

Malign Meme Tümörlü Dişi Köpeklerde Klinik ve Bazı Hematolojik Parametreler Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Relationship Between Clinical and Some Hematological Parameters in Bitches with Malignant Mammary Tumor

 Zeynep GÜNAY UÇMAK^a,
 Kazım GÜVENÇ^a

^aDoğum ve Jinekoloji ABD,
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi,
İstanbul, TÜRKİYE

Received: 25 Sep 2019
Received in revised form: 05 Nov 2019
Accepted: 06 Nov 2019
Available online: 06 Dec 2019

Correspondence:
Zeynep GÜNAY UÇMAK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi,
Doğum ve Jinekoloji ABD, İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
zeynep.gunay@istanbul.edu.tr

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenen 31510 kodlu tez projesinden
türetilmiştir.

ÖZET Amaç: Bu çalışmada; sağlıklı ve meme tümörlü köpeklerde beyaz kan hücreleri [white blood cell (WBC)], platelet (PLT) ve kandan izole edilen total ribonükleik asit (RNA) miktarlarının karşılaştırılması ve ayrıca; tümör tipi, kitle büyüklüğü, kitle sayısı, yaş, ülserasyon ve metastaz varlığı gibi klinik bulgular ile belirtilen hematolojik parametreler arasındaki ilişkinin ortaya konulması amaçlandı. **Gereç ve Yöntemler:** Araştırmanın materyalini, ortalama 5,94±1,21 yaşında 9 adet sağlıklı dişi köpek ve ortalama 11,19±0,41 yaşında 45 adet meme tümörlü dişi köpek oluşturdu. Bunun yanında, kısırlaştırma amacıyla kliniğimize getirilen köpekler ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Operasyon öncesi dönemde hemogram ve total RNA izolasyonu amacıyla kan örnekleri alındı. Total RNA izolasyonu kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. **Bulgular:** Çalışma ve kontrol grubundaki köpekler yaş, PLT, WBC, total RNA miktarı açısından değerlendirildi. Bunun sonucunda; yaş ($p<0,001$), PLT ($p<0,05$), total RNA ($p<0,05$) miktarları meme tümörlü köpeklerde daha yüksek miktarda ölçüldü. Ayrıca, meme tümörlü köpeklerde WBC değerleri ile kitle büyüklüğü ($p<0,05$) ve total RNA miktarları ($p<0,001$) arasında pozitif korelasyon saptandı. Bunun yanı sıra, ülsere tümörlü köpeklerde WBC miktarının daha yüksek olduğu belirlendi ($p<0,01$). **Sonuç:** Bu çalışmada; PLT miktarının karsinogenik olgularda arttığı tespit edildi. Ayrıca, meme tümörlü köpeklerde prognostik tümör belirteçlerinin (biyomarkerların) saptanabilmesi için kandan izole edilen total RNA miktarının, WBC miktarı ile ilişkili olduğu sonucuna varıldı. Elde edilen bulguların tümör patofizyolojisi ile ilgili moleküler düzeydeki çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kan trombositleri; lökositler; meme neoplazmaları; total RNA

ABSTRACT Objective: The amount of white blood cell (WBC), platelet (PLT) and total ribonucleic acid (RNA) isolated from blood in healthy bitches and bitches with mammary tumors (MT) were compared in this study. Also, determination of the relationship between hematological parameters and clinical findings such as tumor type, mass size, number of mass, age, ulceration and metastasis was aimed. **Material and Methods:** The material of the research was composed of the data belonging to the 9 healthy bitches approximately 5.95±1.21 years old and 45 bitches with MT approximately 11.19±0.41 years old. Control group included the bitches which were presented to our clinic for ovariohysterectomy. Blood samples were collected in preoperative term for total RNA isolation and hemogram. Total RNA isolation was performed according to kit procedure. **Results:** Bitches in study and control group were evaluated in terms of age, PLT, WBC and total RNA values. Consequently, age ($p<0,001$), PLT ($p<0,05$) and total RNA ($p<0,05$) values were detected higher in bitches with MT. Also, WBC values were positively correlated with mass size ($p<0,05$) and total RNA values ($p<0,001$) in bitches with MT. Additionally, WBC values were higher ($p<0,01$) in bitches with ulcerated MT. **Conclusion:** Decrease of PLT values in carcinogenic cases were determined in this study. Also, it was concluded that the amount of total RNA in blood was associated with the amount of WBC in order to detect prognostic tumor markers (biomarkers) in bitches with MT. It is thought that these findings will contribute to molecular studies related to tumor pathophysiology.

