Fatma YARIM³, Murat YARIM⁴, Halit KANCA⁵, Mehmet Eray ALÇIĞIR⁶, Efe KARACA⁴

1. Gazi Üniversitesi, Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, Ankara, TÜRKİYE.
2. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Samsun, TÜRKİYE.
3. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun, TÜRKİYE.
4. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Samsun, TÜRKİYE.
5. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara, TÜRKİYE.
6. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
05.05.2016	21.11.2016	31.12.2016

Öz: Bu çalışmanın amacı, malignant meme tümörlü köpeklerde insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2)'nin plazma konsantrasyonu ve tümör dokusundaki ekspresyonunu değerlendirmektir. Çalışmada toplam 15 köpek kullanıldı. Sekiz meme tümörlü köpek grup 1'i, 7 sağlıklı köpek ise grup 2'yi oluşturdu. Köpeklerin diöstrus döneminde oldukları vaginal sitolojik muayene ile belirlendi. Abdominal organların ultrasonografik muayenesi ve toraksın radyografik bakışı yapılarak metastaz değerlendirilmesi yapıldı. Köpeklerden kan örnekleri alındı, plazmaları elde edildi ve IGF-2 konsantrasyonu ELISA yöntemi ile belirlendi. Grup 1'de, tümörler "Dünya Sağlık Örgütü" (WHO)'nun belirlediği "Klinik Derecelendirme Sistemi"ne göre sınıflandırıldı ve komple unilateral mastektomi tekniğiyle uzaklaştırıldı. Tümörlerin histolojik olarak malignite derecesi Nottingham yöntemine göre tubul formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitotik hücre sayısına bağlı olarak değerlendirildi. Histopatolojik incelemelerde 4 karsinosarkom, 1 intraduktal papillar karsinom, 1 karsinom, 1 kompleks tip karsinom ve 1 miks tip karsinom tanısı konuldu. İmmunohistokimyasal incelemede tümör dokusunda meme asinus epitel hücreleri, mioepitel hücreleri ve bazı damar düz kas hücrelerinde IGF-2 ekspresyonunun olduğu, duktus epitel hücrelerinde ise olmadığı gözlemlendi. Sağlıklı köpeklere göre, malignant meme tümörlü köpeklerde plazma IGF-2 konsantrasyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.05).

Anahtar Kelimeler: IGF-2, Köpek, Malignant meme tümörü.

Plasma IGF-2 Concentration and Tissue Expression in Dogs with Malignant Mammary Tumor

Abstract: The aim of this study was to evaluate the plasma concentration of insulin like growth factor-2 (IGF-2) and its expression in tumor tissue of dogs with malignant mammary tumors. Fifteen dogs were used in the study. Eight dogs with mammary tumors constituted group 1, and 7 healthy dogs constituted group 2. Diestrus phase in dogs was determined with vaginal cytological examination. Metastasis was evaluated by ultrasonographic examination of abdomen and thorax radiography. Blood samples were collected from the dogs, plasma was separated and IGF-2 levels were measured with ELISA method. Tumors in group 1 were classified according to Clinical Grading System defined by World Health Organization and were removed by using complete unilateral mastectomy technique. The histological malignancy grading of tumors was made according tubule formation, nuclear pleomorphism, and number of mitotic cells by using Nottingham method. In histopathological examination, 4 carcinosarcoma, 1 intraductal papillary carcinoma, 1 carcinoma, 1 complex type carcinoma, and 1 mix type carcinoma were detected. In immunohistochemical investigation, IGF-2 expression was detected in mammary acinar epithelial cells, myoepithelial cells, and some vascular smooth muscle cells but not in ductal epithelial cells in tumor tissue. Compared to healthy dogs, the increase in plasma IGF-2 concentration in dogs with malignant mammary tumors was statistically significant (P<0.05).

Keywords: Dog, IGF-2, Malignant mammary tumour.

