T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KANİN KUTANÖZ MAST HÜCRE TÜMÖRLERİNDE Kİ67, BAX, BCL-2, KİT VE CD25 EKSPRESYONUNUN TÜMÖR DERECELENDİRİLMESİ VE PROGNOZ İLE İLİŞKİSİ

IŞIL AYTEMİZ DANYER

DANIŞMAN
PROF. DR. AYDIN GÜREL

PATOLOJİ ANABİLİM DALI
PATOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2020

Bu çalışma 26.06.2020 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Pataloji Anabilim Dalı, Patoloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Aydın Gürel
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Funda Yıldırım
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Zini Mutlu
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Gürsel Sönmez
Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Oğuz Kul
Kırıkkale Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Işıl Aytemiz Danyer

İTHAF

Sevgili dedem Emekli Tank Yarbay Recep Melih Özkul'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Başta doktora babam Prof. Dr. Aydın Gürel'e, çalışmanın planlanmasından immunohistokimya yöntemini öğrenmeme kadar pek çok noktada üzerimde emeği olan Doç. Dr. Funda Yıldırım'a, her başım sıkıştığında danıştığım Prof. Dr. Seçkin Serdar Arun'a, bayram tatilini benimle laboratuvarda geçiren Dr. Damla Haktanır'a, optimizasyonları yaparken tıkandığımda yol gösteren Doç. Dr. Gülbin Şennazlı, Doç. Dr. Kıvılcım Sönmez ve Dr. Gülay Yüzbaşıoğlu Öztürk'e, doktora öğrenimim boyunca sadece profesyonel bilgileriyle değil bu süreç boyunca yaşam tecrübeleriyle de beni donatan hocalarım, Prof. Dr. İbrahim Fırat, Prof. Dr. Ahmet Gülçubuk, Dr. Özge Erdoğan Bamaç'a, yüzlerce kesit alırken ağrılarına rağmen bana yardım eden Laborant Sevgi Eren'e ve tabii ki yolu güzel kılan patoloji ailemin minnaklarına;

Laboratuvar çalışmaları sürecinde çok değerli bilgi birikimini ve laboratuvar olanaklarını benimle cömertçe paylaşan Prof. Dr. Oğuz Kul'a, bitmeyen enerjisiyle yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Merve Bişkin Türkmen'e ve Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Kürsüsüne;

İstatistikleri yaparken yardımını esirgemeyen, her zaman yanımda olan hayat arkadaşım Dr. Erdem Danyer'e;

Olguların klinik takiplerini yapan ve mesleki bilgilerini benimle paylaşan, çalışmam sırasında kendilerinden çok şey öğrendiğim klinisyen meslektaşlarıma;

Hastalıkları boyunca titizlikle küçük dostlarının yanında olan ve süreci onlarla yaşarken her ayrıntıyı benimle de paylaşan hasta sahiplerine;

Manevi desteği ile hem lisans öğrenimim hem doktora sürecim boyunca her zaman yanımda olan Prof. Dr. Tanay Bilal'e;

Tutkum olan deniz memelileri alanında bana sürekli yeni ufuklar açmaya devam eden ve patoloji alanında doktora yapmam konusunda beni teşvik eden TÜDAV aileme teşekkür ederim.

Her zaman, her türlü desteği ile yanımda olan aileme ne kadar teşekkür etsem az, kelimelerim kifayetsiz. Hayatımdaki en güzel şey sizsiniz. Sizi çok seviyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-21181

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XİV
ÖZET XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Deri ve Tümörleri Hakkında Genel Bilgiler 4
2.2. Mast Hücreleri Hakkında Genel Bilgiler 8
2.3. Mast Hücre Tümörleri (MCT) Hakkında Genel Bilgiler 10
2.4. Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörleri (CCMCT) Hakkında Genel Bilgiler 11
2.5. Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörlerinde Teşhis Yöntemleri 13
2.5.1. Sitoloji 13
2.5.2. Histopatoloji ve Histopatolojik Derecelendirme 15
2.5.3. İmmunohistokimya (İHK) 19
2.5.4. Diğer Yöntemler 20
2.6. Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörlerinin Prognozu ve Önemli Prognostik Faktörler 21
2.6.1. Histolojik Derece 22
2.6.2. Klinik Evrelendirme (Staging) 25
2.6.3. Klinik Bulgu ve Parametreler 26
2.6.3.1. Tümörün Bulunduğu Yer (Lokalizasyon) ve Boyutu 26
2.6.3.2. Irk, Yaş ve Cinsiyet 27
2.6.3.3. Senkronize Çoklu Tümör Gelişimi 28
2.6.3.4. Cerrahi Sınırlar 28
2.6.3.5. Tümörle İlişkili Sistemik Klinik Bulgular 30

2.6.4. Histopatolojik ve Moleküler Bulgular 30
2.6.4.1. Ki67 32
2.6.4.2. Bax 33
2.6.4.3. Bcl-2 33
2.6.4.4. KIT (CD117, c-kit) 34
2.6.4.5. CD25 38
2.6.4.6. Mitotik İndeks 39
3. GEREÇ VE YÖNTEM 41
3.1. Araştırmada Kullanılan Dokularının Toplanması 41
3.2. Hastaların Klinik ve Prognostik Bilgilerinin Toplanması 41
3.3. Histopatolojik Değerlendirme 42
3.4. İmmunohistokimyasal Boyamalar 43
3.4.1. İmmun Reaksiyonların Değerlendirilmesi 45
3.5. İstatistik Analizleri 47
3.6. Sağ Kalım Sürelerinin Hesaplanması 48
4. BULGULAR 49
4.1. Genel ve Klinik Bulgular 49
4.2. Histopatolojik Bulgular 61
4.2.1. Tümörlerin Patnaik Üçlü Sistemine Göre Derecelendirilmesi 63
4.2.2. Tümörlerin Kiupel Derecelendirme Sistemine Göre Değerlendirilmesi 66
4.2.3. Mitotik İndeks 68
4.2.4. Histopatolojik Bulgular ile İlgili Şekiller 73
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular 78
4.3.1. KIT 78
4.3.2. Ki67 81
4.3.3. CD25 84
4.3.4. Bcl-2 88
4.3.5. Bax 90
4.3.6. İmmunohistokimyasal (İşaretlenmiş Streptavidin-Biyotin-Peroksidaz Tekniği) Boyama ile İlgili Şekiller 94
4.4. Bulgulara İlişkin Özetleyici Tablolar 104
5. TARTIŞMA 106
KAYNAKLAR 124

HAM VERİLER 136
FORMLAR 137
ETİK KURUL KARARI 138
PATENT HAKKI İZNİ 139
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....140
ÖZGEÇMİŞ 141

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Evcil hayvanlarda görülen deri tümörleri, Mauldin ve Peters-Kennedy (2016)'dan uyarlanmıştır. 6
Tablo 2-2: Türlere göre mast hücrelerin özellikleri, Kiupel (2017)'den. 9
Tablo 2-3: Bostock derecelendirme sistemi, Bostock (1973)'ten. 17
Tablo 2-4: Patnaik derecelendirme sistemi, Patnaik ve ark. (1984)'ten. 18
Tablo 2-5: MCT değerlendirilmesinde dereceler ve önemli oluşumlar Ehrhart ve ark. (2013)'ten. 19
Tablo 3-1: İmmunohistokimya çalışmalarında kullanılan antikorların özellikleri. 45
Tablo 3-2: KIT boyanma paternleri, Kiupel ve ark. (2004)'dan. 46
Tablo 4-1: Hastalara ait bilgiler 50
Tablo 4-2: Hastaların yaşlarına ilişkin tanımlayıcı istatikler 55
Tablo 4-3: Cinsiyet ve kısırlaştırmanın yaşam süresine etkisi 57
Tablo 4-4: Tümör lokalizasyonunun yaşam süresi ile ilişkisi 58
Tablo 4-5: Tümörlerin boyutlarına ilişkin istatistiki veriler 59
Tablo 4-6: Yaşam süresi ve nüks'ün Kaplan Meier analizi verileri 59
Tablo 4-7: Yaşam süresi ve tümör sayısının Kaplan Meier analizi verileri 60
Tablo 4-8: Histopatolojik derecelendirme ve immunohistokimyasal bulgular 62
Tablo 4-9: Nüks varlığının Patnaik derecelerine göre dağılımı 64
Tablo 4-10: Teşhisten sonraki yaşam süresinin Patnaik derecelerine göre dağılımı 64
Tablo 4-11: Yaş ve tümör boyutunun Patnaik derecelerine göre farkları 65
Tablo 4-12: Nüks varlığının Kiupel derecelerine göre dağılımı 66
Tablo 4-13: Kiupel derecelendirme sistemine göre yaşam süreleri 66
Tablo 4-14: Kiupel derecesi ile yaş ve boyut verilerinin dağılımı 67
Tablo 4-15: Mİ gruplarına göre sağ kalım süreleri verileri 69
Tablo 4-16: Patnaik II. derece tümörlerin Mİ gruplarına göre yaşam süreleri 70
Tablo 4-17: Nüks bulunan ve bulunmayan tümörlerde Mİ dağılımı 71
Tablo 4-18: Mİ'nin (n) ölüm nedenlerine göre değişimi (tüm olgular) 72
Tablo 4-19: Mİ'nin (n) ölüm nedenlerine göre değişimi (Patnaik II. derece tümörler) . 72
Tablo 4-20: Nüks ve KIT boyanma paternlerinin dağılımı 78
Tablo 4-21: Patnaik derecelendirme sistemine göre tümörler ve KIT paternlerinin dağılımı 78

Tablo 4-22: Kiupel derecelendirme sistemine göre tümörlerin KIT paternlerinin dağılımı 79
Tablo 4-23: KIT paterni ile yaşam süresi verilerine göre dağılımı..... 79
Tablo 4-24: Ki67 indeksinin ölüm/yaşam bilgisine göre dağılımı 81
Tablo 4-25: 0,018 eşik değerine göre Ki67 indeksi ve yaşam süresi verileri..... 81
Tablo 4-26: Ki67 ve nüks verilerinin ilişkisi..... 83
Tablo 4-27: CD25 ekspresyonu ile Patnaik derecelerinin incelenmesi 85
Tablo 4-28: Kiupel derecelerinin CD25 ekspresyonuna göre dağılımı 85
Tablo 4-29: CD25 ekspresyonu gruplarının yaşam süresi verileri 85
Tablo 4-30: Mİ 5 eşik değerine göre grupların CD25 ekspresyonu dağılımları..... 87
Tablo 4-31: Nüks varlığının CD25 ekspresyonuna göre dağılımı..... 87
Tablo 4-32: Bcl-2 reaksiyonu ile teşhisten sonraki ortalama sağ kalım süreleri 88
Tablo 4-33: Mİ'nin Bcl-2 ekspresyonu verilerine göre dağılımı..... 89
Tablo 4-34: Bcl-2 ekspresyonunun Patnaik derecelerine göre dağılımı..... 89
Tablo 4-35: Bcl-2 ekspresyonunun Kiupel derecelerine göre dağılımı..... 89
Tablo 4-36: Bcl-2 Ekspresyonu ile nüks verilerinin dağılımı..... 90
Tablo 4-37: Bax ekspresyonunun Patnaik derecelerine göre dağılımı 90
Tablo 4-38: Bax ekspresyonunun Kiupel derecelerine göre dağılımı 91
Tablo 4-39: Bax ekspresyonunun teşhisten sonraki yaşam sürelerinin dağılımı..... 91
Tablo 4-40: Nüks ve Bax ekspresyonunun ilişkisi 93
Tablo 4-41: Genel bulgulara ilişkin istatistik sonuçları..... 104
Tablo 4-42: Histopatolojik bulgulara ilişkin istatistik sonuçları 104
Tablo 4-43: İmmunohistokimyasal boyamalara ilişkin istatistik sonuçları 105

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: CCMCT'lerin prognostik değerlendirmesi, Kiupel (2017)'den. 22
Şekil 4-1: Erkek ve dişilerin yaşlarının dağılımı 55
Şekil 4-2: Irkların dağılımları (%) 56
Şekil 4-3: Cinsiyetin ırklara göre dağılımı 57
Şekil 4-4: Nüks'ün yaşam süresini tanımlayan grafiği 60
Şekil 4-5: Farklı Patnaik derecelerinin yaşam süreleri grafiği 65
Şekil 4-6: Kiupel derecelendirme sistemine göre sağ kalım süreleri grafiği 67
Şekil 4-7: Mİ'in Patnaik derecelerine göre dağılımı 68
Şekil 4-8: Kiupel dereceleri ile Mİ sıklık dağılımları 69
Şekil 4-9: Mİ gruplarının yaşam süresi grafiği 70
Şekil 4-10: Mİ'nin Patnaik II. derece tümörlerde sağ kalım süresi ile ilgili fonksiyon .. 71
Şekil 4-11: Olgu no:5, Patnaik derecesi: I, Kiupel derecesi: I, Hematoksilen Eosin, 10×, Bar: 100µm 73
Şekil 4-12: Olgu no:5, Patnaik derecesi: I, Kiupel derecesi: I, Hematoksilen Eosin, 40×, Bar: 20µm 73
Şekil 4-13: Olgu no:2, Patnaik derecesi: II, Kiupel derecesi: I, Hematoksilen Eosin, 10×, Bar: 100µm 74
Şekil 4-14: Olgu no:2, Patnaik derecesi: II, Kiupel derecesi: I, Hematoksilen Eosin, 40×, Bar: 20µm 74
Şekil 4-15: Olgu no:7, Patnaik derecesi: II, Kiupel derecesi: II, Hematoksilen Eosin, 100×, Bar: 100µm 75
Şekil 4-16: Olgu no:7, Patnaik derecesi: II, Kiupel derecesi: II, Hematoksilen Eosin, 40×, Bar: 20µm, Oklar: mitotik figürler. 75
Şekil 4-17: Olgu no:10, Patnaik derecesi: III, Kiupel derecesi:II, Hematoksilen Eosin, 10×, Bar: 100µm, ... 76
Şekil 4-18: Olgu no:10, Patnaik derecesi: III, Kiupel derecesi: II, Hematoksilen Eosin, 40×, Bar: 20µm, Oklar: mitotik figürler. 76
Şekil 4-19: Olgu no:32, Patnaik derecesi: III, Kiupel derecesi: II, Giemsa, 40×, Bar: 20µm 77
Şekil 4-20: Olgu no:32, Patnaik derecesi: III, Kiupel derecesi: II, Hematoksilen Eosin, 40×, Bar: 20µm, Oklar: Çok çekirdekli hücreler. 77

Şekil 4-21: KIT paternindeki değişiminin yaşam süresine etkisi 80
Şekil 4-22: Olguların KIT paternlerine göre Mİ dağılımının kutu çizgi grafiği..... 80
Şekil 4-23: 0,018 eşik değerine göre Ki67 indeksi ve yaşam süresi grafiği..... 82
Şekil 4-24: Ki67 indeksinin Patnaik derecelerine göre dağılımı 82
Şekil 4-25: Ki67 indeksinin Kiupel derecelerine göre sıklılık dağılımı 83
Şekil 4-26: Ki67 indeksinin tümör lokilazyonuna göre gruplandırması..... 83
Şekil 4-27: Ki67 ile Mİ ilişki grafiği 84
Şekil 4-28: CD25 gruplarının yaşam süreleri grafiği..... 86
Şekil 4-29: Mİ'nin CD25 gruplarına göre dağılımı 87
Şekil 4-30: Bcl-2 Ekpresyonu ve sağ kalım süresi grafiği..... 88
Şekil 4-31 Düşük ve yüksek Bax ekspresyonu gösteren olguların sağ kalım grafiği..... 92
Şekil 4-32: Mİ verilerinin Bax ekspresyonları gruplarına göre sıklık dağılımları 92
Şekil 4-33: Olgu no:3, KIT ekspresyonu, Patern:1, DAB. 40×, Bar: 20µm..... 94
Şekil 4-34: Olgu no:7, KIT ekspresyonu, Patern:2, DAB. 40×, Bar: 20µm..... 94
Şekil 4-35: Olgu no:30, KIT ekspresyonu, Patern:3, DAB. 40×, Bar: 20µm..... 95
Şekil 4-36: Olgu no: 24, Ki67 ekspresyonu, DAB. 20×, Bar: 50µm..... 95
Şekil 4-37: Olgu no: 15, Ki67 ekspresyonu, DAB. 40×, Bar: 20µm..... 96
Şekil 4-38: Olgu no: 13, Ki67 ekspresyonu, DAB. 40×, Bar: 20µm..... 96
Şekil 4-39: Olgu no:34 CD25 ekspresyonu <%5, AEC. 40×, Bar: 20µm..... 97
Şekil 4-40: Olgu no:53 CD25 ekspresyonu %5-%39, AEC. 10×, Bar: 100µm..... 97
Şekil 4-41: Olgu no:28 CD25 ekspresyonu %39-%79, AEC. 10×, Bar: 100µm..... 98
Şekil 4-42: Olgu no: 28 CD25 ekspresyonu %39-79, AEC. 40×, Bar: 20µm..... 98
Şekil 4-43: Olgu no: 27, CD25 ekspresyonu >%79, AEC. 10×, Bar: 100µm..... 99
Şekil 4-44: Olgu no: 27, CD25 ekspresyonu >%79, AEC. 40×, Bar: 20µm..... 99
Şekil 4-45: Olgu no:24, Düşük Bcl-2 ekspresyonu, DAB. 40×, Bar: 20µm 100
Şekil 4-46: Olgu no:24, Düşük Bcl-2 ekspresyonu, DAB. 10×, Bar: 100µm 100
Şekil 4-47: Olgu no:29, Yüksek Bcl-2 ekspresyonu, DAB. 10×, Bar: 100µm..... 101
Şekil 4-48: Olgu no:29, Yüksek Bcl-2 ekspresyonu, DAB. 40×, Bar: 20µm..... 101
Şekil 4-49: Olgu no:27, Yoğun Bax ekspresyonu, intrasitoplazmik yerleşimli, DAB. 10×, Bar: 100µm 102
Şekil 4-50: Olgu no:27 Yoğun Bax ekspresyonu, intrasitoplazmik yerleşimli, DAB. 40×, Bar: 20µm 102

Şekil 4-51: Olgu no:6, Hafif Bax ekspresyonu, intrasitoplazmik yerleşimli, DAB. 4×, Bar: 200µm 103
Şekil 4-52: Olgu no:6, Hafif Bax ekspresyonu, intrasitoplazmik yerleşimli, DAB. 40×, Bar: 20µm 103

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AgNOR	Argirofilik çekirdekçik yapıcı bölge, argyrophilic nucleolar organizing region
BALT	Bronş ilişkili lenf doku, Bronchus associated lymphoid tissue
CCMCT	Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörü, Canine cutaneous mast cell tumor
CD25	Interlöykin 2Rα (IL-2Rα)
CMCT	Kutanöz Mast Hücre Tümörü, cutaneous mast cell tumor
GALT	Barsak ilişkili lenfoid doku, Gut associated lymohoid tissue
H.E.	Hematoksilen Eozin
İHK	İmmunohistokimya
İTD	İnternal Tandem Duplikasyon
MCT	Mast Hücre Tümörü, mast cell tumor
Mİ	Mitotik İndeks
PCNA	Prolifere olan hücre nükleer antijeni, proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu, polymerase chain reaction
SALT	Deri ilişkili lenfoid doku, skin associated lymphoid tissue
WHO	Dünya Sağlık Örgütü, World Health Organization

ÖZET

Aytemiz Danyer, I (2020). Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörlerinde Ki67, Bax, Bcl-2, Kit ve CD25 Ekspresyonunun Tümör Derecelendirilmesi ve Prognoz ile İlişkisi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Patoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörleri (CCMCT) köpeklerde çok farklı biyolojik davranışlar gösteren sık görülen bir hastalıktır. CCMCT değerlendirilmesinde farklı histolojik derecelendirme sistemleri kullanılmakta, bu sistemlerin prognoz hakkında daha iyi fikir verebilmeleri açısından diğer prognostik indikatörlerle desteklenmeleri gerekmektedir. Bu çalışmada, köpeklerden alınan boyut, çap, dış bakı gibi morfolojik özellikleri kaydedilip %10 formalin solüsyonu içerisinde tespit edilmiş ve histopatolojik incelemelerde CCMT olarak tespit edilmiş 54 tümör kitlesi üzerinde çalışılmıştır. Bu tümöral kitlelerin histopatolojik yapılarıyla beraber bu tümörlerde Ki67, Bax, Bcl-2, KIT ve CD25 ekspresyonları immunohistokimya yöntemiyle incelenmiş ve olguların mitotik indeksleri (Mİ) belirlenerek hem Patnaik hem Kiupel derecelendirme sistemleri ile ilişkileri araştırılmıştır. Mİ ile derecelendirme sistemleri arasında, yaşam süresi açısından önemli bir ilişki olduğu saptanmış, Mİ için 5 eşik değerinin prognoz ile ilişkili olduğu görülmüştür. KIT paternleri ile derecelendirme sistemleri ve Mİ arasında yüksek bir ilişki olduğu, yaşam süresinin II. boyanma paterninde I. ve III. paternlere göre önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Genel olarak hastaların Ki67 indeksleri arasında önemli fark gözlenmezken Ki67 indeksi 0,018 eşik değeri üzerinden değerlendirildiğinde, yaşam süresi ile ilişkili bulunmuştur. CD25 ekspresyonu ile Patnaik derecelendirme sistemi ve Mİ arasında ilişki gözlenirken Kiupel derecelendirme sistemi ile ilişki gözlenmemiş, CD25 % oranı azaldıkça yaşam süresinin azaldığı gözlenmiştir. Bcl-2 reaksiyonunun yaşam süresi ile ilişkili olmadığı görülmüştür. Bax ekspresyonunun her iki derecelendirme sistemiyle de ilişkili olduğu, düşük Bax ekspresyonu görülen olgularda teşhisten sonraki ortalama yaşam süresinin yüksek Bax ekspresyonu gösteren olgulara göre daha uzun olduğu gözlenmiştir. Bu bağlamda, KIT, Ki67, CD25 ve Bax immunohistokimyasının kötü prognozun ortaya koyulmasında tamamlayıcı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler : Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörü, Ki67, Bax, Bcl-2, KIT, CD25

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-21181

ABSTRACT

Aytemiz Danyer, I (2020). Evaluation of Ki67, Bax, Bcl-2, KIT and CD25 in Canine Cutaneous Mast cell Tumours and their relation with prognosis. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Pathology. Doctoral Dissertation. Istanbul.

Canine Cutaneous Mast Cell Tumors (CCMCTs) are common neoplasms of dogs and show various biological behaviors. Different histological grading systems are used for the evaluation of CCMCTs and they should be supported by other prognostic indicators to provide better insight for the prognosis. In this study, 54 samples histopathologically determined as CCMT were used. The samples were fixated in 10% formalin solution Morphological characteristics and gross examination data were recorded. Ki67, Bax, Bcl-2, KIT and CD25 expressions examined with immunohistochemistry, and mitotic index is also determined and correlated with both Patnaik and Kiupel grading systems. There was a significant relationship between Mİ and grading systems in terms of survival, and cutoff value 5 for Mİ was associated with prognosis. There was a correlation between KIT patterns and grading systems and Mİ. Survival is decreased in group with KIT pattern II comparing to pattern I and III. In general, no significant difference was observed between the Ki67 indexes of patients, however Ki67 was found to be correlated with survival when evaluated over the 0.018 cutoff value. There was a relationship between CD25 expression with Patnaik grading system and MI. It was observed that the survival time decreased as CD25 expression decreased. Bcl-2 reaction was not associated with survival. It was observed that Bax expression was associated with both grading systems, and in patients with low Bax expression, the mean survival was longer than in patients with high Bax expression.It is thought that immunohistochemistry of KIT, Ki67, CD25 and Bax may be used as a complement to the grading systems when evaluating the poor prognosis.

Key Words: Canin cutaneous mast cell tumor, Ki67, Bax, Bcl-2, KIT, CD25

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University Cerrahpasa. Project No. TDK-2016-21181

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörleri (CCMCT- Canine Cutaneous Mast Cell Tumor) köpeklerde tüm neoplazmaların % 7 ila % 21'ini ve kanin malign (habis) deri tümörlerinin % 11 ila 27'sini oluşturan ve çok farklı biyolojik davranışlar gösteren ve sık görülen bir neoplastik (tümöral) hastalıktır (Macy 1985; Preziosi, Morini ve ark. 2004). CCMCT derecelendirilmesinde 1984'ten bu yana 3 kademeden oluşan Bostock (Bostock 1973) ve Patnaik (Patnaik ve ark. 1984) derecelendirme sistemleri kullanılmış ancak son dönemde, bu derecelendirme sisteminde II. derece tümörlerde hem malign hem benign (selim) tümörlerin bir arada bulunmasının prognoz açısından hatalara neden olduğu öne sürülmüş ve 2 kademeli yeni bir sistem önerilmiştir (Kiupel ve ark. 2011). Söz konusu sistemlerin prognoz hakkında daha iyi fikir verebilmeleri ve özellikle üç dereceli sistemlerdeki II. derece tümörlerde daha iyi sonuçlar alınabilmesi açısından diğer prognostik indikatörlerle desteklenmesi gerekmektedir (Kiupel ve ark. 2011).

