

**T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ**

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
KESİN RAPORU**

**KÖPEK MEME TÜMÖRLERİNDE p53 PROTEİNİ İLE  
METALLOTHİONEİN'İN İMMUNHİSTOKİMYASAL  
YÖNTEMLERLE GÖSTERİLMESİ**

Proje Yöneticisi  
Doç.Dr.  
SEVİL ATALAY VURAL

PROJE NO:BAP-2003-08-10-058  
BAŞLAMA TARİHİ: Mart 2004  
BİTİŞ TARİHİ: Aralık 2006  
RAPOR TARİHİ: 29.01.2007

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Ankara-“2007”

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>I. Türkçe ve İngilizce Özet</b>	1-2
<b>II. Amaç ve Kapsam</b>	3
<b>III. Materyal ve Yöntem</b>	
III.1. Materyal	4
III.2. Yöntem	4
<b>IV. Bulgular</b>	6
<b>V. Sonuç ve Öneriler</b>	13
<b>VI. Kaynaklar</b>	20
<b>VII.Ekler</b>	27

## I. ÖZET

### **Köpek Meme Tümörlerinde p53 Proteini ile Metallothionein'in İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Gösterilmesi**

Çalışmada malign ve benign meme tümörlerinde immunhistokimyasal olarak prognostik faktör olarak kullanılan p53 proteini ve metallothioneinin (MT) varlığı; bunların tümör tipleri, derecesi ve varsa metastazları ile arasındaki korelasyonu araştırmak amaçlandı. Bu amaçla değişik ırklara ait 6-15 yaşlar arasında 50 adet köpek meme tümörü kullanıldı. Histopatolojik incelemeler sonunda 36 adet malign mikst tümör, 9 adet adenokarsinom (1 papiller kistik, 4 duktal, 4 tubuler karsinom), 5 adet benign mikst tümör saptandı. Bu tümörlerin 5'i torakal, 6'sı abdominal, 18'i inguinal, 11'i torako-abdominal, 10'u abdomino-inguinal meme loblarında lokalize olmuştu.

Malign mikst tümörlerin 35 adedinde, adenokarsinomların hepsinde, benign mikst tümörlerinde üç adedinde meme bezi ve kanal epiteli hücrelerinde MT pozitif alanlara; yine malign tümörlerin hepsinde, benign tümörlerinde iki adedinde genel olarak meme bezi epitellerinde, daha az olarak da kanal epitellerinde p53 proteini pozitif alanlar dikkati çekti. Ayrıca iki benign mikst tümörde ise her iki reagenzle pozitif boyanma saptandı.

**Anahtar Sözcükler** : immunoperoksidaz, meme, metallothionin, p53 protein, tümör

## **I. SUMMARY**

### **Immunohistochemical Demonstration of p53 protein and Metallothionein in Canine Mammary Tumors**

In the study, p53 protein and metallothionein (MT) were investigated by immunohistochemically in benign and malign mammary tumors, and also were evaluated type of tumor degree, metastatic status and the correlation. The 50 cases were examined, different breed and 6-15 years old. There were 36 malign mixed tumor, 9 adenocarcinoma (1 papillary cystic adenocarcinoma, 4 ductal carcinoma, 4 tubular carcinoma), 5 benign mixed tumor. The locations of tumors were seen in five thoracic, six abdominal, 18 inguinal, 11 thoraco-abdominal, and 10 abdomino-inguinal mammary glands.

Positive immunostaining for MT sera was found in 35 malign mixed tumor, nine adenocarcinoma and three benign mixed tumor in mammary gland epithelium and ductal epithelium. Positive immunostaining for p53 protein sera was determined in 36 malign mixed tumor and two benign mixed tumor in generally mammary gland epithelium and rarely ductal epithelium. Also the positivity was seen with p53 protein and MT at one benign mixed tumor.

**Key Words :** immunoperoxidase, mammary gland, metallothionein, p53 protein, tumor

## II. AMAÇ VE KAPSAM

Köpeklerde meme tümörleri, deri tümörlerinden sonra en sık rastlanılan tümörlerdir (Moulton, 1990). Dünyanın bütün bölgelerinde bildirilmiş olan bu tümörlerin ortaya çıkışında ve sıklığında bölgesel farklılık saptanmamıştır. Yapılan araştırmalar, köpeklerde rastlanan tümörlerin yaklaşık % 25-50'sinin meme tümörü kalanlarının da hiperplazi, adenom ve miyoepitelyom yapısında bulunduğunu göstermiştir (Brodey ve ark., 1983; Fidler and Brodey, 1967; Pamukçu and Ertürk, 1962). Son yıllarda insan ve hayvanlarda bu tümörlerin karakterini saptamak amaçlı pek çok prognostik faktörlerden (steroid hormon reseptörleri, MIB-1, p53 protein, EGF-R, metallothionin {MT}vd) faydalanılmaktadır (Cote and Taylor, 1994). Hatta bunları saptamak için de insan meme tümörleri için iyi bir model oluşturduğu ileri sürülen köpek meme tümörlerinden yararlanılmaktadır (Schafer ve ark., 1998; Moulton, 1990).

Bunlardan MT'ler yüksek sistein içerikli düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir ve bunlar seçici olarak çinko (Zn), bakır (Cu) ve diğer grup II ağır metalleri ile bağlanırlar (Bier ve ark., 1994; Schmid ve ark., 1993; Zeng ve ark., 1991). Büyük orandaki metal iyonlarını bağlayabilme özelliklerinden dolayı da bunun Zn ve Cu metabolizmasında, ağır metal detoksifikasyonu ve metal transportunda, hatta oksidatif stresten hücreyi korumada homeostatik rol oynadığı düşünülmektedir (Cubatsu and Meneghini, 1993). Hücre proliferasyonu, embriyojenik gelişim ile karsinogenezisteki rolü ise tam olarak aydınlatılamamıştır. Bunlar aynı zamanda bazı kemoterapotik metallere karşı ilaç rezistansı sağlarken kadmiyum ve antikanser ilaçlarının da yan etkilerini önlemektedir (Sawaki ve ark., 1999). Metal toksisitelerinde; stress ya da yaralanma (yangı, iskemi, ionize radyasyon, alkali sitotoksitesi) durumlarında serbest kalan radikaller DNA'da onarılamayacak hasarlar yaparlarken MT'nin hücre koruyucusu olarak görev yaptığı (Jasani and Schmid, 1997), diğer taraftan da Zn içeren tümör baskılayıcı faktör olan p53 proteini (tumor suppressor p53 protein)'ni inaktive ederek metal şalasyonu ile kontrolsüz neoplastik hücre proliferasyonuna neden olduğu varsayılmaktadır (Douglas-Jones ve ark., 1995).

Prognostik faktörlerden p53 proteini ise fare sarkomlarında saptanan ve tümör hücrelerinin oluşturduğu spesifik hücresel bir onkoprotein (deLeo ve ark., 1979)

olarak kabul edilmekle birlikte günümüzde sadece tümörlü dokularda değil normal dokularda da bulunduğu bilinen bir proteindir. Bu nedenle p53 proteini wild type (normal) p53 proteini” ve “mutant p53 proteini” olarak iki grupta değerlendirilmektedir. Bunlardan “wild type (normal) p53 proteini”nin yarılanma ömrü çok kısadır (6-30 saniye) ve dokuda immunohistokimyasal olarak saptanacak kadar birikimi olmaz. “Mutant p53 proteini”nin ise aksine yarılanma ömrü uzundur ve birikim göstererek hücre çekirdeğinde kolaylıkla saptanabilir. P53 geni ise tümör oluşumunu baskılayan bir gendir. Bu gende oluşan değişiklikler pekçok tümörde sitogenetik, moleküler ve immunohistokimyasal metotlarla saptanmaktadır (Mayr ve ark., 1999; Poller ve ark., 1993; Kastan ve ark., 1991). Özellikle immunohistokimyasal metotlarla p53 proteininin saptanması, p53 genindeki mutasyonun göstergesidir, yüksek dereceli (grade) ve yüksek proliferasyon indeksli malign tümörlerde ekspresyonu çok fazladır (Mayr ve ark., 1999; Cote and Taylor, 1994).

Bu çalışmada özellikle prognostik faktörlerden p53 protein ve metallothioneinden yararlanılarak malign ve benign meme tümörlerindeki varlıkları; bunların tümör tipleri, derecesi ve varsa metastazları ile arasındaki korelasyonu araştırmak amaçlanmıştır.