[✉] Elvan ANADOL

Gazi Üniversitesi, Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, Ankara, TÜRKİYE.
e-posta: elvanadol@yahoo.com

*Bu çalışma Türk Veteriner Jinekoloji Derneği VI. Ulusal Kongresi'nde (uluslararası katılımlı) poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Köpeklerde meme tümörlerinin neoplastik hastalıklar arasında görülme oranı ortalama %27.1 olup deri tümörlerinden sonra ikinci sıklıkta görülmektedir (1,2). Meme tümörü patogenezinde progesteron ve östrojen gibi steroid hormonların rol oynadığı bilinmektedir (3,4). Siklusların denetlenmesi amacıyla ekzojen progesterin uygulamaları nedeniyle büyüme hormonunun (BH) ve dolayısıyla insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)'nin de artarak tümör gelişimine katkı sağladığı bildirilmektedir (2,5-9). Büyüme hormonu uyarımı ile salınan, büyüme ve farklılaşma faktörü olarak bilinen IGF sistemi, IGF-1 ve IGF-2 olmak üzere iki formda bulunmaktadır (10-12). IGF-1, bazik peptid yapıda olup, doğumdan sonra karaciğerde sentezlenirken; IGF-2 nötral peptid yapıda olup, erken embriyonik ve fetal dönemde çeşitli somatik dokulardan sentezlenmektedir (11).

Köpeklerde, normal ve kanserli meme dokusunda BH mRNA ve reseptör ekspresyonu bulunmaktadır. IGF-1'in mitojenik etkisi nedeniyle de, hem BH hem de IGF-1 meme tümörü oluşumunda rol oynamaktadır (6,13-15). IGF-1 sentezi artırılmış transjenik farelerde, IGF-1, meme bezlerinde duktal hipertrofiye neden olmakta ve laktasyon sonrası meme involusyonunu engellemektedir (16).

Köpek meme tümörlerinde plazma BH ve IGF-1 konsantrasyonları ve meme dokusundaki ekspresyonları konusunda çalışmalar bulunmakla birlikte, IGF-2'nin rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu bağlamda, sunulan çalışmada, malignant meme tümörlü köpeklerde plazma IGF-2 konsantrasyonunun ve tümör dokusundaki ekspresyonunun değerlendirilmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Sunulan çalışmada, toplam 15 köpek kullanıldı. Grup 1'de spontan meme tümörü bulunan ve

histopatolojik olarak malignant olduğu belirlenen 8 köpek (çalışma grubu), grup 2'de ise diöstrus döneminde olan 7 sağlıklı köpek (kontrol grubu) yer aldı. Grup 1'de yer alan köpeklerde, tümörler "Dünya Sağlık Örgütü" (WHO)'nun belirlediği "Klinik Derecelendirme Sistemi"ne göre sınıflandırıldı (17). Birden fazla tümör bulunan köpeklerde (n=2) en büyük tümör derecelendirildi ve sadece bu tümörde IGF-2 ekspresyonu değerlendirildi.

Abdominal organların ultrasonografik muayenesi ve toraksın radyografik bakışı yapılarak metastaz değerlendirilmesi yapıldı ve tümörler komple unilateral mastektomi tekniğiyle uzaklaştırıldı. Grup 1'e ilişkin fiziksel bulgular Tablo 1'de sunuldu. Grup 2 ise, sadece plazma IGF-2 konsantrasyonunun karşılaştırılması amacıyla kontrol grubu olarak kullanıldı. Köpeklerin diöstrus döneminde oldukları vaginal sitolojik muayene ile belirlendi. Örnekler vestibulum vaginadan hücre almamak için vaginoskop yardımıyla ve pamuk uçlu svap çubuğu kullanılarak anterior vagina duvarından alındı. Örnek, lam üzerine iki ayrı iz şeklinde sürüldükten sonra Papanicolaou tekniğiyle boyandı (18). Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Leica Microsystems Inc., Illinois, USA) altında birim alandaki hücre tipleri ve sayısı dikkate alınarak incelendi. Çok sayıda parabazal ve intermediyer hücre ve lökosit varlığı diöstrus evresi olduğunu gösterdi. Çalışma, 2014 yılında kabul edilen, Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliği'nde yer alan 8-8/k-1 maddesine uygun olarak gerçekleştirildi.

Histopatolojik İnceleme

Komple unilateral mastektomi tekniğiyle uzaklaştırılan tümörler %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edilip, standart patoloji prosedürlerine göre takip edildi. Parafinde bloklanarak 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Hematoksilin-Eozin boyaması sonrası Goldschmidt ve ark. (19) tarafından önerilen yeni klasifikasyon

sistemine göre histopatolojik sınıflandırma yapıldı. Tümörlerin malignite derecesi ise Nottingham yöntemine göre belirlendi. Buna göre tubul formasyonu, nükleer polimorfizm ve mitotik hücre sayısı 1-3 arasında puan verilerek değerlendirildi. Tümörler derecelendirilirken 3-5 puan=iyi diferensiyel olmuş (Evre 1), 6-7 puan=orta diferensiyel olmuş (Evre 2), 8-9 puan=zayıf diferensiyel olmuş (Evre 3) olarak tanımlandı (20).