Keywords: Blood platelets; leukocytes; mammary neoplasms; total RNA

Köpek meme tümörleri %25-50 insidansa sahiptir ve %53 oranında malign karakterdedir.^{1,2} Meme tümörleri bölgesel lenf yumrularına ve iç organlara metastaz yapma potansiyeline sahiptir.³ Metastazların gelişiminde trombositlerin önemli rolü vardır.⁴ Trombositler, dolaşım sisteminde hemostatik etkilerinin yanı sıra; sitokinlerin, kemokinlerin ve çeşitli adezyon moleküllerinin salgılanmasını sağlayarak yangı, arterioskleroz, kanser metastazı gibi çeşitli patolojik hâllerin değişimine katkıda bulunan yüksek duyarlılıktaki bileşiklerdir.⁵ Trombositlerin; tümör büyümesi, anjiyogenezi ve metastazında doğrudan etkili olarak kanser gelişimine ve ilerlemesine katkı sağladığı bildirilmiştir.⁶ Yüksek miktarda trombosit varlığında metastaz riskinin arttığı, prognozun zayıfladığı ve çoklu tümör tiplerinin görülme insidansının yüksek olduğu saptanmıştır.^{7,8} Kanser hastalarında lökosit ve trombosit miktarının değerlendirilmesinin, tromboz oluşum potansiyelinin belirlenebilmesi açısından faydalı olabileceği savunulmaktadır.⁹ Tümör hipoksisi ya da nekrozunda ise nötrofiller ile lenfositler arasında dengesizlik görülebileceği ve bunun antiapoptotik etkiler ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir.¹⁰

Köpek meme tümörü olgularında, yaş, kitle sayısı, kitle büyüklüğü, lokalizasyon, tümör tipi, metastaz ve ülserasyon varlığı gibi bulgular prognozu etkilemektedir.³ Özellikle yaş aralığı 4-8 yıl olanlarda meme tümörlerinin gelişimi hızlı olmakla birlikte, 8 yaşından büyük köpeklerde meme tümörü görülme sıklığı daha yüksektir.^{1,11} Meme tümörlerinde prognozun belirlenmesi amacıyla, Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği tümör (T), bölgesel lenf düğümünün durumu (N) ve uzak metastazlar (M) yönünden yapılan bir sınıflanma mevcuttur.¹² Ayrıca, meme tümörlerinde lokalizasyon ile tümör tipinin birbiri ile ilişkili olduğu bildirilmiş olup, inguinal bölgede bulunan kitlelerin daha malign karakterde olduğu savunulmaktadır.¹³

Meme tümörleri, kan ve lenf yoluyla dolaşıma katılarak metastaz yapma potansiyeline sahiptir.³ Dolaşımdaki tümör hücreleri; tümörden veya onun metastazından dökülen, hastanın periferik kanında

dolaşan neoplastik hücreler olarak tanımlanır.¹⁴ Bu hücrelerin varlığı, hastalığın tekrarlamasında ve hastalığa bağlı ölümlerde prognostik açıdan önem taşımaktadır ve metastazik potansiyelin önemli bir göstergesidir.¹⁵ Tümör belirleyiciler (marker); kanser biyolojisinde, etiyolojisinde, teşhisinde, tedavisinde ve prognozunda önemli rol oynamaktadırlar. Markerlar, genellikle tümör hücrelerince üretilir. Buna bağlı olarak kitle büyüklüğü ve kitle sayısı gibi parametrelerle marker düzeyleri arasında belirgin bir bağlantı olduğu düşünülmektedir.¹⁶ Bu markerların saptanabilmesi için, dolaşan tümör hücrelerine ait hedef mesajcı RNA'ların en çok bulunduğu örnekler olan kan, serum, hücre kültürleri, dokular (hayvan ya da bitki) ve bakteri kültürleri kullanılmaktadır.¹⁷ Sağlıklı ve meme tümörlü köpeklerin meme dokusunda bu markerların miktarının farklı olması, markerlara ait dolaşımdaki total RNA miktarlarının da farklı olacağını göstermiştir.¹⁸

