

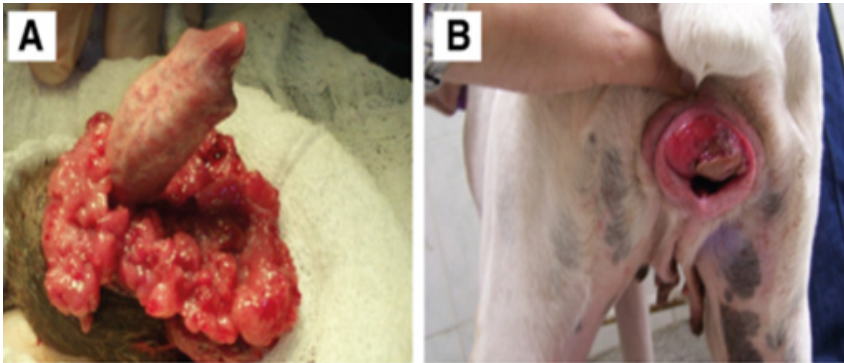
BÖLÜM 6

CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TÜMÖR İÇİN SPESİFİK, GÜNCEL BİOMARKER VE GEN EKSPRESYONLARI

Eren ÇANKAYA¹
Hatice ERÖKSÜZ²

GİRİŞ

İnfeksiyöz sarkoma, venereal granuloma, transmissible lenfosarkoma ve sticker tümörü olarak da bilinen bulaşıcı venereal tümör, köpeklerde hem dış hem de iç genital organlarda görülebilen retikülo-endotelyal kökenli bir tümör olarak tanımlanmaktadır . Çiftleşme ile bulaştırılan bu tümöre özellikle genç ve seksüel olgunluğa ulaşmış dişi köpeklerde rastlanmaktadır. Bazı ülkelerde tümör insidansı ovarioktomi ile paralel olarak azalmıştır. Tümör hücrelerinin genital organ mukozasına implantasyonu sonucunda hayvandan hayvana bulaşma gerçekleşmektedir. TVT' lerde metastaz olaylarının değişik kaynaklarda % 5-17 'den az olduğu ve erkek hayvanlarda metastazın (% 16) dişilere oranla (% 2) daha yaygın olduğu bildirilmiştir (1).



Şekil 1. Köpekte Transmissible venereal tümör (TVT)'nin erkek (A) ve dişi (B) genital organlarda görünümü.

1 Yl. Öğr., Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji AD., cnkyeren@yahoo.com

2 Prof. Dr., Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji AD., heroksuz@firat.edu.tr

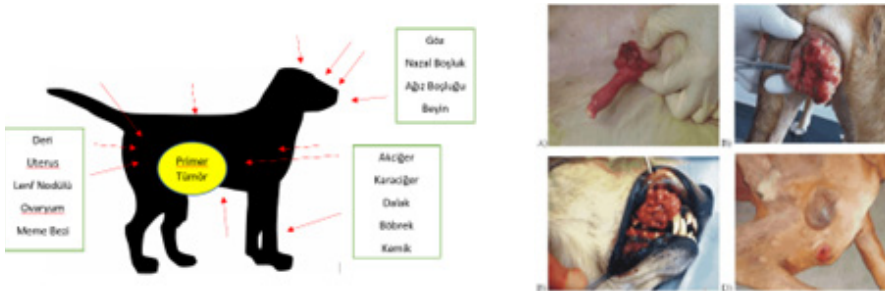
Hem dişi hem de erkek köpeklerde çoğunlukla dış genital organlara yerleşen bu tümör deri, deri altı bağ dokusu, burun, ağız boşluğu göz, beyin, lenf düğümü, karaciğer, dalak, kemik iliği, abdominal, subinguinal bölge, uterus ve ovaryum gibi bir çok organa metastaz yaptığı bildirilmiştir (Şekil 2) (2). Dünyaca yaygın olan bu tümör özellikle sıcak ülkelerde sokak köpeklerinde sık olarak gözlemlenmektedir. Tümörün bulaşıcı olduğu eskiden beri bilinmesine rağmen etiyojisi tam olarak bilinmemektedir. Patoloji tarihinde bulaştırılan ilk tümör olmasının yanında ilk kez Rus Hekim Novinsky tarafından 1863 yılında deneysel olarak gerçekleştirilmiştir (3).