Proliferasyon indeksinde en çok kullanılan belirteçlerden (marker) biri olan Ki67 son zamanlarda histolojik derecelendirme yöntemleri dışında prognostik bir belirleyici olarak öne çıkmakta, immunohistokimysal boyamaları değerlendirmede kullanılmaktadır (Vascellari ve ark. 2012).

Bax ekspresyonu birçok neoplazi türünde çalışılmış bir biyobelirteç (biyomarker) olarak CCMCT'de de çalışılmış, tümör malignitesi ile yakından ilişkili bulunmuştur ancak prognostik faktör olarak daha iyi anlaşılabilmesi için diğer apoptoz regülatörleri ile karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır (Strefezzi ve ark. 2012).

Anti apoptotik bir protein olan Bcl-2'nin mastositozisli (generalize mast hücre tümörüne sahip olan) hastalarda arttığı bilinmektedir (Hartmann ve ark. 2003). Kanin mast hücre tümörlerinde prognostik faktörlerin incelendiği bir çalışmada, Bcl-2'nin CMCT progresyon ve prognozunda olası rolüne dair veri bulunmadığı ve çeşitli anatomik bölgelerden alınan CMCT lerde Bcl-2 proteininin saptandığı ancak sağlık durumu ve tümör derecesi ile bir korelasyon bulunmadığı bildirilmektedir (Vascellari ve ark. 2012).

KIT proteini c-kit proto-onkogeninin ürünü olan bir tirozin kinaz reseptörüdür. Yapılan çalışmalar, KIT proteininin CMCT'lerin prognozunda önemli bir belirleyici olduğuna işaret etmektedir (Preziosi, Morini ve ark. 2004; Webster ve ark. 2007; Gil da

Costa ve ark. 2007; Zemke ve ark. 2002; Kiupel ve ark. 2004). CCMCT'lerde KIT proteininin hücresel yerleşiminin derecelendirme ve prognoz ile ilişkisi Kiupel ve arkadaşları tarafından ortaya atılmış olup, yeni çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir (Kiupel ve ark. 2004).

CD25 (IL-2Rα), özellikle düzenleyici T hücreler tarafından eksprese edilen membrana bağlı IL2 reseptörünün α alt ünitesidir (Tizard 2013). Son dönemde sistemik mastositozlu insanlarda neoplastik ve neoplastik olmayan mast hücrelerinin ayrılmasında başarılı bir belirleyici olarak kullanılmaktadır (Kiupel 2017). Meyer ve ark. (2012), CD25 ile tümör derecesi arasında negatif bir korelasyon bulmuş, ancak diğer prognostik belirleyicilerle korele etmemişlerdir.

Mitotik indeksin prognostik önemi birçok çalışmada ortaya konulmakla birlikte, bu bilginin diagnostik düzene adapte edilmesinde hala çeşitli zorluklar bulunmaktadır (Vascellari ve ark. 2012; Elston ve ark. 2009).

Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa (İ.Ü.C.) Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi ve Özel Veteriner Kliniklerine getirilen köpeklerden deri tümörü şüphesi ile teşhis amaçlı olarak alınmış olan dokular ile İ.Ü.C. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arşivinde bulunan deri mast hücre tümörü teşhisi doğrulanmış doku blokları kullanılmıştır. Meteryal olarak boyut, çap, dış bakı gibi morfolojik özellikleri kaydedildikten sonra, % 10 formalin solüsyonu içerisinde tespit edilmiş ve daha önce histopatolojik incelemelerde CCMT olarak tespit edilmiş olan 54 örnek üzerinde çalışılmıştır.

Söz konusu örneklerde işaretlenmiş Streptavidin-biyotin-peroksidaz tekniği ile yapılan immunohistokimya boyama yöntemi ile boyanan tümöral dokuları oluşturan hücrelerde Ki67, Bax, Bcl-2, KIT ve CD25 belirteçlerinin, ekspresyon (salınım) oranları ve bunlara ek olarak mitotik indeks sayıları belirlenerek hem Patnaik hem Kiupel derecelendirme sistemleri ile korelasyonları araştırılmış, elde edilen bulgular hastaların klinik tablo ve hasta takiplerine ilişkin bilgiler ile karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda elde edilen bulguların;

- CCMCT'lerde derecelendirme sistemlerindeki hata payının en aza indirgenmesi için Kiupel ve Patnaik derecelendirme sistemlerinin karşılaştırıldığı bilimsel çalışmalara katkı sağlaması,

-Ki67, Bax, Bcl-2, KIT ve CD25 belirteçlerinin köpek deri mast hücre tümörlerinde prognostik indikatör olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceği konusunda ve bu belirteçlerin aralarında bir korelasyon bulunup bulunmadığına ilişkin yeni veriler sağlaması,

-Kiupel ve arkadaşları tarafından ortaya atılmış olan KIT proteininin hücresel yerleşiminin, derecelendirme ve prognoz ile ilişkisi hakkında yeni veriler sağlaması ve

-Mitotik indekse ilişkin verilerin diyagnostik düzene adapte edilmesine yardımcı olacak bilgiler elde edilmesi,

-Hastalığın derecelendirilmesine ve farklı prognostik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlaması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri ve Tümörleri Hakkında Genel Bilgiler

Deri, vücudun en geniş organı olup vücut ağırlığının % 7-12'sini teşkil eder. Bu organda gelişen klinik semptomlara ve lezyonlara bağlı olarak birçok hastalığın teşhisi ve hastanın genel durumu hakkında veteriner hekimlere önemli ipuçları veren derinin genel görevleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Vücudu örterek ultraviyole ışınları ile diğer mekanik, kimyasal ve toksik etkilerden korumak,
- Isı yalıtımı yaparak dehidrasyonu önlemek,
- Yapısındaki lenfoid doku (SALT-Skin associated lymphoid tissue) sayesinde hücre sistemleri yönüyle sindirim sistemindeki (GALT-Gut associated lympohoid tissue) ve solunum sistemindeki (BALT-Bronchus associated lymphoid tissue) lenfoid dokulara benzer şekilde immun sistemin önemli bir bölümünü oluşturarak savunma yapmak,
- İçerdiği ısı, basınç, ağrı, dokunma reseptörleri sayesinde duyuları almak,
- Ter bezleri, kıllar, yağ bezleri gibi oluşumların yardımı ile termoregülasyonu sağlamak,
- D vitamini sentezi ve yağ depolama gibi önemli metabolik fonksiyonları yerine getirmek,
- Meme bezleri aracılığı ile süt üretimi,
- Memelilerde amfibi ve sürüngenlere oranla çok daha az olmasına rağmen (% 1-2 civarı) solunum yapma,
- Koku salgısı ve renk değişimleri ile cinsel uyarının sağlanması,
- Yarasalar ve deniz memelileri gibi canlılarda lokomotor sistemde görev alması (Montagna ve Parakkal 1974; Tanyolaç 1984; Aslan 2010).

Deri (kutis, derma), ektodermal kökenli epitel katmanı olan **epidermis** ve mezodermal kökenli bağ doku katmanı olan **dermisten** oluşur. **Dermisin** altında ise **hipodermis (subkutis)** adı verilen ve adipoz hücreler içeren gevşek bağdokudan oluşan derialtı doku bulunur (Junqueira ve ark. 1971).

Derinin en dış katmanı olan epidermis'in yüzeyi kornifiye-keratinize olmuş ölü hücrelerle kaplıdır. Epidermiste en çok keratinositler (~% 85) ve yer yer Langerhans hücreleri (~% 3-8), melanositler (~% 5) ve Merkel hücreleri (~% 2) bulunur. Keratinositler yapısal keratin ve immun yanıt için gerekli sitokinleri üreten, fagositoz yapan ve antijen işleyebilen hücrelerdir. Langerhans hücreleri derinin immun yanıtının önemli bir parçası olup fagositoz, sitokin üretimi, deriyi etkileyen antijenlerle etkileşime girerek T helper hücreler için antijen işleme ve sunma gibi faaliyetlerden sorumludur. Melanositler derinin rengini veren melanin pigmentlerini taşımalarının yanı sıra ürettikleri sitokinlerle yangısal yanıtta da rol oynarlar. Merkel hücreleri ise özelleşmiş mekanoreseptörler olup, derideki kan akışı, ter üretimi, keratinosit proliferasyonu ve kıl üretim döngüsünde rol alır (Noyan 2005; Paterson 2008).

Dermis, epidermisi destekleyerek hipodermise bağlayan, bol miktarda kolajen ve elastik iplikler içeren zengin kan ve lenf damarı ağının yanı sıra; sinirler, yağ ve ter bezleri ile kıl folikülleri ve bunlara eşlik eden düz kas tellerinin bulunduğu bağ doku katmanıdır (Junqueira ve ark. 1971; Tanyolaç 1984).

Hipodermis/subdermal yağ doku ise deriyi gevşekçe alttaki organlara bağlayarak derinin bu organlar üzerinde kaymasını sağlayan katman olup, sıklıkla yağ hücreleri içerir (Junqueira ve ark. 1971).

Deride gelişen lezyonlar ve bunların patolojileri son derece geniş bir alan olup küçük hayvan pratiğinde sıklıkla rastlanan sorunlardır. Deri hastalıkları genellikle benzer semptomlar verdiğinden birbirinden ayrılması güçtür ve tecrübe gerektirir. Küçük hayvan pratiğinde hastanın dış görünüşünü de bozduğundan hasta sahibi tarafından kozmetik bir sorun olarak da görülen bu hastalıklar, tedavi edilmediğinde hızla ilerleyebilir ve genel olarak tedavileri sabır gerektirir (Harvey ve McKeever, 2006).

Deri; köpek, kedi, at ve sığırlarda neoplazmaların en çok görüldüğü organ olup, ektodermal, mezodermal ve melanositik kökenli tümörlerin yanı sıra epitelyal doku ve kıl folikül kistleri, hamartomlar ve tümör benzeri lezyonlar da gözlenir (Hazıroğlu ve Milli, 2000).

Evcil hayvanlarda görülen deri tümörleri, Mauldin ve Peters-Kennedy'den (2016) uyarlanarak Tablo 2-1'deki gibi gruplandırılmıştır:

Tablo 2-1: Evcil hayvanlarda görülen deri tümörleri, Mauldin ve Peters-Kennedy (2016)'dan uyarlanmıştır.

Epitelyal Tümörler

Epidermis Tümörleri

- Papillomalar ve papillomavirüs kaynaklı lezyonlar,
- Yassı hücreli karsinom (squamous cell carcinoma),
- Bazal hücreli karsinom,
- Bazoskuamöz karsinomlar

Deri Eklenti Yapılarının Tümörleri

- *Kıl folikülü kökenli tümörler:* İnfindibular keratinize akantom (intrakutanöz kornifiye epitelyoma, keratoakantoma), trikolemmoma, trikofoliküloma, trikoblastoma, trikoepitelyoma ve pilomatriksoma
- *Sebaseöz ve modifiye sebaseöz bez kökenli tümörler:* Yağ bezi tümörleri (nodüler sebaseöz hiperplazi, sebaseöz adenoma, sebaseöz epitelyoma ve sebaseöz karsinoma), Meibomian bez tümörleri (adenomalar, epitelyomalar, karsinomalar), Perianal bez tümörleri (adenomu, epitelyomu ve karsinomu),
- *Ter bezi tümörleri:* Apokrin bez tümörleri, ekrin bez tümörleri, seröminöz bez tümörleri

Melanositik Tümörler

- Benign melanositik tümörler,
- Malign melanomalar

İğsi Hücre (spindle cell) Tümörleri

- *Benign iğsi hücre tümörleri:* fibrovasküler papilloma, fibroepitelyal polip, deri polipleri, kolajenöz hamartomlar, fibromalar ve miksomalar
- *Lokal infiltratif ve malign iğsi hücre karsinomaları:* Kanin perivasküler hücre tümörleri (glomus tümörü, hemajiyoperistoma, anjioleomiyoma/sarcoma, anjiyomiyofibroblastoma ve anjiyofibroma), nöral oijinli kutanöz tümörler, fibrosarkomalar, andiferensiye pleomorfik sarkoma
- *Diğer mezenşimal tümörler:* Lipomalar, liposarkomalar, rabdomyom ve rabdomiyosarkomlar

Vasküler Tümörler

- Hemanjiyoma, hemanjiyosarkoma,
- Lenfanjiyoma, lenfanjiyosarkoma

Histiyositik Proliferatif Bozukluklar

- Kanin kutanöz histiyositom,
- Kanin kutanöz langerhans hücre histiyosiozis,
- Kutanöz ve reaktif histiyositozis,
- Histiyositik sarkoma kompleksi,
- Felin progresif histiyositozis

Mast Hücre Tümörleri

Kutanöz Lenfoma

Merkel Hücre Tümörü

Deriye Metastaz Yapan Tümörler

Köpeklerde derideki değişimler kolaylıkla farkedildiğinden deri tümörleri sıklıkla görülen tümörlerdir ve MCTler (Mast Cell Tumor – Mast Hücre Tümörü) bu tümörler arasında önemli bir yer tutmaktadır.

Finnie ve Bostock (1979)'un Avustralya ile ABD ve Birleşik Krallık'taki köpek deri neoplazilerini karşılaştırdıkları çalışmada, Avustralya'da 3 yıl boyunca raporlanan 1000 olguda % 17,6 ile MCT'lerin ilk sırada olduğu bunu bazal hücre tümörleri, perianal bez tümörleri, histiyositoma ve melanomanın izlediği, bu verilerin diğer iki ülke verileri ile uyumlu olduğu belirtilmektedir. Söz konusu iki ülkenin verilerinden bahsedilirken Amerika'da köpek deri tümörlerinde % 21,3 prevalansla MCT'lerin ilk sırada geldiğini raporlayan Brodey (1970) ve Birleşik Krallık'ta köpek deri tümörlerinde % 19,2 prevalansla MCT'lerin ilk sırada geldiğini raporlayan Bostock (1977)'a atıf yapılmıştır.

Kore'de 42 ay süreli bir çalışmada toplam 2952 köpek deri biyopsisinden 748'i (% 25,34) köpek deri tümörü olup, otuz üç farklı çeşit deri tümörü teşhis edilmiştir. Bunların % 56,95'i epitelyal ve melanositik, % 38,90'ı mezenşimal ve % 4,14'ü hematopoetik kökenli deri tümörleri olarak gruplandırılmış; bu tümörlerin % 69,25'inin benign, % 30,74'ünün malign olduğu belirlenmiştir. Bu tümörlerin arasında en çok görülenler epidermal ve foliküler kistler (% 12,70), lipoma (% 11,36), mast hücre tümörleri (% 8,82), kutanöz histiyositoma (% 7,49), bazal hücre tümörleri (% 6,82), sebaseöz bez adenomu (% 6,68), sebaseöz bez hiperplazisi (% 5,08), hepatoid bez adenomu (% 3,61), apokrin adenokarsinoma (% 3,07) ve fibroma (% 2,81) olarak teşhis edilmiş, ortalama yaşın 8 yıl 3 ay olduğu ve cinsiyetin önemli olmadığı raporlanmıştır (Pakhrin ve ark. 2007).

Hırvatistan'da yapılan üç yıl süreli bir başka çalışmada ise, farklı köpeklerden alınan toplam 1658 köpek biyopsi örneğinin 717'sinin (% 43,24'ü) köpek deri tümörü olduğu, bunların 340'ının malign 365'inin ise benign olduğu belirlenmiş, 11'ine ise teşhis konulamamıştır. Söz konusu çalışmada en yoğun olarak hepatoid bez tümörü (% 13,94) olurken, bunu mast hücre tümörleri (% 10,38), lipomalar (% 10,10), kanin kutanöz histiyositomlar (% 6,69) ve skuamöz hücre karsinomları (% 5,69) izlemiştir. Söz konusu çalışmada köpeklerin ortalama yaşı 8 yıl üç ay olarak izlenirken malignitede cinsiyetin önemli olmadığı gözlenmiştir (Gudan-Kurilj ve ark. 2012).

Kuzey Amerika'da faaliyet gösteren hayvan hastanelerinin veri tabanı üzerinden yapılan ve 1964-2002 yıllarını kapsayan ve deri tümörlerinin yoğunluğu üzerine yapılan bir retrospektif epidemiyolojik çalışmada, toplam 1.139.616 hasta kaydı incelenmiş, bunların 25.996'sının deri neoplazmalarına ilişkin olduğu saptanmış, en yoğun görülen

deri neoplazmalarının ise sırasıyla lipoma (% 27,44), adenoma (% 14,08) ve mast hücre tümörü (% 10,98) olduğu raporlanmıştır (Villamil ve ark. 2011).

Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörleri (CCMCT) köpeklerde tüm neoplazmaların % 7 ila % 21'ini ve kanin malign deri tümörlerinin % 11 ila 27'sini oluşturan ve çok farklı biyolojik davranışlar gösteren sık görülen bir hastalıktır (Macy 1985; Preziosi, Morini ve ark. 2004).

Danimarka'da kurulan Veteriner Kanser Kayıt Sistemi kapsamında 2005-2008 yılları arasında raporlanan 1,768 köpek deri neoplazisi olgusu incelenmiş, olguların % 66'sının benign, % 21'inin malign olduğu ve en çok karşılaşılan malign neoplazinin MCT ikinci olarak karşılaşılan neoplazinin ise yumuşak doku sarkomu olduğu, olguların oluştuğu yer, cinsiyet dağılımı ve biyolojik davranışları açısından literatürle benzerlik gösterdiği raporlanmıştır (Brønden ve ark. 2010).

Literatür incelemesinde ülkemizde köpeklerde mast hücre tümörlerine ilişkin yapılan tek saha araştırması (survey) özelliğindeki çalışmanın Atalay Vural ve Aydın (2001) olduğu görülmüştür. Söz konusu çalışmada 1960-1999 yılları arasında saptanmış 19 CCMCT olgusu incelenmiş ve tümörlerin % 40'ının olgunlaşmış (iyi diferensiye), % 47'sinin orta derecede olgunlaşmış (orta diferensiye) ve % 13'ünün olgunlaşmamış ya da anaplastik (kötü diferensiye) yapıda olduğu raporlanmıştır.

2.2. Mast Hücreleri Hakkında Genel Bilgiler

Mast hücreleri birçok fizyolojik fonksiyonun sürdürülmesinin yanı sıra hastalıkların patofizyolojilerinde de rol oynayan, kemik iliğinin pluripotent progenitor hücrelerinden köken alan ve yerleşecekleri dokuya ulaşarak büyüme faktörlerinin etkisi ile burada olgunlaşan, bunun dışında normal şartlarda kan dolaşımında bulunmayan hücrelerdir (Krystel-Whittemore ve ark. 2016). Mast hücrelerin yerleşerek olgunlaştığı dokular arasında özellikle yabancı antijenlere karşı ilk temasta bulunan deri, solunum yolu ve gastrointestinal kanallar bulunur (London ve Seguin 2003). Kan yolu ile deriye ulaşan mast hücreleri burada olgunlaşarak bağ dokunun yerleşik hücreleri haline gelirler ve en çok damarların çevresinde bulunurlar (Albanese 2017). Köpeklerde mast hücreler en yoğun olarak dermiste, özellikle kıl folikülleri ile damarların etrafında ve epidermisin stratum bazale katmanı yakınında bulunurlar. Buna karşın, deri altı yağ dokuda mast hücre yoğunluğu çok azdır. (Kiupel 2017)

Morfolojik olarak, merkezi bir çekirdeği bulunan ve çok sayıda intrasitoplazmik metakromatik granüller taşıyan yuvarlak hücrelerdir (Albanese 2017). Bu granüller mast hücrelerin en belirgin özelliği olup, olgun hücrelerin sitoplazmalarının büyük bir kısmını kaplar. Mast hücrelerinin ilk teşhisi Paul Erlich tarafından bu dolu salgı granüllerine bakılarak Almanca '*mastung'* (şişmanlamış) kelimesi ile adlandırılmıştır (Wernersson ve Pejler 2014).

Mast hücreleri bulundukları anatomik bölge ve bu bölgedeki sitokinlere bağlı olarak farklı ürünler sentezleyebilmektedir (London ve Seguin 2003). Bu ürünler; çeşitli lizozomal enzimler, biyogenik aminler, sitokinler, büyüme faktörleri, proteoglikanlar, proteazlar ve granül-membran ilişkili proteinler olup, etkileri başta allerjik reaksiyonlar ve anafilaksi olmak üzere, arteroskleroz, kontakt dermatit, kanser, artrit gibi birçok hastalıkta yıkımlayıcı rol oynar (Wernersson ve Pejler 2014). Bunun yanı sıra, sıklıkla yangısal alanlarda ve reaktif lenf nodlarında görülen mast hücreler, koruyucu immun yanıtlarda da önemli rol oynar (London ve Seguin 2003).

Mast hücreleri aynı zamanda immun yetenekli hücreler olup, yangı ve alerjik yanıtta aktif rol alırlar. Sitimüle olduklarında histamin, heparin, serotonin, prostaglandinler ve proteolitik enzimler gibi birçok ürünü salgılarlar (Turin ve ark. 2006).

Tablo 2-2: Türlere göre mast hücrelerin özellikleri, Kiupel (2017)'den.

Rodentler	1) Formole dirençli mezenşimal (bağ doku) mast hücreler • Toludin blue veya Giemsa ile kolaylıkla boyanan metakromatik granüllere sahiptir. • Bu durum, mezenşimal mast hücrelerin daha büyük miktarlarda yüksek oranda sülfatlanmış asit mukopolisdakkaritler içermesine bağlanmaktadır. 2) Formole duyarlı mukozal mast hücreler • Granüllerin Giemsa ve Alcian Blue gibi özel boyalarla boyanabilmesi için Carnoy fiksasyonuna gerek duyulur. • Mukozal mast hücreler daha az miktarda sülfatlı asit mukopolisakkaritler ile kateşolaminler, 5-hidroksitriptamin ve histamin içerirler.
İnsanlar	1) Sadece triptaz içeren mast hücreler 2) Çimaz ve karboksipeptidaz içeren mast hücreler 3) Her üç proteazı ve katepsini içeren mast hücreler
Köpekler	- Formole dirençli ve duyarlı mast hücreleri tespit edilmiştir. - Mast hücrelerde çimaz ve triptaz bulunmuştur. - İnsanlardaki sadece triptaz bulunan mast hücre subtipine benzemektedir.

Mast hücreleri biyokimyasal, histokimyasal, ultrastruktürel ve işlevsel karakterlerindeki farklılıklar nedeniyle heterojen bir hücre popülasyonudur (Kiupel 2017). Türlere göre mast hücrelerin özellikleri Tablo 2-2'de verilmektedir.

Kutanöz MCTler (Mast hücre tümörü, mast cell tumor) sadece triptaz içeren mezenşimal mast hücrelerden köken alırlarken subkutanöz ve visseral MCTler için daha fazla karşılaştırmalı araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Kiupel 2017).

2.3. Mast Hücre Tümörleri (MCT) Hakkında Genel Bilgiler

Mast hücreleri bağ doku bulunan her yerde bulunabileceğinden, bu dokulardan herhangi birinde MCT'ye rastlamak mümkün olmakla birlikte en çok deri ve subkutanöz dokularda görülürler (O'Keefe 1990).

Tek veya çoklu mast hücre tümörleri kutanöz veya visseral tutulum gibi farklı biyolojik davranışlarla köpek, kedi, at, gelincik, domuz, sığır gibi tüm evcil türlerde görülmekle birlikte en sık olarak köpeklerde ortaya çıkar (Ginn ve ark. 2007).

Visseral organlarda görülen MCTlerin her zaman deri kökenli olup olmadığı bilinmemekle birlikte, özellikle kedilerde dalak, karaciğer ve diğer organlarda eş zamanlı oluşan ve dissemine mastositozis olarak raporlanan olgunun bir multisentrik neoplazik hastalık süreci olduğu düşünülmektedir. Yine mast hücre lösemisi birçok türde nadirken, MCTli kedilerin % 40'ında kan frotilerinde mastositemi görülmektedir (Kiupel 2017).