### **III. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **III.1. Materyal**

Çalışmanın materyalini, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı’ndan Patoloji Anabilim Dalı’na gönderilen 50 adet köpek meme tümörü oluşturmuştur. Bu köpekler Terrier (23), Boxer (3), Cocker (3), Kangal (1), İrlanda Setteri (1), Doberman (1), Rotweiler (1), Poodle (1), Pointer melezi (1), Melez (15) ırklarında, 6-15 yaşlar arasında ve hepsi dişiydi.

#### **III.2. Yöntem**

##### **Histopatolojik İncelemeler:**

Toplanan meme tümörü örnekleri % 10’luk tamponlu formalinde birkaç gün tespit edildi, rutin doku takibine alındı ve parafinde bloklandı. Her bloktan 5 µm kalınlığında

kesitler alınarak, hematoksilen-eozin (HE)ve Perl boyası ile boyandı (Luna, 1968) ve ışık mikroskobunda (DM 4000B, Leica) incelendi.

### **İmmunhistokimyasal İncelemeler:**

Tümörlü meme dokularından histopatolojik incelemelere göre hazırlanan aynı doku kesitlerine immunoperoksidaz yöntemi (Avidin-Biotin Peroxidase Complex [ABP-C]) uygulandı. Kesitler ksilollerde deparafinize, dereceli alkol serilerinde de dehidre edildikten sonra oda ısısında 5 dakika % 3'lük hidrojen peroksitte tutuldu. Daha sonra 90°C'de 20 dakika antigen retrieval solusyonu (Dako) ile muamele edildi (pH 6.0). Nemli kamaraya alınan kesitlerin üzerine birer damla normal keçi serumu (Dako) damlatılarak 37°C'lik etüvde 20 dakika bekletildi. Bunu izleyen aşamada da kesitlere anti-metallothionin ve anti-p53 protein (Pab240) serumu (Dako) damlatılıp, 60 dakika aynı derecelik etüvde inkube edildi. Daha sonra Biotinize sekonder antikor ve Streptavidin-peroksidaz (Universal LSAB-2 Kiti/Dako) damlatılıp 37°C'lik etüvde 20'şer dakika tutuldu. Nihayet kesitler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC)'den oluşan kromojende kontrollü olarak bekletildi. Kesitler normal keçi serumunun kullanıldığı aşama hariç hematoksilenle boyanmaya kadar fosfatlı bufferla (pH 7.4) yıkandı. Mayer'in hematoksilen boyasında 1 dakika karşıt boyamaya tabi tutulup çeşme suyu altında yıkandı; üzerlerine su bazlı yapıştırıcı damlatılarak lamelle kapatıldı.

Kontrol için ayrılan doku kesitlerine de benzer prosedür uygulandı. Ancak primer antikor yerine normal tavşan serumu kullanıldı. İmmunoperoksidaz yöntemine göre bu şekilde hazırlanan doku kesitleri inceleninceye kadar oda sıcaklığında ve karanlıkta muhafaza edildi. Değerlendirilmeleri ışık mikroskobunda (DM 4000B, Leica) değerlendirildi.

### ***MT ve p53 protein saptanması aşağıdaki gibi derecelendirilmiştir :***

- (-) İmmunopozitifliğin saptanmaması
- (+) Farklı on mikroskop sahasında birkaç tümör hücresinde immunopozitifliğin saptanması
- (++) Farklı on mikroskop sahasında fokal alanlar halinde ancak belirgin olarak tümör hücrelerinde immunopozitifliğin saptanması

(+++)  
Farklı on mikroskop sahasında %50'den fazla tümör hücresinde güçlü immunopozitifliğin saptanması

#### IV. BULGULAR

##### IV.1. Histopatolojik Bulgular:

İncelenen tümörlerin histolojik klasifikasyonuna Dünya Sağlık Teşkilatı'na göre yapıldı (Hampe ve Misdorp, 1974). Bu değerlendirme sonucunda: 36 adet malign mikst tümör, 9 adet adenokarsinom (1 papiller kistik, 4 duktal, 4 tubuler karsinom), 5 adet benign mikst tümör tanısı konuldu (Tablo 1) (Resim 1-4). Bu tümörlerin 5'i torakal, 6'sı abdominal, 18'i inguinal, 11'i torako-abdominal, 10'u abdomino-inguinal meme loblarında lokalize olmuştu. Tümör tiplerine göre etkilenen meme lobları Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo1.** Meme tümörlerinin histopatolojik sınıflandırılması

<b>Benign Tümörler</b>	<b>5 (% 10)</b>
Benign Mikst	5
<b>Malign Tümörler</b>	<b>45 (% 90)</b>
Malign mikst tümör	36
Karsinom	9
Tubuler adenokarsinom	4
Papillar kistik adenokarsinom	1
Duktal adenokarsinom	4
<b>Toplam:</b>	<b>50</b>



**Tablo 2.** Tümörlerin lokalize oldukları meme lobu/lobları

Tümör tipleri	Etkilenen meme lobları				
	Torakal	Abdominal	İnguinal	Torako-abdominal	Abdomino-inguinal
<b>Malign mikst tümör</b>	3	4	17	5	7
<b>Tubuler adenokarsinom</b>	2	1	1	-	-
<b>Duktal karsinom</b>	-	-	-	1	3
<b>Papillar kistik adenokarsinom</b>	-	1	-	-	-
<b>Benign mikst tümör</b>	-	-	-	5	-
<b>Toplam</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>18</b>	<b>11</b>	<b>10</b>

#### IV.2. İmmunohistolojik Bulgular:

##### p53 Protein

Malign tümörlerin hepsinde, benign tümörlerin ise iki adedinde meme bezi ve kanal epiteli hücrelerinin sitoplazma ve/veya çekirdeğinde ya da her ikisinde değişen şiddette diffuz kahverengi boyanan p53 proteini pozitif alanlar dikkati çekti (Tablo 3 ve Resim 5-10)

**Tablo 3.** Tümör tiplerine göre p53 protein saptanması

Tümör tipleri	Pozitiflik şiddeti (Adet)				Toplam (Adet)
	-	+	++	+++	
<b>Malign mikst tümör</b>	-	9	17	10	36
<b>Tubuler adenokarsinom</b>	-	2	2	-	4
<b>Duktal karsinom</b>	-	3	1	-	4
<b>Papillar kistik adenokarsinom</b>	-	-	-	1	1
<b>Benign mikst tümör</b>	3	2*	-	-	5

\* Aynı zamanda MT ile de pozitif reaksiyon vermiştir.

## Metallothionein

Histopatolojik olarak tanısı konan malign mikst tümörlerin 35 adedinde, adenokarsinomların hepsinde, benign mikst tümörlerinde iki adedinde genel olarak meme bezi epitellerinin, daha az olarak da kanal epitellerinin sitoplazma ve/veya çekirdeğinde ya da her ikisinde değişen şiddette diffuz kahverenkli MT pozitif alanlar dikkati çekti (Tablo 4 ve Resim 11-15). Bazı olgularda ise adeta mozaik gibi bir alanda kuvvetli boyanırken diğer alanda boyanmanın görülmediği alanlar saptandı. Ayrıca hem malign hem de benign karakterde olan tümörlerde, tümörlü ve tümörsüz alanda bulunan mioepitel hücrelerinde de boyanmalar gözlemlendi (Resim 16).

**Tablo 4.** Tümör tiplerine göre MT saptanması

Tümör tipleri	Pozitiflik şiddeti (Adet)				Toplam (Adet)
	-	+	++	+++	
Malign mikst tümör	1	5	18	12	36
Tubuler adenokarsinom	-	2	2	-	4
Duktal karsinom	-	1	3	-	4
Papillar kistik adenokarsinom	-	-	1	-	1
Benign mikst tümör	2	2*	1	-	5

\* Aynı zamanda p53 proteini ile de pozitif reaksiyon vermiştir.