İmmunohistokimyasal İnceleme

Tümör dokularının ikinci kesitlerine streptavidin-biotin peroksidaz (SABP) immunohistokimya kiti kullanılarak (Zymed Histostatın Plus Bulk Kit. Cat. No. 85-9043. San Francisco. CA) immunohistokimyasal boyama uygulandı. Kesitler ksilolde deparafinize edildi ve dereceli alkollerden geçirilerek rehidre edildi. Endojenaz peroksidaz aktivitesi, metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂ ile 15 dakika inkübe edilerek engellendi. Tüm basamaklar oda ısısında ve nemli ortam oluşturulmuş kapalı bir kaptaki gerçekleştirildi. Kesitler pH'sı 7.2 olan fosfat tamponlu solüsyonla yıkandı ve antijenik yapıyı açığa çıkarmak için pH'sı 6 olan sitrat tamponlu solüsyon içerisinde ve mikrodalga fırında 800 watt'ta 10 dakika ısıtıldı. Ardından spesifik olmayan proteinler, protein bloklayıcı solüsyonda 10 dakika tutularak engellendi ve kesitler tavşan anti-IGF-2 poliklonal antikoruna (1:64), (Bioss; cat. No. Bs-0015R. Massachusetts. ABD) ile 4°C'de bir gece inkübe edildi. Kesitler daha sonra anti-tavşan biotinli polivalan sekonder antikor ile 10 dakika ve takiben de horseradish peroksidaz enzimi ile 10 dakika inkübe edilip, 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) kromojenle 10-15 dakika (mikroskop altında kontrollü olarak) tutuldu. Primer antikorlar yerine PBS kullanılarak negatif kontrol kesitleri elde edildi. Kesitlerin karşı boyanmaları Mayer's haematoksilen ile yapıldı ve distile su ile yıkandıktan sonra su bazlı yapıştırıcı ile yapıştırıldı. İmmunopozitif hücrelerin dağılımı Nikon Eclipse E600 mikroskopta yapıldı. Değerlendirmeler, 40 objektif büyütmede 10

mikroskop sahası taranarak gerçekleştirildi. Buna göre immün boyanma yoksa (-), % 1-10 arası hücrede immün boyanma (+), % 11-40 arası hücrede immün boyanma (++) ve % 41 ve üzeri hücrede immün boyanma (+++) olarak değerlendirildi.

Kan Örneklerinin Alınması ve Plazma Elde Edilmesi

Grup 1'deki köpeklerden preoperatif dönemde olmak üzere her iki gruptaki köpeklerin *v. sephalica antebrahii*'lerinden EDTA'lı tüplere 5'er ml kan örneği alındı ve 1550 g'de 10 dak. santrifüj edildi. Elde edilen plazma örnekleri, IGF-2 konsantrasyonu ölçülünceye kadar -80°C'de saklandı.

Plazma IGF-2 Konsantrasyonunun Ölçümü

Sağlıklı ve meme tümörlü köpeklerin plazma IGF-2 konsantrasyonu enzim bağlı immunosorbent analizi (ELISA) ile belirlendi. Bu amaçla, köpek spesifik ticari ELISA kiti (MBS107968, MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA) kullanıldı ve üretici firmanın belirttiği prosedür takip edildi. Tüm örnekler paralel çalışıldı. Mikropleyette oluşan rengin absorbansı 450 nm'de mikropleyit okuyucuda (Infinite F50, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) değerlendirildi ve sonuçlar ng/ml olarak sunuldu.

İstatistiksel Analiz

Bulguların istatistiksel analizinde SPSS 14.0 versiyon paket programı kullanıldı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Gruplar arası farklılık Mann-Whitney *U* testiyle belirlendi. Sonuçlar ortalama değer ± standart hata olarak sunuldu ve P değerinin 0,05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Klinik ve Histopatolojik Bulgular

Çalışmada yer alan köpeklerin ırk ve yaşları ile tümörlerin özellikleri Tablo 1 ve 2'de sunuldu.