MCTler genellikle yetişkin hayvanlarda görülmektedir (Kiupel 2017). Genç köpek, kedi, domuz, sığır ve atlar ile insanlarda çoklu ve spontane şekilde regrese olan mast hücre tümörlerinin ise aslında gerçek bir neoplazi değil de mast hücre hiperplazisi olabileceği, yine kedi, köpek ve taylarda deride geniş yüzeylerde diffuz şekilde yayılım gösteren iyi diferensiye mast hücrelerinin görülmesinin ise insanlardaki urticaria pigmentosa'ya benzer bir durum olabileceği düşünülmektedir (Ginn ve ark. 2007).

Çoğu mastositoma deri ve derialtı dokudan köken almakta, bunlardan çok azı geniş metastatik hal almakta olup, kutanöz bir mastositomla alakalı olmayan dissemine mastositoz köpeklerde nadiren raporlanmaktadır (O'Keefe ve ark. 1987), (Turin ve ark. 2006).

Köpeklerde görülen MCTlerin en önemli komplikasyonları histamin salınımına bağlı gelişen gastro duodenal ülserler, heparin salınımına bağlı pıhtılaşma bozuklukları ve tümörün alınmasından sonra bölgedeki yaranın geç iyileşmesidir (O'Keefe 1990).

Köpek, kedi ve atlarda görülen çoğu MCT genellikle cerrahi ekstirpasyon ile tedavi edilebilirken, Köpek kutanöz mast hücre tümörlerinin bir kısmı ile kedi ve atlardaki bazı olgular lokal lenf nodlarına sıçramakta ve yaygın metastaza neden olabilmektedir (Kiupel 2017).

2.4. Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörleri (CCMCT) Hakkında Genel Bilgiler

Kutanöz mast hücre tümörleri (veya bazı kaynaklara göre MCT, histiyositik mastositoma, mast hücre sarkomu, mastositoma) köpek kliniğinde en sık karşılaşılan deri tümörüdür. Öyle ki tüm deri tümörlerinin % 16 ila 21'ine ve malign deri tümörlerinin % 11 ila 27'sine tekabül eder (London ve Thamm 2013; Turin ve ark. 2006).

MCTler tüm köpek ırklarında ve melez köpeklerde görülmekle birlikte bazı ırkların daha yatkın olduğu düşünülmektedir (Ritt 2010). Buldog soyundan gelen ırklar (Boxer, Boston terrier, İngiliz buldog, pug), Labrador ve Golden Retrieverlar, Cocker Spaniel, Schnauzer, Staffordshire terrierler, Weimaraner, Rhodesian ridgeback, Beagle ve Shar-Pei ırkı köpekler predispozedir (Leblanc 2016; London 2010).

Belirli ırklardaki artmış insidens, MCTlerin genetik sebeplerinin olabileceğini düşündürmekte, pug gibi buldog soyundan gelen köpeklerde insidensin yüksek olup tümör karakterinin genellikle benign olması, buna karşın Shar-Pei'lerde görülen MCTlerin biyolojik olarak agresif olduklarına dair yayınlar bu düşünceleri desteklemektedir (London 2010; McNiel ve ark. 2006; Miller 1995). Diğer bir görüş ise, bu ırklarda neoplaziye predispozisyon yaratan gen sekanslarının herediter aktarımı ile gerçekleşebileceği ancak tümör gelişiminin karsinojenik ajanlar veya virüsler gibi diğer faktörlere bağlı olduğudur (Macy 1985). Bu bilgilere rağmen tüm MCTlere ırk ayrımı yapılmaksızın malign olarak kabul edilmesi ve buna göre yaklaşılması önerilmektedir (London ve Seguin 2003).

MCT'ler daha çok yaşlı hayvanlarda görülmekle birlikte (ortalama 8-9 yaş) genç hayvanlarda da rastlanmakta, ancak herhangi bir cinsiyet yatkınlığı söz konusu olmamaktadır (London 2010).

CCMCTlerin bulundukları/geliştiği bölgeler, görünüşleri ve biyolojik davranışları çok çeşitlilik göstermektedir (London 2010) ve köpeklerde diğer türlere göre daha agresif seyreder (Zemke ve ark. 2002). CCMCT'lerin klinik görünümleri nodül ya da plaklar şeklinde olup nodüllerin çoğu kubbe ya da düğme şeklinde, saplı, alopesik, eritematöz,

hiperpigmente görünümü olabilir, kıvamları sert, yumuşak ya da jelatinöz ya da ülsere olabilir, büyüklükleri birkaç milimetreden büyük kütlelere varacak büyüklüklerde ve yerleşimleri kutanöz ya da subkutanöz olacak şekilde, tekli ya da çoklu şekilde izlenebilir (Albanese 2017).

CCMCT'ler genellikle tekil olarak izlenirken hastaların % 11'i civarında çoklu tümör gelişimi raporlanmış olup, bu çoklu tümörlerin metastaz mı yoksa multisentrik orijinli mi oldukları aydınlığa kavuşmamıştır (Hottendorf ve Nielsen 1968; Cockerell ve MacCoy 1978).

Tümörler çoğunlukla gövde, perineum ve ekstremitelerde gelişir, bazı tümör olgularında hücrelerdeki granüllerin salınımına bağlı sekonder olarak gastrik veya duodenal ülserler ve koagülopatiler gibi lezyon ve klinik bulgular da görülebilmektedir (Leblanc 2016). Bu durum, hem tümörün gelişimi hem de beraberinde görülen diğer patolojilerin önlenebilmesi yönünden prognostik faktörleri daha da önemli kılmaktadır.

İnce iğne aspirasyonu gibi çok küçük müdahaleler veya küçük travmalar sonrasında bile MCT'lere özgü bir klinik davranış olarak birçok CCMCT'nin boyutlarının geçici bir şekilde büyüdüğü ve birkaç saat içinde eski boyutuna döndüğü gözlenmiştir. Bu durumun, mast hücrelerinin degranülasyonu sonucu açığa çıkan vazoaktif maddeller nedeniyle oluşan ödemden kaynaklandığı ve bazen de bu duruma eritemin eşlik ettiği bildirilmektedir (Albanese 2017).

CCMCT olgularında tedavi cerrahi, radyoterapi, kemoterapi veya bunların kombinasyonu halinde yapılır. Mast hücre tümörlerinin önerilen birincil tedavi şekli mümkün olduğu durumlarda tümörün total olarak ekstirpe edilmesidir ve çoğunluğu bu şekilde tedavi edilmekle birlikte sitemik tedavi gerektiren durumlarda prognozun belirlenmesi daha da önemli hale gelmektedir (Garrett 2014).

Thompson, Pearl ve ark. (2011) son dönemde kutanöz ve subkutanöz MCTler arasında bir ayrım yapılmaya başlandığını, ancak daha önceki dönemlere ait literatürlerin deride görülen MCTleri kutanöz MCT olarak bir arada ele aldığını, bazı yayınların ise kutan ve subkutan tümörleri birlikte ele aldığını ifade etmektedir. Ayrıca, subkutan MCT'lerin farklı prognozları konusunda fikir birliğine varıldığında, bu tür çalışmaların kesin sonuçlar olarak kabul görmeyeceğini belirtmektedir.

Newman ve ark. (2007) subkutanöz tipin özelliklerini orta histolojik derece, uzamış ortalama sağ kalım (teşhisten sonra sağ kalım) süresi ve dermal tipin yüksek dereceli tümörlerine göre uzun dönemde biraz daha iyi bir prognoza sahip olmaları şeklinde özetlemiştir. Tanımlanan bu tip, halen yaygın olarak kullanılmakta olan Patnaik'in üçlü derecelendirme sisteminde kutanöz-subkutanöz ayrımı olmadığından, bulundukları yerden ötürü birçok patolog tarafından II. derece olarak nitelendirilmekte, ancak ileride anlatılacak olan ikinci derece tümörlerin değerlendirilmesinde patologlar arası varyasyon gibi hususlar bu durumu karmaşıklaştırmakta, II. derece olarak nitelenen subkutanöz ve kutanöz tümörlerin prognozları arasındaki farklılıklar da göz önüne alındığında bu iki tip tümörün farklı değerlendirilmeleri gerektiği düşünülmektedir (Thompson, Yager ve ark. 2011).

İyi diferensiye olmayan tümörü olan, tümörü tam olarak ekstirpe edilemeyen ya da sistemik hastalık belirtisi olan hayvanların metastaz konusunda daha detaylı incelenmesi için lenf yumrusu aspirasyonları, görüntüleme teknikleri ve karaciğer, dalak, kemik iliği gibi organlardan alınacak aspiratların değerlendirilmesi yoluna gidilmelidir (Leblanc 2016).

CCMCT'lerin etiyopatogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte diğer tümörlerde de olduğu gibi birçok faktöre bağlı olması muhtemeldir (Welle ve ark. 2008). Bu faktörlerin genetik, hormonal ve tümörogenezde rol oynayan diğer faktörler olduğu düşünülmektedir (White ve ark. 2011). Farklı araştırmacılar tarafından prognozu da ortaya koymak için üstünde çalışılan birçok faktör etiyoloji konusunda da fikir vermektedir.

CCMCT'lerin değişken biyolojik ve klinik davranışlarını ve dolayısıyla prognozlarını belirleyebilmek için birçok parametre belirlenmiş olup bunlardan en istikrarlı olanları histolojik derece ve klinik evrelerinin belirlenmesi iken son zamanlarda birçok moleküler belirteç üzerinde de çalışılmaktadır (Turin ve ark. 2006).

2.5. Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörlerinde Teşhis Yöntemleri

2.5.1. Sitoloji

Mast hücre tümörleri genellikle ince iğne aspiratının sitolojik yönden incelenmesiyle kolaylıkla teşhis edilebilir ve bu yöntem, cerrahi sınırların belirlenmesinde operasyon öncesi avantaj sağlamasının yanı sıra, metastaz varlığının

saptanabilmesi için lenf yumruları ve diğer organların incelenmesinde de kolaylıkla kullanılır (O'Keefe 1990).

MCT'lerin sitolojilerinde yuvarlak çekirdekli ve tümör diferansiasyonuna bağlı olarak farklı düzeylerde boyanan bazofilik intrasitoplazmik granüller içeren birçok yuvarlak hücre görülür. (Leblanc 2016). CCMCT'lerin Romanovski tipi boyalarla boyanmaması gibi nadir durumlarda, daha detaylı bir gözlem ve granülleri kırmızı boyayan toludin mavisi ile belirginleştirilmesi önerilmektedir (Albanese 2017).

Yine "Diff-Quik" özellikle kedilerde bazı durumlarda sonuç vermeyebilir. Bu nedenle, yuvarlak hücreli bir tümörün Diff - Quik ile boyanmış sitolojik preparatında mast hücre seçeneğini elemeden önce aynı ya da farklı bir lamın Wright – Giemsa ile de boyanması önerilmektedir (Kiupel 2017).

Birçok CCMCT'de granüllerin taşıdığı eozinofilotaktik (eozinofil çekici) maddeler nedeniyle değişken sayıdaki eozinofiller de gözlemlenir ve bu nedenle eozinofiller teşhiste yardımcı olarak da kullanılır. Anaplastik MCT'lerde eozinofil sayısının daha az olduğu izlenmiştir (Albanese 2017).

Bazı hücrelerde sitoplazmik granüller o kadar fazladır ve o kadar yoğun boyanır ki çekirdeği gizlerler. Bu tür durumlarda serbest granüllerin arka plana dağılması teşhisi kolaylaştırırken, derecelendirme için çekirdek ve diğer sitolojik öğeleri görmek zorlaşır. Bazı hücrelerde ise granüller belirgin değildir ve daha büyük büyütmelerde incelemek gerekir (Kiupel 2017).

İkili derecelendirme sistemini CCMCT sitoloji örneklerinde uygulamayı deneyen bir çalışmada, histolojik olarak yüksek dereceli 38 ve düşük dereceli 103 olgu sitolojik olarak derecelendirildiğinde; 36 yüksek dereceli 105 düşük dereceli tümör olarak raporlanmıştır. İkili sisteme göre histolojik ve sitolojik derecelendirme konusunda bir anlaşma sağlanması ancak yine de histolojik olarak yüksek dereceli 5 tümörün sitolojide düşük derece olarak raporlanması, sitolojinin birincil değerlendirme için uygun olduğunu ama buna dayanarak sonuç vermenin halen yetersiz olacağını göstermektedir (Hergt ve ark. 2016).

Bu bilgiler ışığında, sitolojide malignite özelliklerine göre yüksek dereceli CCMCT teşhisi koyulabilmekte olup, çok iyi diferensiye hücrelerin varlığında düşük dereceli MCT teşhisi koyulmadan önce histopatoloji ile doğrulanması doğru olur. Mitotik

ve çok çekirdekli hücreler neoplastik bir kitlenin her yanına eşit dağılmadığından ince iğne biyopsisinde bu bölgelerin örneklenmeme riskini göz ardı etmemek ve cerrahi ekstirpasyonun ardından histopatolojik derecelendirme için laboratuvara göndermek gerekmektedir (Albanese 2017).

2.5.2. Histopatoloji ve Histopatolojik Derecelendirme

MCTlerin ilk tanısı sitoloji ile koyulabilmekle birlikte, bir MCTnin eksize edilerek histolojik derecesinin belirlenmesi, tümörün tam olarak alındığından emin olunması ve andiferensiye tümörlerde tanıdan emin olunması açısından, histoptolojik incelenmesi çok önemli ve gereklidir (O'Keefe 1990).

CCMCTlerin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmış derecelendirme sistemleri sırası ile Bostock'un üçlü derecelendirme sistemi (Bostock 1973), Patnaik'in üçlü derecelendirme sistemi (Patnaik ve ark. 1984) ve Kiupel'in ikili derecelendirme sistemlerinde ikinci derece olarak nitelenen tümörlerin davranışlarının belirsizliğini göz önüne alarak önerdiği iki dereceli sitemdir (Kiupel ve ark. 2011).

Halen Patnaik ve arkadaşlarının tanımladığı (Patnaik ve ark. 1984) histolojik değerlendirme sistemi bir MCT'nin biyolojik davranışının belirlenmesinde en sık kullanılan histolojik değerlendirme sistemidir (Maglennon ve ark. 2008).

Patnaik histopatolojik sistemi, sitolojik ve dağılıma bağlı parametrelere bakarak MCTleri iyi diferensiye (I. Derece/ Grade I), orta diferensiye (II. Derece/ Grade II) ve kötü diferensiye (III. Derece/ Grade III) olmak üzere üç dereceye ayırmaktadır (Patnaik ve ark. 1984). Bu sistem sadece sitolojik özellikler üzerine kurulu olmayıp hastalığın yayılımına da baktığından ilk iki dereceyi sitolojik olarak tam ayırmak mümkün değildir (Albanese 2017).

Aynı kurumda çalışan 10 veteriner patoloğun 60 CCMCT'yi Patnaik ve Bostock üçlü derecelendirme sistemlerine göre düşük-orta-yüksek derece olmak üzere değerlendirdiği kör çalışmada, örnekleri derecelendiren patologların değerlendirmeleri arasında önemli farklılıklar bulunduğu ve çalışmaya katılan tüm patologların olguların sadece % 7'sinde tam bir fikir birliğine vardıkları kaydedilmiş, olguların % 50'sinde patologların en az % 80'inin fikir birliğinde olması ise, bu konuda bir birliktelik sağlanabilmesi için çalışmalar yapılması önerisi ile sonuçlanmıştır (Northrup, Harmon ve ark. 2005).

Aynı çalışmanın devamı olan bir çalışmada ise değerlendirmeler arasındaki çeşitliliği azaltmak için aynı olgular aynı patologlar tarafından tek bir derecelendirme sistemiyle (Patnaik derecelendirme sistemine göre) değerlendirilmiş, patologlar arasında teşhis açısından çeşitliliğin önemli şekilde azaldığını ve çeşitliliğin genellikle I. – II. derece ile II.-III. derece arasında görülmüştür (Northrup, Howerth ve ark. 2005). Bu durum II. derece tümörlerle ilgili kararsızlıkların azaltılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Bu nedenle son dönemde Kiupel ve ark.'nın tanımladığı (Kiupel ve ark. 2011) iki dereceli sistem de öne çıkmaktadır. Bu sistem ise daha çok mitoz sayısı üzerine yoğunlaşmaktadır.

CCMCT'lerde tanısal ve terapötik kararlar verilirken hala histolojik derecelendirme kullanılmasına rağmen, veteriner patologların farklı derecelendirme sistemleri kullanması ve veteriner patologların aynı tümörü değerlendirirken gösterdiği farklılıklar yeni sistemlerin kullanılmasını gündeme getirmiştir (Kiupel ve ark. 2011).

Kiupel ve ark.'ın (2011) çalışmasında 16 kuruluştan 28 patoloğun katıldığı ve 95 CCMCT olgusunun değerlendirildiği kör çalışmada, III. Derece tümörlerin teşhisindeki uyumluluk % 75 civarında görülmüşken, I. ve II. derece tümörlerin teşhisindeki uyumluluk % 64 civarında görülmüştür. İki dereceli değerlendirme sistemi de bu nedenle önerilmektedir (Kiupel ve ark. 2011).

Daha önce de belirtildiği gibi, son dönemde subkutan ve kutan mast hücre tümörleri arasındaki anatomik ayrım da histopatolojik değerlendirmelerde yeni sistemlerin oluşturulmasına neden olmuştur. Bu sistemlerin detaylı özellikleri aşağıda anlatılmaktadır.

Bostock Derecelendirme Sistemi

Bostock sistemi (Bostock 1973); çekirdek çapı ile hücre çapının birbirine oranı, mitotik figür sıklığı, hücresel pleomorfizm, tümör hücrelerinin ayrıklığı ve tümörün hücreselliği ile intrasitoplazmik metakromatik granüllerin görünümü gibi kriterleri göz önünde bulundurur, eozinofil sayısının mast hücre sayısına oranını ise kesin sayısı bilinemeyeceğinden göz ardı eder. Derecelendirme şekli Tablo 2-3'de verilmektedir.

Tablo 2-3: Bostock derecelendirme sistemi, Bostock (1973)'ten.

I. Derece Kötü Diferensiye Tümör	- Yüksek selülerite, - Sık dizilimli belirsiz sitoplazmik sınırlı, bazofilik ve genellikle düzensiz şekilli çekirdeğe sahip olan hücreler, - Çekirdek çapı/hücre çapı oranı genellikle 0,70 veya daha fazla, - Zaman zaman çok sık görülen mitotik figürler, - Yüksek derecede hücresel pleomorfizm, - Bazı olgularda yıldız şekilli çok çekirdekli dev hücreler ile asidofilik intranükleer inklüzyonu olan hücreler
II. Derece Orta Diferensiye Tümör	- Sık dizilimli ve belirsiz sitoplazmik sınırlı olma eğiliminde hücreler, - Çekirdek çapı /hücre çapı oranı 0,55 ile 0,70 arası, - Mitotik figürler sık görülmez,
III. Derece İyi Diferensiye Tümör	- Net olarak belirlenmiş sitoplazmik sınırlar, düzenli ve küresel çekirdek, - Çekirdek çapı/hücre çapı oranı genellikle 0,55'ten daha az, - Mitotik figürler çok nadir, - Hücreler genellikle geniş kolajen ipliklerle birbirinden ayrılmış, dolayısı ile toplam hücre sayısı diğer derecelere göre daha az, - Hücre tipi genel olarak daha homojen

Patnaik Derecelendirme Sistemi

Patnaik derecelendirme sistemine göre derecelendirme şekli Tablo 2-4'te verilmektedir.

Tablo 2-4: Patnaik derecelendirme sistemi, Patnaik ve ark. (1984)'ten.

I. Derece	- Tümör dermis ve foliküller arası alanla sınırlı, - İyi diferensiye mast hücreleri şeritler veya küçük gruplar halinde kümelenmiş ve dermisin olgun kolajen iplikleriyle birbirlerinden ayrılmışlardır. - Hücreler yuvarlak, monomorfik, bol sitoplazmalı olup, çoğu belirgin sitoplazmik sınıra ve orta boylu intrasitoplazmik granüllere sahiptir. - Çekirdek yuvarlak ve yoğun kromatinlidir. - Mitotik hücre yoktur. - Travmatize tümörlerde az derecede ödem ve nekroz bulunabilir.
II.Derece	- Ortadan yüksek dereceye hücresel olup, neoplastik hücreler alt dermal ve subkutan dokuya infiltre olmuş ya da bu bölgelerin yerini almıştır. Bazı tümörler iskelet kaslarına ya da çevreleyen dokulara kadar ilerlemiştir. - Orta derecede pleomorfik hücreler ince fibrovasküler stroma ile gruplar halinde toplanmıştır. Bazı bölgelerde stroma kalın ve fibrokolajenöz olup, hiyalinize alanlar gözlenebilir. - Neoplastik hücreler yuvarlaktan ovoide şekiller gösterirken dağınık halde iğsi ve dev hücreler de bulunur. - Çoğu hücre düzgün intrasitoplazmik granüllere ve belirgin bir sitoplazmaya sahiptir ancak bazılarında büyük hiperkromatik granüller ve belirgin olmayan sitoplazmik sınırla gözlenebilir. - Çekirdekler yuvarlak veya girintili çıkıntılı şekillerde, dağınık kromatinli ve tek çekirdekli olup bazı hücreler çift çekirdeklidir. - Mitotik hücreler nadirdir. Yüksek büyütmede 0-2 arasındadır. - Diffüz ödem ve nekroz alanları vardır.
III.Derece	- Hücresel ve pleomorfik neoplazmalardır. Neoplastik doku subkutan ve derin dokuların yerini almıştır. - Pleomorfik, orta boyutlu, yuvarlak, ovoid ya da iğ şekilli neoplastik hücreler yan yana dizilmiş tabakalar halindedir. - Sitoplazmalar belirgin olmayıp intrasitoplazmik granüller düzgün ve belirgin ya da belirgin olmayan görünümde olabilir. - Stroma fibrovaskülerdir ya da hiyalinizasyonların izlendiği kalın fibrokolajenöz haldedir. - Veziküllenmiş çekirdek girintili çıkıntılıdan yuvarlağa değişen formlarda ve bir ya da iki belirgin çekirdekçiğe sahiptir. - Çift çekirdekli hücreler yaygındır. - Mitotik hücreler de yaygın olup her bir yüksek büyütmeli alanda 3-6 hücre izlenir. - Ödem, hemoraji ve nekroz yaygındır.

Kiupel Derecelendirme Sistemi

CCMCT'leri düşük ve yüksek dereceli (differensiasyon durumlarına göre) olmak üzere ayıran sistemde, bir tümörün yüksek dereceli olması için aşağıdaki kriterlerden birine sahip olması gerekmektedir:

- 10 adet yüksek büyütmeli alanda (40X objektif altında) en az 7 mitotik figür,
- 10 adet yüksek büyütmeli alanda en az 3 çok çekirdekli hücre (dev hücre),
- 10 adet yüksek büyütmeli alanda en az 3 yıldız şekilli çekirdek (bizzare nuclei),
- Karyomegali (Kiupel ve ark. 2011).

Yeni literatürde MCT'lerin kutanöz ve subkutanöz olarak ayrı ayrı tarif edilmesi ve var olan derecelendirme sistemlerine istinaden Erhart ve ark. (2013) tarafından hazırlanan özet tablo, Tablo 2-5'te verilmektedir:

Tablo 2-5: MCT değerlendirilmesinde dereceler ve önemli oluşumlar Ehrhart ve ark. (2013)'ten.

Derecelendirme	Önemli oluşumlar
I, II, III	Hücresellik, çekirdek:sitoplazma oranı, hücre morfolojisi, mitotik indeks, derinlik, nekroz, granülleşme
2'li sistem: Yüksek, düşük	Mitotik indeks, karyomegali, çok çekirdeklilik, tuhaf şekilli çekirdekler
Subkutan: Yüksek, düşük	Mitotik indeks ≤4, >4; invazivlik; çok çekirdeklilik

2.5.3. İmmunohistokimya (İHK)

İmmunohistokimya, veteriner patoloji laboratuvarlarında gün geçtikçe daha çok kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle otomatik makinelerin de kullanılmaya başlamasıyla beşeri patoloji laboratuvarlarında onkoloji hastalarından alınan örneklerin değerlendirilmesinde kanserin tipine göre farklı immunohistokimya prodsedürleri oturtulmuş ve rutin olarak kullanılır hale gelmiştir. Ülkemizde veteriner patoloji laboratuvarlarında, gelen numune sayısının azlığı, maliyet gibi sebeplerle otomatik

immunohistokimya makinelerinin kullanımı yaygın olmayıp manuel prosedürler kullanılmaktadır.