Sunulan çalışmada; sağlıklı ve malign meme tümörlü köpeklerde beyaz kan hücresi [white blood (WBC), platelet (PLT) ve kandan izole edilen total ribonükleik asit (RNA) miktarlarının karşılaştırılması ve malign meme tümörlü köpeklerde tümör tipi, kitle büyüklüğü, kitle sayısı, yaş, ülserasyon ve metastaz varlığı gibi prognostik öneme sahip klinik muayene bulguları ile belirtilen hematolojik parametrelerle arasındaki ilişkinin ortaya konulması hedeflenmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan 2013/14 numaralı etik kurul onaylı 'Meme tümörlü köpeklerde metastazik potansiyelin preoperatif dönemde alınan kandan, prognostik tümör belirleyicilerin (marker) tayini ile belirlenmesi' isimli ve 31510 kod numaralı tez projesinden türetilmiştir. Bu çalışma, Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne uygun olarak yapıldı.

HAYVAN MATERYALI

Çalışma grubunu İstanbul Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Kliniğine getirilen ortalama

11,19±0,41 yaşında ve 16,26±1,49 kg ağırlığında, 45 adet meme tümörlü köpek; kontrol grubunu ise kliniğimize ovariohisterektomi amacıyla getirilen ortalama 5,94±1,21 yaşında ve 20,16±2,73 kg ağırlığında 9 adet sağlıklı köpek oluşturdu.

KLİNİK VE HEMATOLOJİK MUAYENE

Çalışma ve kontrol grubundaki köpeklerin opere edilebilir olup olmadığına karar vermek için, operasyon (ovariohisterektomi/mastektomi) öncesi dönemde hemogram ve bazı biyokimyasal parametreler (glukoz, üre, kreatinin, total protein, albumin, globulin, alanin aminotransferaz, alkalın fosfataz, aspartat aminotransferaz) incelendi. Çalışmada kullanılacak olan WBC ve PLT değerleri operasyon öncesi dönemde yapılan rutin hemogram ölçümünden elde edildi. Çalışma grubundaki meme tümörlü köpeklerdeki tümörün boyutu, lokalizasyonu, ülserasyon varlığı, bölgesel lenf yumrularının durumu muayene edildi. Tüm hematolojik ve klinik bulgular arşivlendi. Meme tümörlü köpeklerde kitle büyüklüğü, TNM sınıflandırmasına uygun olarak gruplandırıldı. Lenf yumrularının palpasyonu, akciğer radyografisi ve ultrasonografik muayene ile metastazik meme tümörlü köpekler belirlendi. Çalışma grubuna, histopatolojik inceleme neticesinde malign epitelyal tip tümöre sahip meme tümörlü köpekler dâhil edildi. Tümörlerin histopatolojik derecelendirilmesi Grade 0, Grade 1, Grade 2, Grade 3 şeklinde değerlendirildi.

TOTAL RNA İZOLASYONU İÇİN KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE HAZIRLANMASI

Tüm köpeklerde vena jugularis bölgesinin tıraş ve dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra yeşil renk vakumlu iğne ucu kullanılarak etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içeren 2 mL'lik steril tüplere operasyon öncesi dönemde kan alındı. Çalışma ve kontrol grubunu oluşturan köpeklere ait anamnez bilgi formundaki numaralandırmaya uygun olarak, numune alınan tüpler etiketlendi. Her bir köpek için önceden hazırlanmış olan 2 ependorf tüpüne 0,5 mL EDTA'lı kandan ve 1,3 mL RNA-later solüsyonundan katıldı. Tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra nazıkçe 2 defa alt üst edilerek -20 °C'de depolandı.