Tablo 1. Çalışma ve kontrol grubundaki köpeklerin ırk ve yaşları ile tümörlerin özellikleri ve plazma IGF-2 konsantrasyonları (ng/ml).**Table 1.** Species and ages of dogs with the tumor features and plasma IGF-2 concentrations in the experimental and control groups.

Gruplar	Olgu no.	İrk	Yaş	Tümörün lokalizasyonu	Tümörlü meme bezi sayısı	Tümörün evresi	Tümörün büyüklüğü	Plazma IGF-2 (ng/ml)
Çalışma Grubu	1	Melez	6	Sol inguinal	1	Evre 2	T2	107.82
	2	Melez	16	Sol inguinal	3	Evre 3	T2	90.40
	3	Alman Kurdu	6	Sağ kaudoabdominal	2	Evre 2	T1	40.83
	4	Terrier	12	Sağ kraniyoabdominal	1	Evre 1	T3	38.69
	5	Terrier	7	Sol inguinal	1	Evre 2	T2	116.50
	6	Golden Retriever	7	Sol kaudoabdominal	1	Evre 2	T1	84.14
	7	Terrier	15	Sağ kaudoabdominal	1	Evre 1	T2	77.81
	8	İngiliz Setter	8	Sol kaudotorakal	1	Evre 2	T3	96.26
Kontrol Grubu	9	Melez	2	-	-	-	-	12.59
	10	Melez	2	-	-	-	-	27.45
	11	Pointer	4	-	-	-	-	10.73
	12	Melez	2	-	-	-	-	22.39
	13	İngiliz Setter	2	-	-	-	-	15.25
	14	Melez	2	-	-	-	-	10.79
	15	Dogo Arjantin	2	-	-	-	-	19.08

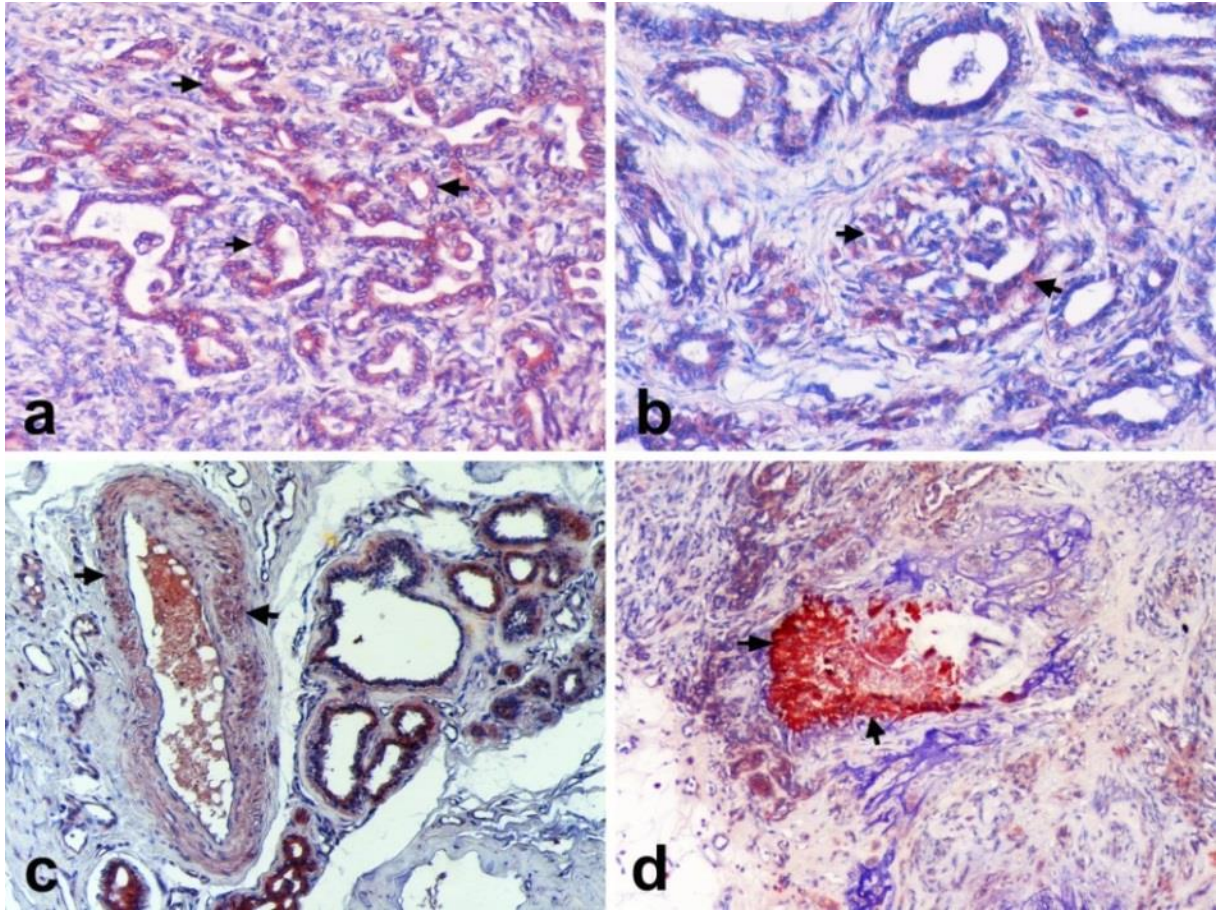
Tablo 2. Meme tümörlü köpeklerde histolojik tanıya göre meme dokusundaki IGF-2 ekspresyonu.**Table 2.** IGF-2 expression of mammary tissue in dogs with mammary tumor according to histological diagnosis.