İHK tek başına bir teşhis yöntemi olmamakla birlikte, sağladığı prognostik veri ve tedavi aşamalarında gerçekleşen ilerlemeler nedeniyle kanser araştırmalarında artan önemini önümüzdeki dönemde de koruyacaktır. İHK çalışmalarının rutin ve etkin bir şekilde gerçekleştirilebilmesi, antikorların ve kullanılan diğer kimyasalların doğru bir şekilde saklanması, her bir aşamanın optimizasyonunun gerçekleştirilmesi gibi faktörlerin yanı sıra, dokuların fiksasyonunun ve takibinin kalitesine ve doğru yürütülmesine bağlıdır.

Hali hazırda beşeri tıpta mast hücrelerle ilgili patolojilerde CD25 ve KIT immunohistokimyası bir çok beşeri patoloji laboratuvarında rutin olarak kullanılmaktadır. CCMCTlerde ise öne çıkan immunohistokimyasal parametreler daha sonra detaylarıyla ele alınacaktır.

2.5.4. Diğer Yöntemler

Neoplastik mast hücrelerin çoğu normal mast hücrelerine benzerlik gösterdiğinden, MCT'leri sitolojik ve histolojik olarak teşhis etmek göreceli olarak kolaydır. Ancak asıl zorluk, marjinleri değerlendirme ve derecelendirme kısmında başlar ve moleküler araçlardan da yardım almak gerekebilir (Kiupel 2017).

Flow sitometri, şüpheli neoplastik kitlelerden ya da sıvılardan sağlanan hücre süspansiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan bir analitik yöntem olup, beşeri tıpta sıklıkla teşhis için, bazen de idrar kesesi karsinomu gibi çeşitli tümörlerin nüksünün izlenmesi için kullanılmaktadır (Ehrhart ve ark. 2013). En sık kullanılan flow sitometri uygulamaları hücresel DNA içeriğinin belirlenmesi ve hücre döngüsü analizleridir (Nunez 2001). Flow sitometri analizleri tümörlerin plöidi durumlarını belirleyebilmektedir ancak mast hücre tümörlerinde net bit prognostik faktör olmadığından sonuçlar diğer parametrelerle birlikte ele alınmalıdır (Ayl ve ark. 1992).

PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) kanser araştırmalarında genetik durumun değerlendirilebilmesi için gen veya kromozomlardaki değişikliklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. CCMCT hakkında literatür taraması yapılırken PCR yönteminin sıklıkla c-kit proto-onkogenindeki mutasyonların belirlenmesi konusunda yapılan çalışmalarda kullanıldığı ve bu sonuçların prognoz belirlemede önemli ve gerekli olduğu

görülmektedir. Bu çalışmalara c-kit'in prognostik faktör olarak ele alındığı bölümde detayı olarak değinilecektir.

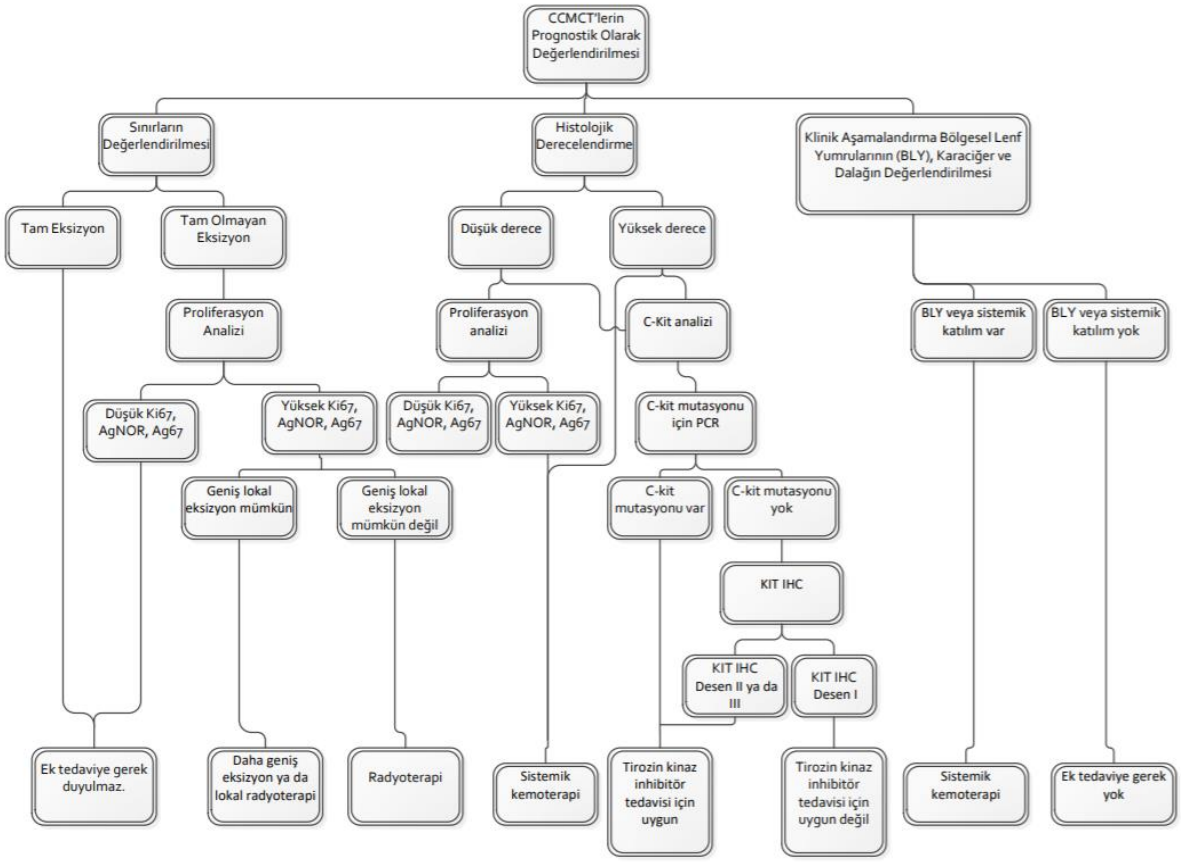
Elektron mikroskopi rutinde tümör teşhisinde kullanılan bir yöntem olmamakla birlikte, sitolojik ya da histopatolojik incelemelerle hücre tipi belirlenemediğinde ek olarak kullanılabilen bir yöntemdir (Ehrhart ve ark. 2013).

Ozaki ve ark. (2002) köpek gastrointestinal MCT'lerde ayırıcı tanı konusunda yaptıkları çalışmalarında bu tip tümörlerin sıklıkla malign lenfomalarla karışabildiğine dikkat çekmekte ve kullandıkları mast hücre triptaz ve c-kit immunohistokimyası, elektron mikroskopi ve metakromazi için boyamayı kapsayan teşhis panelinin MCT'nin ayırıcı tanısını sağladığını belirtmektedir.

2.6. Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörlerinin Prognozu ve Önemli Prognostik Faktörler

Grade 1 MCT'lerde klinik olguların prognozunun iyi olduğu görülse de genel olarak MCTler potansiyel malign karakterli tümörler olarak değerlendirilmelidir (Misdorp, 2004). Moleküler teşhis araçlarındaki gelişmeler göz önünde tutulduğunda dahi, CCMCTlerin histolojik sınıflandırılması halen en çok başvurulan teşhis ve prognoz belirleme yöntemidir. Yine de biyolojik davranışlarının tam olarak tayin edilebilmesi için ek prognostik parametrelere ihtiyaç duyulmaktadır (Sledge ve ark. 2016).

MCTlerin prognozlarının üzerinde bu kadar durulmasının temel sebeplerinden biri de masraflı tedavi yöntemleri ve sürecin stresi düşünüldüğünde en iyi tedavi seçeneğini belirlemektir. Bu konuda cerrahi seçeneğin ötesinde tedaviler düşünülen olgularda doğru kararı vermek adına hazırlanmış şema Kiupel (2017)'in çalışmasından tercüme edilerek Şekil 2-1'de sunulmaktadır.



Şekil 2-1: CCMCT'lerin prognostik değerlendirmesi, Kiupel (2017)'den.

Bu bölümün devamında, şimdiye kadar MCT'lerde prognostik açıdan değerlendirilen önemli faktörlere değinilecektir.

2.6.1. Histolojik Derece

CCMCT'lerde histolojik derece, basit ve ucuz boyama teknikleriyle gerçekleştirilebilmesi ve tutarlılığı nedeniyle tüm diğer kriterler arasında biyolojik davranışın belirlenmesinde en çok kullanılan prognostik faktördür (Preziosi ve ark. 2007).

Patnaik'in önerdiği üçlü değerlendirme sisteminin tüm dünyada halen en sık kullanılan yöntem olması bir yana, olguların histolojik değerlendirilmesinde tecrübeli patologların yorumlarında dahi farklılıklar bulunması nedeniyle farklı prognostik faktörlere ihtiyaç olduğu düşünülmektedir (Kiupel ve ark. 2005; Maglennon ve ark. 2008; Northrup ve ark. 2005; Preziosi ve ark. 2007).

Bostock'un 114 olgu ile kendi önerdiği üçlü derecelendirme sistemine göre yaptığı çalışmasında operasyon sonrası 30 hafta yaşayan köpeklerin çoğunun hastalıktan

kurtulduğunu ve bu oranla ilişkili olarak III. derece (Bostock sistemine göre iyi diferensiye) olguların tedavi oranının I. derece (Bostock sistemine göre kötü diferensiye) olgulardan 6 kat fazla, II. derece (Bostock sistemine göre orta diferensiye) olgulardan ise iki kat fazla olduğunu raporlamıştır (Bostock 1973).

Patnaik üçlü derecelendirme sisteminin kullanıldığı ilk çalışmada ise 83 CCMCT olgusu kullanılmış, tümörlerin ekstirpe edilmesinin ardından hastalar 1500 gün süreyle takip edilmişlerdir (Patnaik ve ark. 1984). Söz konusu çalışmada; I. derece (Patnaik sitemine göre iyi diferensiye) olgulardan hayatta kalan köpek sayısının, II. derece (Patnaik sitemine göre orta diferensiye) olguların iki, III. derece (Patnaik sitemine göre kötü diferensiye) olguların, on altı katı olduğu ve II. derece tümörlü köpeklerin sağ kalım oranının III. derece tümörlü köpeklerden beş kat fazla olduğu, genel olarak da üç grup arasındaki sağ kalım süresi oranlarının anlamlı şekilde farklı olduğu raporlanmıştır.

Kiupel ve ark. (2011)'nın ikili sistemi kullandığı 95 kutanöz tümörün incelendiği çalışmada ise yüksek dereceli tümörlerin belirgin bir şekilde daha kısa sürede metastaz ve tümör gelişimi ile daha kısa sağ kalım süresi ile ilişkili olduğunu, yüksek dereceli tümörlerde ortalama yaşam süresi 4 aydan kısayken düşük dereceli tümörlerde bu sürenin iki seneden fazla olduğunu bildirmiştir.

Patnaik'in üçlü ve Kiupel'in ikili sistemlerini prognostik açıdan kıyaslayan 137 olgunun incelendiği bir çalışmada, Patnaik sistemine göre olguların % 13,1'i I. derece, % 60,6'sı II. derece ve % 26,3'ü III. derece olarak belirlenmiş, III. Derece olguların anlamlı oranda kötü prognozla ilişkili olduğu, ancak I. ve II. derece tümörlerin arasında böyle bir fark görülmediği saptanmıştır. Çalışmada ayrıca, tüm I. Derece tümörlerin Kiupel sistemine göre düşük dereceli ve tüm III. Derece tümörlerinse Kiupel sistemine göre yüksek dereceli olduğu ancak II. derece tümörlerin % 85,6'sının düşük, % 14,4'ünün yüksek dereceli olduğu bu iki grubun bir yıl sağ kalım oranınınsa sırasıyla % 94 ve % 46 olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle ikili derecelendirme sisteminin daha yüksek bir prognostik değeri olmakla birlikte, çalışmanın sonuçları histolojik değerlendirmenin tek başına bir biyolojik davranış belirteci olamayacağını göstermektedir (Sabattini ve ark. 2015).

Yine Kiupel ve Patnaik sistemlerinin, tümörlerin ilk kez incelenmesi sırasında metastaz varlığının tahmin edilebilmesi için kullanımına ilişkin 386 hasta ile yapılan bir çalışmada tüm Patnaik I.derece MCTlerin (n = 52) Kiupel düşük derece MCTler; tüm

Patnaik III. derece MCTlerin ise (43) Kiupel yüksek derece MCTler olduğu, 291 Patnaik II. derece MCTnin ise 243'ünün (% 83.5) Kiupel düşük derece MCT, 48'inin (% 16.5) Kiupel yüksek derece MCT olduğu bildirilmektedir. Patnaik III. derece olguların I. ve II. derece olgulara göre daha fazla metastaz riskinin bulunduğu ve Kiupel yüksek derece olguların düşük derecelere göre daha fazla metastaz riski olduğu; ancak Patnaik I. derece tümörlerin % 5,8'inin, II. derece tümörlerin % 16,5'inin ve Kiupel düşük derece tümörlerin % 14,9'unun metastatik hastalık geliştirdiği belirtilmektedir. Bu sonuçlar göz önüne alınarak, değerlendirme sistemi ne olursa olsun prognoz konusunda sadece histolojik derecelendirmenin yeterli olmadığı, evrelendirmenin de göz önünde tutulması gerektiği bildirilmektedir (Stefanello ve ark. 2015).

Takeuchi ve ark. (2013)'nın çalışmasında her iki sisteme göre incelenen olgulardan Patnaik III. derece olanların I. ve II. derece olgulara göre önemli ölçüde daha kısa sağ kalım süresi ve tedavi sonrası sağlıklı süreye sahip oldukları, ancak I. ve II. dereceler arasında böyle bir fark izlenmediği, Kiupel da yüksek derece olguların düşük derece olgulara göre yine önemli ölçüde kısa sağ kalım süresi ve tedavi sonrası sağlıklı süreye sahip oldukları gözlemlenmiş, yapılan incelemelerde Kiupel sisteminin Patnaik sistemine göre değerlendiriciler arasındaki fark açısından daha tutarlı olduğu ve sağ kalım süresi ve hastalıktan ari sürenin prognozunun belirlenmesi açısından bağımsız olarak sonuç verdiği belirtilmiştir.

Vascellari ve ark. (2012)'nın 53 olgu ile gerçekleştirilen çalışmasında ise her iki sisteme göre değerlendirme yapılmış ve iki sistem de prognozla anlamlı ölçüde ilişkili bulunmuş, ancak % 23 oranında ölüm görülmesinden dolayı Patnaik derecelendirme sisteminde II. derece tümörlerin değerlendirilmesi noktasında zorluklarının olduğu görülmüştür. Kiupel'in ikili derecelendirme sisteminde ise yüksek dereceli olguların, % 71 oranında mortalite ile ilişkilendirilmesi ve patologlar arasındaki tutarlılığı arttırdığı belirtilmiştir.

CCMCTler için oluşturulan histolojik derecelendirme sistemleri subkutanöz MCTler için geliştirilmemiş olup, halen bu tümörlerin çoğu II. derece veya daha yüksek dereceli olarak değerlendirilmektedir (Thompson, Pearl ve ark. 2011). Ancak subkutan MCTlerin % 90'ından fazlası selim karakterli olup sadece cerrahi yöntemler ile tedavi edilebilmektedir (Kiupel 2017).

2.6.2. Klinik Evrelendirme (Staging)

Mast hücre tümörlerinin yaygın değerlendirmelerinden biri de büyümeleri/ilerlemeleri baz alınarak yapılan klinik evrelendirme/evrelemedir (Zemke ve ark. 2002). WHO tarafından önerilen bu klinik evrelemeye göre;

- Evre 0: Dermisten tam olarak eksize edilmemiş, histolojik olarak tanımlanmış, bölgesel lenf nodu tutulumu olmayan tek bir tümör,
- Evre I: Dermisle sınırlı, bölgesel lenf nodu tutulumu olmayan tek bir tümör,
- Evre II: Dermisle sınırlı, bölgesel lenf nodu tutulumu olan tek bir tümör,
- Evre III: Bölgesel lenf nodu tutulumu olan veya olmayan, büyük, infiltre olan çoklu dermal tümörler,
- Evre IV: Kan ve kemik iliği tutulumu dahil olmak üzere uzak metastazlı tümörler (Zemke ve ark. 2002; London ve Thamm 2013).

Köpeklerin çoğunda tümör metastaz eğilimi göstermemekte ve her olgu detaylı bir evrelendirmeyi gerektirmemektedir. Bununla birlikte, kapsamlı ve pahalı tedavi programları söz konusuysa ya da tümörün çok kötü diferensiye olduğu durumlarda detaylı evrelendirme önerilmekte, bu detaylı evrelendirmenin en azından drene olan lenf yumrusundan ince iğne aspirasyonu ve abdominal ultrasonu içermesi beklenmektedir (Blackwood ve ark. 2012).

Ancak, yapılan çalışmalarda evre II tümörlerin evre III tümörlere göre daha zayıf prognoz izlemesi gibi sonuçların alınması (Murphy ve ark. 2006) ve lenf nodu metastazının sadece çoklu tümör varlığı karşısında daha kötü bir prognozunun olacağı görüşü nedeniyle evre II ve III'ün yer değiştirmesi gerektiği düşünülmektedir (Kiupel 2017).

Literatürde rastlanan en yeni çalışmada, görülen sorunlara ilişkin olarak, mevcut evrelendirme sisteminin yeniden düzenlenmesi önerilmektedir (Horta ve ark. 2018). Bu çalışmada önerilen düzenlemeler aşağıda sunulmaktadır:

- Evre I: Tek bir tümör, lenf yumrusuna invazyon yok.
- Evre II: Çoklu tümörler (≥3), lenf yumrusuna invazyon yok.
- Evre III: Tek bir tümör, bölgesel lenf yumrusuna invazyon var.

- Evre IV: Sınırları olmayan, büyük ve infiltratif tümörler ya da bölgesel lenf yumrusuna invazyonu olan çoklu tümörler (≥3).
- Evre V: Kemik iliği invazyonu ve periferal kanda mast hücre mevcudiyeti dahil olmak üzere uzak metastazı olan tüm tümörler.

Horta ve ark. (2018) bu değişikliklerle eski WHO Evre II'nin Evre III olarak ele alınmasını, Eski WHO Evre III'ün ikiye ayrılarak II. ve IV. Evre haline gelmesini ve WHO Evre IV'nin Evre V olarak ele alınmasını önermektedir.

2.6.3. Klinik Bulgu ve Parametreler

2.6.3.1. Tümörün Bulunduğu Yer (Lokalizasyon) ve Boyutu

Uzun zaman boyunca tümörün bulunduğu yerin hem yer aldığı bölge hem de derinlik açısından incelendiği çalışmalarda prognostik açıdan önemli olmadığı raporlanmıştır.

Kiupel ve ark. (2005) 100 köpekten alınan MCT dokusu ile yaptıkları araştırmada tümör derinliğinin prognostik bir değerinin olmadığını, ancak kafa ve boyun bölgelerinde CCMCT saptanan köpeklerin uzak bölgelerde yeni MCT gelişimi konusunda daha yüksek risk taşıdıklarını belirtmişlerdir.

Sfiligoi ve ark. (2005) ise 124 olgu ile çalışarak inguinal ve perineal bölgelerde oluşan kutanöz MCTler ile vücudun diğer bölgelerinden alınan kutanöz MCTleri karşılaştırdıkları çalışmalarında, karşılaştırdıkları bölgelerin hastalığın tekrarlamadığı süre ve sağ kalım süresi açısından karşılaştırıldığında önemli bir fark göstermediğini raporlamışlarıdır. Yine inguinal ve perineal kutanöz MCTleri konu alan bir başka çalışmada uygun şekilde tedavi edildikleri sürece sağ kalım açısından diğer olgulardan farklı olmadıkları belirtilmektedir (Cahalane ve ark. 2004).

Reynolds ve ark. (2019) yüksek dereceli tümörleri inceledikleri çalışmalarında, inguinal bölgede yüksek dereceli tümör gelişiminin daha fazla olduğunu, bu durumun bölgenin mekanik stimülasyon ve kronik iritasyona açık bir bölge olmasına bağlanabileceğini, diğer çalışmalardan farklı olarak çalışmalarında baş bölgesinde de yüksek dereceli tümör riskinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Ancak son dönemde, Patnaik sistemine göre yerleşimi nedeniyle II. derece tümör olarak değerlendirilen subkutanöz MCTler, kutanöz MCT'lerden ayrılmaya

başlanmıştır(Thompson, Yager ve ark. 2011) ve bu çalışmalar öncesinde literatürde bulunan lokasyon konusundaki çalışmaların büyük bir kısmı bu ayrımı gözetmeksizin yapılmıştır.

Subkutanöz MCT'li 306 köpeğin değerlendirildiği bir çalışmada, uzun sağ kalım süresi, düşük nüks oranı ve metastaz ile çoğunun prognozunun olumlu olduğu kaydedilmiş, gösterdikleri bu özellikler dikkate alındığında sadece lokasyonlarına bakılarak II. derece olarak değerlendirilmemeleri gerektiği belirtilmektedir. (Thompson, Pearl ve ark. 2011).

Reynolds ve ark (2019), literatürde tümör boyutu ile histolojik derece arasında ilişkiyi belirten çalışma bulunmadığını, ancak yaptıkları retrospektif çalışma sonucunda eksizyon sırasındaki tümör boyutu ile tümörün histopatolojik derecesi arasında bir bağlantı olmadığını belirtmişlerdir.

2.6.3.2. Irk, Yaş ve Cinsiyet

Bostock (1973) Boxer ırkı köpeklerde rastlanan MCT'lerde iyi diferensiye olgu sayısının daha fazla ve bu nedenle daha uzun yaşam süreleri olduğunu, kendi çalışmasında ise Labrador/Retriever sayısı fazla olduğundan daha çok mastositoma geliştirdikleri gibi subjektif bir tablonun ortaya çıktığını açıklamıştır.

Kiupel ve ark. (2005), CCMCT teşhisli yaşlı köpeklerin ve boxer ırklarının uzak metastaz gelişmesi açısından daha yüksek risk altında olduğunu, CCMCT'li yaşlı erkek köpeklerin belirgin şekilde daha kısa yaşam süreleri olduğunu ve kısırlaştırılmış CCMCT'li köpeklerin daha kısa sağ kalım süreleri olduğunu raporlamıştır. Ancak, çalışmada da belirtildiği gibi, bu bulgular çok değişkenli analizlerle doğrulanmamıştır.

London (2010), MCT'lerin daha çok yaşlı hayvanlarda görülmekle birlikte (ortalama 8-9 yaş) genç hayvanlarda da rastlandığını, ancak herhangi bir cinsiyet yatkınlığı söz konusu olmadığını belirtmektedir. Benzer sonuçları gösteren birçok yayın bulunmaktadır (Patnaik ve ark. 1984; Pakhrin ve ark. 2007; Gudan-Kurilj ve ark. 2012).

Ancak MCT'lerin prognozunda ırk dışındaki diğer faktörlerin yeterince değerlendirilmediğini savunan ve Patnaik sistemine göre II. ve III. derece olarak raporlanan 252 olgunun değerlendirildiği bir başka makalede, kısırlaştırılmış dişilerin kısırlaştırılmamış dişilere göre MCT gelişimi konusunda önemli ölçüde artan bir risk altında olduğu, yine kısırlaştırılmış erkek köpeklerin kısırlaştırılmamış olanlara göre

muhtemelen daha fazla risk taşıdığı açıklanmıştır (White ve ark. 2011). Aynı makalede, Boxer, Labrador retriever, pug, Golden retriever, mastiff ve terrier filogenetik gruplarının dışındaki büyük ve dev ırk köpeklerde de MCT gelişme riskinin arttığı bildirilmektedir.

Reynolds ve ark. (2019)'ın yüksek dereceli tümörlerde hastaya bağlı faktörlerin etkisini araştırdıkları çalışmada ise; bazı ırkların yüksek dereceli CCMCT gelişimine yatkın olduğu ancak yaş, cinsiyet veya kısırlaştırma durumunun etkisi olmadığı belirtilmektedir.

2.6.3.3. Senkronize Çoklu Tümör Gelişimi

Kiupel ve arkadaşlarının (2005) 100 köpekten alınan MCT dokuları ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, senkronize çoklu tümör gelişiminin (aynı zamanda birden fazla tümör oluşması), sadece cerrahi yöntemlerle tedavi edilen köpeklerde, azalmış sağ kalım süresi ile ilişkili olduğunu açıklamışlardır.