TOTAL RNA İZOLASYONU

Çalışma ve kontrol grubuna ait kan numuneleri toplandıktan sonra, her ayın sonunda o ay içinde toplanan numunelerden total RNA izole edilerek -86°C soğutucularında saklandı. Total RNA izolasyonu için (Jena Bioscience, Almanya) tedarik edilen PP-210S katalog numaralı total RNA pütrifikasyon ticari kiti kullanıldı. Kitin prosedürüne göre hazırlanan 1,8 mL'lik kan ve RNA-later solüsyonu karışımı öncelikle mikrosantrifüj cihazında 1 dk santrifüj edilerek 2 faza ayrıldı. Üstte kalan sıvı kısım (supernatant) uzaklaştırıldı. Tüpün alt kısmında kan hücreleri ve plazma proteinlerini içeren 'pellet' olarak adlandırılan koyu kahverengi kısma, kan hücrelerini eritmek için 800 µL Lysis solüsyonu ve 50 µL sodyum asetat solüsyonu eklenerek tüp karıştırıcıda homojenizasyon sağlanana dek karıştırıldı. Elde edilen homojen karışıma 500 µL asit fenol kloroform eklenerek, 30 sn tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dk beklettikten sonra 2 ayrı faz elde etmek için karışım mikrosantrifüj cihazında 1 dk santrifüj edildi. Üstte kalan, total RNA içeren sıvı faz 2 mL'lik steril bir ependorf tüpüne aktarıldı. Elde edilen sıvı fazın hacmi her bir numune için 1-1,2 mL arasında değişmekteydi. Bu fazın içine 600 µL %100 etanol (Taç Kimya, Türkiye) eklenerek sertçe karıştırıldı ve ependorf tüpünün etrafında kalan sıvıyı toplamak için 1 dk santrifüj edildi. Her numune için 100 µL konulacak şekilde kitin içinde bulunan RNaz içermeyen tüpe ayrıştırma solüsyonu ilave edilerek, hazırlanan bu solüsyon 75°C'ye ısıtıldı. Her bir numune için kitin içindeki tüpleri etiketledikten sonra, tüpün içine filtreli kartuş yerleştirildi. RNA eldesinde kullanılmak üzere kit içindeki toplama tüplerinden bir seri daha hazırlandı. Numunelerden 700 µL filtreli kartuşa döküldükten sonra, sıvının filtreden geçmesi için 5-10 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonunda dibe çöken sıvı kısım uzaklaştırıldı ve total RNA'ları tutan filtre yine aynı tüpe yerleştirildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Filtreli kartuşa 700 µL bir numaralı yıkama solüsyonu eklenerek 5-10 sn santrifüj edildi. Dipte kalan sıvı dökülerek filtreli kartuş tekrar aynı tüpe yerleştirildi. Bu kez 2/3 numaralı yıkama solüsyonundan yine 700 µL filtreli kartuşa

eklenerek 5-10 sn santrifüj edildi. Filtreden geçen sıvı dökülerek filtre aynı tüpe yerleştirildi ve bu işlem 2/3 numaralı yıkama solüsyonu için 2 defa tekrarlandı. Son yıkamadan sonra tüpün altında toplanan sıvı dökülüp aynı filtrelili kartuş tüpe yerleştirildi. Kalıntı sıvıların filtreden akıp gitmesi için 1 dk santrifüj edilip, dibe çöken sıvı atıldı. Daha önceden etiketlenerek hazırlanan kit içindeki toplama tüplerine filtrelili kartuşlar yerleştirildi. Filtrenin merkezine önceden 75°C'de ısıtılan ayrıştırma solüsyonundan 50 µL ilave edildi. Tüpün kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 20 sn bekletildikten sonra 7000 rpm devirde 20-30 sn (Roche MagNa Lyser) santrifüj edildi. Aynı işlem 1 kez daha tekrarlandı ve böylece tüpün dibinde 100 µL total RNA elde edildi. Bu şekilde de -20 °C ve daha altındaki sıcaklıkta elde edilen total RNA saklanabilir, fakat total RNA içeren bu sıvının içinde bulunabilecek olası deoksiribo nükleik asit (DNA) parçacıklarını uzaklaştırmak için kısa bir işlem daha uygulandı. Bunun için elde edilen total RNA'ya, 1/20 hacminde 20x DNaz tampon maddesi ve 1 µL DNaz ilave edildi. Karışım yavaşça fakat iyice karıştırıldı ve 37°C'de 30 dk inkubasyona bırakıldı. Elde edilen total RNA miktarının %20'si kadar DNaz inaktivasyon ayracı eklendi. Eklenen ayrac ve total RNA karıştırıcı ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2 dk beklettikten sonra 1-2 kez tüpe parmakla hafifçe vurmak suretiyle tekrar karıştırıldı. Ayrıca, DNaz inaktivasyon ayracını çöktürmek ve bu karışımdan total RNA'yı ayırmak amacıyla 1 dk santrifüj edildi. Üstte kalan total RNA, steril olan ayrı bir ependorf tüpüne aktarıldı.