Olgu no.	Histolojik Tanı	Asinus Epiteli	Miyoeptel	Duktal Epitel	Kıkırdak	Damar Düz Kası
1	Karsinosarkoma	+++	++	-	+++	++
2	İntraduktal papiller karsinoma	-	-	-	-	-
3	Karsinoma ve malignant miyoepteliyoma	+++	-	-	-	-
4	Kompleks tip karsinoma	+++	+	-	-	-
5	Karsinosarkoma	+++	-	-	-	-
6	Karsinosarkoma	++	++	-	-(olgun)	++
7	Miks tip karsinoma	+	+	-	-(olgun)	-
8	Karsinosarkoma	+++	+	-	-(yok)	-

İmmunohistokimyasal Bulgular

Tümör dokusunda meme asinus hücreleri, miyoepitel hücreleri ve bazı damar düz kas hücrelerinde IGF-2 ekspresyonlarının olduğu, duktal epitelyumda ise ekspresyonların olmadığı gözlemlendi (Tablo 2). İntraduktal papillar karsinoma olgusunda ise, meme dokusunda IGF-2 ekspresyonuna rastlanılmadı. Karsinosarkom olgularında yeni

şekillenen kıkırdak matriksinin iç kısımlarında yoğun IGF-2 ekspresyonları görülürken, olgun kıkırdaklarda IGF-2 ekspresyonuna rastlanılmadı. Miyoepitel hücrelerinin immün boyanmalarının, özellikle miyoepitel hücre kümelerinin dış kısımlarında yoğunlaştığı gözlemlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Köpek meme tümörü dokusunda IGF-2 ekspresyonu. Meme bezi asinus hücrelerinde yoğun immün boyanma (oklar) (a); miyoepitel hücrelerinde immün boyanma (oklar) (b); damar düz kas hücrelerinde immün boyanma (oklar) (c) ve yeni şekillenen kıkırdak matriksinin iç kısımlarında yoğun immün boyanma (oklar) (d). SABP ile Mayer's hematoksilen boyama; a,b,c x 300 ve d x 150.

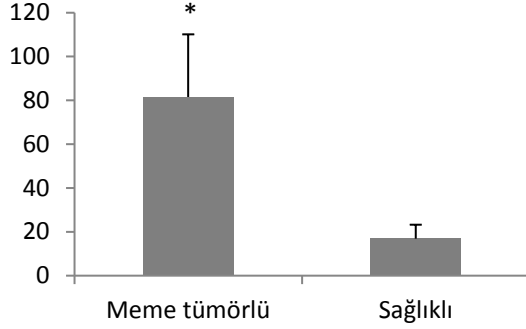
Figure 1. IGF-2 expression of canine mammary tumour tissue. Immunopositivity of mammary gland acinar cells (arrows) (a); immunopositivity of myoepithelial cells (arrows) (b); immunopositivity of smooth muscle cells of vessel (arrows) (c) and strong immunopositivity of inner cartilage matrix (arrows) (d) in the tumoural mammary tissue samples. SABP method, Mayer's haematoxylin stain; a,b,c x 300 and d x 150.