İki veya daha fazla spontan tümörü olan 54 olgu ile yürütülmüş bir başka çalışmada ise, doğru bir şekilde eksizyonları gerçekleştirildiğinde, çoklu kutanöz MCTlerin düşük metastaz oranı, uzun sağ kalım süresi ve iyi prognozları olduğunu ve orta dereceli tekil tümörlerle kıyaslanabileceğini bildirmektedir (Mullins ve ark. 2006).

2.6.3.4. Cerrahi Sınırlar

Cerrahi tedavi mast hücre tümörlerinde halen en önemli tedavi yolu olmakla birlikte, tümör hücrelerinin görülebilen tümör alanının dışında da bulunabilmesi nedeniyle geniş cerrahi sınırla eksizyonu önerilmektedir. Tümörün lateralindeki normal dokudan 3 cm genişliğinde ve altında en az bir fasiyal katmanı kapsayacak şekilde eksizyonu ideal olarak kabul görmekle birlikte bu önerinin bilimsel tabanı hala eksik görülmektedir (McCaw ve ark. 1997). Bu nedenle cerrahi sınırların prognozda oynadığı rol birçok araştırmaya konu olmuştur. Seguin ve ark.'ın (2001), 55 adet II. derece MCT olgusunda gerçekleştirdiği çalışmada sadece cerrahi tedavi uygulanan olguların % 84'ünde nüks görülmemekle birlikte, prognostik bir değer belirtilememiştir. Yine Seguin ve ark.'ın (2006), II. derece tümörlerden oluşan 28 olgu ile yürütülen bir diğer araştırmasında ise tam olarak ekstirpe edilemeyen tümörlerde nüks oranının % 23 olduğu, bu oranın küçük olmasına karşın lokal olarak nüks eden olguların sağ kalım oranının negatif etkilendiği bildirilmiştir. Fulcher ve ark.'ın (2006), 16 MCT'li hastada cerrahi sınırlara ilişkin çalışması 2 cm lateral marjin ve bir fasiyal plan'ın I. ve II. derece

MCT'lerde tatmin edici sonuçlar verdiğini III. Derece tümörler için ileri araştırmalara ihtiyaç olduğunu bildirişlerdir. Simpson ve ark.'ın (2004), I. ve II. derece MCTleri olan 21 hastada geçekleştirdikleri çalışmanın sonucunda olguların hiçbirinde lokal nüks görülmediğinden bu tip tümörlerin tam ekstirpasyonu için 2 cm lateral marjin ve bir fasiyal plan'ın uygun olduğunu önermektedir. Ancak çalışmada III. Derece tümör bulunmaması, olgu sayısının azlığı ve olguların % 24'ünde farklı bölgelerde yeni MCTlerin gelişmesi cerrahi sınırın prognostik değeri konusunda daha ileri çalışmaların yapılmasının gerektiğini düşündürmektedir.

Michels ve ark.'ın (2002), histopatolojik olarak tümör hücresi bulunan ve bulunmayan cerrahi sınırlara dair 31 olgunun dahil edildiği çalışmasında nüks ve tümör ilişkili ölümler gözlenen hayvanlarda her iki grup arasında prognostik açıdan anlamlı bir fark bulunamamış, ancak bu durumun örnek sayısının yetersizliğinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ozaki ve ark.'ın (2007), II. derece 48 tümör olgusunun 30 aylık postoperatif takibi ile gerçekleştirdiği çalışmanın sonuçları, nüks ve/veya metastaz ve mortalite oranlarının tümörün cerrahi olarak tamamen alınmadığı grupta tümörün tam olarak alınabildiği gruba göre daha yüksek olduğunu ve II. derece tümörlerde tam olmayan eksizyonun göreceli olarak daha yüksek metastaz oranı ve kötü prognoza neden olduğunu göstermiştir. Donnelly ve ark.'ın (2013), 39 yüksek 51 düşük derece olmak üzere 90 MCT olgusunda gerçekleştirdiği çalışmada, düşük dereceli tümörlerin % 29'unun 3mm'den daha az sınırlarda histolojik olarak temiz göründüğü ve nüks etmediği ve 3mm gibi yakın sınırların bile düşük dereceli tümörlerde nüksü önleyebildiği, yüksek dereceli tümörlerin ise histolojik olarak tümörden temiz sınırlarla bağlantılı olmaksızın lokal nükse yatkın olduğu raporlamaktadır.

Schulteiss ve ark. (2011) ise I. ve II. Derece tümörlerin çoğunun önerilenden daha düşük cerrahi sınırlara rağmen (≥ 10 mm lateral marjin ve ≥ 4 mm derin marjin) başarıyla cerrahi tedavisinin yapıldığı ve 100 köpekten II. ve III. derece tümörleri olan 4 olguda ölümle ilişkilendirilen metastatik hastalık geliştiğini raporlamaktadır.

Benzer birçok araştırma bulunmakla birlikte, histolojik olarak sınır değerlendirilmesinde herkes tarafından kabul edilen ve uygulanan bir metot bulunmaması ve çalışmaların çoğunun bu marjinlerin tam olarak nasıl değerlendirildiğini belirtmemesi, nüks kavramının ise mutlaka aynı yerde bir büyümenin olması ve bunun histoloji ya da sitoloji ile teşhisinin yapılarak altının doldurulması gerekliliği bu araştırmalar konusunda

dikkati çeken ve üzerinde durulması gereken önemli noktalar olarak karşımıza çıkmaktadır (Kiupel 2017).

Thompson, Pearl ve ark. (2011) ise, subkutan MCT olguları ile gerçekleştirdiği çalışmada, olguların çoğu için tam bir cerrahi eksizyonun tek başına etkin bir tedavi olduğunu ve tümörün iyi sınırlı, eksizyonun tam olarak gerçekleştirildiği olgularda nüksün mümkün görünmediğini raporlamışlardır.

2.6.3.5. Tümörle İlişkili Sistemik Klinik Bulgular

Mast hücre tümörleri gelişen köpeklerin, genellikle paraneoplastik sendromlardan etkilendiği bilinmekte, bu tür hayvanlarda gelişen gastrik ülserasyon ise hiperhistaminemiye bağlanmaktadır. Bu konuda 17 MCT'li köpekte plazma histamin konsantrasyonları ölçülerek yapılan bir çalışmada MCT'li köpeklerin plazma histamin konsantrasyonlarının, normal köpeklere oranla önemi oranda daha yüksek olduğu, ancak plazma gastrin konsantrasyonların tam tersi şekilde gözlemlendiği ve bu durumun mide hiperasiditesinin hiperhistamineminin sekonder etkisi olduğunun dolaylı bir kanıtı olduğu düşünülmektedir. Yine de bu çalışmada kullanılan olgularda plazma histamin ve gastrin konsantrasyonlarının hastalığın klinik evreleri, tümörün histolojik derecesi veya tümör boyutu ile bir korelasyonunun bulunmaması ve hiperhistamineminin tüm MCT'li köpeklerde görülebilmesi plazma histamin konsantrasyonunun prognostik değerini sorgulatmaktadır (Fox ve ark. 1990).

2.6.4. Histopatolojik ve Moleküler Bulgular

MCTler yoğun olarak mast hücrelerden oluşmakla birlikte, değişen sayılarda eozinofilleri ve mezenşimal hücreleri de içerebilmektedir (Whitney ve Berent 2010). Mast hücrelerin eozinofilotaktik maddeler içeren granüllerinden bu maddelerin serbest kalmasının hem tümördeki lokal eozinofil infiltrasyonunun hem de periferal eozinofilinin sebebi olduğu düşünülmektedir (Macy 1985). Ancak şimdiye kadar eozinofil sayısı ile tümör derecesi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Bostock 1973; Atalay Vural ve Aydın 2001).

Proliferasyon belirteçlerinin değerlendirilmesi tümör patolojisinde yaygın olarak ele alınmaktadır. Şimdiye kadar MCT'lerin prognozunu belirlemede birçok proliferasyon belirteçlerinin önemi değerlendirilmiştir. Belirlenen proliferasyon belirteçlerinin hücre bölünmesine giren hücre sayısının belirlenerek sadece mitotik figürleri saymanın dışında

mitozun diğer fazlarındaki hücrelerin de belirlemesini sağladığından daha sağlıklı bir tahmin sağladığı düşünülmektedir (Scase ve ark. 2006).

Ki67 indeksi, AgNOR (argirofilik çekirdekçik yapıcı bölgeler, argyrophilic nucleolar organizing regions) ve PCNA (prolifere olan hücre nükleer antijeni, proliferating cell nuclear antigen) sayımları, Mitotik indeks (Mİ) ve mast hücrelerin proliferasyonundaki etkili faktörlerden olan KIT ekspresyonu CCMCT'lerin prognozunun değerlendirilmesinde kullanılan başlıca belirteçlerdir (Kiupel 2017).

Mast hücrelerde kontrollü hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozu (Kerr ve ark. 1972), düzenleyen büyüme faktörleri, kaspazlar, tümör nekroz faktör-α, monomerik IgE, Toll-like reseptörler ve Bcl-2 ailesi proteinleri gibi birçok mekanizma üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Gerbaulet ve ark. 2006, Barra ve ark. 2017).

Sitopatolojik nükleer morfometri CCMCTlerin derecelendirilmesinde ek bir yöntem olarak önerilmekte ve tümör progresyonu hakkında bilgi verdiği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada ortalama nükleer alan ve ortalama nükleer çeperin üçlü derecelendirme sistemine göre değerlendirilen tümörlerde I. ve III. Derece tümörler arasında önemli farklılıklar gösterdiği raporlanmıştır (Maiolino ve ark. 2005). CCMCTlerde ortalama nükleer alanın değerlendirildiği bir diğer çalışmada ise nükleer alan genişledikçe sağ kalım zamanının azaldığı ve ucuz, hızlı, kesin ve tekrarlanabilir olması nedeniyle sitomorfometrinin özellikle II. derece tümörlerde başlı başına prognostik bir faktör olarak değerlendirilebileceği raporlanmıştır (Strefezzi ve ark. 2009).

Tümör içi kılcal damar yoğunluğunun (IMVD) bir anjiyogenez belirteci olarak MCTlerin biyolojik davranışını belirlemedeki öneminin araştırıldığı bir çalışmada, anjiyogenezin insan hastalarda da olduğu gibi yaşam süresi ile bağlantılı olduğu, IMDV'nin ameliyat sonrası tümör davranışı konusunda hassas bir belirteç olduğu, ayrıca bu parametrenin olduğu bilinen mitotik indeks gibi diğer histopatolojik parametrelerle benzer şekilde prognostik değeri olduğu raporlanmıştır (Preziosi, Sarli ve ark. 2004).

CCMCT'lerde prognostik değerleri incelenen diğer molekül ve belirteçler; p53, MDM2, serotonin ve serotonin reseptörü, COX-2, siklin D1, prostaglandin E 2, MCM7, triptaz ve p21 ekspresyonları ile plazma histamin konsantrasyonları olup diğer çeşitli belirteçlerle aralarında ilişkiler bulunmakla birlikte, verdikleri prognostik bilgilerin diğer belirteçlerden ileri gidemediği bilinmektedir (Kiupel 2017; Kiupel ve ark. 2004).

Bu çalışmada ele alınan belirteçler hakkında detaylı bilgi aşağıda sunulmaktadır.

2.6.4.1. Ki67

Ki67 hücrenin tüm aktif fazlarında bulunup mitozun geç fazlarında azalmaya başlayan bir protein olup, G0 fazında ya da dinlenmekte olan hücrelerde bulunmayan bir proteindir (Gerdes ve ark. 1984; Scholzen ve Gerdes 2000). Ki67'nin normal ya da tümör hücresi olsun olmasın çoğalan tüm hücrelerde bulunması, belirli bir hücre grubunun (farklı tip tümörler de dahil olmak üzere) çoğalması hakkında iyi bir belirteç olmasının önünü açmıştır (Scholzen ve Gerdes 2000).

Sakai ve arkadaşlarının (2002), çalışmasında Ki67'nin PCNA gibi diğer proliferasyon belirteçlerine göre çok daha iyi bir standart olduğu belirtilmekte 'altın standart' ifadesi kullanılmaktadır. Scase ve ark. (2006), 85 hastada Patnaik derecelendirme sistemini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada, ikili bir Ki67 değişkeni önerilerek (Ki-67 skoru eşik değeri (cutoff noktası) =1.8) II. derece MCTlerde sağ kalım süresi için önemli bir belirleyici olduğunu bildirmişlerdir. Buna göre II. derece MCTye sahip köpeklerin sırasıyla 1, 2 ve 3 yıllık sağ kalım ihtimalleri ve Ki67 skorları 1.8, 0.92 ve 0.86'dan daha az olacak şekilde belirtilmiştir. Yine aynı süreler göz önünde tutulduğunda, Ki-67 skoru 1.8'den yüksek olan II. Derece MCT'li hastalarda sağ kalım ihtimali 0.43, 0.21 ve 0.21 olarak verilmiştir.

Yine aynı çalışmayı desteklemek üzere yapılan ve Patnaik derecelendirme sisteminin II. derece olarak belirlediği tümörlerde prognoz belirlemede yaşanan sıkıntıya dikkat çeken bir çalışma, 163 olguda Ki67 indeksinin prognozla ilişkisini değerlendirmiş, bu indeksin klinisyene bir fikir vereceğini ancak kötü prognozun yerel nüks, metastaz ya da sistemik hastalığa bağlı olup olamayacağı hakkında fikir vermediği için terapi konusunda belirteç olamayacağı sonucuna varılmıştır (Maglennon ve ark. 2008).

Ozaki ve arkadaşlarının (2007), II. derece CCMCT'li hastalarda gerçekleştirdiği çalışmada tümörü tam olarak ekstirpe edilen ve edilemeyen hastalarda Ki67 boyanması ayrı ayrı incelenmiş, tümörü tam olarak ekstirpe edilemeyen grupta düşük Ki67 boyanması olan gruplar anlamlı şekilde daha iyi sağ kalım oranı sergilemiş, ancak Ki-67 pozitifliği ile nüks ve metastaz oranı anlamlı bir korelasyon gösterememiştir. Webster ve arkadaşlarının (2007), proliferasyon belirteçlerini değerlendirdikleri çalışma ise artan Ki67 ve AgNOR sayımlarının anlamlı şekilde azalan sağ kalım süresiyle ilişkili olduğunu bildirmekte, bu belirteçlerin rutinde prognoz belirlemede kullanılmasını önermektedir.

Yine Ki67 ve mitotik indeksin prognostik önemini öne çıkaran Vascellari ve ark. (2012)'nın çalışmasında, Ki67 indeksinin ≥10,6 olan bir hastanın ölüm ihtimalinin daha düşük Ki67 indeksli bir hastaya göre 8 kat fazla olduğu belirtilmekte ancak Ki67 eşik değerinin (cut off value) ve sayımının yayından yayına değişiklik göstermesi nedeniyle standardizasyonunun yapılmasının patologlara daha iyi bir cut off değeri belirleme, klinisyenlere ise prognozu daha iyi değerlendirme konusunda yardımcı olacağını ifade etmektedir.

2.6.4.2. Bax

Bax proteini Bcl-2 ailesinden mitokondriyal membranda delikler açarak apoptozla hücre ölümüne yol açan proteinlerdendir (Westphal ve ark. 2011).

24 CCMCT'nin materyal olarak kullanıldığı ve Bax'ın immunohistokimyasal ekspresyonunu, histolojik derece ve prognostik değerini inceleyen bir çalışmada, Bax ekspresyonu'nun histolojik derece ile birlikte yükseldiğini, yüksek Bax ekspresyonu olan hayvanların hastalıktan ölme oranının arttığını ve operasyon sonrası hayatlarının kısaldığını, bu verilerin Bax ekspresyonunun tümörün agresyonuyla ilişkili olabileceğini gösterdiği belirtilmektedir (Strefezzi ve ark. 2012).

Elli olguya ait örneklerle de yapılan bir başka çalışmada ise, yine yüksek Bax ekspresyonu gösteren olguların, MCT nedeni ile ölüm oranlarının 5 kat fazla olduğu bulunmuştur (Barra ve ark. 2017).

2.6.4.3. Bcl-2

Apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde en iyi bilinen protein ailesi olan Bcl-2 ailesi anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerden oluşmakta; bunlardan Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apopotik üyeler, apoptozu kaspazların sekestrasyonu veya mitokondriyal apoptojenik faktörlerin salınımını bloke etme yoluyla engellemektedir ve artmış ekspresyonları birçok kanser türünde gözlemlenmektedir (Vascellari ve ark. 2012; Tsujimoto 1998).

Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin yüksek ekspresyonunun, insanlarda mast hücrelerinin sağ kalım süresini uzattığı ve bu nedenle mastositozis patogenezine katkıda bulunabileceği raporlanmıştır (Hartmann ve ark. 2003).

Yapılan literatür incelemelerinde Bcl-2 proteininin CMCT'lerin progresyonu ve prognozunda muhtemel rolü üzerine yapılan tek çalışmanın Vascellari ve ark. (2012)'nın

çalışması olduğu görülmüştür. Söz konusu çalışmada İHK kullanarak incelenen köpek mast hücre tümörü dokularında, tüm olgularda Bcl-2'nin neoplastik mast hücre sitoplazmalarında eşit bir şekilde dağılım göstermelerine rağmen Bcl-2 protein ekspresyonuyla derecelendirme sistemleri ve sağlık durumları arasında korelasyon saptanamadığı ancak moleküler çalışmalar sırasında neoplastik dokularda cerrahi sınır ve kontrol dokuları örneklerine göre Bcl-2 mRNA ekspresyonunda önemli bir azalma olduğu bildirilmiş ve bu konuda yeni çalışmaların yapılmakta olduğu belirtilmiştir.

2.6.4.4. KIT (CD117, c-kit)

KIT (CD117), mast hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücrede c-kit proto-onkogeni tarafından eksprese edilen bir tip III tirozin kinaz kök hücre faktör reseptörü (SCF, Stem Cell Factor) olup, mutasyona bağlı olarak fonksiyonunun arttığı durumlarda, KIT bağımlı hücreler olan barsaklardaki interstisyel Kajal hücreleri, mast hücreleri ve germ hücreleri gibi hücelerin tümörleri'nin oluşumuna neden olmaktadır (Miettinen ve Lasota, 2005; Webster ve ark. 2006).

c-kit proteini MCTlerin onkogenezisi üzerindeki rolü ve bu nedenle c-kit inhibitörlerinin kullanımı noktasında terapötik bir hedef oluşu nedeniyle veteriner onkolojide güncel bir araştırma konusu halini almıştır (Gil da Costa 2015).

Yapılan çalışmalar, KIT proteininin CMCT'lerin prognozunda önemli bir belirleyici olduğuna işaret etmektedir (Preziosi, Morini ve ark. 2004; Webster ve ark. 2007; Gil da Costa ve ark. 2007; Zemke ve ark. 2002; Kiupel ve ark. 2004).

Webster ve ark. (2006), MCT'lerin köpeklerdeki yüksek prevalansı ve c-kit'in köpek MCT'lerinde oynadığı rol düşünüldüğünde; CCMCT'lerin insan ve hayvan neoplazilerinde c-kit'in biyolojisini çalışmak için çok iyi bir in vivo model olduğunu hatta c-kit nedenli kanserleri için test edilecek c-kit proto-onkogenini hedefleyen kemoterapik tedaviler için de mükemmel bir model olduklarını ve c-kit proto-onkogeninin CCMCT tedavisinde potansiyel bir hedef olduğunu belirtmektedir.

Ma ve ark. (1999)'nın, c-kit jukstamembran mutasyonlarını inceledikleri çalışmalarında, yedi CCMCT olgusunın üçünde, beş farklı mutasyon bulmuş ve bu mutasyonların KIT'in yüksek oranda spontan tirozin fosforilasyonuna neden olduğunu ve c-kit jukstamembran mutasyonlarının aktivasyonunun MCT gelişiminde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir.

London ve ark. (1999)'nın çalışmasında ise, on bir CCMCT olgusundan beşinde ekson 11 ve 12'de gelişen yeni tandem duplikasyonlar raporlanmış, bu duplikasyonların c-kit proteininin (KIT) yapısal fosforilasyonu ile ilişkili olduğundan köpeklerde MCT oluşumu sürecinde rol oynadığı düşünülmüştür.

Zemke ve ark. (2001)'nın çalışmalarında, 15 CCMCT'den ikisinde jukstamembran domain duplikasyonu saptamış, hatta bu olguların birinde nüks görülmüş, aynı mutasyon tekrar saptanmış hatta patolojik tümör teşhisinin net olmadığı bu dokuda moleküler doğrulama sağlanmıştır.

Zemke ve ark. (2002)'nın kanin mastositomalarında c-kit mutasyonları üzerine 88 CCMCT dokusu kullanarak yaptığı daha detaylı bir çalışmada ise tümör derecesi ile c-kit jukstamembran domain mutasyonları arasında bir ilişki olduğu belirtilmekle birlikte, I. derece tümörlerde bu mutasyonlara rastlamamaları, II. derece tümörlerin % 10'undan azında ve III. Derece tümörlerde her altı tümörden dördünde rastlamaları jukstamembran duplikasyonlarının sadece agresif tümörlerde görüldüğünü, bu durumun c-kit mutasyonlarının tümörojenik gelişimde rol aldığına işaret ettiğini düşünmelerine ve diğer domainlerin de çalışılmasını önermelerine neden olmuştur.

Letard ve ark. (2008) ise KIT aktive eden mutasyonların 8 ve 9. eksonlarda da saptandığını belirtmişlerdir.

Moleküler çalışmaların yanı sıra immunohistokimyasal çalışmalarla da görülen KIT proteinlerinin anormal ekspresyonunun CCMCTlerin prognozuyla negatif ilişkisi ortaya koyulmuştur (Kiupel 2017).

Bu konuda yapılan ilk çalışmada materyal olarak 23 MCT kullanılmış, bunların yoğunluk ve reaksiyonu değişmekle birlikte tüm örneklerde I. derece tümörlerde en az, III. derecelerde en fazla olmak üzere ekspresyon görülmüş, boyanma paternlerinin (protein ekspresyonunun lokasyonuna ilişkin desenler) ise normal ve bazı neoplastik hücrelerde daha çok hücre membranlarında görülürken, tümörlerin bir çoğunda genellikle hücre çekirdeğine yakın olacak şekilde sitoplazmada yoğunlaştığı raporlanmış, ancak bu paternler tam olarak anlamlandırılamamıştır (Reguera ve ark. 2000).

Preziosi, Morini ve ark. (2004)'nın, MCTlerde KIT proteini üzerine 31 CCMCT olgusu ile yaptıkları çalışmada temel olarak üç farklı boyama paterni olduğunu görmüşlerdir:

- Diffuz patern: Mast hücrelerinin sitoplazmaları boyunca yoğun KIT ekspresyonun gözlemlendiği patern,

- Yüzey ilişkili/membranöz patern: Hücre membranında yerleşmiş immunopozitivite,

- Sitoplazmik perinükleer patern: KIT ekspresyonunun neoplastik mast hücrelerinin sitoplazmalarında nükleusa yakın saptandığı patern.

Söz konusu çalışmada olguların % 55'inde diffuz, % 13'ünde membranöz, %16'sında sitoplazmik perinükleer boyanma görülürken bazı olgularda ise karışık paternler görüldüğü, olguların % 10'unun sitoplazmik perinükleer ve membranöz paterni, % 6'sının ise membranöz ve sitoplazmik diffuz paterni birlikte gösterdiği bildirilmiştir. I. ve II. derece tümörlerde farklı paternler gözlenebilirken III. derece tümörlerde sadece sitoplazmik perinükleer patern gözlemlenmiş, bunun da III. derece tümörlerin teşhisinde sağ kalım süresi ile ilgili yorum yapılmasında önemli bir belirteç olduğu öne sürülmüştür. Yapılmış diğer genetik çalışmalarda tüm MCT'lerde mutasyon görülmemesine karşın, bahsedilen çalışmada, diğer immunohistokimyasal çalışmalarda olduğu gibi, tüm MCT'lerin immunohistokimyasal olarak KIT paternine sahip olduğu görülmüştür.