**Resimler :**

**Resim 1.** Duktal karsinom, HE, X 100.

**Resim 2.** Papillar kistik adenokarsinom, HE, X 100.

**Resim 3.** Malign mikst tümör, HE, X 100.

**Resim 4.** Benign mikst tümör, HE, X 100.

**Resim 5.** Bez epitel hücrelerinde p53 proteini pozitif boyanma, malign mikst tümör, ABC-P, X 100.

**Resim 6-7.** Kanal epitel hücrelerinde p53 proteini pozitif boyanma, duktal karsinom, ABC-P, X 100.

**Resim 8.** Bez epitel hücrelerinde p53 proteini pozitif boyanma, papiller kistik adenokarsinom, ABC-P, X 100.

**Resim 9.** Bez epitel hücrelerinde p53 proteini pozitif boyanma, malign mikst tümör, ABC-P, X 100.

**Resim 10.** Bez epitel hücrelerinde p53 proteini pozitif boyanma, benign mikst tümör, ABC-P, X 100.

**Resim 11-12.** Bez epitel hücrelerinde MT pozitif boyanma, tubuler adenokarsinom, ABC-P, X 100.

**Resim 13.** Kanal epitel hücrelerinde MT pozitif boyanma, duktal karsinom, ABC-P, X 100.

**Resim 14.** Bez epitel hücrelerinde MT pozitif boyanma, papiller kistik adenokarsinom, ABC-P, X 100.

**Resim 15.** Bez epitel hücrelerinde MT pozitif boyanma, malign mikst tümör, ABC-P, X 100.

**Resim 16.** Miyoepitel hücrelerinde MT pozitif boyanma, benign mikst tümör, ABC-P, X 100.

## V. SONUÇ ve ÖNERİLER

Meme tümörlerinin köpeklerde yaşa bağlı olduğu, 2 yaşın altındaki köpeklerde ender görüldüğü, insidensin 6-7. yaşlardan sonra artmaya başladığı ve 10-11. yaşlardan sonra azalma eğiliminde olduğu bildirilmiştir (Moulton, 1990; Krayannopoulou ve ark., 1989). Bu çalışmada köpeklerin yaşları 6-15 arasında değişmekle birlikte, 8-11 yaşlar arasında meme tümörlerinin daha fazla görüldüğü tespit edildi. Özellikle son yıllarda hayvan sevgisinin ile evde beslenen hayvan sayılarının artması, hayvanların bakım-besleme şartlarının sağlıklı koşullarda bilinçli yapıyor olması bu hayvanların daha uzun süre yaşama şanslarını arttırmakta ve yaşın ilerlemesiyle de tümörlerin görülme oranında bir artış görülmektedir. Av ve spor amacıyla yetiştirilen köpek ırklarıyla Kurt ve Kanış ırkı köpeklerde bu tümörlere daha sık rastlanmaktadır (Vural ve Aydın, 2001; Moulton, 1990). Çalışmada ise en fazla Terrier ırkı köpeklerde saptanmıştır.

Köpek meme tümörlerinin histopatolojik incelemesinde, 45 adet (% 90) malign, 5 adet (% 10) benign karakterde 50 adet meme tümörü saptandı. Çeşitli araştırmalarda da % 50-57 malign, % 43 benign özellikte tümörlere rastlanmıştır (Doré ve ark., 2003; Gilbertson ve ark., 1983). Karayannopoulou ve ark. (1989), malign meme tümörlerinin % 39'unun malign mikst tümör, % 59'unun adenokarsinom olduğunu bildirirlerken Moulton (1990) ise köpeklerdeki meme tümörlerinin yaklaşık % 65'inin benign mikst tümör, % 25'inin karsinom, diğerlerinin ise hiperplazi, adenom, malign mikst tümör ve miyoepitelyom yapısında olduğunu saptamıştır. Çalışmada bu tümörlerden malign mikst tümörlere % 72, adenokarsinoma % 18, benign mikst tümörlere ise % 10 oranında rastlanmıştır. Genel anlamda malign tümörler bu sonuçlarla uyum gösterirken benign olgularda bu oran aksine çok düşük bulunmuştur. Ayrıca çalışmada, bu tümörlerin 5'i torakal, 6'sı abdominal, 18'i inguinal, 11'i torako-abdominal, 10'u abdomino-inguinal meme loblarında lokalize olmuştu. Bu lokalizasyonda malign tümörlerin çoğunlukla inguinal meme loblarında lokalize olması dikkat çekiciydi.

İnsan ve köpek meme tümörleri davranış ve histolojik köken bakımından benzerlik gösterdiği için son yıllarda özellikle insan hekimliğinde meme tümörleri için iyi bir model oluşturduğu ileri sürülen köpek meme tümörlerinden yararlanılmaktadır (Schafer ve ark., 1998; Moulton, 1990). Çalışmada da bu amaçla köpeklere ait meme tümörlerinden ve p53 protein ile metallothionein reagenzlerinden faydalanılmıştır.

Günümüzde insan ve hayvanlarda bu tümörlerin karakterini saptamak amaçlı pek çok prognostik faktörlerden (steroid hormon reseptörleri, MIB-1, p53 protein, EGF-R, metallothionin {MT} gibi) faydalanılmaktadır (Cote and Taylor, 1994). Bu reagenzlerden p53 proteini hücre siklusunun kontrolünde önemli rol oynar. Bu metilokolantren (methylocolantrene) tarafından oluşturulan fare sarkomlarında bulunan nükleer nonhiston bir proteindir. Bu protein DNA yıkımlanmasına karşın DNA onarımını kolaylaştırır. DNA'nın zarar gördüğü durumlarda p53 gen proteini aktive olmaktadır ve bu proteinin hücrelerde birikmesi hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde, çeşitli organların karsinogenezisinde ve programlı hücre ölümünde önemli rol oynamaktadır (Hainaut ve ark., 1997; Yonish-Rouach ve ark., 1991). p53 gen mutasyonları insanlarda akciğer, kolon ve göğüs kanserlerinin pek çok çeşidinde sıklıkla bulunmakta ve malignite de önemli oranda rol oynamaktadır (Barnes ve ark., 1993; Davidoff ve ark., 1991, Iwaya ve ark., 1991, Koutselini ve ark., 1991). Hayvanlarda ise bu mutasyonlara, köpeklerde meme tümörleri (Mayr ve ark., 1999) ve osteosarkomlar (Mendoza ve ark. 1998, van Leeuwen ve ark., 1997); kedilerde hematopoietik tümörlerde (Okuda ve ark.,1994), protein birikimleri ise köpek meme tümörleri (Inoue ve Shiramizu, 1999; Rungsipat ve ark., 1999; Gamblin ve ark., 1997) ile kedi ve köpeklerde yassı hücreli karsinomlarda (Gamblin ve ark., 1997; Teifke ve Lohr, 1996) rastlanmıştır.

Mutant p53 proteininin aşırı birikimi ile köpek meme tümörünün gelişimi arasındaki korelasyon çalışmaların sınırlı olması nedeniyle tam olarak aydınlatılamamıştır. İnsanlarda, göğüs kanserlerindeki p53 proteini pozitiflik oranı % 20-50 arasında tespit edilirken (Nakopoulou ve ark., 1996; Davidoff ve ark., 1991) insanlar için bir model olarak düşünülen köpek meme tümörlerinde bu oran, kullanılan antikör ve tümör tiplerine göre (CM-1, PAb24, PAb1801, BP53-12, PAb122 ve PAb421) oldukça büyük farklılıklar göstermektedir (Lee ve ark., 2004; Albaric ve ark., 2001; Gamblin ve ark., 1997; Wolf ve ark., 1997; Sagartz ve ark., 1996). Bunlardan köpeklerde PAb421'in immunhistokimyasal olarak hiç sonuç vermediği (Lee ve ark., 2004), CM-1 ve PAb240'ın ise hem benign hem de malign tümörlerde pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2004; Rungsipat ve ark., 1999). Wolf ve ark. (1997), benign tümörlerdeki yüksek pozitif p53 protein saptanmasının antijen kaybıyla açıklanamayacağını, ancak pozitif boyanması beklenen ve histopatolojik incelemede malign tanısı konulan bazı



tümörlerde reaktivitenin düşük olması ya da olmamasının dokuların tespit edilmesi, gömülmesi ve diğer rutin takipte hata yapılması sonucu antijen kaybıyla ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Diğer taraftan Kanaya ve ark. (2002) ise köpeklerde p53 proteininin sadece malign myoepitelyomda yoğun olarak boyandığını, meme tümörleri ve diğer tümör çeşitlerinde ise boyanma tespit edilemediğini bildirmişlerdir. Bazı araştırmalar ise (Albaric ve ark., 2001; Sironi ve ark., 1999) Ab-7 ve DO-7 anti-human p53 antikorları ile köpek tümörlerinde sonuç alamadıklarını bildirmişler ve bu durumun insan p53 proteinleri ile karşılaştırıldığında, köpeklerdeki p53 molekülünün yüzeyindeki aminoasitlerin yerleşimindeki ve yapısındaki lokal farklılıktan kaynaklanmış olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmada ise Pab240 klonuna sahip p53 proteini kullanılmış ve iki adet benign, 45 adet malign tümörde değişen şiddette p53 protein boyanması saptanmıştır. Pozitif boyanmaya yoğunlukla kötü huylu tümörlerde rastlanması köpek meme tümörlerinde kötü prognoz ve artan malign potansiyelin tespitinde PAb240 anti-human p53 antikorunun bir malignite kriteri olarak değerlendirirken benign olgularda da rastlanmasını tümörlerin histopatolojik değerlendirmede benign özellikte görülmesine karşın malignite riskinin yüksek olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Diğer taraftan Haga ve ark. (2001), köpek meme tümörlerinde p53 protein birikiminin insan veya fare meme tümörleriyle karşılaştırıldığında % 50-60 pozitiflik elde etmişlerdir ve pozitifliğin oldukça yüksek oranda olmasını birden fazla monoklonal antikor kullanmalarıyla açıklamışlardır. P53 proteinin BP53-12 monoklonal antikorunu ile % 50, PAb122 ile % 60 pozitif sonuç elde etmişler ve iki farklı monoklonal antikor kullanarak p53 geninin BP53-12 ile N, PAb122 ile C epitoplarını saptamışlardır. Böylece N, C ve hatta orta bölgedeki epitopların hepsini ilgilendiren çok sayıda monoklonal antikorun kullanılmasıyla, pozitif oranın çok daha yüksek seviyede olacağını, bu araştırmaların yalnızca köpek meme tümörlerinde değil insan meme tümörlerinin araştırmalarında da çok faydalı olacağını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise Haga ve ark. (2001)'nin bildirdiklerinin aksine sadece tek tip antikor (Pab240) kullanıldı ve % 94 pozitiflik elde edildi. Bu farklılığın, kullanılan monoklonal antikorlardan ve tümör tiplerinden kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