Total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra tüm örneklerin total RNA konsantrasyonları ve saflıkları Thermo Scientific Nanodrop 2000 cihazı ile ölçüldü. 1 µL total RNA örneği alınıp cihaza konularak konsantrasyon miktarı ve 260/280 ve 260/230 oranlarına bakılarak saflıkları belirlendi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışma ve kontrol grupları arasında PLT, WBC, total RNA miktarı yönünden fark ile klinik belirtilerin (tümör tipleri, yaş, kitle büyüklüğü, ülserasyon, metastaz varlığı) bu faktörler

üzerindeki etkisini belirlemek için bağımsız örneklem t-testi uygulandı. Elde edilen bulgulardaki ortalama veriler standart hata değerleriyle birlikte verildi. Bununla birlikte, WBC, PLT, total RNA veri setinin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile kontrol edildi. Sonuç olarak, PLT verisinin normal dağılım sergilediği gözlemlendi ve dolayısıyla gruplar arası PLT miktarı, farklı parametrik bir test olan bağımsız örneklem t-testi ile değerlendirildi. Shapiro Wilk testi neticesinde, WBC ve total RNA verileri normal dağılım sergilemediğinden, belirtilen parametrelerin istatistiksel analizi Mann Whitney-U testi ile gerçekleştirildi ve her iki parametre için ortalama değerler hesaplandı. Yaş ve PLT miktarları yönünden gruplar arası fark t-testi ile analiz edildi. Kandan izole edilen total RNA miktarı ile WBC ve PLT parametreleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla Pearson korelasyon testi uygulandı.

BULGULAR

Çalışma ve kontrol grubundaki köpeklere ait PLT ve WBC parametrelerinin ortalama değerleri, meme tümörlü köpeklerde sırasıyla 522,71±30,83 µL ve 27,98x10³ µ/mL; kontrol grubundaki sağlıklı köpeklerde sırasıyla 324,89±74,68 µL ve 25,11x10³ µ/mL olarak ölçüldü. Meme tümörlü köpeklerden alınan kandan ortalama 29.72 ng/mL, kontrol grubundaki köpeklerden alınan kandan ise ortalama 16,39 ng/mL total RNA izole edildi. Lenf yumrularının palpasyonu, akciğer radyografisi ve ultrasonografik muayenede meme tümörlü köpeklerin 22'sine makroskobik olarak metastaz teşhisi konuldu. Çalışma grubundaki köpeklere ait meme tümörlerinin 12'si 0-3 cm, 11'i 3-5 cm arasında, 22'si de 5 cm'den büyük olduğu ve ortalama 4,09±0,37 sayıda meme lobunda bulunduğu saptandı. Çalışma grubunu oluşturan malign epitelyal tümörlü köpeklere ait histopatoloji sonuçları sırasıyla; kompleks tip karsinom (18 köpekte), tübülopapiller karsinom (9 köpekte), tübüler karsinom (7 köpekte), solid karsinom (6 köpekte), karsinosarkom (3 köpekte), malign mikst tümör (2 köpekte) olarak saptandı. Histopatolojik olarak derecelendirilen meme tümörlerinden 3'ü

TABLO 1: Çalışma ve kontrol gruplarının yaş, PLT, WBC, total RNA değerleri yönünden değerlendirilmesi.

Parametreler	Gruplar	n	Ortalama değer±standart hata	p
Yaş (yıl)	Çalışma	45	11,19±0,41	p<0,001
	Kontrol	9	5,94±1,21	(p=0,000)
PLT (µL)	Çalışma	45	522,71±30,83	p<0,05
	Kontrol	9	324,89±74,68	(p=0,013)
WBC (x10 ³ µ/mL)	Çalışma	45	27,98	p>0,05
	Kontrol	9	25,11	(p=0,618)
Total RNA (ng/mL)	Çalışma	45	29,72	p<0,05
	Kontrol	9	16,39	(p=0,020)

PLT: Platelet, WBC: Beyaz kan hücresi, RNA: Ribonükleik asit.

Grade 0, 13'ü Grade 1, 13'ü Grade 2 ve 16'sı Grade 3 olarak ölçüldü.

Çalışma ve kontrol gruplarına ait yaş, PLT, WBC, total RNA parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 1'de verildi. Ayrıca, gruplar arasında yaş ve PLT miktarları

değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan önemli fark bulunmadı (p>0,05). Çalışma grubunda ise WBC miktarları ile kitle büyüklüğü ve total RNA miktarları arasında korelasyon saptandı (Tablo 2).

Çalışma grubundaki meme tümürlü köpeklerde ölçülen WBC, PLT, total RNA

TABLO 2: Çalışma grubundaki köpeklere ait kitle büyüklüğü, WBC, PLT, total RNA miktarlarının korelasyonu.