Kiupel ve ark. (2004)'nın, sadece cerrahi müdahale ile tedavi edilen CCMCT olgularında KIT ve triptaz immunohistokimya paternlerini inceledikleri çalışmada, üç farklı KIT boyama paterni belirlenmiştir. Bu paternler; (i) membran ilişkili boyanma, (ii) düşük membran ilişkili fokalden benekli görünüme değişen şekilde boyanma, (iii) diffuz sitoplazmik boyanma olarak tanımlanmıştır. Aynı çalışmanın sonuçları ayrıca, artan sitoplazmik KIT boyanmasının artan yerel nüks ve azalan sağ kalım zamanı ile anlamlı şekilde bağlantılı olduğunu göstermekte ve KIT paternlerinin yeni bir prognostik değerlendirme kriteri olmasını önermektedir. Ancak bu çalışmada paternler histolojik derecelerle korele edilmemiştir.

Webster ve ark. (2006), 42 MCT ile geçekleştirdikleri çalışmada doku microarray, immunfloresan, immunohistokimya ve PCR yöntemleri kullanarak incelemeler yapmış, ve c-kit mutasyonları görülen MCT'lerin nüks görülme oranı ve ölümle anlamlı şekilde ilişkili olduğu, c-kit mutasyonlarının aynı zamanda anormal protein lokalizasyonu ile ilişkili olduğu, ancak KIT ekspresyon seviyesinin c-kit mutasyonları veya değişen protein lokalizasyonu ile bir korelasyonu bulunmadığını açıklamışlardır. Çalışmanın İHK kısmına daha detaylı bakıldığında görülmektedir ki; söz konusu çalışmada Webster ve

ark. (2006) İHK çalışmalarını daha önce Kiupel ve ark. (2004)'nın çalışmasında belirtilen paternlere göre gerçekleştirmiş, yangısal MCT'lerde de izlenen patern olan perimembranöz boyanma dışında kalan iki paterni anormal KIT lokalizasyonu olarak tanımlamış ve bu anormal lokalizasyonun c-kit mutasyonlarıyla ilişkili olduğunu bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada da KIT paternleri histolojik dereceler ile korele edilmemiştir. Turin ve ark. (2006)'nın, köpek MCT'lerinde c-kit protoonkogen ekspresyonu üzerine yaptığı dinamik çalışmada c-kit ekspresyon seviyelerinin ölçülebilmesine rağmen prognozla bir korelasyonu bulunamamış, dolaşımdaki mast hücrelerin azaltılması için cerrahinin temel yaklaşım olduğu doğrulanmış ve çok iyi diferensiye I. derece MCT'ler dahil olmak üzere MCT'lerde dolaşımda mast hücrelerin görülebileceği raporlanmıştır. Çalışmada elde edilen, sitolojik olarak dolaşımda mast hücreye rastlanmasa bile c-kit ekspresyonu bulgusu ve cerrahi prosedür sonrasında kandaki c-kit ekspresyonunda düşüş görülmesi önemli sonuçlardır. Gil da Costa ve ark. (2007)'nın, CCMCT'lerde KIT paterni, c-kit mutasyonları ve proliferasyon indeksi olarak kullanılan AgNOR ve Ki67'nin değerlendirildiği çalışmalarında; KIT paterni olarak Kiupel ve ark. (2004)'nın çalışması referans alınmış ve Patnaik histolojik değerlendirme sistemi, nekroz varlığı ve mitotik indeksle ile korele edilmiş ve yüksek oranda anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen bulgular KIT'in CCMCT'lerdeki rolünü doğrulamakta ve anormal KIT ekspresyonu ile artmış hücre proliferasyonu ve yüksek histolojik derece arasında bir ilişki olduğunu doğrular niteliktedir.

Thompson, Yager ve ark. (2011) ise son dönemde kutanöz MCT'lerden ayrılması savunulan subkutan MCT'lerde yaptıkları çalışmalarında kullandıkları hücresel proliferasyon belirteçleri (MI, Ki67 ve Ki67 ile AgNOR kombinasyonu) ve hücresel KIT yerleşim paternlerinin lokal nüks ve metastazla ilişkili olduğunu ve bu nedenle subkutan MCT'ler için prognostik değeri olduğunu raporlamışlardır.

Ancak bir diğer görüşe göre c-kit mutasyonları her ne kadar köpeklerde CCMCT'ler için uygun bir belirteç olarak önerilse de tüm CCMCTlerde görülmediğinden henüz neoplastik ve neoplastik olmayan mast hücreleri için ayırıcı bir belirteç olarak uygun değerlendirilmemektedir (Meyer ve ark. 2012).

Vučićević ve ark (2018) ise 52 MCT'yi Kiupel sistemine 16 düşük, 36 yüksek dereceli tümör olarak sınıflandırmış, KIT immunohistokimyasal paternlerini incelediklerinde, düşük dereceli olan tümörlerin hepsinin membran yerleşimli KIT

ekspresyonu gösterdiğini, yüksek dereceli tümörlerin çoğunun ise sitoplazmik ekspresyon gösterdiğini belirtmiştir. Söz konusu çalışmada, bu durumun anormal KIT ekspresyonunun artmış hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğunu düşündüklerini, KIT ekspresyon paternlerinin yanı sıra mitotik figürler, çok çekirdekli hücreler, düzensiz şekilli çekirdekler ve karyomegalinin de en önemli prognostik faktörler olduğu ifade edilmiştir. Vučićević ve ark. (2018) ayrıca, daha önce bazı çalışmalarda anormal KIT ekspresyonunun yüksek dereceli ancak mutasyon görülmeyen tümörlerde de görüldüğü bildirildiğinden KIT ekspresyonunun köpeklerde MCT teşhisi ve sınıflandırılmasında rutin olarak kullanılması gerektiğini belirtmektedir.

Onkoloji-Patoloji Çalışma Grubu'nun son konsensüs dokümanına göre ise; hiçbir prognostik belirteç %100 belirleyici olmamakla birlikte, c-kit gen mutasyonları ve KIT lokalizasyonunun histolojik olarak en "belirsiz" tümörlerde en faydalı belirteç olabileceği, c-kit mutasyonunun histolojik olarak düşük dereceli ancak biyolojik olarak agresif tümörlerin belirlenmesinde, membran KIT lokalizasyonunun ise progresif hastalık olasılığı düşük tümörlerin belirlenmesinde kullanılabileceği belirtilmektedir (Thamm ve ark. 2019).

2.6.4.5. CD25

CD25 interlöykin-2 reseptör α zinciri (IL-2R α) olup; başta düzenleyici T hücreleri olmak üzere aktive T hücreleri, B hücreleri ve monositler tarafından eksprese edilir (Tizard 2013). CD25, WHO sınıflandırmasına göre insanlarda görülen sistemik mastositoz için minör değerlendirme kriterleri arasındadır ve teşhislerde Triptaz ve KIT ile birlikte rutin olarak kullanılmaktadır (Horny 2007). Anormal mast hücrelerinin normal olmayan bir şekilde CD25 ve bir diğer IL-2 reseptörü olan CD2 antijenlerini eksprese ettiği bilinmektedir (Sandes ve ark. 2013).

Meyer ve ark. (2012)'nın çalışması, CD25'i alerjik dermatit sırasında aktifleşmiş mast hücreleri haricinde dinlenen bağ doku mast hücrelerinde görülmemesi ve köpek neoplastik mast hücrelerinde görülmesi nedeniyle bir MCT belirteci olarak önermekte, ekspresyon seviyelerinin histolojik dereceyle negatif korelasyonu olmasının tümör biyolojisinde ilk tümör gelişimi evresinde potansiyel etkisi olduğu ancak bu etkinin malign davranışta yüksek bir etkisinin olmadığını ortaya koymaktadır. Yine aynı çalışmanın sonuçlarına göre, CD25'in yüksek dereceli tümörlerdeki düşük ekspresyonunun bir pozitif tümör belirteci olarak kullanılmasında soru işareti oluşturduğu

ve CCMCTlerin diğer IL-2R sub-ünitelerini eksprese edip etmediği ve bunun sonucunda IL-2'nin bağlanması ile stimüle olup olmadığı sorgulanmaktadır.

Bir başka tecrübeli araştırmacı Kiupel (2017)'in çalışmalarına göre ise, köpeklerde CD25'in neoplastik olmayan çok sayıda mast hücrede de eksprese edildiğinin görüldüğü, bu nedenle CD25'in tümör ekstirpasyonu sırasında cerrahi sınır belirlenmesinde kullanılmasını amaçlayan bir araştırmanın başarısız olduğu belirtilmektedir.

2.6.4.6. Mitotik İndeks

Mitotik indeks hücre çoğalmasının dolaylı bir ölçütü olup, birçok insan ve köpek tümöründe güçlü bir gösterge olarak önerilmektedir. Ancak son dönemde yapılmış bir çalışma, veteriner patoloji yayınlarında mitotik indeks kavramının çoğunlukla mitotik sayım yerine yanlış bir şekilde kullanıldığını belirtmekte, sayım yöntemi ve alanlar açısından bir standardizasyonun gerekliliğini vurgulamaktadır (Meuten ve ark. 2016).

Bu çalışmada kavramın diğer çalışmalarla karşılaştırılmasında bir karmaşa yaşanmaması adına "Mitotik İndeks" kavramı "Mitotik Sayım" yerine kullanılmaya devam edilmiş, literadürde en çok kullanılan sayım yöntemi metot olarak tercih edilmiştir.

Berlato ve ark. (2013) MI'nin Kİ67 indeksi ile birlikte Birleşik Krallık'ta en çok kullanılan proliferatif markır olduğunu, rutin hematoksilen eosin (H.E.) kesitlerden tayin edilebilen bir markır olup, iki farklı çalışmada (Romansik ve ark. 2007; Elston ve ark. 2009) tümör derecesi ve sağ kalım ile ilişkilendirildiğinden sıklıkla ticari laboratuvarların rutin histopatoloji raporlarında yer almaya başladığını belirtmektedir.

Romanisk ve ark. (2007)'nın, 148 olgu ile yürüttüğü çalışma, H.E. preparatlar üzerinden rutin histopatolojik inceleme sırasında kısa bir zamanda değerlendirilebilen mitotik indeksin, MCT biyolojik davranışı ve sağ kalım süresinin güçlü bir ön göstergesi olduğunu ve ek bir prognostik indikatör olarak değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Literatürdeki diğer çalışmalar da mitotik indeksin belirtilen özellikleri dolayısı ile prognostik bir indikatör olarak kullanılabileceği görüşünü desteklemektedir (Berlato ve ark. 2013; Vascellari ve ark. 2012).

Elston ve ark. (2009), Romanisk ve arkadaşlarının çalışmasına dayanarak yaptıkları doğrulama çalışmasında, MCT'li köpeklerde mitotik sayımın prognostik

öneminin altını tekrar çizmiş, ancak Romanisk ve arkadaşlarının 5 olarak belirlediği eşik değerinin 1 ve 7 olarak değerlendirilmesinin ve hastaların üç guruba ayrılmasının daha iyi sonuçlar vereceğini belirtmiş ancak bunun için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu da eklemiştir.

Mitotik indeksin değerli bir parametre olmasına rağmen hücresel proliferasyon için tek bir belirleyici olarak kullanılmasının, sayım sırasındaki alan seçimi, kesit yüzü, alan çapı, artifakt bulunması, nekroz ve/veya apoptotik hücrelerin varlığı gibi faktörlerden etkilenebilmesi nedeniyle dezavantajlı olacağı ve bunu aşabilmek için ise diğer histokimyasal ve immunohistokimyasal metotlarla desteklenmesi gerektiği (Thompson, Yager ve ark. 2011) ve halen net bir eşik değerin belirlenememiş olmasının teşhiste kullanılmasını zorlaştırdığı (Vascellari ve ark. 2012) da diğer görüşler arasındadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan Dokularının Toplanması

Çalışmada, çalışma süresince köpeklerden derinin değişik bölgelerinden alınmış veya anabilim dalımız doku arşivinde bulunan toplam 64 MCT olgusu incelenmiş ve bunlardan; (i) ilk defa gelişmiş, (ii) histolojik inceleme ile MCT olarak doğrulanmış, (iii) hastaların takip bilgilerine ulaşılabilen ve çalışmadaki analizler için uygun, formolde fikse edilmiş ve prafin bloklara gömülmüş doku örnekleri bulunan 59 olgu araştırma için seçilmiştir.

Bu olguların 4'ü subkutan MCT, 1'i de daha önce kayıtlı bir olgunun nüksü olduğu saptandığı için çalışma dışı bırakılmıştır. Sonuç olarak, 2011 Ocak – 2017 Şubat tarihleri arasında İ. Ü. C. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda (n=35) ve Özel Veteriner Patoloji Laboratuvarlarında (n=19) teşhis edilen olgular olmak üzere toplam 54 olguya ait formolde fikse edilmiş ve parafin bloğa gömülmüş doku örneği materyal olarak kullanılmıştır.

Araştırma için etik kurul izni alımış olup (İ. Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 04/06/2015 tarih ve 2015/55 sayılı kararı), tümör biyopsileri ve total ekstirpasyonları hastaların rutin tedavi prosedürünün bir parçası olarak İ.Ü.C. Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı'nda veya özel kliniklerde kliniklerin sorumlu Veteriner Hekimleri tarafından hayvan refahı prensiplerine göre gerekli anestezi prosedürlerine uyularak gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında araştırmacılar hayvanlara hiçbir invazif girişim veya medikal tedavide bulunmamışlardır.

3.2. Hastaların Klinik ve Prognostik Bilgilerinin Toplanması

Çalışma materyalini oluşturan tümör dokularının alındığı hastalara ait klinik ve prognostik bilgilerin düzenli bir şekilde toplanması ve değerlendirilebilmesi için bir hasta takip formu hazırlanmış ve her bir hasta için tüm bilgilerin toplanmasına gayret edilmiştir. Takip formunun bir örneği formlar başlığı altında yer almaktadır.

Hasta takip formları fakülte hastanesinde kayıtlı hasta takip dosyaları, hastaların sorumlu veteriner hekimleri ve hasta sahipleri ile yapılan mülakatlara bağlı olarak doldurularak olguların klinik takipleri ve prognostik çalışma için gerekli bilgiler toplanmıştır.

Elde edilen bilgilerden cinsiyet, kısırlaştırma, tümör lokalizasyonu, nüks ve tümör sayısına ilişkin bulgular ile teşhisten sonraki yaşam süresine ilişkin veriler arasındaki ilişkinin istatistiksel analizi yapılmıştır. Ayrıca, tümör boyutu ile lokalizasyonu arasındaki ilişki de incelenmiştir. Bu bilgiler, "Bulgular" bölümünde detaylı olarak sunulmuştur.

3.3. Histopatolojik Değerlendirme

Çalışmada kullanılan taze alınmış tümör dokularının her biri alındığı tarihte bilimsel kriterlere uygun şekilde küçültülüp, örnekler % 10'luk formalin solüsyonunda fikse edildikten sonra ve bilinen standart işlemlerden geçirilip ardından parafin boklara gömüldü ve bunlardan Rotary mikrotom vasıtasıyla 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilen Eosin (H.E.) ve doku Giemsa boyaları ile boyanıp ışık mikroskobunda incelendi.

Çalışmadaki olguların bazıları, İ.Ü.C. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı blok arşivinden alınan ve gerekli boyaları yapılmış ve MCT teşhisi konmuş olgulardır. Bu olguların parafin bloklarından kesitler hazırlanıp, H.E. ve doku Giemsa prosedürleri ile boyandıktan sonra mikroskobik değerlendirmeler için kullanıldı.

Özel Veteriner Teşhis laboratuvarından temin edilen parafin blokların histopatolojik incelenmesi için gerekli H.E. ve Giemsa preparatları da anabilim dalımız laboratuvarında hazırlandı.

Her bir olguya ait tüm preparatlar tekrar incelenerek her bir olgudan tümörü en iyi temsil edecek şekilde tek bir parafin blok seçildi. Hem histopatolojik hem immunohistokimyasal çalışmada paralellik olması açısından bu bloktan alınan ardışık kesitler kullanıldı.

Çalışmanın materyalini oluşturan 54 olgunun histopatolojik değerlendirmesi ile seçilen kesite ait histolojik preparat hem Patnaik'in üç dereceli (Patnaik ve ark. 1984) hem de Kiupel'in iki dereceli sistemine (Kiupel ve ark. 2011) göre yapıldı.

Histopatolojik incelemede ayrıca mitotik indeks (bazı kaynaklara göre mitotik sayım) Romansik ve ark. (2007)'nın yaptığı gibi tümörün en yüksek mitotik aktivite görülen bölgeleri seçilerek 10 adet yüksek büyütmeli alanda (40X objektif altında) mitotik figürlerin sayımı yapılarak belirlendi. Mİ verileri ayrıca, Romansik ve ark. (2007)'de belirtildiği gibi 5 eşik değerine göre de gruplandırıldı.

Histopatolojik incelemeler sonucu elde edilen Patnaik ve Kiupel Derecelerine ayrılan tümör grupları ile Mitotik indeks verileri ve 5 eşik değerine göre gruplandırılan Mİ verileri; nüks, teşhisten sonraki yaşam süresi, yaş, tümör boyutu ve mortalite (yaşam/ölüm sebebine göre gruplandırma)'nin yanı sıra KIT, Ki67, CD25, Bcl-2 ve Bax immunohistokimyasal boyamalarından elde edilen veriler ile istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

3.4. İmmunohistokimyasal Boyamalar

Çalışmada incelenen tüm dokular KIT, Ki67, Bax, Bcl-2 ve CD25 antijenlerine karşı geliştirilmiş ticari antikorlar (poli veya monoklonal olan) ile, işaretlenmiş Streptavidin-biyotin-peroksidaz tekniği kullanılarak immunohistokimyasal olarak boyanmıştır. İzlenen protokol aşağıda detaylı olarak anlatılmaktadır.

İmmunohistokimyasal boyamalar için kullanılan 54 adet parafin bloktan pozitif şarjlı lamlara 4 ila 5µm kalınlığında kesitler alınmış, ksilolde deparafinize edilmiş, kademeli olarak alkolde rehidre edilmesinin ardından distile su ile yıkandı. Antijen açığa çıkarma işlemi için Sitrat tampon çözeltisi içinde mikrodalga fırında 800W'da 15 dakika kaynatıldı, ardından soğumaya bırakıldı (yaklaşık 20 dakika) ve 2x5 dakika yıkandı. Son olarak, % 3'lük hidrojen peroksit içinde 15 dakika inkübe edildi ve 2x5 dakika yıkanarak ön işlemi tamamlandı.

Boyama prosedürü için işaretlenmiş Streptavidin-biyotin-peroksidaz prensibine dayalı immunohistokimya kiti (Millipore, IHC Select® HRP/DAB, ABD) kullanıldı.

Kullanılan immunohistokimya kitinin protokolüne göre sırası ile;

- Antijen bloklama (oda sıcaklığında, 5 dakika) yapıldı,
- Primer antikor ile inkübasyon (bu aşamada negatif kontrol dokularına sadece antikor dilüenti (Antibody Diluent Reagent Solution, Life Technologies™) damlatılmıştır, kullanılan her bir antikora ait klon, marka ve sulandırma bilgisi ile izlenen inkübasyon protokolü Tablo 3-1'de verilmektedir.) gerçekleştirildi,
- 2x5 dakika yıkama yapıldı,
- Sekonder antikor ile inkübasyon (oda sıcaklığında, 10 dakika) gerçekleştirildi,
- 2x5 dakika yıkama yapıldı,
- Streptavidin HRP ile inkübasyon (oda sıcaklığında, 10 dakika) gerçekleştirildi,

- 2x5 dakika yıkama yapıldı,
- Kromojen ajanı ile inkübasyon (KIT, Bax ve Bcl-2 için yukarıda refere edilen kit kromojeni olan DAB kullanılmış olup, kitin protokolünde 1x25 dilüsyon önerilirken yüksek yüzey boyanması nedeni ile dilüsyon 1x40 olarak modifiye edildi. İnkübasyon süresi dokuların renk değişimi gözlenerek 30 saniye ile 6 dakika arasında değişti. Ki67 ve CD25 için ise kromojen olarak AEC (Thermo Scientific, UltraVision Detection System) kullanıldı ve inkübasyon için 1 ila 10 dakika bekletildi.
- DAB Kromojeni ile boyanan preparatlar akan su altında 10 dakika, AEC ile boyanan preparatlar su banyolarında 10 dakika yıkandı.
- Hematoksilende 5 dakika bekleterek zemin boyaması yapıldı.
- Akan su altında 10 dakika yıkandı,
- Çeşme suyunda 10 dakika bekletildi.

Bu aşamalardan sonra;

- AEC kromojeni ile boyanan preparatlara Vison Mount (Thermo Scientific) kullanılarak,
- DAB kromojeni ile boyanan preparatlara ise dereceli alkollerden geçirerek dehidrasyon, kurutma, ksilol içinde 15 dakika bekletme sonrassı Entellan (Milipore) ile yapıştırılarak lamel kapatıldı.

İmmun boyama sırasında boyanan her bir seride, boyanacak olan bloklardan birinden fazladan bir kesit alındı ve bu kesit negatif kontrol doku kesiti olarak kullanıldı. Bu kesit, immun boyama esnasında primer antikor uygulandığı aşamada primer antikor yerine antikor dilüenti (Antibody Diluent Reagent Solution, Life Technologies^{TM}) ile inkübe edilerek negatif kontrol oluşturuldu. Bu aşama dışında protokol aynı şekilde uygulandı. Söz konusu negatif kontrol dokularında pozitiflik izlenmedi.

İmmun boyama prosedürleri optimize edilirken İ.Ü.C. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı blok arşivinden seçilen pozitif kontrol dokuları kullanıldı. Ki67 ve Bcl-2 için köpek hiperplastik lenf nodu dokusu, CD 117 için önceden CCMCT olarak teşhis edilen tümör dokuları, Bax için meme karsinomu ve CD25 için tonsil kullanıldı.

Tablo 3-1: İmmunohistokimya çalışmalarında kullanılan antikorların özellikleri.

Protein	Tip	Kaynak	Titre	İnkübasyon zamanı
Bax	Tavşan poliklonal	Novusbio NB100-5697	1:2000	90 dakika, oda sıcaklığı
Bcl-2	Tavşan poliklonal	Novusbio NB100-56098	1:2000	120 dakika, oda sıcaklığı
Ki67	Tavşan monoklonal	Novusbio NB600-1252	1:50	120 dakika, oda sıcaklığı
KIT	Tavşan poliklonal	ThermoFisher PA5-16770	1:200	90 dakika, oda sıcaklığı
CD25	Fare monoklonal	Santa Cruz sc-393326	1:200	Gece boyunca, +4 ^{o}C

3.4.1. İmmun Reaksiyonların Değerlendirilmesi

Kontrol dokularının işaretlenmesine bakıldıktan sonra, immunohistokimyasal yöntemler ile boyanan preparatlar, Olympus BX50F4 ışık mikroskobu ile bütün alanlar taranarak öncelikli olarak tümör hücrelerinde immun reaksiyonun varlığına göre pozitif ve negatif olarak, ardından da incelenen her bir proteine uygun değerlendirme sistemlerine göre değerlendirildi.

Bax ekspresyonu Strefezzi ve ark.'nın (2012) çalışmasında olduğu gibi kalitatif ve kantitatif metotlarla büyük büyütmede (40X objektif) 10 alan incelenerek gerçekleştirildi. Alan seçimleri, düşük büyütmelerde en yoğun ve yüksek sayıda boyanan alanlar belirlenerek yapıldı.

Kalitatif değerlendirme sitoplazmik boyanma yoğunluğu dikkate alınarak; 0 (boyanmamış), 1 (zayıf boyanmış), 2 (orta yoğunlukta boyanmış), 3 (yoğun boyanmış), 4 (çok yoğun boyanmış) şeklinde yapıldı. Kantitatif değerlendirme ise pozitif boyanan tümör hücrelerinin yüzdelerine dayanarak; 0 (boyanma yok), 1(<% 25 boyanmış hücre), 2 (% 25-50 boyanmış hücre), 3 (% 50-75 boyanmış hücre), 4 (% 75-100 boyanmış hücre)

şeklinde yapıldı. Ardından bu iki değerlendirme sonucunda verilen değerlerin toplamı temel alınarak reaksiyon olmayan preparatlar 0, 1-4 arası değer alanlar 1(düşük ekspresyon) ve 5-8 arası değer alanlar ise 2 (yüksek ekspresyon) olarak skorlandırıldı.

Bcl-2 ekspresyonu Bax ekspresyonu ile aynı yöntemle değerlendirildi ve skorlandırıldı.