Tarihsel olarak ise ilk bildirilen CTVT vakası 1810'da Londra'da kayıt edilmiştir (4). 1910'dan önce ise Amerika Birleşik Devletleri, Fransa, Almanya, İtalya, Japonya ve Papua Yeni Gine'de de CTVT'nin endemik bir hastalık olduğu belirtilmiş ve vakanın bu ülkelerde görüldüğü kayıt altına alınmıştır (5-9). 1950'lere gelindiğinde yapılan çalışmalarda ise CTVT'nin prevalansında düşüşler kaydedilmiş, 1954'de yapılan diğer bir çalışmada ise New York City' de CTVT'nin insidansında azalma olduğu belirtilmiştir (10-17).

Başlangıçta 1-3 mm çapında, küçük, gülgüni renkte olan neoplastik oluşumlar tedavi edilmediğinde 10-15 mm çapında multilobüler bir yapı kazanır. Böylece karnabahar görünümünde kolay zedelenebilen yapılar haline gelirler. Çoğunlukla benign karakterde olan bu tümörler bağışıklığı düşük hayvanlarda malign karakter gösterebileceği bildirilmiştir. Tüm bunlara rağmen hastalığın lokal invazyon oranı %40, metastaz oranı ise %5 civarındadır (1-6, 8, 9).

Patogenez, Makroskobik ve Mikroskobik Görünüm

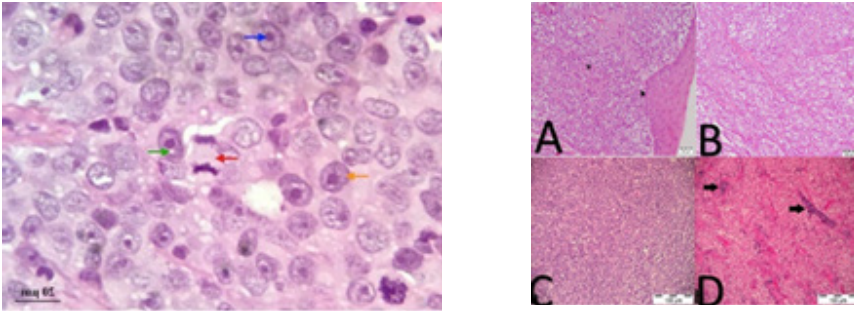
Çiftleşme ve yalama gibi fiziksel temas sırasında neoplastik hücreler hayvanların genital, nazal veya oral mukozasına penetre olmaktadır (7,8). Ayrıca tümörün organlara implantasyonu, doku bütünlüğünün bozulmasıyla da artmaktadır (18, 19).



Şekil 2. Transmissible venereal tümörün metastaz yaptığı doku ve organlar, (TVT)' nin peniste (A), vulvada (B), ağız mukozasında (C), vulva ve deride (D) görünümü

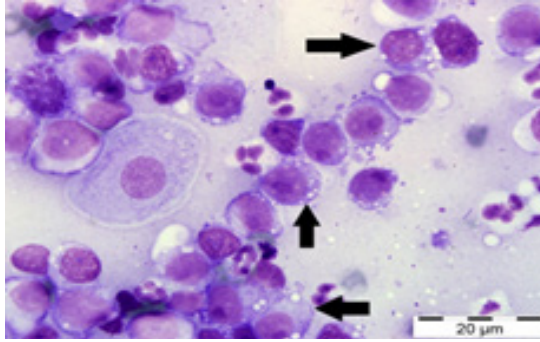
TVT'li köpeklerde mikroskopik olarak ise tümörün yuvarlık, oval, poligonal hücrelerden meydana geldiği gözlemlenir. Sınırları belirgin olan hücreler HE boyamalarda solukturlar. Büyümekte olan tümörlerde ise mitotik aktivite yüksektir. Nükleusta ekzantrik yerleşmiş büyük bir nükleolus bulunur. Tümör hücreleri sık yığılıklar halinde olabildiği gibi, ince vasküler bir stroma ile kordon ya da adacıklara bölünmüş olabilirler (18,19).