Plazma IGF-2 Konsantrasyonları

Malignant meme tümörlü köpeklerde plazma IGF-2 konsantrasyonunun 81.55 ± 28.59 ng/ml,

sağlıklı köpeklerde ise 16.89 ± 6.36 ng/ml olduğu belirlendi ($P < 0.05$) (Şekil 2). Malignant meme tümörlü köpekler arasında en yüksek plazma IGF-2

konsantrasyonu 116.50 ng/ml (karsinosarkoma) iken, en düşük 38.69 ng/ml (kompleks tip karsinoma) olarak ölçüldü (Tablo 1).



Şekil 2. Meme tümörlü ve sağlıklı köpeklerde plazma IGF-2 konsantrasyonları. *P<0.05, Mann Whitney U test.

Figure 2. Plasma IGF-2 concentrations in dogs with mammary tumors and healthy dogs. *P<0.05, Mann Whitney U test.

TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsan ve köpek meme tümörlerinde BH ve IGF-1 proteinlerinin meme dokusundaki ekspresyonları bilinmekle birlikte (15,21), özellikle köpek meme tümörlerinde IGF-2 ekspresyonunun araştırıldığı çalışmalar kısıtlıdır.

Büyüme hormonunun metabolik etkilerine aracılık eden IGF'lerden, IGF-1 pubertaya kadar artış gösterip puberta sonrası azalırken, IGF-2 seviyesinin en yüksek olduğu dönem fetal dönemdir (10,11,22). Erişkin dönemde ise IGF-2'nin, karaciğer ve beyin dokusunda eksprese olduğu ve hücre çoğalmasında, büyümesinde ve farklılaşmasında önemli role sahip olduğu ortaya konulmuştur (10,11). IGF-1 meme bezinin stromal kısmından salınırken, IGF-2 hem stromal hem de epitel hücrelerden sentezlenmektedir (23). Sunulan çalışmada da, benzer olarak meme bezi epitelinde ve mioepitel dokularda yoğun IGF-2 ekspresyonları gözlenmiştir.

Köpeklerde ekzojen progesteron uygulamalarının meme bezinde BH üretimini uyardığı ve plazma IGF-2 konsantrasyonunu artırdığı bilinmektedir. Büyümeyi uyaran bu faktörlerin lokal ekspresyonlarının artması malignite riskini artırabilmektedir (8). Sunulan çalışmada, seksüel

siklusun diöstrus döneminde yüksek olan endojen progesteron konsantrasyonunun, plazma IGF-2 konsantrasyonuna olan etkisini ayırt edebilmek amacıyla kontrol grubu olarak diöstrus dönemindeki köpekler kullanıldı. Bu çalışmanın bulguları, malignant meme tümörlü köpeklerde plazma IGF-2 konsantrasyonunun diöstrus dönemindeki sağlıklı köpeklere göre belirgin olarak daha yüksek olduğunu gösterdi. Benzer şekilde, köpeklerde testis tümörlerinde IGF-1 ekspresyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, Sertoli hücre tümörleri ve seminomlarda ekspresyonun düşük, Leydig hücre tümörü ve mikst tümörlerde yüksek olduğu tespit edilmiş ve tümör tipine göre ekspresyonun farklılık gösterebileceği ileri sürülmüştür (24). Ayrıca, her ne kadar çalışmamızda benign tümörler incelenmemiş olsa da insanda kolorektal tümör dokularının değerlendirildiği bir çalışmada, IGF-2 ekspresyonunun karsinom tipi tümörlerde adenomlara oranla çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir (25). Öte yandan sunulan çalışmada tümör tipleri göz önüne alındığında plazma IGF-2 konsantrasyonları arasında farklılık gözlenmesine karşılık tümörlerin bez epitel hücrelerinde belirlenen IGF-2 ekspresyonları incelendiğinde belirgin bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 2).