		WBC (X10 ³ µ/mL)	PLT (µL)	Total RNA (ng/mL)	Kitle büyüklüğü (cm)
WBC (x10 ³ µ/mL)	Korelasyon katsayısı	1	-0,082	0,668	0,314
	p	-	p>0,05 (p=0,553)	p<0,001 (p=0,000)	p<0,05 (p=0,036)
PLT (µL)	Korelasyon katsayısı	1	-0,082	-0,176	0,111
	p	p>0,05 (p=0,553)	-	p>0,05 (p=0,203)	p>0,05 (p=0,469)
Total RNA (ng/mL)	Korelasyon katsayısı	0,668	-0,176	1	0,184
	p	p<0,001 (p=0,000)	p>0,05 (p=0,203)	-	p>0,05 (p=0,227)
Kitle büyüklüğü (cm)	Korelasyon katsayısı	0,314	0,111	0,184	1
	p	p<0,05 (p=0,036)	p>0,05 (p=0,469)	p>0,05 (p=0,227)	-

PLT: Platelet, WBC: Beyaz kan hücresi, RNA: Ribonükleik asit.

TABLO 3: Çalışma grubunda ülserasyon varlığında WBC, PLT, total RNA miktarlarının değerlendirilmesi.

Parametreler	Gruplar	n	Ortalama değer±standart hata	p
WBC (X10 ³ µ/mL)	Ülserasyon (+)	19	25,14±3,83	p< 0,01
	Ülserasyon (-)	26	14,73±1,11	(p=0,005)
PLT (µL)	Ülserasyon (+)	19	537,00±54,01	p>0,05
	Ülserasyon (-)	26	512,27±36,76	(p=0,697)
Total RNA (ng/mL)	Ülserasyon (+)	19	78,83±18,32	p>0,05
	Ülserasyon (-)	26	49,71±6,57	(p=0,101)

PLT: Platelet, WBC: Beyaz kan hücresi, RNA: Ribonükleik asit.

miktarları ile kitle sayısı, kitle büyüklüğü, lokalizasyon, tümör tipi, tümör grade ve metastaz varlığı gibi klinik parametreler arasında istatistiksel açıdan önem saptanmadı ($p>0,05$). Bununla birlikte; çalışma grubundaki köpeklerde, WBC miktarının ülserasyon varlığının istatistiksel açıdan önemli olduğu ve ülseratif meme tümörlü köpeklerde WBC değerinin daha yüksek miktarlarda ölçüldüğü belirlendi (Tablo 3).

TARTIŞMA

Meme tümörlerinin 8 yaşından büyük, ortalama 9-11 yaşındaki köpeklerde daha yüksek insidansa sahip olduğu bilinmektedir.^{11,19} Yapılan çalışmada meme tümörlü köpeklerin yaş ortalamasının $11,19\pm 0,41$ olarak belirlenmesi araştırmacıların bildirişisiyle uyumludur.^{11,19} Bununla birlikte, çalışma ve kontrol gruplarını oluşturan köpeklerde yaşın PLT miktarı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, istatistiksel açıdan önem saptanamamış olunması ($p>0,05$), PLT miktarının köpeğin yaşından değil fizyopatolojik durumundan etkilendiğini göstermektedir. Ayrıca, sunulan çalışmada, köpeklerdeki meme tümörlerinin yaklaşık %60'ının 4. ve 5. çift meme bezlerinde tespit edilmesi ve bu meme tümörlerinin yaklaşık %34 oranla en çok inguinal meme bezlerinde gelişmiş olması, araştırmacıların bildirişisiyle uyumlu bulunmuştur.¹³

Trombositlerin kanser ilerlemesini ve metastazını kolaylaştırdığı savunulmaktadır. Bu amaçla PLT'lerin; tümör hücreleri ile agregatlar oluşturduğu, tümör büyümesini, epitelyal-mezenkimal geçişi ve invazyonu indüklediği, dolaşımdaki tümör hücrelerini bağışıklık gözetiminden ve öldürülmekten koruduğu, dolaşımdaki tümör hücrelerinin bağlanmasını kolaylaştırdığı, uzak bölgelerde anjiyogenez ve tümör hücresi oluşumunu teşvik ettiği bildirilmiştir.²⁰ Çalışmamızda, PLT miktarı açısından çalışma ve kontrol grupları arasındaki farkın önemli olması ($p<0,05$) ve çalışma grubundaki köpeklerde PLT miktarının daha yüksek ölçülmesi, araştırmacıların bildirişisi doğrultusunda trombositlerin karsinojenik olgulardaki işlevlerini destekler niteliktedir.