Tümör hücreleri histiositik kökenli olup ve belirgin kromozom aberasyonu gösterir. Normal köpeklerde kromozom sayısı 78'dir. Buna karşın venereal tümör hücreleri 57-59 kromozoma sahiptir. Spontan iyileşmeden sonra bağışıklık şekillenir (20). Giemsa ile boyalı sitolojik preparatlarda tümör hücrelerinin sitoplazmasında çok sayıda vakuol bulunması TVT tanısı için tipik bulgulardandır (3). Genel olarak hematoxilen eozin ile boyanan dokular, incelendiğinde (Şekil 3) kümeler halinde dağılmış homojen büyük yuvarlak neoplastik hücreler, belirgin çekirdek ve nükleoller, yoğun eozinofilik bazen ise vakuollü sitoplazma, bazen ise mitotik hücreler gözlemlenmiştir (21).



Şekil 3. Belirgin çekirdek (turuncu ok), mitotik aktivite (kırmızı ok), vakuollü sitoplazma (yeşil ok), neoplastik hücrelerin çekirdeklerindeki (A,B,C,D) veziküler görünüm (yıldız) ve marjinal hiperkromazi (ok)

Tümoral kitleden alınan smearler diff plus (Diff Quick) ile boyanarak incelendiğinde eksantrik yerleşimli çekirdek büyük ve vakuolar sitoplazmaya (Şekil 4) sahip tümör hücrelerinin yanında az sayıda nötrofil lökosit gözlenmektedir (22).

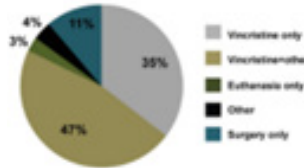


Şekil 4. Boyamada tümör hücrelerinin spesifik görünümü-Diff Quick

TANI, AYIRICI TANI-TEDAVİ

Yapılan klinik muayeneler ve hasta sahiplerinden alınan bilgiler doğrultusunda teşhis kolaylıkla konulabilse de kesin tanı histopatolojik incelemeler sonucunda ortaya konmaktadır. Mikroskopik incelemede, neoplastik hücrelerin çok sık, düzensiz ve hiperkromatik çekirdek özelliğine sahip, çekirdek/sitoplazma oranının ise çekirdek lehine arttığı bildirilmiştir. Ayrıca lenfosit, plazma hücreleri ve makrofajlar gibi yangısal hücrelerinin de histopatolojik kesitlerde arttığı rapor edilmiştir (1-6,8).

TVT hastalığında teşhise giderken ayırıcı tanıda birçok bakımdan önem taşımaktadır. Olguyu değerlendirirken; köpek lenfoması, histiocytoma, mast hücre tümörü, cyctitis, üretritis, prostatitis gibi hastalıkların dışında östrüs gibi fizyolojik olgularda değerlendirilmelidir (23).



Şekil 5. Transmissible venereal tümörlerin köpeklerde tedavi başarı yüzdeleri.