IGF'ler etkilerini membrandaki reseptörlerine (insülin reseptörü, IGF-1 reseptörü ve IGF-2 reseptörü) bağlanarak göstermekte ve plazmada bağlayıcı proteinleri ile (IGFBP1,2,3,4,5,6) taşınmaktadır (26,27). İnsanlarda yapılan kanser araştırmalarına göre, IGF-1 veya IGF-2 proteinlerinde artış ve IGFBP1-6'da düşüş saptanmasının, tümör gelişim riskinin artmasına neden olduğu bildirilmiş ve meme, prostat, akciğer, kolon, endometriyum ve mesane kanserlerinde, IGF-2'nin tümör gelişiminde parakrin rolü olduğu ifade edilmiştir (12,28). Kolon, karaciğer ve pankreas kanserlerinde, IGF-1 ve IGF-2 düzeyleri ile tümör gelişimi arasında korelasyon saptanırken, meme kanserinde herhangi bir korelasyon belirlenmemiştir (10). Klopffleisch ve ark. (21), köpek meme tümörlerinde insanlara benzer olarak

adenom, karsinom ve metastaz varlığında IGF-1 ve IGF-2 mRNA ekspresyonlarında artış olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle IGF-2 salınımı artırılmış transjenik hayvanlarda, meme bezinde adenokarsinom şekillenme riskinin arttığı ve erken dönemde daha agresif seyirli kanserlerin oluştuğu rapor edilmiştir (29,30). Çalışmamızın bulguları, sağlıklı köpeklerle göre malign meme tümörlü köpeklerde plazma IGF-2 konsantrasyonundaki artışın ve tümör dokusundaki IGF-2 ekspresyonunun kaynağının, ekspresyonun yoğun olarak görüldüğü meme bezi epitel hücreleri olabileceği kanaatini uyandırdı.

IGF-2'nin köpekte fetal gelişim için önemli bir rol oynadığı, özellikle implantasyon başladıktan sonra ekspresyonun arttığı ve fetal ve plasental büyümeden sorumlu faktörlerden biri olduğu bildirilmiştir (31). Benzer şekilde, gebe kısıraklarda embriyonal adezyonun oluşmaya başladığı dönemde fetal ve plasental IGF-2 ekspresyonunun görülmeye başladığı tespit edilmiştir (32). Büyüme ile olan bağlantısı düşünüldüğünde IGF-2'nin apoptozis mekanizmasının bozulduğu tümör gibi hastalıklarda artması beklenebilir. Genel olarak IGF'lerin, özellikle de IGF-2'nin tümör büyümesini artırdığı bilinmektedir (10). Bu konudaki çalışmalar ile uyumlu olarak, çalışmamızda da malign meme tümörlü köpeklerde IGF-2 plazma konsantrasyonu yüksek bulundu. Sonuç olarak, IGF-2'nin tümör hücrelerinin büyümesi, farklılaşması ve invazyonuna olan etkisi göz önünde bulundurulduğunda, malign meme tümörlerinin kemoterapisinin ve diğer medikal tedavi seçeneklerinin takibinde IGF-2'nin bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. Cohen D., Reif JS., Brodey RS., Keiser H., 1974. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Research*, 34, 2859-2868.
2. Johnston SD., Kustritz MVR., Olson PNS., 2001. Canine and Feline Theriogenology. 1 st ed., 243-256, Saunders, Philadelphia.
3. Illera JC., Pérez-Alenza MD., Nieto A., Jimenez MA., Silvana G., Dunner S., Peña S., 2006. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, 71, 541-548.
4. Queiroga FL., Pérez-Alenza MD., Silvan G., Peña L., Lopes C., Illera JC., 2005. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 94, 181-187.
5. Concannon P., Altszuler N., Hampshire J., Butler WR., Hansel W., 1980. Growth hormone, prolactin, and cortisol in dogs developing mammary nodules and an acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology*, 106, 1173.
6. Mol JA., van Garderen E., Selman PJ., Wolfswinkel J., Rijnberk A., Rutteman GR., 1995. Growth hormone mrna in mammary gland tumors of dogs and cats. *Journal of Clinical Investigation*, 95, 2028-2034.
7. Mol JA., van Garderen E., Rutteman GR., Rijnberk A., 1996. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 57, 67-71.
8. Mol JA., Selman PJ., Sprang EP., van Neck JW., Oosterlaken-Dijksterhuis MA., 1997. The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *Journal of Reproduction and Fertilty Supplement*, 51, 339-344.
9. Selman PJ., Mol JA., Rutteman GR., Rijnberk A., 1994. Progestin treatment in the dog. I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. *European Journal of Endocrinology*, 131, 413-421.