Köpek meme tümörlerinde p53 proteini pozitifliğine % 20 çekirdekte, % 80 sitoplazmada rastlanmıştır (Inoue ve Shiramizu, 1999). Özellikle intrasitoplazmik

birikimin nedeni, p53 proteininin çekirdekten içeri alınamaması şeklinde açıklanırken (Bosari ve ark., 1995), Haga ve ark. (2001) bu boyanmanın PAb122'ye karşı şekillendiğini yani sadece p53'ün C kısmını bağlayan monoklonal antikoru sitoplazmayı boyadığı şeklinde ifade etmişlerdir. Çalışmada ise pozitiflik saptanan her olguda sitoplazmada ve/veya çekirdekte ya da her ikisinde boyanmalara rastlandı.

Son yıllarda yapılan immunohistokimyasal çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre insan ve hayvan tümörlerinden özellikle invaziv duktal karsinomlarda ve malign melanomlarda, diğer prognostik faktörlerden MT'nin arttığı ve bunun tümör tipleri, dereceleri, lokal nüksü, lenf düğümlerine ya da diğer dokulara metastazı ve hastanın yaşama süresi ile arasında önemli bir ilişkinin olduğu düşünülmektedir (Dincer ve ark., 2001; McCluggage ve ark., 1999; Jasani ve ark., 1998; Jasani and Schmid, 1997; Ofner ve ark., 1994; Schmid ve ark., 1993). Ayrıca preneoplastik karaciğer lezyonlarında ise pozitif prognostik bir faktör olarak kabul edilmektedir (Sawaki ve ark., 1999; Bier ve ark., 1994). Ancak yine bu çalışmalara göre MT'nin artması veya azalması canlılığın türüne ya da tümörün tipine göre farklılıklar gösterebilmektedir (Dinçer ve ark., 2001).

Yıllardan beri ağır metallere ziyade bunların toksik etkilerine karşı hücrenin korunmasında MT'nin rolü tartışmalıdır. Büyük oranda tiol gruplarıyla karakterize karmaşık yapısı nedeniyle MT çok güçlü bir antioksidandır ve nükleofilik özellikleri vardır. MT'nin diğer olası bir rolü de spesifik hücre çekirdeğinde dolayısıyla DNA'da koruyucu bir rol oynamaktadır. Koruyucu etkiyi kapsayan mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Hidroksi radikalleri DNA zincirlerini ayırmanın yanısıra mutajenik zararlara sebep olurlarken MT'nin endojenöz antimutajenik factor olarak önemli bir rol oynamaktadır. Gerçekten de içerdiği bu protein hidroksil radikallerini seçmede mükemmel bir kapasiteye sahiptir (Chubatsu ve Meneghini, 1993). Ancak, MT'nin fizyolojik antioksidan rolü ile ilgili çelişkiler vardır. İmmunohistokimyasal olarak MT miyoepitel, böbrek ve troid epitel hücreleri hariç normal doku hücrelerinde saptanamazlar. Çoğu dokuda geniş oranda ağır metal iyonlarına, lipopolisakkaritlere, interlökin 1'e, interferonlara, glukokortikoidlere ve UV ışığına maruz kalma gibi stress faktörleri mevcutsa süratle MT ekspresyonu oluşur (Jasani ve ark., 1998; Kagi, 1991). İmmunohistokimyasal olarak aşırı MT ekspresyonu çeşitli insan tümörlerinde saptanmıştır ve göğüs kanseri ile malignant melanomada kötü prognoz ile ilişkili olduğu

saptanmıştır. Ancak MT'nin aşırı ekspresyonunun biyolojik temeli ve prognozdeki etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Kedi ve köpeklerde oluşan spontan tümörler, karsinogenezisi çalışmak için oldukça uygun tümörlerdir (MacEwen, 1990; Rutten ve ark., 1990). Özellikle de bu hayvanlardaki meme tümörleri ile melanomlardan insane kanser biyolojisi çalışmalarında faydalanılmaktadır (MacEwen, 1990). Bu amaçla son yıllarda MT'nin karsinogenezis, tanı ve tümörün prognozu açısından rolü araştırılmaktadır (McCluggage ve ark., 1999; Jasani ve Schmid, 1997). Ayrıca göğüsün invaziv duktal karsinomlarında immunohistokimyasal olarak özellikle klinik gidişatını, MT ekspresyonu, local oluşumu, hastanın canlılık süresini göstermek için çalışmalar yapılmaktadır (Douglas-Jones ve ark., 1995; Schmid ve ark., 1993). Yine immunohistokimyasal olarak pek çok insan tümörlerinde MT ekspresyonuna rastlanmıştır (Jasani ve Schmid, 1997) ve duktal meme karsinomunda kötü prognozu ifade etmektedir (Schmid ve ark., 1993).

Bu çalışmada diğer bazı çalışmalarda (Douglas-Jones ve ark., 1995; Bier ve ark., 1994; Schmid ve ark., 1993) olduğu gibi miyoepitel hücreleri hariç normal kanal ve bez epitel hücrelerinde boyanmalar saptanmazken özellikle malign olguların 44'ünde, benign olguların üçünde oldukça yoğun pozitiflikler saptandı. İncelenen benign olgu sayısı az olmasına rağmen MT'e ilgili pozitifliklerin görülmesi p53 protein boyanmasında olduğu gibi bu tümörlerdeki düşük maligniteye yorumlandı. Nitekim aynı olgular hem p53 protein hem de MT ile pozitif boyanması da bu kanıtı güçlendirirken bir malign olguda boyanmanın görülmemesi de doku tespitinde ya da işlenmesinde bir hata yapılmış olmasına yorumlanmıştır. Aksi halde pozitiflik daha fazla olurdu.

İmunohistokimyasal olarak fare meme tümörlerinde, tumor hücrelerinde farklı yoğunluklarda MT varlığı saptanmış ve bunun karsinogeneziste rol oynadığı düşünülmüştür (Yamamura ve ark., 2000). Ancak bazı araştırmacılar aşırı MT ekspresyonunun kötü prognozu gösterdiğini ileri sürmelerine rağmen (Schmid ve ark., 1993), MT ekspresyonu ile histopatolojik bulguların ve klinik gidişatından elde edilen sonuçların da uniform olmadığını belirtmişlerdir (Oyama ve ark., 1996; Bier ve ark., 1994). Bugün bu görüşlerin aksine çeşitli insane tümörlerinde MT kötü huyluluk derecesini saptamada ve prognozda yararlı bir reagenz olarak kabul edilmesine rağmen hala meme karsinogenezisindeki rolü aydınlatılamamıştır (Yamamura ve ark., 2000).

Bazı araştırcılar (Douglas-Jones ve ark., 1995; Schmid ve ark., 1993) MT pozitif alanlara hem malign hem de benign epitelin sitoplazma ve/veya çekirdeğinde ya da her ikisinde güçlü boyanmalar şeklinde rastlamışlardır. Ancak yine bu araştırcılardan Douglas-Jones ve ark. (1995) boyanmanın negatif olduğu olgulardan da bahsetmişlerdir. Tümör hücrelerindeki MT pozitifliği ya metabolik olarak şekillenen stabil MT'den ya da MT'nin artan sentezi sonucu sitoplazma ve/veya çekirdekte birikimler oluşmaktadır (Douglas-Jones ve ark., 1995). Nitekim çalışmada da daha önce belirtildiği bir malign olguda, ikisinde de benign olguda boyanmaya rastlanmamıştır.