TVT 'li köpeklerde tedavi cerrahi tedavi, radyoterapi, immunoterapi, biyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi protokolleri uygulanmaktadır (Şekil 5) (1,2,8). Radyoterapi tedavisi , TVT olgularında kemoterapiyle birlikte özellikle beyin, göz, burun boşluğu gibi organlara ve dokulara metastaz yaptığı durumlarda tümör lezyonlarının giderilmesi için kullanılır. Radyoterapi yönteminin çok fazla deza-

vantaja sahip olması, tedavi sürecinin uzunluğu sebebiyle çok fazla tercih edilen bir yöntem değildir. Biyoterapi ve immunoterapi yöntemlerinin ise tümör tedavisi üzerindeki etkisi geniş olmamasından dolayı hastalığın tedavisinde tercih edilen en etkili yöntem kemoterapidir (2, 7, 8, 10). Kemoterapi tedavisinde en çok tercih edilen kemoterapik ilaçlar vinkristin sülfat, siklofosfamid ve doksorubisin grubu ilaçlardır. Hastalığın tedavisinde kullanılan siklofosfamid, myelosupresyon ve steril tedavi sürecinde yan etkilere sahip ve en çok karşılaşılan komplikasyon hemorajik sistitistir. Bu nedenle tedavilerde çoğunlukla kemoterapi için 0.025 mg/kg dozunda vinkristin sülfat İV yolla haftada bir kez olmak üzere 2-8 hafta uygulanmaktadır (1-3, 8)

MOLEKÜLER ANLAMDA CTVT

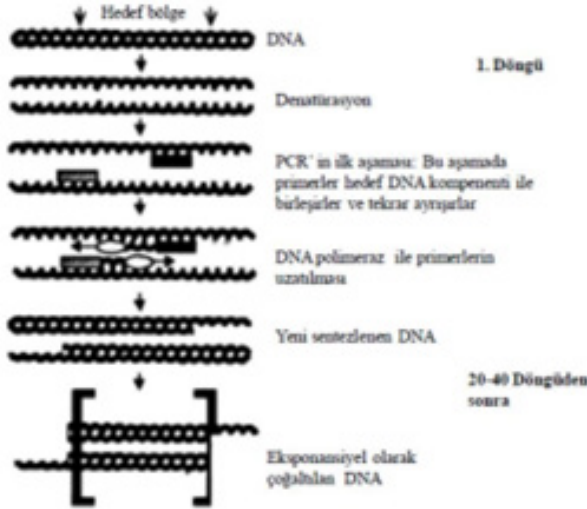
Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Moleküler biyoloji alanındaki çalışmalarda en çok kullanılan yöntemlerden biri olan DNA'nın in vitro koşullarda çoğaltılmasıdır. Bu yöntem ile DNA çok miktarda elde edilerek, moleküler analizinin yapılmasını kolaylık sağlamaktadır. İn Vitro koşullarda çalışılmak istenen genin veya DNA dizisinin çok miktarda kopyasının elde ederek rekombinant DNA yöntemleri ile DNA klonlamasının yanında temeli 1980'li yıllara dayanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu ("Polymerase Chain Reaction") 'da en çok tercih edilen yöntemlerdendir (24).

Polimeraz Zincir Reaksiyonunu (PCR), DNA'ya ulaşmak amacıyla Kary Mullis, yüksek ölçüde duyarlı ve özgün yöntem olarak 1985 yılında ilk kez uygulamış, bu yöntemin bulucusu ünvanına sahip olarak teşhis ve araştırma olanaklarında devrime yol açan başarısından dolayı Nobel ödülünü almıştır. (25)

"*Thermus aquaticus*" olarak adlandırılan bakteriden izole edilmiş, ısıya dayanıklı polimeraz enziminin (taq polimeraz) kullanımına başlamasıyla için PCR otomatize sıcaklık siklüs cihazları icat edilmeye başlanılmıştır. Floresan ışımaya yöntemlerinde kullanılmasıyla Revers Transkriptaz-PCR (RT-PCR)'da istenilen seviyelere gelinmiştir (26). Günümüzde hastalıklara daha kolay bir şekilde tanı konulması, moleküler anlamda teşhise giden yolu kolaylaştırmaktadır (27). Zamanın dar olmasının dışında tanıya giden yolun hızlı ve güvenilir olması gibi sebeplerle, tanı ve epidemiyolojik çalışmalar, günümüzde moleküler yöntemlerin tercih edilmesini sağlamaktadır. Son yıllarda hızlı bir şekilde gelişen ve geçmiş zamanlarda kullanılan moleküler yöntemlerin temelini sağlayan, tanı, tedav, ve birçok sebeple kullanılması tercih edilen moleküler yöntemlerden biri de polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dır (28).