10. Bergman D., Halje M., Nordin M., Engström W., 2013. Insulin-like growth factor 2 in development and disease: A mini-review. *Gerontology*, 59, 240-249.
11. Engström W., Shokrai A., Otte K., Granerus M., Gessbo A., Bierke P., Madej A., Sjolund M., Ward A., 1998. Transcriptional regulation and biological significance of the insulin like growth factor I1 gene. *Cell Proliferation*, 31, 173-189.
12. Samani AA., Yakar S., LeRoith D., Brodt P., 2007. The role of the igf system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrine Reviews*, 28, 20-47.
13. Van Garderen E., Van der Poel HJA., Swennenhuis JF., Wissink EHJ., Rutteman GR., Hellmen E., Mol JA., Schalken JA., 1999. Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. *Endocrinology*, 140, 5907-5914.
14. Queiroga FL., Pérez-Alenza MD., Silvan G., Peña L., Lopes C., Illera JC., 2008. Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 β -estradiol) in canine mammary tumours. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 110, 76-82.
15. Queiroga FL., Pérez-Alenza MD., Silvan G., Peña L., Lopes C., Illera JC., 2010. Serum and intratumoural GH and IGF-I concentrations: Prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer. *Research in Veterinary Science*, 89, 396-403.
16. Kleinberg DL., 1998. Role of IGF-I in normal mammary development. *Breast Cancer Research and Treatment*, 47, 201-208.
17. Owen LN., 1980. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals, 1st ed., 2-53, World Health Organization, Geneva.
18. Papanicolaou GN., 1942. A new procedure for staining vaginal smears. *Science*, 95,432.
19. Goldschmidt M., Peña L., Rasotto R., Zappulli V., 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48, 117-131.
20. Elston CW., Ellis IO., 1998. Assessment of histological grade. In "The breast", Eds., CW Elston. IO Ellis., Vol. 13, 356-84, Churchill Livingstone, Edinburgh, New York.
21. Klopffleisch R., Hvid H., Klose P., da Costa A., Gruber AD., 2010. Insulin receptor is expressed in normal canine mammary gland and benign adenomas but decreased in metastatic canine mammary carcinomas similar to human breast cancer. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8, 293-301.
22. Harbili S., 2008. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF): Egzersiz metabolizması ve kas dokusu üzerine etkileri. *Genel Tıp Dergisi*, 18, 177-184.
23. Mol JA., Lantinga-van Leeuwen IS., van Garderen E., Selman PJ., Oosterlaken-Dijksterhuis MA., Schalken JA., Rijnberk A., 1999. Mammary growth hormone and tumorigenesis-lessons from the dog. *Veterinary Quarterly*, 21, 111-115.
24. Peters MA., Mol JA., van Wolferen ME., Oosterlaken-Diksterhuis MA., Teerds KJ., van Sluijs FJ., 2003. Expressions of the insulin-like growth factor (IGF) system and steroidogenic enzymes in canine testis tumors. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14, 1-22.
25. Noshio K., Yamamoto H., Taniguchi H., Adachi Y., Yoshida Y., Arimura Y., Endo T., Hinoda Y., Imai K., 2004. Interplay of insulin-like growth factor-II, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I receptor, Cox-2, and matrix metalloproteinase-7, play key roles in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Clinical Cancer Research*, 10, 7950-7957.
26. Clemmons DR., 1997. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling igf actions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 8, 45-62.
27. Keleş M., Türkeli M., 2005. İnsülin benzeri büyüme faktörü ve kanser. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 3, 39-43.
28. Yu H., Rohan T., 2009. Role of the insulin-like

- growth factor family in cancer development and progression. *The Journal of the National Cancer Institute*, 92, 1472-1489.
29. Bates P., Fisher R., Ward A., Richardson L., Hill DJ., Graham CF., 1995. Mammary cancer in transgenic mice expressing insulin-like growth factor II (IGF-II). *British Journal of Cancer*, 72, 1189-1193.
30. Rogler CE., Yang D., Rossettin L., Donohoe J., Alt E., Chang JC., Rosenfeld R., Neely K., Hintz R., 1994. Altered body composition and increased frequency of diverse malignancies in insulin-like growth factor II transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 13779-13784.
31. Beceriklisoy HB., Schafer-Somi S., Kucukaslan I., Agaoglu R., Gltiken N., Ay SS., Kaya D., Aslan S., 2009. Cytokines, growth factors and prostaglandin synthesis in the uterus of pregnant and non-pregnant bitches: the features of placental sites. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 115-119.
32. Lennard SN., Stewart F., Allen WR., 1995. Insulin like growth factor II gene expression in the foetus and placenta of the horse during the first half of gestation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 103, 169-179.