Metallothionein Zn, Cu ve diğer grup II ağır metalleri için seçici bağlanma özelliği gösteren, Zn ve Cu metabolizmasında ağır metal detoksifikasyonunda ve metal transportunda esansiyel bir rolü olan proteindir. (Kagi, 1991). Hatta oksidatif stresten koruyucu rol oynamaktadır (Chubatsu ve Meneghini, 1993). Histokimyasal olarak hem benign hem de meme kanseri dahil malign tümörlerde eseri metal konsantrasyonlarına bakıldığında özellikle malign tümörlerde Cu ya da Zn seviyelerinde artışa rastlanmıştır (Margalioth ve ark., 1983). Bu metallerin yüksek çıkma olasılığı kaynaklarda da belirtildiği üzere MT'nin Zn ve Cu'a bağlanma kapasitesine ilgili şekillenmektedir. Ancak çalışmada bakır yönünden gerçekleştirilen histokimyasal boyamada bakıra rastlanılmamıştır.

**Sonuç olarak :** Yukarıda izah edilen verilerle çalışmada elde edilen veriler dikkate alındığında çalışmada kullanılan reagenzler sıklıkla malign olgularda pozitif sonuçlar vermiştir. Benign olgularda saptanan pozitiflikler ise tümörün düşük malignitesine; malign olgularda boyanmanın olmaması ise hatalı manipulasyonlara bağlanmıştır. Ancak bunu tam olarak kesinleştirmek için eşit sayıda, aynı tip malign ve benign tümörlerde özellikle p53 protein için çok sayıda antikör tiplerinin kullanılarak çalışmaların sürdürülmesi ve detaylandırılması gerekmektedir ki bunun da hem zaman alıcı hem de maddi açıdan çok pahalı olacağı da gözardı edilmemelidir. Diğer taraftan MT ile pozitiflik ya da negatiflik açısından, literatürler de dikkate alındığı taktirde, tümörün tipi de büyük önemlilik arz etmektedir. Bütün bu sonuçları, kesinlikle karsinogenezi rolü olan p53 proteini ve MT için de bazı reagenzlerde olduğu gibi kesin kalıplara sokabilmek amacıyla benzeri çalışmaların hem meme tümörlerinde hem de farklı tümörlerde devam etmesi gerektiği kanaatindeyiz. Ayrıca immunhistokimyasal olarak

çeşitli tümörlerde, hem benign ve malign tümörlerde yine bu reagenzlerin kullanılmasıyla tümör tipleri, şiddetleri, lokal olarak nüksü, lenf düğümlerine ya da diğer dokulara metastazı ve hastanın yaşama süresi arasında önemli bir ilişkinin olduğu varsayılmasına rağmen bu konu üzerinde daha çok çalışmalar yapılarak fikir olarak kalan pek çok şeyin aydınlatılacağı düşünülmektedir.

## VI. KAYNAKLAR

Albaric, O., Bret, L., Amardeihl, M., Delverdier, M., Immunohistochemical Expression of p53 in Animal Tumors: A Methodological Study Using Four Anti-human p53 Antibodies, *Histol Histopathol.*, 16, 113- 121, (2001).

Barnes, D.M., Dublin, E.A., Fisher, C.J., Levison, D.A., Millis, R.R., Immunohistochemical Detection of p53 Protein in Mammary Carcinoma: An Important New Independent Indicator of Prognosis? *Human Pathol.*, 24, 469-476, (1993).

Bier, B., Douglas-Jones, A., Tötsch, M., Dockhorn-Dworniczack, Böcker, W., Jasani, B., Schmid K.W., Immunohistochemical Demonstration of Metallothionein in Normal Human Breast Tissue and Benign and Malignant Breast Lesions. *Breast Cancer Res. Treat.*, 30, 213-221, (1994).

Bosari, S., Viale, G., Roncalli, M., Graziani, D., Borsani, G., Lee, A.K., Coggi, G., p53 Gene Mutations, p53 Protein Accumulation and Compartmentalization in Colorectal Adenocarcinoma, *Am. J. Pathol.*, 147, 3, 790-798, (1995).

Brodey, R.S., Goldschmidt, M.H., Rossel, J.R., Canine Mammary Gland Neoplasms. *J Am Anim Hosp. Assoc.*, 19, 61-90, (1983). In: Karayannopoulou, M., Kaldrimidou, E., Dessiris, A., Some Epidemiological Aspects of Canine Mammary Tumours Treatment and Prognosis, *Onderstepoort J. Vet.*, 41-47, (1989).

Chubatsu, L.S., Meneghini, R., Metallothionein protects DNA from Oxidative Damage. *Biochem. J.*, 291, 193-198, (1993).

Cote, R. J., Taylor, C.R., Immunomicroscopy: A diagnostic Tool For teh Surgical Pathologist. Tumors of the Breast. WB Saunders Company, 2<sup>nd</sup> edition, Chapter 7, 200-235, (1994).

Davidoff, A.M., Humphrey, P.A., Iglehart, J.D., Marks, J.R., Genetic Basis for p53

Overexpression in Human Breast Cancer, *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 88, 5005-5010, (1991).

DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E. ve ark., Detection of a Transformation-Related Antigen in Chemically Induced Sarcomas and Other Transformed Cells of the Mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 2420. In: *Immunomicroscopy: A diagnostic Tool for the Surgical Pathologist. Tumors of the Breast*. Taylor, C. R., Cote, R. J. (1994). WB Saunders Company, Pennsylvania, 219-221, (1979).

Dincer, Z., Jasani, B., Haywood, S., Mullins, J.E., Fuentealba, I.C. (2001). Metallothionein Expression in Canine and Feline Mammary and Melanotic Tumours. *J. Comp. Pathol.*, 125, 130-136.

Doré, M., Lanthier, I., Sirois, J., Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumors, *Vet Pathol.*, 40, 207-212, (2003).

Douglas-Jones, A.G., Schmid, K.W., Bier, B., Horgan, K., Lyons, K., Dallimore, N.D., Moneypenny, I.J., Jasani, B., Metallothionein Expression in Duct Carcinoma In Situ of the Breast. *Human Pathol.*, 26, 217-222, (1995).

Fidler, I. J., Brodey, S.R., A Necropsy Study of Canine Malign Mammary Neoplasm. *J. A. V. M. A.*, 151, 710-715, (1967).

Gamblin, R. M., Sagartz, J. E., Couto, C. G., Overexpression of p53 Tumor Suppressor Protein in Spontaneously Arising Neoplasm of Dogs, *Am. J. Vet. Res.*, 58, 857-863, (1997).

Gilbertson, S.R., Kurzman, I.D., Zachrau, R.E., Hurvitz, A.I., Black, M.M., Mammary Epithelial Neoplasms: Biologic Implications of Morphologic Characteristics Assessed in 232 Dogs, *Vet. Pathol.*, 20, 127-42, (1983).

Haga, S., Nakayama, M., Tatsumi, K., Maeda, M., Imai, S., Umesako, S., Yamamoto, H., Hilgers, J., Sarkar, N.H., Overexpression of the p53 Gene Product in Canine Mammary Tumors, *Oncol Rep.*, 8, 1215-9, (2001).

Hainaut, P., Soussi, T., Shomer, B., Hollstein, M., Greenblatt, M., Hovig, E., Harris, C., Montesano, R., Database of p53 Gene Somatic Mutations in Human Tumors and Cell Lines; Updated Compilation and Future Prospects, *Nucleic Acid. Res.*, 25,151-157, (1997).

Hampe, J.F., Misdorp, W., Tumours and Dysplasias of the Mammary Gland, *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 111-134, (1974).

Inoue, M., Shiramizu, K., Immunohistochemical Detection of p53 and c-myc Proteins in Canine Mammary Tumors, *J. Comp. Pathol.*, 120, 169-175, (1999).

Iwaya, K., Tsuda, H., Hiraide, H., Tamaki, K., Tamakuma, S., Fukutomi, T., Mukai K., Hirohashi, S., Nuclear p53 Immunoreaction Associated with Poor Prognosis of Breast Cancer, *Japanese Journal of Cancer Research*, 82, 835-840, (1991).

Jasani, B., Campbell, F., Navabi, H., Schmid, K.W., Williams, G.T., Clonal Overexpression of Metallothionein is Induced by Somatic Mutation in Morphologically Normal Colonic Mucosa. *J. Path.*, 184, 144-147, (1998).

Jasani, B., Schmid, K.W., Significance of Metallothionein Overexpression in human Tumours. *Histopathology*, 31, 211-214, (1997).

Kagi, J.H.R., Overview of Metallothionein. *Methods Enzymol.*, 205, 613-626. In: Douglas-Jones, A.G., Schmid, K.W., Bier, B., Horgan, K., Lyons, K., Dallimore, N.D., Money Penny, I.J., Jasani, B. (1995). Metallothionein Expression in Duct Carcinoma In Situ of the Breast. *Human Pathol.*, 26, 217-222, (1991).