PCR'in aşamaları genel olarak denatürasyon, annealing-ekstansiyon ve son ekstansiyon aşamalarından meydana gelmektedir. (Şekil 6). Çalışmada RNA çalışılmak isteniyorsa, ilk olarak RNA, DNA'ya dönüştürülerek tepkimeye, DNA çoğaltma aşamalarıyla devam edilir (25). PCR uygulamalarında istenilen DNA'nın çoğaltılması ortalama olarak 20-40 siklus içerisinde meydana gelir. Her siklus birbirinden farklı sıcaklıklardan oluşan 3 aşamadan meydana gelmektedir. 3 aşama denatürasyon, kullanılan DNA halkasının açılarak tek zincirli bir DNA'ya dönüşmesidir. 50-60 °C'de gerçekleşen Annealing (birleşme) olarak adlandırılan aşamada ise tek zincirli DNA'nın kullanılan primerlerle bir araya gelerek birleşme aşamasıdır. Extension (uzama) aşaması ise 72°C' de DNA polimeraz enziminin maksimum aktiviteye ulaştığı aşamadır. Tek zincirli DNA'nın bileşenleri ise primerlerin dışında Taq polimeraz enziminin ortamdaki dNTP' ler sayesinde DNA zincirini uzatarak tek zincirli DNA çift zincirli halka yapısına ulaşır. Bu siklus 20-40 döngü şeklinde meydana gelerek devam eder ve hedef DNA istenilen oranda çoğaltılır (29).



Şekil 6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Döngüsü

Siklusların sonucunda DNA fragmenti 2^n kadar çoğaltılır (n = siklus sayısı). Bu işlemin her bir aşaması farklı sıcaklıklarda gerçekleşir. İlk aşamada 94- 98°C; sonrasında ikinci aşamada 37-65°C; ve en son olarak üçüncü aşama 72°C 'de gerçekleşmektedir. Bu aşamaların tamamı bir-iki saat içerisinde tamamlanır (27). Her döngü çift sarmallı bir şablonla başlar ve primerin eşleşebileceği iki tek sarmallı molekül oluşturmak için denatürasyon gerekir. Bu, DNA polimerazın başlangıç

noktası olarak işlev görür ve doğru koşullar mevcut olduğunda uzama meydana gelebilir ve bu da DNA şablonunu iki katına çıkartır (26,27).

Denatürasyon eşleşme-uzama döngüsü tekrarlanır ve şablonun büyütülmesi gerçekleşir (28). Jelde incelenebilecek DNA bantına ulaşmak için ise gerekli olan amplikasyon döngülerinin sayısı hedef DNA'nın ilk yoğunluğuna göre değişmektedir. Örneğin; 50 hedef molekül çoğaltabilmek için 40-45 siklus önerilir, fakat eşit yoğunlukta 3×10^5 molekülü çoğaltmak için 25-30 siklus gerekli olacaktır. Meydana gelen oransızlığa ise "Plato Etkisi" denilmektedir. Bu oransızlığın meydana gelmesinin nedeni kullanılan ürün yoğunluğunun 0,3-1 nM'e geldiği PCR'ın bitmesine yakın meydana gelen reaksiyonlardaki lineer hızındaki düşüştür (27,28).