Araştırmacılar, sağlıklı köpeklerdeki WBC ve PLT miktarlarına ait referans aralıklarını sırasıyla; $6-17\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ ve $200-500\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ olarak bildirmişlerdir.²¹ Çalışmamızda, PLT değeri tümörlü hastalarda daha yüksek miktarlarda ölçülmesine rağmen, tümöre ilişkin klinik parametreler (kitle sayısı, kitle büyüklüğü, lokalizasyon, tümör tipi, tümör grade) ile PLT değeri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, PLT miktarları açısından önemli bir fark saptanmadı. Ayrıca, tümör metastazı ile total RNA, PLT, WBC parametreleri arasındaki ilişki istatistiksel açıdan önemsiz bulundu. Bu sebeple, konunun daha detaylı irdelenebilmesi için, materyal sayısının artırılması gerektiği sonucuna varıldı.

Araştırmacılar, aktive trombositlerin lökositlerle özellikle de monositlerle etkileşime girerek lökosit-trombosit agregatları (LTA)'nı oluşturduklarını savunmaktadırlar.²² Kanser hastalarında yapılan çalışmalarda, LTA değerlerinin C-reaktif protein değeri ile birlikte artış gösterdiği bildirilmiştir.¹⁰ Ayrıca, nötrofiller ile lenfositler arasındaki dengesizliğin tümör hipoksisi ya da nekrozuna sebep olabileceği ve antiapoptotik etkiler ile ilişkili olduğu üzerinde durulmaktadır.²³ Çalışmamızda ülseratif meme tümörlü köpeklerde ölçülen WBC değerleri istatistiksel açıdan önemli olup ($p<0,01$), nonülseratif meme tümörlü köpeklere göre daha yüksek miktarlarda saptanması araştırmacıların bildirişisiyle uyumludur.²³ Bunun yanı sıra, araştırmacıların bildirişileri doğrultusunda PLT miktarındaki artışın lökositleri de etkileyerek artırdığı düşünülmektedir.^{10,22}

Çalışma grubundaki köpeklerde kitle büyüklüğü ile WBC miktarları arasındaki pozitif korelasyonun, araştırmacıların bildirişisinde açıklandığı gibi tümör hipoksisi nedeni ile kaynaklandığı düşünülmektedir.²³ Böylece, tümöral kitle büyüdükçe, tümör hipoksisi neticesinde beslenemeyen dokuda vücudun savunma mekanizması devreye girerek, lökositöz şekillenmesi muhtemel görülmektedir.

Total RNA izolasyonu; doku ya da hücrelerin lizis solüsyonu ile parçalanıp, fenol yardımıyla total

RNA'nın ekstrakte edilmesi prensibine dayanan protokoldür.²⁴ Kandan total RNA izolasyonu, EDTA'lı tüpe alınan kandan elde edilen lökosit tabakası kullanılarak yapılmaktadır.²⁵ Çalışmamızda, total RNA miktarı ile WBC miktarı arasında pozitif korelasyon olması, kandan izole edilen total RNA miktarının lökosit miktarı ile doğrudan ilişkili olduğunu destekler niteliktedir.

Sunulan araştırmada, araştırmacıların bildirisine paralel olarak, kandaki tümör belirteçlerinin saptanması amacıyla sağlıklı ve malign meme tümörlü köpeklerde dolaşımdaki total RNA miktarları belirlendi.¹⁸ Bunun neticesinde, çalışma ve kontrol gruplarında total RNA miktarı açısından farkın istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunması ve kandan izole edilen total RNA miktarının malign meme tümörlü köpeklerde sağlıklı köpeklere göre daha yüksek ölçülmesi, kanser olgularında artan PLT miktarı ile kandan izole edilen total RNA miktarının ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada; sağlıklı ve malign meme tümörlü köpeklerde hematolojik parametrelerin karsinojenik olgulardaki önemi araştırıldı. Ayrıca, meme tümörlü köpeklerde prognostik biyomarkerlerin saptanmadan önceki aşaması olan total RNA izolasyonuna etkili klinik ve hematolojik parametreler değerlendirildi. Böylece, kliniklerimize getirilen meme tümörlü hayvanlarda, operasyon öncesi alınan kan örneklerinde WBC, PLT ve dolayısıyla total RNA