Kanaya, N., Okuda, M., Toyama, N., Oikawa, T., Inokuma, H., Morimoto, M., Hayashi, T., Une, S., Nakaichi, M., Taura, Y., Tsujimoto, H., Onishi, T., Detection of the anti-p53 Antibodies in Dogs with Tumors, *J. Vet. Med. Sci.*, 64, 973- 979, (2002).

Karayannopoulou, M., Kaldrimidou, E., Dessiris, A., Some Epidemiological Aspects of Canine Mammary Tumours Treatment and Prognosis, *Onderstepoort J. Vet.*, 41-47, (1989).

Koutselini, H., Malliri, A., Field, J.K., Spandidos, D.A., p53 Expression in Cytologic Specimens from Benign and Malignant Breast Lesions. *Anticancer Res.*, 11, 1415-1419, (1991).

Lee, C.H., Kim, W.H., Lim, J.H., Kang, M.S., Kim, D.Y., Kweon, O.K., Mutation and Overexpression of p53 as a Prognostic Factor in Canine Mammary Tumors, *J. Vet. Sci.*, 5, 63-69, (2004).

Luna, L.N., *Manuel of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3<sup>rd</sup> Ed., McGraw-Hill, New York, (1968).

MacEwen, E.G., Spontaneous Tumors in Dogs and Cats: Models for the Study of Cancer Biology and Treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 9, 125-136. In: Dincer, Z., Jasani, B., Haywood, S., Mullins, J.E., Fuentealba, I.C. (2001). Metallothionein Expression in Canine and Feline Mammary and Melanotic Tumours. *J. Comp. Path.*, 125, 130-136, (1990).

Margalioth, E.J., Schenker, J.G., Chevion, M., Copper and Zinc Levels in Normal and Malignant Tissues. *Cancer*, 52, 868-872, (1983).

Mayr, B., Reifinger, M., Alton, K., Novel Canine Tumor Suppressor Gene p53 Mutations in Cases of Skin and Mammary Neoplasm. *Vet. Res. Com.*, 23, 285-291, (1999).

McCluggage, W.G., Maxwell, P., Hamilton, P.W., Jasani, B., High Metallothionein Expression is Associated with Features Predictive of Aggressive Behaviour in Endometrial Carcinoma. *Histopathology*, 34, 51-55, (1999).

Mendoza, S., Konishi, T., Dernell, W.S., Withrow, S.J., Miller, C.W., Status of the p53, RB and MDM2 Genes in Canine Osteosarcoma, *Anticancer Res.*, 18, 4449-4453, (1998).

Moulton, J.E., *Tumors in Domestic Animals*. 3<sup>rd</sup> Ed., University of California Press, (1990). Pp: 518-549.

Nakopoulou, L.L., Alexiadou, A., Theodoropoulos, G.E., Lazaris, A.C., Tzonou, A., Keramopoulos, A., Prognostic Significance of the Co-Expression of p53 and c-erbB-2 Proteins in Breast Cancer. *J.Pathol*, 179,31-38, (1996).

Ofner, D., Maier, H., Riedmann, B., Bammer, T., Rumer, A., Winde, G., Böcker, W., Jasani, B., Schmid, K.W., Immunohistochemical Metallothionein Expression in Colorectal Adenocarcinoma: Correlation with Tumor Stage and patient Survival. *Virchows Archiv*, 425, 491-497, (1994).

Okuda, M., Umeda, A., Sakai, T., Ohashi, T., Momoi, Y., Youn, H. Y., Watari, T., Goitsuka, R., Tsujimoto, H., Hasegawa, A., Cloning of Feline p53 Tumor-Suppressor Gene and its Aberration in Hematopoietic Tumors. *Int. J. Cancer*, 58, 602-607, (1994).

Oyama, T., Takei, H., Hikino, Y., Lino, Y., Nakajima, T., Immunohistochemical Expression of Metallothionein in Invasive Breast Cancer in Relation to Proliferative Activity, Histology and Prognosis. *Oncology*, 53, 112-117, (1996).

Pamukcu, M., Ertürk, E., Ankara'da Köpeklerde Görülen Tümör Çeşitleri. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 9, 1-9, (1962).

Poller, D.N., Roberts, E.C., Bell, J.A., Elston, J.W., Blamey, R.W., Ellis, I.O., p53 Protein Expression in Mammary Ductal Carcinoma In-Situ: Relationship to Immunohistochemical Expression of Estrogen Receptor and c-erbB-2 Protein. *Human Pathol.*, 24, 463-468, (1993).

Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K., Miyoshi, N., Hayashi, T., Immunohistochemical Analysis of c-yes and c-erbB-2 Oncogene Products and p53 Tumor Suppressor Protein In Canine Mammary Tumors, *J. Vet. Med. Sci.*, 61, 27-32, (1999).

Rutten, V.P., Misdorp, W., Gauthier, A., Estrada, M., Mialot, J.P., Parodi, A.L., Rutteman, G.R., Weyer, K. Immunological Aspects Mammary Tumors in Dogs and Cats: A Survey Including Own Studies and Pertinent Literature. *Vet Immunol. Immunopath.*, 26, 211-225, (1990).

Sagartz, J.E., Bodley, W.L., Gamblin, R.M., Couto, C.G., Tierney, L.A., Capen, C.C., p53 Tumor Suppressor Protein Overexpression in Osteogenic Tumors of Dogs. *Vet. Pathol.*, 33, 213-221, (1996).

Sawaki, M., Enomoto, K., Hattori, A., Tsuzuki, n., Sawada, N., Mori, M., Elevation of Metallothionein Level in Preneoplastic Lesions During Chemical Hepatocarcinogenesis of the Fischer 344 Rat. *Toxicol. Letters*, 108, 55-61, (1999).

Schafer, K.A., Kelly, G., Schrader, R., Griffith, W.C., Muggenburg, B.A., Tierney, L.A., Lechner, J.F., Janovitz, E.B., Hahn, F.F., A Canine Model of Familial Mammary Gland Neoplasia, *Vet. Pathol.*, 35, 168-177, (1998).

Schmid, K.W., Ellis, I.O., Gee, J.M.W., Darke, B.M., Lees, W.E., Kay, J., Cryer, A., Stark, J.M., Hittmair, A., Öfner, D., Dünser, M., Margreiter, R., Daxenbichler, G., Nicholson, R.I., Bier, B., Böcker, W., Jasani, B., Presence and Possible Significance of Immunocytochemically Demonstrable Metallothionein Over-Expression in Primary

Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. *Virchows Archiv A Pathol Anat.*, 422, 153-159, (1993).

Sironi, G., Riccaboni, P., Mertel, L., Cammarata, G., Brooks, D.E., p53 Protein Expression in Conjunctival Squamous Cell Carcinomas of Domestic Animals, *Veterinary Ophthalmology*, 2, 227-231, (1999).

Teifke, J. P., Lohr, C. V., Immunohistochemical Detection of p53 Overexpression in Paraffin Wax-Embedded Squamous Cell Carcinomas of Cattle, Horses, Cats, and Dog, *J. Comp. Pathol.*, 114, 205-210, (1996).

Van Leeuwen, I. S., Cornelisse, C. J., Misdorp, W., Goedegebuure, S. A., Kirpensteijn, J., Rutteman, G. R., p53 Gene Mutations in Osteosarcomas in the Dog. *Cancer Lett.*, 111, 173-178, (1997).

Vural, S.A., Aydın, Y., Ankara'da 1973-1998 Yılları Arasında İncelenen Köpek Meme Tümörleri, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 233-239, (2001).

Wolf, J.C., Ginn, P.E., Homer, B., Fox, L.E., Kurzman, I.D., Immunohistochemical Detection of p53 Tumor Suppressor Gene Protein in Canine Epithelial Colorectal Tumors. *Vet. Pathol.*, 34, 394-404, (1997).