İlk başta kullanılan ana molekülün yoğunluğunun yetersiz geldiği zamanlarda ise yeni amplikasyonlardan alınan sonuçlar iyi iken siklus sayılarının 40 veya daha fazla uygulanması sonuçlara iyi oranda yansımaz (28,29). Çoğaltılan DNA parçalarının gösterilmesi için agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yapılır. Elektroforez ile boylarına göre ayrıştırılan DNA dizileri etidyum bromür gibi çift zincirli DNA boyaları ile boyanarak morötesi ışık (UV) altında görüntülenir (30).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun Çeşitleri

Günümüzde Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun kullanılmasının kolay olmasını iki temel gelişim tarafından meydana gelmiştir;

1) Aşırı sıcaklıkta yapısını koruyabilen polimeraz enzimlerinin tercih edilmesi ve sonuç olarak tepkime başında kullanılan polimeraz enzimlerinin istenilen siklus boyunca aynı aktivitede olması (25).

b) Sıcaklığın belirli zamanlarda aşamalı bir şekilde istenilen ısıya indirilip, yükseltebilen ısı banyolarının kullanılması. Genel olarak PCR yöntemleri enfeksiyonların tanısı, çalışılmak istenen genlerin izolasyonu, DNA parçalarının çoğaltılmasında büyük öneme sahiptir (25). PCR uygulamalarının zamanla kullanım oranı artmaktadır. PCR uygulamasının ilk uygulanişından bu yana gelişmekte olan sanayi ve teknolojiyle birlikte pek çok PCR tekniği ortaya çıkmıştır. Bu uygulamalardan bazıları Real Time PCR, Kantitatif PCR, Ters Transkriptaz PCR, Nested PCR ve Multipleks PCR dir (20). Multiplex PCR: Eşzamanlı analizlerine izin veren tek bir PCR'de birden fazla hedefi büyötmek için kullanılır (27). Bir dizi farklı genetik lokasyondaki mutasyonları veya aynı genetik lokus içindeki çoklu mutasyonları saptamak için kullanılan temel PCR'nin bir modifikasyonudur (25,26). Nested PCR: Beklenmedik primer bağlanma bölgelerinin amplifikasyonu nedeniyle ürünlerin spesifik olmayan bağlanmasını azaltmaya yönelik modifiye edilmiş bir

PCR'dir. İki PCR adımı içerir. İlk PCR reaksiyonunda, ikinci PCR 26 reaksiyonu için bir hedef görevi gören DNA ürünlerini üretmek için bir çift primer kullanılır. DNA amplifikasyonunun özgülüğünü arttırmaya yardımcı olur (30).

Reverse transcriptase PCR: RT-PCR, başlangıç materyali olarak mRNA'yı içermiştir ve mRNA'yı tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürmek için ters transkriptaz kullanır. Bu cDNA daha sonra düzenli PCR yardımıyla büyütülür (27). Real time PCR(Quantitative PCR): Belirli bir örnekteki hedef DNA (veya RNA) miktarını nicellemek için kullanılır. Amplifikasyon ilerledikçe PCR ürününün kantitatif tahminine izin verir. SYBR® green I veya floresan rezonans enerji transferi gibi spesifik olmayan boya kullanır. Daha sonra DNA ürünleri içindeki bazların sırasını belirlemek için PCR ürünleri dizilir (30).

MYC GENİ

Myc geni , onkogenler ailesinin bir üyesi olup, mutasyon durumunda anormal büyüme hızı ve bölünmeyen bir hücrede bölünmenin tetiklenmesine sebep olan bir gen dir (31).

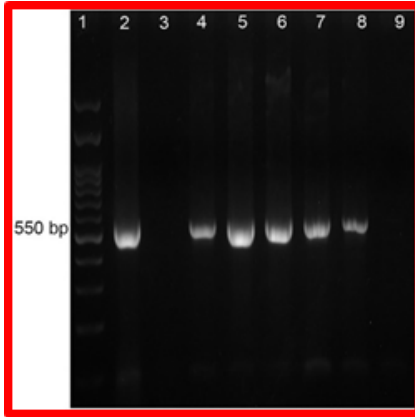
c-Myc geni, hücresel metabolizma ve proliferasyonunun “ana düzenleyicisi” olarak hizmet eder. Çok sayıda onkojenik yolak tarafından aktive edildiğinden ve karşılığında malign dönüşümle sonuçlanan birçok metabolik değişikliği uyardığından, karsinogenezde büyük önem taşır (31).