Ki67 immun boyanmasının değerlendirilmesi için Ozaki ve ark. (2007)'nın da gerçekleştirdiği gibi Ki67 indeks, tümör kesitinin boyutuna göre 3 ila 10 yüksek büyütmeli alanda (40X objektifte) 500'den fazla hücrede yoğun Ki67 pozitif boyanan hücreler sayılarak ve daha sonra yüzdeleri belirlenerek hesaplandı. Alanlar, tüm preparat tarandıktan sonra en yoğun immun boyanma gösteren alanlardan seçildi.

KIT boyanma paterni, Kiupel ve ark. (2004) tarafından belirtildiği gibi incelendi. Söz konusu çalışmada da raporlandığı gibi, neoplastik olmayan mast hücrelerin membranlarının zayıf şekilde immunpozitif olduğu ve sitoplazmalarında boyanma olmadığı görüldü. Neoplastik hüreler ise boyanma paternlerine göre Tablo 3-2'deki gibi üç grupta ele alındı:

Tablo 3-2: KIT boyanma paternleri, Kiupel ve ark. (2004)'dan.

Boyanma Paterni	Boyanma Özellikleri
Patern I	Genel olarak hücre zarı boyunca ve sadece çok az miktarda sitoplazmik boyanma görülen patern. Boyanma yoğunluğu, hafif zar boyanması ve hiç sitoplazmik boyanma olmayan neoplastik hücrelerden yoğun membran boyanması ve az miktarda sitoplaazma boyanması görülen hücrelere değişkenlik göstermektedir.
Patern II	Yoğun ve odaksal toplanan boyanma ya da sitoplazma boyunca güçlü pozitif noktalar halinde boyanan patern. Bu hücrelerde membranla ilişkili boyanma öne çıkan bir özellik olmayabilir.
Patern III	Neoplastik hücrelerde diğer sitoplazmik özelliklerin tamamını kapatan diffuz sitoplazmik boyanma görülür.

Yine Kiupel ve ark. (2004)'nın belirttiği üzere boyanma paternleri her bir MCT'de en yoğun olan ve yüksek büyütmede 100 neoplastik hücrenin yaklaşık % 10'unda ya da tümör içinde yoğun şekilde toplanmış neoplastik hücreler göz önünde bulundurularak patern belirlendi. Preparatlarda tümör marjinlerindeki hücrelerden kaçınılarak muhtemel hatalı boyanmaların sınıflandırmaya katılmaması sağlandı.

Her bir tümörde CD25 pozitif hücrelerin sayılması için Meyer ve ark. (2012)'nın 4 kategorili semi-kantitatif değerlendirme sistemi ve istatistik metodu kullanıldı. Sistemin kategorileri aşağıdaki gibidir:

Grup 0: % 5'ten az pozitif tümör hücresi,

Grup 1: % 5 ile % 39 arasında pozitif tümör hücresi,

Grup 2: % 40 ile % 69 arasında pozitif tümör hücresi,

Grup 3: % 70 ve üzeri pozitif tümör hücresi.

3.5. İstatistik Analizleri

Elde edilen verilerin varyanslarının homojen dağılımı Levene testiyle kontrol edildi (Kuş ve Keskin 2008; Özdamar 2015; Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu 2016). Niteliksel verilerde 2×2 ya da çok gözlü Ki-kare testleri kullanıldı. Göz sıklıkları 25'in aşağısında olanlarda Yates düzeltmeli Ki kare değeri, herhangi bir gözde beklenen sıklık değerinin 5'in altında olması halinde Fischer'ın kesin testinden yararlanıldı.

Sayısal verilerin bağımsız iki grup oluşturması durumunda varyanslar homojen dağılım göstermesi durumunda iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testinden yararlanıldı. Sayısal verilerde bağımsız ikiden fazla grubun karşılaştırılması durumunda varyansların homojen dağılımı söz konusu ise tek yönlü varyans analizi, aksi taktirde Kruskal Wallis testi ile incelendi.

Verilerin dağalımlarının daha iyi anlaşılması için kutu-çizgi grafikleri ve çubuk grafikleri kullanıldı.

Homojen dağalım gösteren sonuçlar; grup ortalaması ve standart hata ortalaması olarak raporlandı. İstatistiksel önem sınırı tüm analizler için $p \leq 0,05$ olarak kullanıldı. Çalışma süresince elde edilen verilerin istatistik analizleri IBM® SPSS® (V. 21, Armonk, NY, ABD) programıyla değerlendirildi.

3.6. Sağ Kalım Sürelerinin Hesaplanması

Sağ kalım (teşhisten sonra hayatta kalma) sürelerinin hesaplanması için çoğu hasta sahibinin tümörün ilk oluştuğu tarihi hatırlayamaması göz önünde tutularak hastalığın başlangıcı, Scase ve ark. (2006)'nın kullandığı gibi tümörün ilk teşhis edildiği tarih olarak alındı.

Olguların sağ kalım süreleri Scase ve ark. (2006) ile Maglennon ve ark.'ın (2008) da uyguladığı gibi, tümörün teşhisinden hastaların ölümlerine kadar ya da çalışmanın hasta takip sürecinin sonuna kadar geçen zaman dikkate alınarak hesaplandı (son takip zamanı: 30 Haziran 2019). Cerrahi dışında kemoterapi ya da radyoterapi ile tedavi edilen hastalar ile sağ kalım süresi verisine ulaşılamayan hastalar sağ kalım analizlerinin dışında tutuldu. Halen yaşayan ya da MCT nedeni ile ölen hastaların dışında kalan; bilgilerine ulaşım kesildiğinden takip edilemeyen ve MCT'ye bağlı olmayan nedenlerden ölen hastalar, bu hesaplama yapılırken sansürlendi, yani izlem süreleri tamamlanmadığı için tamamlanmamış veri (sansürlü, censored, incomplete) olarak kabul edildi.

Yine Scase ve arkadaşlarının (2006) yaptığı gibi, aynı köpekten alınmış birden fazla doku dikkatle incelendi, eğer lokal nüks veya metastaz ise, ilk doku örneği dikkate alındı, aynı anda çok sayıda tümör görülen olgularda (nüks veya metastaz olmayan) ise her bir tümör ayrı ayrı incelendikten sonra tümörün özelliklerini en iyi gösteren örnek üzerinden çalışmaya devam edildi.

Yaşam analizleri Kaplan Meier analiz yöntemi ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Genel ve Klinik Bulgular

Çalışma materyali olan 54 CCMCT olgusuna ilişkin yaş, ırk, cinsiyet bilgileri ile tümörlerin lokalizasyonuna ilişkin bilgiler Tablo 4-1'de verildi.

Hastalar altı aylık periyotlarla sürekli olarak takip edildi. Bu Hastaların 17'si (% 31,5) takip süresi içinde öldü. 26 hasta (% 48,1) halen hayatta olup, 11 hastanın (% 20,4) takibi ise hasta sahipleri ile iletişimin kesilmesinden dolayı devam ettirilemedi.

Ölen hastaların 12'si (% 71) MCT nedeniyle ya da MCT'ye bağlı komplikasyonlar nedeniyle, 5'i (% 29) diğer sebeplerden ölmüştür.

Çalışma boyunca 32 hastada (% 59,3) nüks görülmediği, 12 hastada (% 22,2) ise tümörün nüks ettiği saptandı. 10 hastanın (% 18,5) ise takip edilememesinden dolayı nükse ilişkin bilgileri alınamadı.

Hastalardan dördüne kemoterapi, ikisine ise radyoterapi uygulandığı, kemoterapi alan hastaların tamamı MCT'ye bağlı komplikasyonlar sonucu öldüğü, radyoterapi gören hastaların ise halen hayatta olduğu saptandı. Bu hastalardan birinin teşhis süreci ve tedavisi hakkında olgu sunumu yapılmıştır (Öztürk Gürgen ve ark. 2019).

Çalışma sonuçları sunulurken kemoterapi ve radyoterapi gören hastalar, prognozu gösterecek olan sağ kalım istatistikleri dışında tutuldu, takip edilemeyen olgular ise tamamlanmamış veri olarak kabul edildi (sensörlendi). Ancak teşhisten sonraki yaşam süresiyle alakalı olmayan histopatolojik bulgular gibi diğer analizlere katılmaya devam edildi. Değerlendirmeler elde olan verilere göre yapıldığından izleyen bölümlerde grup sayılarında elde bulunan verilere göre değişiklik görülebilmektedir.

Tablo 4-1: Hastalara ait bilgiler

No.	Yaş	Irk	Cinsiyet	Kısırlaş-tırma	Tümörün Yeri	Tümörün Boyutu (cm^3)	Sağ kalım (gün)	Tümör sayısı	Nüks	Takip Durumu	Tedavi Durumu
1.	15	Terrier	Dişi	VY	G	VY	VY	Ç	VY	TE	TE
2.	9	Dachshund	Dişi	VY	E	3,30	2213	T	Y	DÖ	C
3.	15	Cocker	Dişi	VY	G	VY	472	T	Y	DÖ	C
4.	5	Golden retriever	Erkek	VY	E	105,00	VY	T	VY	TE	TE
5.	3	Golden retriever	Dişi	VY	G	10,00	VY	T	VY	TE	TE
6.	10	Golden retriever	Dişi	VY	VY	VY	VY	VY	VY	TE	TE
7.	15	Terrier	Dişi	Evet	E	33,00	322	T	Y	MÖ	C
8.	6	Cocker	Erkek	VY	G	6,00	2578	Ç	V	Y	C
9.	11	Boxer	Erkek	Evet	BB	231,00	69	T	V	MÖ	C+K
10.	5	Shar-Pei	Erkek	VY	G, BB	187,50	VY	Ç	VY	TE	TE

11.	9	Golden retriever	Erkek	VY	Pİ	VY	2292	Ç	V	MÖ	C
12.	12	Melez	Erkek	VY	G	320,00	249	T	V	MÖ	C
13.	12	Boxer melezi	Erkek	Hayır	BB	120,00	52	T	Y	MÖ	C
14.	8	Fransız Bulldog	Erkek	Hayır	E	6,00	1270	T	Y	Y	C
15.	1,5	Golden retriever	Dişi	VY	BB	16,00	154	T	Y	DÖ	C
16.	11	Golden retriever	Erkek	Evet	G	45,00	244	T	V	MÖ	C
17.	13	Husky melezi	Dişi	Evet	E	VY	1496	T	Y	Y	C+R
18.	5	Golden retriever	Erkek	Hayır	G	15,00	1483	T	Y	Y	C
19.	8	Golden retriever	Dişi	VY	G	15,75	1548	T	Y	Y	C
20.	15	Golden retriever	Dişi	VY	G	197,50	4	Ç	Y	DÖ	C
21.	13	Alman kurdu	Dişi	Evet	E	15,00	414	T	Y	Y	C
22.	13	Golden retriever	Erkek	Hayır	G	28,00	238	T	V	MÖ	C
23.	7	Jack russel	Dişi	Evet	BB	6,00	229	T	V	TE	TE

24.	15	Golden retriever	Erkek	VY	VY	56,00	VY	Ç	VY	TE	TE
25.	9	Golden retriever	Erkek	Hayır	E	4,00	1149	T	Y	Y	C
26.	3	Pug	Dişi	VY	E	6,00	1141	T	Y	Y	C
27.	9	Labrador	Dişi	VY	G, E	VY	1195	Ç	Y	Y	C
28.	8	Dogo Arjantin	Erkek	Hayır	G	10,00	886	Ç	Y	Y	C
29.	10	Pekines	Erkek	VY	G	VY	VY	T	VY	TE	TE
30.	8	Setter	Erkek	Evet	Pİ	4,00	1056	Ç	Y	Y	C+R
31.	13	Terrier	Dişi	VY	G, BB	10,80	109	Ç	Y	MÖ	C+K
32.	8	Boxer	Dişi	Evet	BB, E	72,00	774	Ç	V	MÖ	C+K
33.	8,5	Shar-Pei	Dişi	VY	BB	165,00	110	T	V	MÖ	C
34.	5	Golden retriever	Erkek	Hayır	G	10,50	1140	Ç	V	Y	C
35.	5	Bernese	Erkek	VY	E	123,75	194	T	V	Y	C
36.	11	Terrier	Dişi	Evet	E	30,00	767	T	Y	Y	C
37.	5	Greyhound	Erkek	Evet	E	0,15	1095	T	Y	Y	C

38.	9	Golden retriever	Erkek	Evet	G	20,00	1091	Ç	Y	Y	C
39.	9	Golden retriever	Erkek	VY	E	13,50	1089	T	Y	Y	C
40.	4	Golden retriever	Dişi	Evet	BB	15,00	1063	T	Y	Y	C
41.	10	Cocker	Erkek	VY	BB, E	39,30	1061	Ç	Y	Y	C
42.	12	Melez	Erkek	Evet	E	104,00	1061	T	Y	Y	C
43.	8	Bassethound	Dişi	Hayır	E	216,00	984	T	Y	Y	C
44.	10	Melez	Dişi	VY	E	20,00	1	T	Y	DÖ	C
45.	11	Golden retriever	Erkek	Evet	E	VY	256	T	V	MÖ	C+K
46.	11	Pitbull	Dişi	Evet	Pİ	20,00	826	T	Y	Y	C
47.	6	Fransız Bulldog	Dişi	Hayır	BB	2,00	818	T	Y	Y	C
48.	5	Cocker	Erkek	Hayır	E	VY	796	T	Y	Y	C
49.	10	Samoyed	Erkek	VY	G	VY	VY	VY	VY	TE	TE
50.	3	Golden retriever	Dişi	VY	E	VY	643	T	Y	Y	C

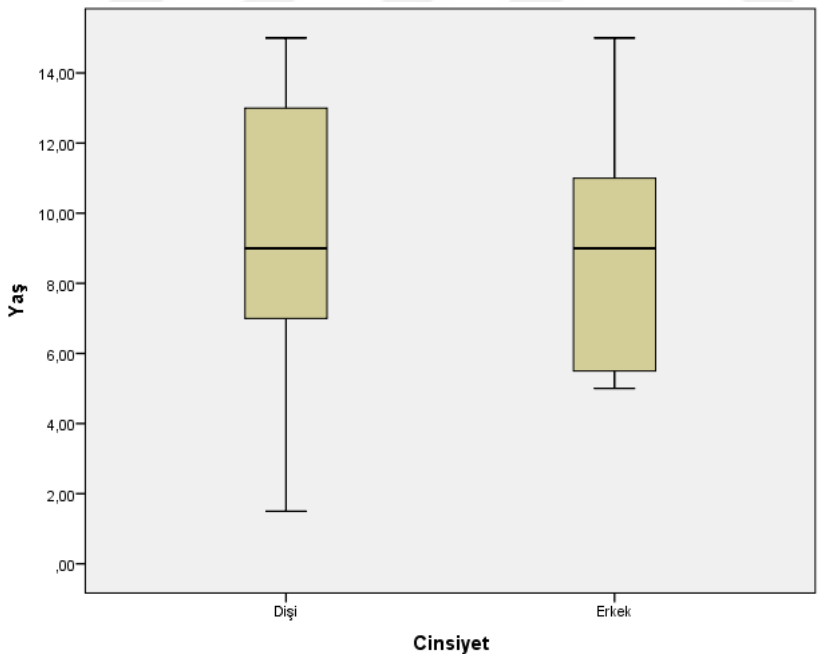
51.	10	Melez	Erkek	VY	G	VY	VY	VY	VY	TE	TE
52.	10	Dogo Arjantin	Dişi	Hayır	BB	VY	VY	T	VY	TE	TE
53.	7	Saint Bernard	Dişi	Evet	E	9,00	680	T	Y	Y	C
54.	9	Golden retriever	Erkek	Hayır	G	352,60	172	Ç	V	MÖ	C

VY:veri yok, G:Gövde, E:Ekstremite, BB: Baş-Boyun, Pİ: Perineal-İnguinal; Ç:Çoklu, T:Tekil; V:Var, Y:Yok; TE: Takip edilemedi, MÖ: MCT ve MCT'ye bağlı komplikasyonlar sebebiyle ölüm, DÖ: Diğer sebeplerden ölüm, Y: Yaşıyor; C:Sadece cerrahi ile tedavi edilen hastalar, C+K: Cerrahi tedavi ardından kemoterapi alan hastalar, C+R: Cerrahi tedavi ardından radyoterapi alan hastalar.

Hastaların hastalığın teşhis edildiği tarihteki yaş bilgilerine ilişkin genel değerlendirme Tablo 4-2'de verildi. Dişi ve erkeklerin yaşlarının dağılımı ise Şekil 4-1'de gösterildi. Hastalığa yakalanma için en büyük yaş ve ortalama yaş, dişi ve erkek bireylerde aynı olsa da dişilerin daha erken yaşta hastalığa yakalandığı belirlendi.

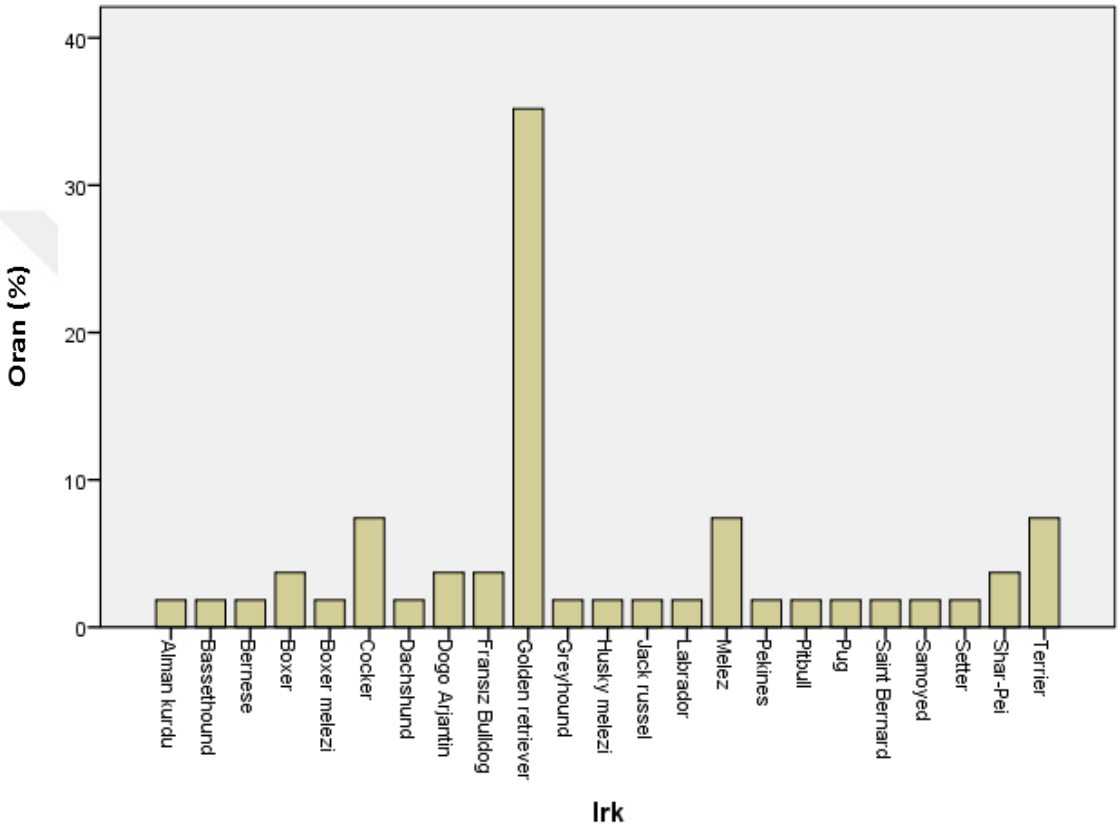
Tablo 4-2: Hastaların yaşlarına ilişkin tanımlayıcı istatikler

	Yaş ortalaması	Ortanca değer	Standart Sapma	En küçük değer	En büyük değer	T	p
Toplam hasta (n:54)	8,94	9,0	3,45	1,5	15		
Dişi hastalar (n:26)	9,07	0.79	9	4,06	1,5	0,26	0,78
Erkek hastalar (n: 28)	8,82	0,53	9	2,84	5		



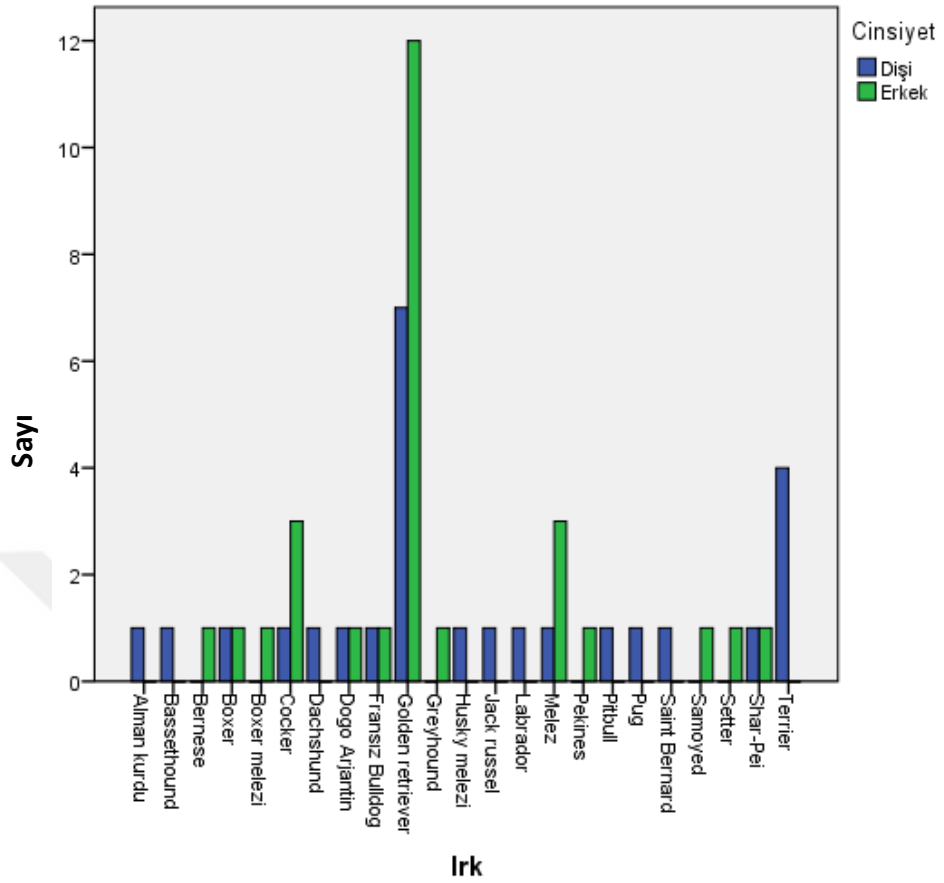
Şekil 4-1: Erkek ve dişilerin yaşlarının dağılımı

Hastaların ırk profili 20 farklı köpek ırkı ile beraber melez köpeklerden oluşmakta olup, bu ırklar Tablo 4-1'de daha önce verilmiştir. Sayıca en fazla olan ırk Golden Retriever (n=19, % 35,2) iken bunu, Cocker (n=4, % 7,4) ve Terrier (n=4, % 7,4) izlemiştir. 6 melez köpeğin ise (% 11,2) biri boxer, biri husky melezidir. Irkların detaylı dağılımı Şekil 4-2'de verilmektedir.



Şekil 4-2: Irkların dağılımları (%)

Olgularda cinsiyet dağılımı 26 dişi (% 48,1), 28 erkek (% 5 1,9) olup; dişilerin 9'u kısırlaştırılmış, 3'ü kısırlaştırılmamış, 14'ünün durumu hakkında veri yoktur. Erkeklerin 7'si kısırlaştırılmış, 8'i kısırlaştırılmamış, 13'ünün durumu bilinmemektedir. Irklara göre cinsiyet dağılımı Şekil 4-3'te verildi.



Şekil 4-3: Cinsiyetin ırklara göre dağılımı

Tablo 4-3: Cinsiyet ve kısırlaştırmanın yaşam süresine etkisi

		Ortalama		%95 Güven Aralığında		X^2	p
		Yaşam Süresi	Standart Hata	En az	En çok		
Cinsiyet	Erkek n:19	1962,16	166,18	1636,43	2287,89	1,09	0,29
	Dişi n:19	1822,84	245,25	1342,14	2303,54		
	Toplam n:38	1974,26	175,02	1631,21	2317,31		
Kısırlaştırma	Evet n:11	932,60	102,85	730,99	1134,20	0,32	0,56
	Hayır n:11	1120,54	178,87	769,95	1471,13		
	Toplam n:22	1183,96	117,41	953,83	1414,09		

Yaşam süreleri ve hastaların cinsiyetleri incelendiğinde teşhisten sonraki yaşam süresinin cinsiyete göre farklılık göstermediği görülmüştür (Tablo 4-3). Yine kısırlaştırma ile ilgili bilgileri tamamlanmış olan hastaların yaşam süreleri ve kısırlaştırılma durumları incelendiğinde kısırlaştırmanın yaşam süresi ile ilişkili olmadığı görüldü (Tablo 4-3).