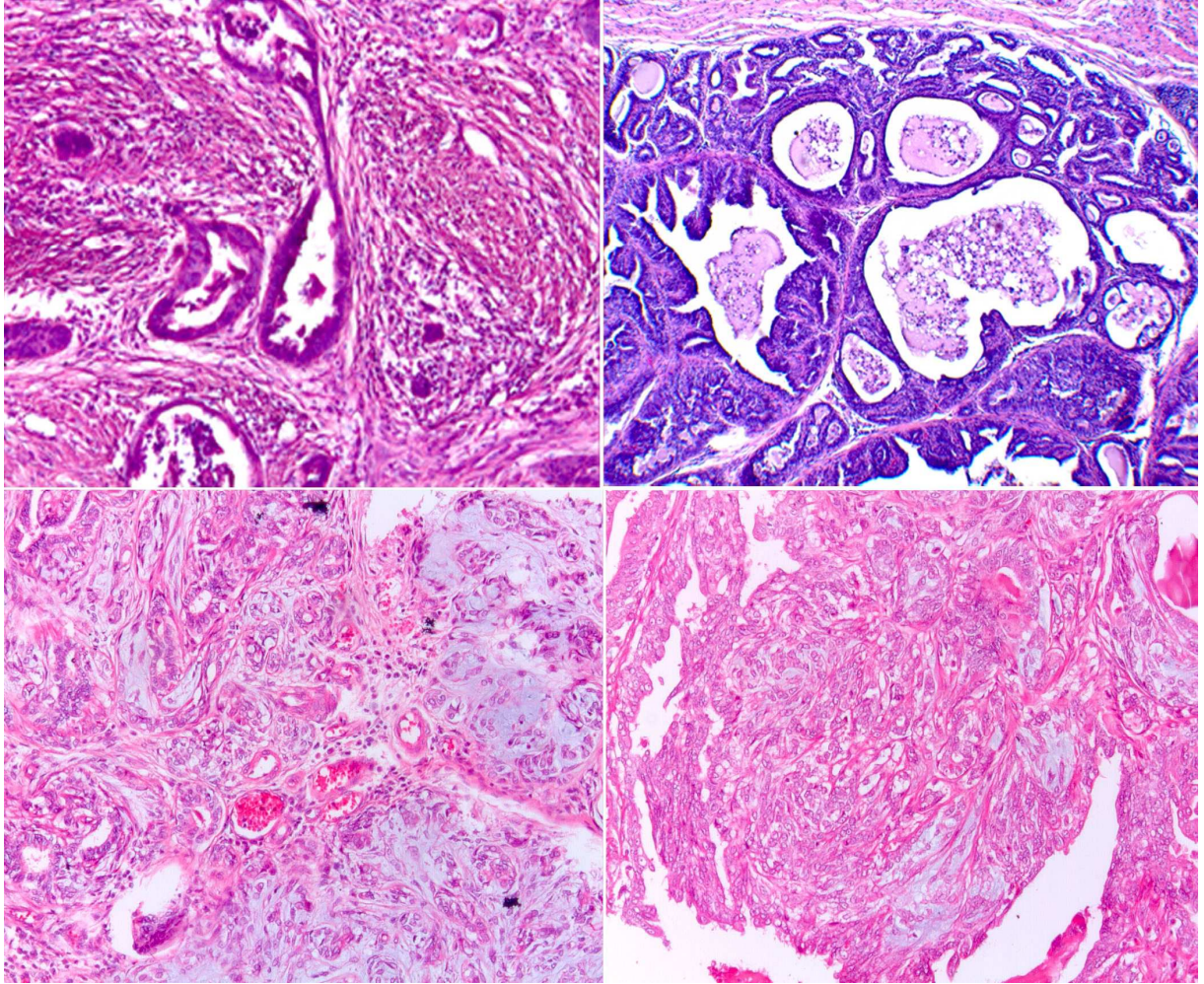
Yamamura, Y., Sayama, K., Takeda, Y., Matsuzawa, A., Iguchi, T., Ohta, Y. Metallothionein Expression in Transplantable Mouse Mammary Tumors. *Anticancer Res.*, 20, 379-384, (2000).

Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., M. Oren, M., Wilder-Type p53 Induces Apoptosis of Myeloid Leukaemic Cells that is Inhibited by Interleukin-6, *Nature*, 352, 345-347, (1991).

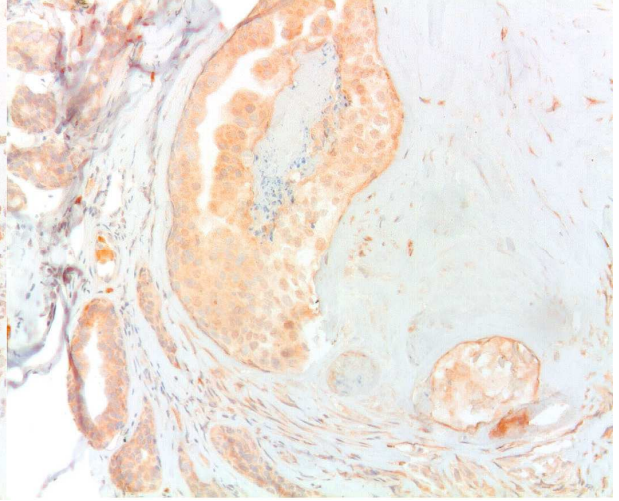
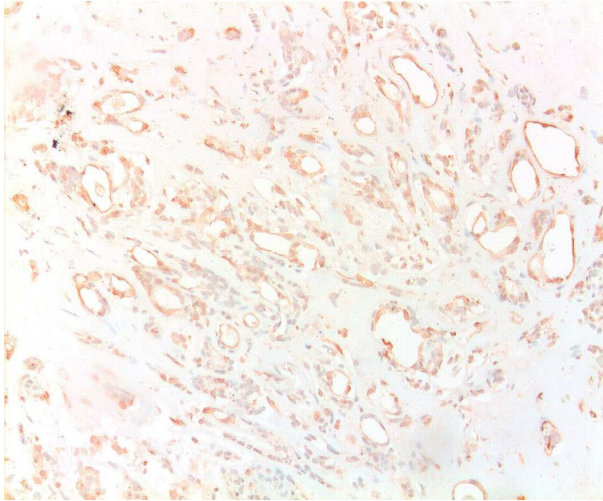
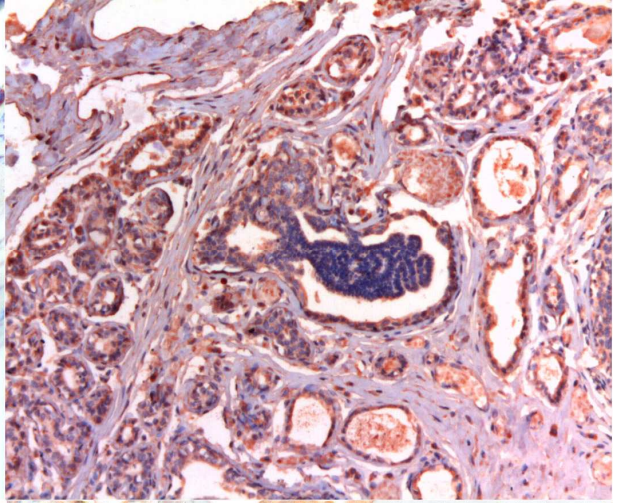
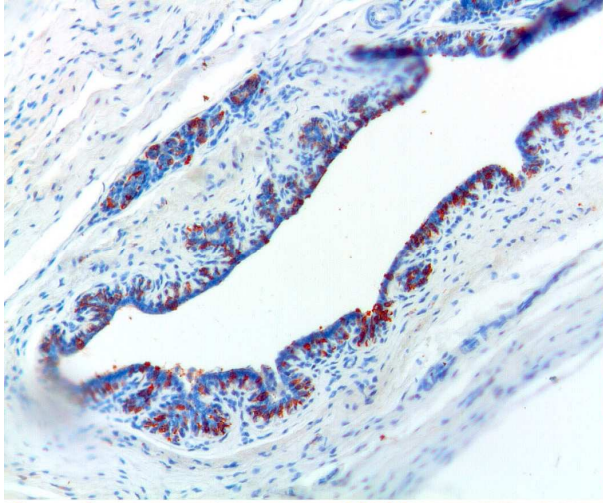
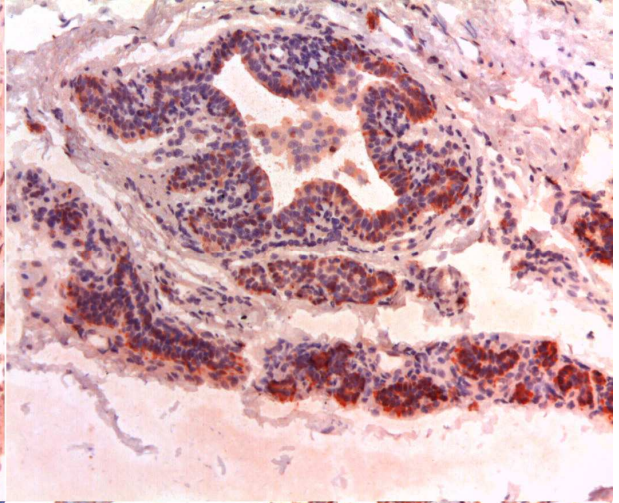
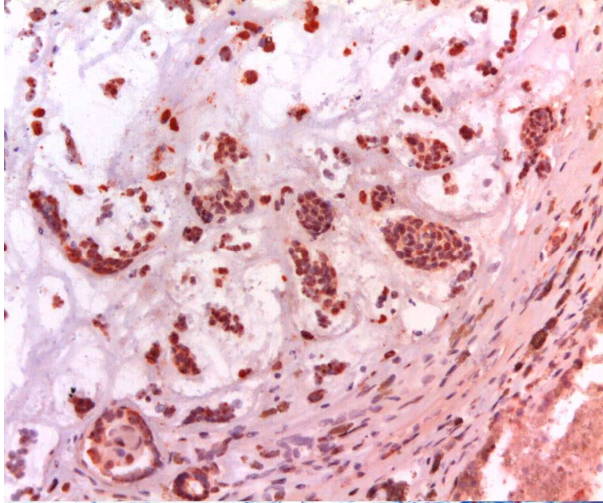
Zeng, J., Heuchel, R., Schaffner, W., Kagi, H.R., Thonein (Apometallothionein) can Modulate DNA Binding and Transcription Activation by Zinc Finger Containing Factor Sp1. *Federation Europ. Bio. Soc.*, 279, 310-312, (1991).