Normal koşullar altında c-Myc, ekspresyonu ve işlevi için mitojenik stimülasyona bağlıdır. c-Myc, hızlı hücre bölünmesi için gerekli olan çoklu sentetik fonksiyonları çalıştırırken aynı zamanda antiproliferatif fonksiyonlara sahip genlerin ekspresyonunu inhibe eden çok fonksiyonlu bir transkripsiyon faktörüdür. Apoptozu indükleme eğilimi nedeniyle ekspresyonu sıkı bir şekilde düzenlenir. Dönüştürülmüş hücrelerin anormal büyüme yeteneklerine katkıda bulunan çok çeşitli gen ailelerinin ifadesini etkiler. Hücre fonksiyonunun düzenlenmesindeki bu merkezi rolün, yeni kanser tedavileri geliştirmek için eşsiz bir fırsatı temsil ettiği oldukça açıktır (31,32).

CTVT hücreleri, *myc* geninin üst bölgesinde spesifik uzun şekilde yerleşmiş nükleer elementler (LINE) içerir ve bu, tanısal polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı bir saptama tahliline izin verir. CTVT'ler de histiositik tümörlerle aynı orijini paylaşır, bu nedenle immünohistokimyasal yöntemler bazı durumlarda yetersiz kalabilir (31).

CTVT, normal somatik hücrelerde ve diğer tümör hücrelerinde bulunmayan bir c- myc gen yeniden düzenlemesine dayanan bir moleküler özelliğe sahiptir. Bu

nedenle, cmyc, LINE elementinin varlığından kaynaklı in situ polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve tartışmalı vakalarda konvansiyonel PCR kullanılarak (Şekil 7) CTVT vakalarının daha hızlı ve güvenilir teşhisini yapmak için bir tanı aracı olarak kullanılmıştır (31,32).



TVT orijinli LINE1 -c- myc gen yeniden düzenlemesinin PCR tespiti

PCR ürünleri

(1=100 bp DNA işaretçisi, 2= PK

(pozitif kontrol grubu) , 3= NK

(negatif kontrol grubu) , 4-9, vajinal

kitle , cilt kütlesi , nazal kitle , burun

kütlesi ve kronik inflamasyon

Şekil 7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda c-myc Geninin İncelenmesi

KAYNAKLAR

1. Martins MIM., Souza F, Gobello C. The canine transmissible venereal tumor: etiology, pathology, diagnosis and treatment. In "Recent Advances in Small Animal Reproduction" Eds., PW Concannon, G England, J Verstegen and C Linde-Forsberg. *International Veterinary Information Service*. 2005. Ithaca NY.
2. Moulton JE. Tumours in Domestic Animals. University of California Press. Berkeley and Los Angeles. 1978. California.
3. Çiftci MK, Erer H, Kiran MM. Veteriner Temel Patoloji, *Atlas Yayınevi Ankara*. 2016
4. Blaine DP. A Domestic Treatise on the Diseases of Horses and Dogs London T Boosey. 1810.
5. Sticker A. Transplantables Lymphosarcom des Hundes. *Z Krebsforsch* 1904, 1:413-444.
6. Beebe SP. The growth of lymphosarcoma in dogs-summary of recent observations. *JAMA*. 1907. 49(18):1492-1493.
7. Borrel MA. Lymphosarcome du chien. *Sem Med (Paris)* 1907, 27:94-95.
8. Sticker A. Ueber den Krebs der Thierte. *Arch Klin Chir* 1902, 65:1023-1087.
9. Çine T. Köpeklerde sitolojik muayene ile transmissible veneral tümör insidansının araştırılması. 2019. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
10. Sticker A. Transplantables Rundezellensarkom des hundes Ein beitrage zur Lehre der Krebsübertragbarkeit. *Z Krebsforsch* 1906, 4:227-314.
11. Sticker A. Endemischer Krebs. *Z Krebsforsch* 1907, 5(2):215-224.
12. Bergell P, Sticker A. Ueber Pathogenese und über den spezifischen Abbau der Krebsgeschwulste. *Dtsch Med Wochenschr*. 1907, 2(38):1521-1522.
13. Von BE. Gelungene Carcinomübertragung beim Hunde. *Centralbl Chir* 1895.
14. Duplay S. Tumeurs expérimentales chez les animaux. *Atti dell'XI Congresso Medico Internazionale Roma*. 1894. 2:103-104.
15. Hobday F. Observations on contagious venereal tumours in canine patients. *Vet J*. 1905, 2:342-