miktarının yüksek olmasının; tümörün malign karakterde olabileceği şüphesi doğuracağı ve özellikle operasyon ve sonrasındaki tedavi prosedürlerinin, patoloji sonuçları elde edilene kadar bu sonuçlara göre şekillendirilebileceği ve ileriki çalışmalarda özellikle mikro RNA'ların tespiti ile daha ayrıntılı bir şekilde konunun incelenmesi gerektiğini gösterdiği sonucuna varıldı.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Zeynep Günay Uçmak; **Tasarım:** Zeynep Günay Uçmak; **Denetleme/Danışmanlık:** Zeynep Günay Uçmak, Kazım Güvenç; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Zeynep Günay Uçmak; **Analiz ve/veya Yorum:** Zeynep Günay Uçmak; **Kaynak Taraması:** Zeynep Günay Uçmak, Kazım Güvenç; **Makalenin Yazımı:** Zeynep Günay Uçmak, Kazım Güvenç; **Eleştirel İnceleme:** Zeynep Günay Uçmak, Kazım Güvenç; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Zeynep Günay Uçmak; **Malzemeler:** Zeynep Günay Uçmak.

KAYNAKLAR

1. Boldizsár H, Szenci O, Muray T, Csenki J. Studies on canine mammary tumours. I. Age, seasonal and breed distribution. *Acta Vet Hung.* 1992;40(1-2):75-87. [[PubMed](#)]
2. Moe L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl.* 2001;57:439-43. [[PubMed](#)]
3. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003;33(3):573-96. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
4. Kim HJ, Choi GS, Park JS, Park S, Kawai K, Watanabe T. Clinical significance of thrombocytosis before preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: predicting pathologic tumor response and oncologic outcome. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(2):513-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
5. Borsig L. The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008;8(8):1247-55. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
6. Nash GF, Walsh DC, Kakkar AK. The role of the coagulation system in tumour angiogenesis. *Lancet Oncol.* 2001;2(10):608-13. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
7. Buergy D, Wenz F, Groden C, Brockmann MA. Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer.* 2012;130(12):2747-60. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
8. Ji Y, Sheng L, Du X, Qui G, Su D. Elevated platelet count is a strong predictor of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer patients. *Platelets.* 2015;26(2):138-42. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
9. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost.* 2007;5(4):692-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
10. Avcı B, Avcı O, Solmaz D, Yetişiyiğit T, Burhan T. [Contribution of leukocyte platelet aggregates to development of thrombosis in patients with advanced cancer]. *Namık Kemal Medical Journal.* 2017;5(1):7-15.
11. Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant tumours. *J Small Anim Pract.* 1996;37(10):462-4. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
12. Owen LN. Classification of tumors in domestic animals. *Veterinary Public Health Unit & WHO Collaborating Center for Comparative Oncology.* Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1980. p.6-21.
13. Baştan A, Zonturlu AK. [The investigation of the relationship between age, tumour character and the localization in canine mammary tumours]. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2002;49: 203-6.
14. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors are seen in the blood after death. *Med J Aust.* 1869;14:146.
15. Ignatiadis M, Georgoulas V, Mavroudis D. Circulating tumor cells in breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008;20(1):55-60. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
16. Küçükusta AR. [Tumor markers]. *Endoskopi Dergisi.* 1992;1:50-2.
17. Okutucu B, Pehlivan S. [Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and application areas]. *Arşiv.* 2003;12:138-48.
18. de Costa A, Oliveira JT, Gärtner F, Kohn B, Gruber AD, Klopfleisch R. Potential marker for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. *Vet J.* 2011;190(1):165-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
19. Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol.* 2011;48(1):85-97. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
20. Meikle CK, Kelly CA, Garg P, Wuescher LM, Ali RA, Worth RG. Cancer and thrombosis: the platelet perspective. *Front Cell Dev Biol.* 2017;4:147. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
21. Gunay Z, Uçmak M, Yıldırım F, Sabuncu A, Tek Ç, Çalışkan E. [Gynecologic pathology complex in a bitch]. *J Fac Vet Med Istanbul Univ.* 2013;39(2):277-83.
22. Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14(1):18-22. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhao QT, Yang Y, Xu S, Zhang XP, Wang HE, Zhang H, et al. Prognostic role of neutrophil to lymphocyte ratio in lung cancers: a meta-analysis including 7,054 patients. *Onco Targets Ther.* 2015;29(8):2731-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
24. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
25. Chomczynski P, Sacchi N. The singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]