## VII. EKLER

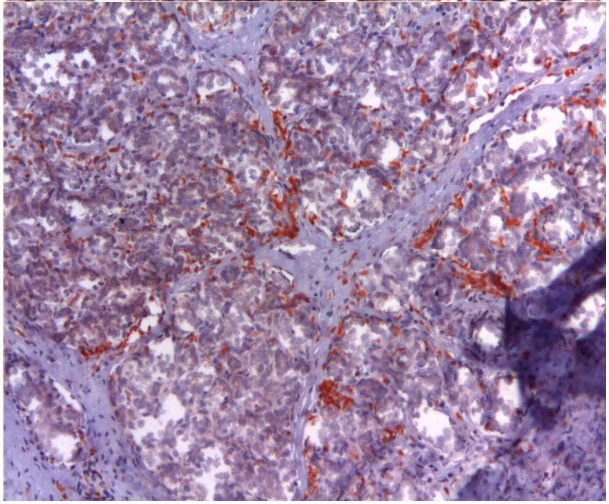
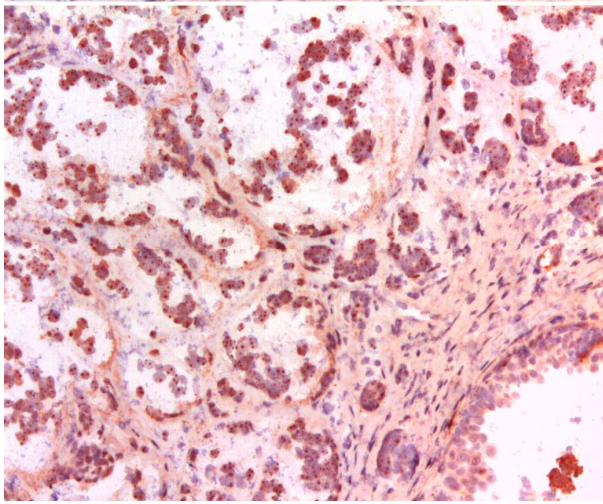
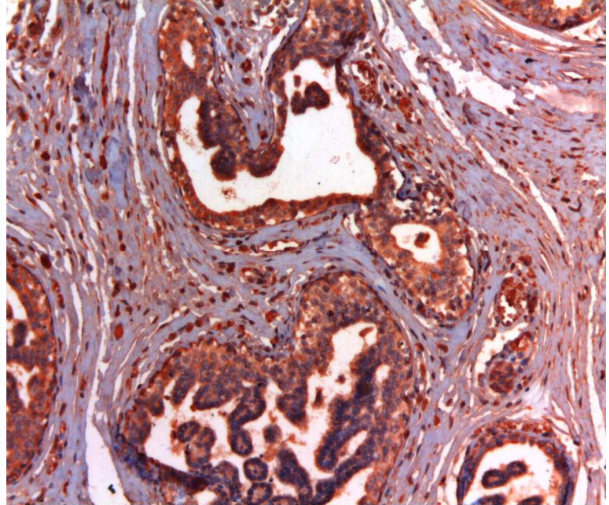
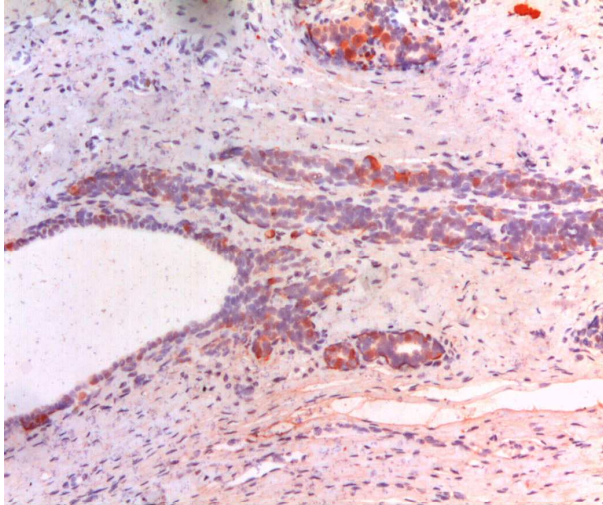
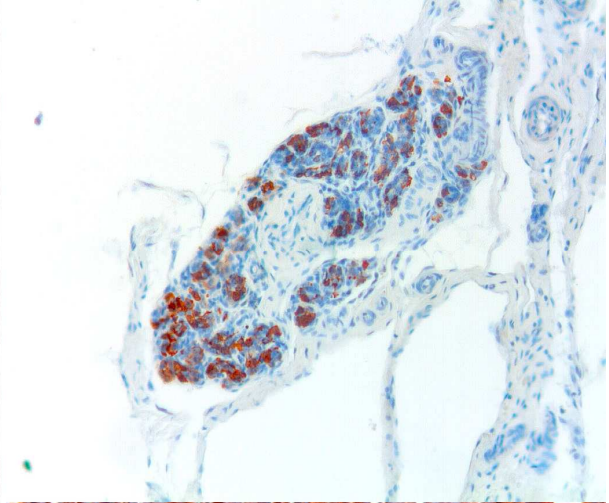
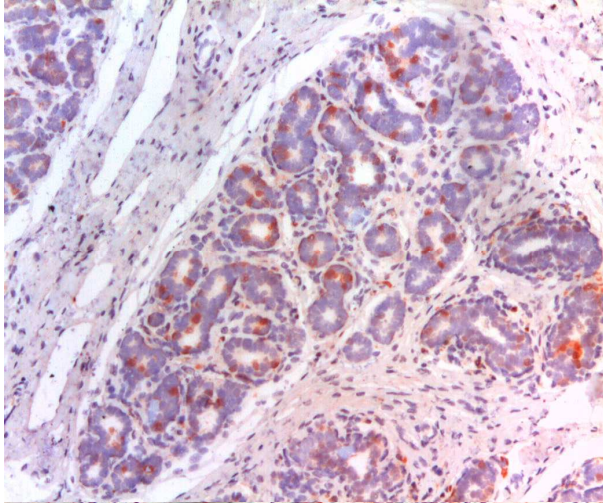
- a) Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 17.09.2003 tarihinde kabul edilen proje “48.790 YTL” (48.790.000 TL) ile desteklenmiştir. Destek miktarı Demirbaş ve sarf malzemelerin alımında, fotokopi masraflarının karşılanmasında kullanılmıştır.
- b) Projeden makina-teçhizat olarak “Digital Görüntüleme Sistemi (Leica) (Demirbaş No: 2328), Elektrokoter cihazı (Demirbaş No: 2257) ve Renkli Hastabaşı Monitörü (Petaş) (Demirbaş No: 2258)” alınmıştır. Bu makinaların hepsi amaçlarına uygun olarak projenin hazırlanmasında kullanılmıştır. Bugün ve ilerleyen dönemde de gerek konu ile ilgili gerekse farklı konulardaki çalışmaların değerlendirilmesinde kullanılması amaçlanmaktadır. Özellikle “Digital Görüntüleme Sistemi (Leica)” sayesinde patolojik açıdan elde edilen verilerin resmedilmesinde biz çalışanlara korkunç kolaylıklar sağlamaktadır. Diğer taraftan bu sistem sayesinde rastlanılan enteresan olgularda slayt haline dönüştürülerek lisans ve lisansüstü ders alan öğrencilere aktarılabilir. Bu sistemin alınmasıyla Patoloji Anabilim Dalı’nın önemli bir eksiğini giderilmiş durumdadır.



1	2
3	4



5	6
7	8
9	10



11	12
13	14
15	16