346.

16. Smith GB, Washbourn JW. Pathological society of London. Meeting held on 6th April. *Lancet*.1897, 10:1025–1026.
17. Hobday F. Surgical Diseases of the dog and cat and Anaesthetics (Second Edition). 8 Henrietta Street: Bailliere, Tindall and Cox; 1906:266–270. and 291–292.
18. Özyurtlu N, Bademkiran S, Ünver Ö, Yıldız F, İçen H. Dişi bir köpekte transmissible venereal tümörün abdominal ve subkutan inguinal bölgeye metastazı. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*. 2008; 1: 48-51.
19. Gülbahar MY, Hazıroğlu R. Bir köpekte ekstragenital metastazlı transmissible venereal tümör olgusu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1995; 4: 441-444.
20. Uçar M. Transmissible venereal tümör. *Kocatepe Vet J* 2016; 9: 230-235.
21. Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. Disorders of the canine vagina, vestibule, and vulva. In: Canine and Feline Theriogenology. W.B. Saunders Company, *Philadelphia*, 2001. 225242.
22. Ogilvie GK, Moore AS. Tumors of the reproductive system. In: Managing the Veterinary Cancer Patient: A practice manual. Trenton, NJ, *Veterinary Learning Systems*. 1995; pp 415-429
23. Yang TJ. Immunobiology of a spontaneously regressive tumor, the canine transmissible venereal sarcoma (Review). *Anticancer Res*. 1988,8:93-96
24. Temizkan G, Temel AN. İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri Genomik ve Proteomik Analizler. *Nobel Tıp Kitabevleri*, 2017.
25. Kahya S, Büyükcangaz E, Çarlı KT. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. *Uludağ University J.Fac.Vet.Med*. 2013, Cilt 1. 1:31-38.
26. Sayitoğlu MA, “Hematolojide Real Time PCR” <http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/mugeaydinsayitoglu.pdf> [Erşim Tarihi:18.04.2020]
27. Zamani AG, Genetik Tanı Yöntemleri. KonyaTürk Toraks Derneği Okulu
28. Kahya S, Yılmaz Ö, Carlı TK. Enfeksiyöz Hayvan Hastalıklarının Teşhisinde Gerçek Zamanlı (Real Time) Pcr'ın Geleneksel Pcr'a Göre Avantajları. *Uludağ Univ. J. Fac.Vet.Med*. 2014, Cilt 2. 2:39-44.
29. Okutucu B, Pehlivan S. Revers-Trankriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rt-Pcr) Ve Uygulama Alanları. *Arşiv*. 2003, Cilt 12.
30. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. Meyer N, Penn LZ. MYC ile 25 yılı yansıtmak. *Nat Rev Kanser*. 2008; 8 :976-990.
31. Hann SR, Eisenman RN. İnsan c-myc onkogeni tarafından kodlanan proteinler: neoplastik hücrelerde diferansiyel ekspresyon. *Mol Hücre Biol*. 1984; 4 :2486–2497.
32. Meyer N, Penn LZ. MYC ile 25 yılı yansıtmak. *Nat Rev Kanser*. 2008; 8 :976-990.