Tümörlerin bulunduğu lokalizasyonlar (i) Baş-boyun, (ii) Ekstremite, (iii) Gövde, (iv) Perineal-inguinal bölge olmak üzere dört grup halinde gruplandırıldı. Bölgelere göre tümörler gruplandırıldığında çoklu tümörlerin de bölgeleri göz önünde bulundurularak sırasıyla gövde (n:20), ekstremite (n:22), baş-boyun (n:12) ve perineal-inguinal bölgelerde (n:3) geliştiği saptandı. İki tümörün lokalizasyonu hakkında net bilgi alınamamıştır. Çoklu tümör olan olgularda değerlendirme, en yüksek histopatolojik dereceye göre yapılmıştır.

Tümörlerin lokalizasyonları ve genel sağ kalım sürelerine ait veri incelendiğinde, bölgeye göre sağ kalım arasında fark olmadığı saptandı (X^2:1,78; p=0,18), (Tablo 4-4). Ancak bu tablodaki en dikkat çekici husus baş-boyun bölgesinde tümör saptanan hastaların ortalama yaşam süresinin diğer gruplara göre oldukça düşük olduğudur.

Tablo 4-4: Tümör lokalizasyonunun yaşam süresi ile ilişkisi

	Ortalama		**% 95 Güven Aralığında**			
Lokalizsyon	**Yaşam Süresi**	**Standart Hata**	**En az**	**En çok**	**X^2**	**P**
Ekstremite (n:16)	2077,92	130,15	1822,81	2333,03		
Gövde (n:13)	1793,91	320,14	1166,43	2421,39		
Baş boyun (n:7)	782,42	167,77	453,58	1111,26	1,78	0,18
Perineal-inguinal (n:2)	2292,00	0,000	2292,00	2292,00		
Toplam (n:38)	1974,26	175,02	1631,21	2317,31		

Tümör boyutuna ilişkin verilerin alındığı olgulara ait veriler, Tablo 4-5'de sunuldu. Boyut ve lokalizasyon arasında yapılan karşılaştırma sonucunda aralarında önemli bir ilişki olmadığı saptandı (KW: 2,45; p=0,48).

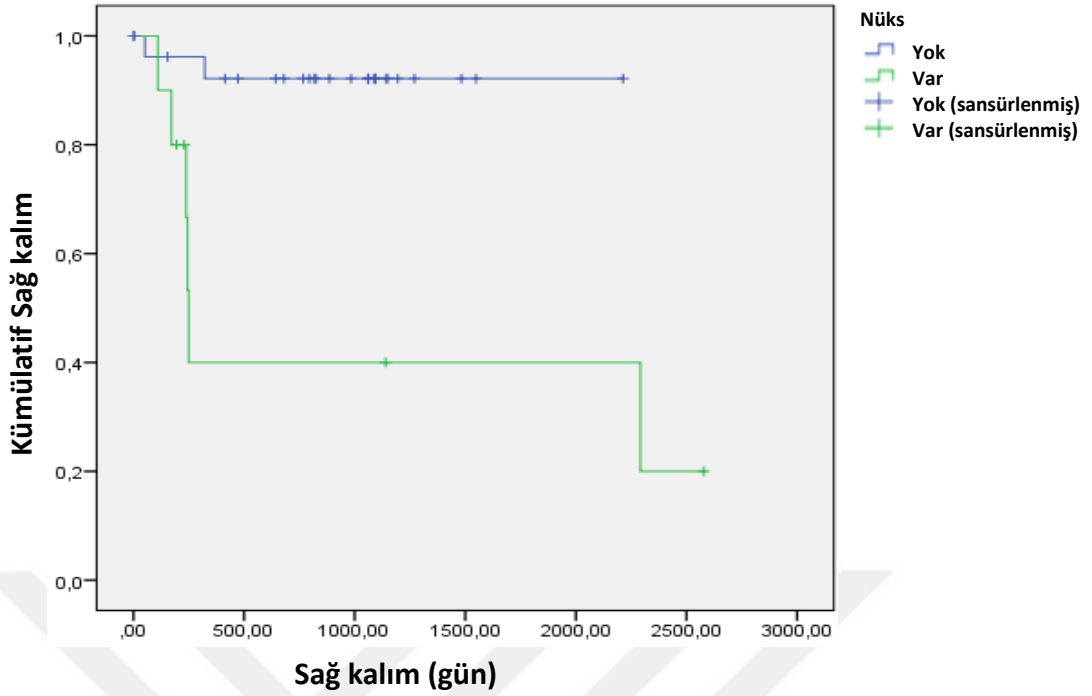
Tablo 4-5: Tümörlerin boyutlarına ilişkin istatistiki veriler

	N	Ortalama	Ortalamanın Standart Hatası	Ortanca	Standart Sapma	En Küçük Değer	En Büyük Değer
Boyut	41	64,96	14,06	20	90,07	0,18	352

Sağ kalım ve nüks bilgileri incelendiğinde nüks görülen hastaların ortalama yaşam süresinin (1099 gün) nüks görülmeyen hastalara göre (2054 gün) önemli derecede düşük olduğu saptandı (x^2=11,10; p=0,001) (Tablo 4-6, Şekil 4-4).

Tablo 4-6: Yaşam süresi ve nüks'ün Kaplan Meier analizi verileri

	Ortalama		% 95 Güven Aralığında			
Nüks	**Yaşam Süresi**	**Standart Hata**	**En az**	**En çok**	**X^2**	**p**
Yok n:28	2054,12	108,01	1842,41	2265,83	11,10	0,001
Var n:10	1099,66	390,74	333,80	1865,53		
Toplam n:38	1947,26	175,02	1631,21	2317,317		



Şekil 4-4: Nüks'ün yaşam süresini tanımlayan grafiği

Çalışmaya dahil edilen tümörlerden 37 tanesinin tek, 14 tanesinin çoklu olduğu saptandı ve 3 tanesine ilişkin kesin bilgiye ulaşılamadı. Bu tümörlerin yaşam süresine ilişkin bilgileri incelendiğinde, tümörlerin tek veya çoklu oluşunun tek başına yaşam süresi ile önemli bir ilişkisi bulunmadığı görüldü (x^2=0,36; p=0,54) (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: Yaşam süresi ve tümör sayısının Kaplan Meier analizi verileri

	Ortalama		% 95 Güven Aralığında		X^2	P
	Yaşam Süresi	Standart Hata	En az	En çok		
Tek n:29	1745,84	167,62	1417,29	2074,39	0,36	0,54
Çoklu n:9	2152,12	279,00	1605,27	2698,97		
Toplam n:38	1974,26	175,02	1631,21	2317,31		

4.2. Histopatolojik Bulgular

Çalışmanın materyalini oluşturan 54 örneğin histopatolojik incelemeleri yapıldı ve tümörler Patnaik (Patnaik ve ark. 1984) ve Kiupel (Kiupel ve ark 2011) sistemlerine göre derecelendirildi. Bunlarla ilgili detaylı kriter bilgileri ve değerlendirme metotları, genel bilgiler kısmında histopatolojik derecelendirme bilgisi altında sayfa 18 ve 19'da verilmiştir. Çalışmada kullandığımız MCT materyallerine ait histolojik bulgular Tablo 4-8'de verilmiştir. Materyallerin histopatolojik incelemeleri sonucunda bazı olgularda;

- Hücresel yoğunluğun düşük olduğu (Şekil 4-11), yuvarlak şekilli, bol sitoplazmalı, granülleri yoğun, sınırları belirgin, yuvarlak çekirdekli iyi diferensiye hücrelerden oluştuğu ve bu hücrelerin genel olarak şeritler oluşturduğu, aralarında yer yer eozinofil lökosit hücreleri ve farklı kalınlıkta kolajen iplikleri izlendiği, mitotik aktivitenin görülmediği veya çok düşük olduğu histolojik yapıya sahip olduğu (Şekil 4-12) belirlendi ve bu tümörler çalışmamızda, Patnaik ve Kiupel derecelendirme sistemlerinde olduğu gibi, I. derece tümör olarak değerlendirildi (n=22).
- Orta derecede hücresel yoğunluk izlenen, hücrelerin aralarında yer yer eozinofil lökositlerin yanı sıra hiyalinize kolajen birikimleri ve buna bağlı olarak hücresel gruplaşmaların gözlenen (Şekil 4-13), çok sayıda yuvarlaktan ovoide kadar değişen farklı şekillerde, çoğunluğunun sitoplazmaları ve intrasitoplazmik granülleri hala belirgin olan, çekirdekleri hala yuvarlak yapıda olan, kısmen pleomorfizm gösteren hücrelerden oluştuğu (Şekil 4-14), mitotik indekslerinin 7'nin altında olduğu saptandı. Bu tümörler çalışmamızda, Patnaik sistemine göre II. derece ve Kiupel sistemine göre de I. derece olarak değerlendirildi (n=15).
- Yoğun selülerite, orta derecede pleomorfizm, hiyalinize kolajen birikimleri (Şekil 4-15) ve nadiren dev hücreler izlendi, yuvarlaktan ovoide farklı şekillerde, az ve orta yoğunlukta sitoplazmaya sahip, intrasitoplazmik granülleri halen belirgin, farklı çekirdek şekilleri gözlenen hücrelerden oluştuğu saptandı ve yüksek mitotik aktivite gözlendi (Şekil 4-16). Çalışmamızda bu tümörler, hem Patnaik hem Kiupel sistemlerinde olduğu gibi II. derece olarak değerlendirildi (n=11).
- Yoğun selülerite ve hücresel pleomorfizmin belirgin olduğu (Şekil 4-17), yer yer kolajen birikimleri, ödem ve nekroz alanları saptandı. Çok sayıda mitotik figürlerin izlendiği bu olgularda, hücre sitoplazma granül yoğunluğunun az

olduğu ve hücre sitoplazma ve çekirdek yapılarının yuvarlaktan iğ şekline değişkenlik gösterdiği, değişik formlarda görülen çekirdeklerin veziküllendiği ve çift çekirdekçiklerin fazla olduğu ve bu hücreler arasında yer yer eozinofilik lökosit infiltrasyonlarının (Şekil 4-18, Şekil 4-19) ve diğer olgulara göre daha fazla dev hücrenin görüldüğü (Şekil 4-20) bir histopatolojik yapı saptandı. Çalışmamızda bu tümörler, Patnaik sisteminde olduğu gibi III. derece ve Kiupel sisteminde olduğu gibi II. derece olarak değerlendirildi (n=6).

Tablo 4-8: Histopatolojik derecelendirme ve immunohistokimyasal bulgular

Hasta No.	Tümör Derecesi		MI/MC	KIT Paterni	CD25 Grubu	Ki67 İndeksi	Bcl-2 Grubu	Bax Grubu
	Patnaik	Kiupel						
1.	2	Y	16	2	3	0,4	1	2
2.	2	D	5	1	4	0,6	2	2
3.	2	D	5	1	4	0,70	1	2
4.	2	Y	14	2	4	2,6	1	2
5.	1	D	0	1	4	0	0	1
6.	2	Y	8	3	4	0,7	1	1
7.	2	Y	17	2	4	1,20	1	2
8.	2	D	3	3	3	0,01	1	1
9.	2	Y	13	2	3	0,20	2	2
10.	3	Y	22	3	3	3,2	1	2
11.	1	D	2	3	4	0	2	1
12.	1	D	1	3	3	0	2	2
13.	2	D	6	2	2	1,90	2	2
14.	1	D	0	1	4	0,30	0	1
15.	2	Y	20	2	3	2,80	1	2
16.	2	D	2	1	3	2,10	2	2
17.	3	Y	28	2	3	3,80	2	2
18.	1	D	3	3	4	0	2	2
19.	1	D	0	3	4	1,40	1	1
20.	1	D	3	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
21.	2	D	2	3	4	2,80	2	2
22.	2	D	4	1	3	0,90	0	1
23.	2	Y	17	2	4	4,30	1	2
24.	1	D	1	3	2	0,40	0	1
25.	2	Y	19	1	2	0,70	1	2
26.	1	D	1	3	4	0	2	2

27.	1	D	2	1	3	0,50	1	1
28.	2	D	4	2	4	0,10	2	2
29.	3	Y	27	3	2	Negatif	0	2
30.	3	Y	24	3	3	15,6	2	2
31.	3	Y	29	2	2	2,80	2	2
32.	3	Y	40	3	2	3,70	2	2
33.	2	Y	12	2	1	2,60	0	2
34.	1	D	2	3	4	1,10	0	2
35.	2	Y	12	2	4	0,80	2	2
36.	1	D	0	2	3	2,20	2	1
37.	1	D	0	1	4	0,40	1	1
38.	1	D	1	1	3	0,3	0	1
39.	1	D	0	1	4	0,00	1	1
40.	1	D	0	1	4	0	2	2
41.	1	D	2	1	4	0	1	1
42.	1	D	1	3	3	0,20	0	1
43.	1	D	0	1	3	2,90	0	2
44.	2	D	5	1	3	0,30	2	2
45.	2	D	6	2	2	0,10	1	1
46.	1	D	0	3	3	0,30	1	2
47.	1	D	0	2	4	0,00	2	2
48.	2	D	3	2	4	0,10	0	1
49.	2	D	5	1	3	0,10	1	1
50.	1	D	0	2	4	0,20	1	1
51.	2	D	3	1	2	1,20	1	2
52.	2	D	5	2	2	1,40	1	1
53.	2	D	3	2	3	4,70	2	2
54.	2	Y	18	2	3	2,80	2	2

D: Düşük derece, Y: Yüksek derece; (X): İşlem sırasında dökülen preparat.

4.2.1. Tümörlerin Patnaik Üçlü Sistemine Göre Derecelendirilmesi

Patnaik üçlü derecelendirme sistemine göre 22 olgu (% 41) I. derece, 26 olgu (% 48) II. derece ve 6 (% 11) olgu III. derece MCT olarak değerlendirildi. II. derece olan tümörlerde nüks etme sayısının diğer iki dereceye göre fazla olduğu, ancak Patnaik derecelendirme sistemine göre derecelendirmenin nüks ile ilişkisinin anlamlı olmadığı saptandı (x^2=4,3; p=0,1) (Tablo 4-9) .

Tablo 4-9: Nüks varlığının Patnaik derecelerine göre dağılımı

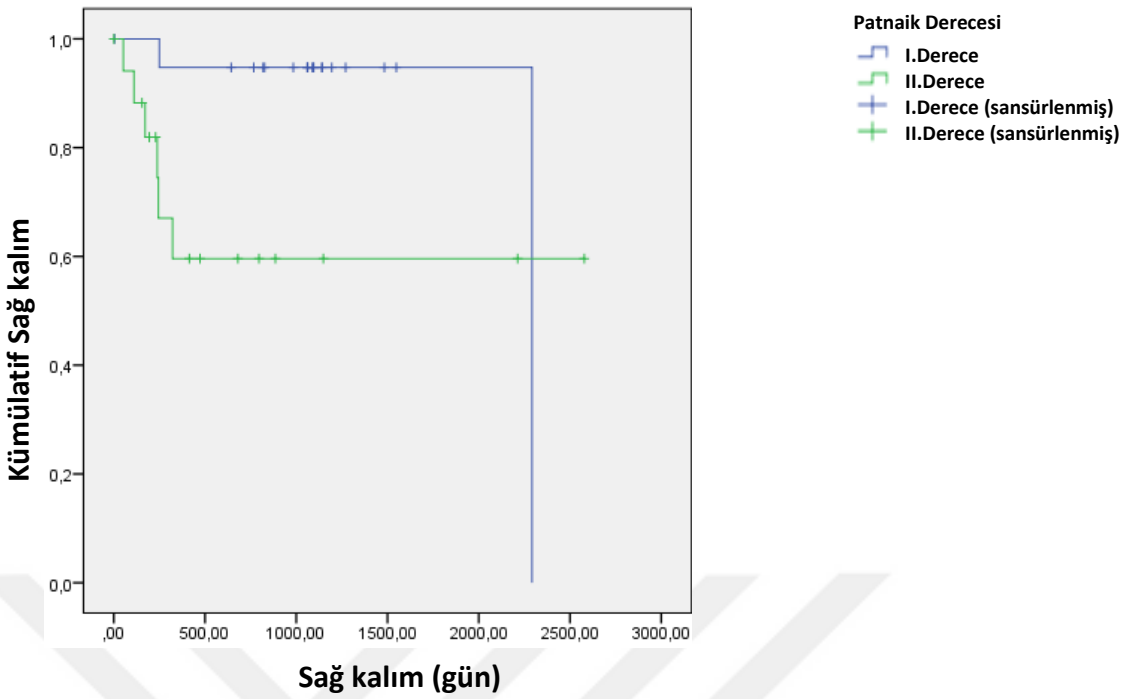
Patnaik derecesi	Var		Yok		X^2	p
	n	%	N	%		
Grade I	3	15	17	85	4,3	0,10
Grade II	9	45	11	55		
Grade III	1	25	3	75		
Toplam	13	29,5	31	70,5		

Tablo 4-10: Teşhisten sonraki yaşam süresinin Patnaik derecelerine göre dağılımı

Patnaik derecesi	Ortalama		% 95 Güven Aralığında		X^2	p
	Yaşam Süresi	Standart Hata	En az	En çok		
I n:20	2184,47	148,00	1894,37	2474,57	4,08	0,043
II n:18	1616,42	307,80	1013,11	2219,72		
III n:-	-	-	-	-		
Toplam n:38	1974,26	175,02	1631,21	2317,31		

Patnaik III. derece tümörlerin bir kısmı kemoterapi/radyoterapi aldığından, bir kısmı da takip edilemediğinden, teşhisten sonra sağ kalım süresine ilişkin analizlere III. derece tümörü olan hastalar dahil edilemediğinden Patnaik derecelendirme sistemine göre sağ kalım süreleri (gün) incelenemedi.

Bu şartlar altında yapılan analizde Patnaik I. ve II. derece arasında önemli bir fark olduğu saptandı (Tablo 4-10; X^2=4,08; P=0,043; Şekil 4-5). Takibi eksiksiz yapılabilen ve kemoterapi ya da radyoterapi almamış 38 olguya ait verilere göre Patnaik I. derece tümörü olan hastaların ortalama yaşam süresi 2184 günken II. derece tümörü olan hastalar için bu süre 1616 güne düşmüş olduğu saptandı.



Şekil 4-5: Farklı Patnaik derecelerinin yaşam süreleri grafiği

Patnaik derecelendirme sistemine ilişkin verilerin yaş (F=0,90, P=0,41) ve boyut (F=0,11, P=0,89) ile ilişkisi olup olmadığına bakıldı, önemli bir ilişkiye rastlanmadı (Tablo 4-11).

Tablo 4-11: Yaş ve tümör boyutunun Patnaik derecelerine göre farkları

	Patnaik derecesi	n	Ortalama	Standart hata	F	P
Yaş (ay)	I	22	8,18	0,77		
	II	26	9,46	0,65	0,90	0,41
	III	6	9,50	1,28		
Boyut	I	19	57,72	20,45		
	II	18	71,81	22,71	0,11	0,89
	III	4	68,57	42,48		

4.2.2. Tümörlerin Kiupel Derecelendirme Sistemine Göre Değerlendirilmesi

Kiupel ikili derecelendirme sistemine göre 37 olgu (% 69) düşük derece, 17 olgu (% 31) yüksek derece MCT olarak değerlendirildi. Patnaik sistemine göre I. derece değerlendirilen tüm olguların (n=22) Kiupel sisteminde düşük derecelendirildiği, III. Derece olarak değerlendirilen tüm olguların da (n=6) Kiupel sistemine göre yüksek derecelendirildiği saptandı. Patnaik sistemine göre II. Derece olarak değerlendirilen olguların ise (n=26) % 42,3'ünün (n=11) Kiupel sistemine göre yüksek, % 57,7'sinin ise (n=15) Kiupel sistemine göre düşük olarak derecelendirildiği izlendi.

İstatistiksel çalışmalara göre, Kiupel derecelendirme sistemi ile değerlendirilen olguların nüks bulgusuyla ilişkisi saptanamadı (x^2=; p=0,135) (Tablo 4-12).

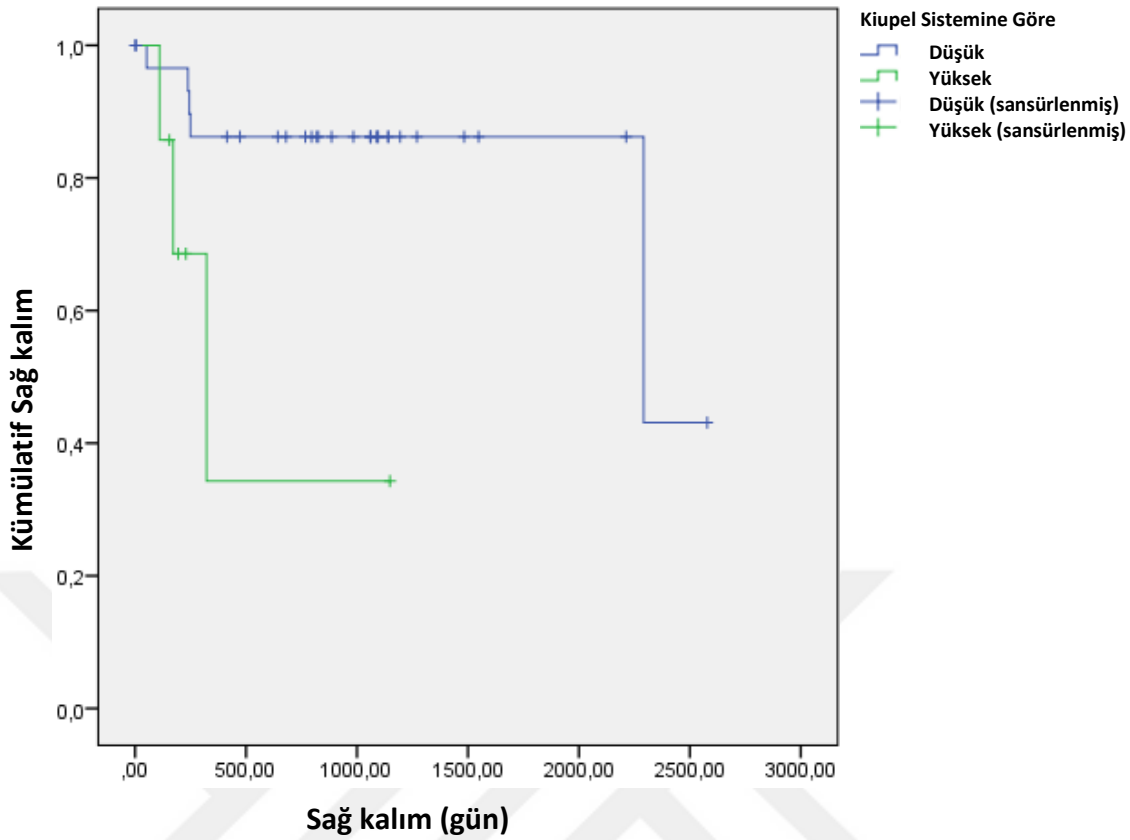
Tablo 4-12: Nüks varlığının Kiupel derecelerine göre dağılımı

Kiupel Derecesi	Var		Yok		X^2	p
		%	n	%		
Yüksek	6	46,2	6	19,4		
Düşük	7	53,8	25	80,6	2,10	0,14
Toplam	13	100	33	100		

Tablo 4-13: Kiupel derecelendirme sistemine göre yaşam süreleri

Kiupel	Ortalama		%95 Güven Aralığında		X^2	p
	Yaşam Süresi	Standart Hata	En az	En çok		
Düşük n:31	2126,13	167,90	1797,05	2455,22	6,68	0,01
Yüksek n:7	549,54	228,61	101,46	997,62		
Toplam n:38	1974,26	175,02	1631,21	2317,31		

Kiupel derecelendirme sistemi ile sağ kalım sürelerine ilişkin verileri incelendiğinde gruplar arasında, p=0,01 düzeyinde, önemli bir fark görüldü (X^2=6,68). Buna göre Kiupel sistemine göre düşük dereceli tümör teşhis edilen olguların teşhisten sonraki ortalama yaşam süreleri 2126 gün, yüksek dereceli tümör teşhis edilen hastaların ortalama yaşam süreleri ise 549 gün olarak belirlendi (Tablo 4-13, Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Kiupel derecelendirme sistemine göre sağ kalım süreleri grafiği

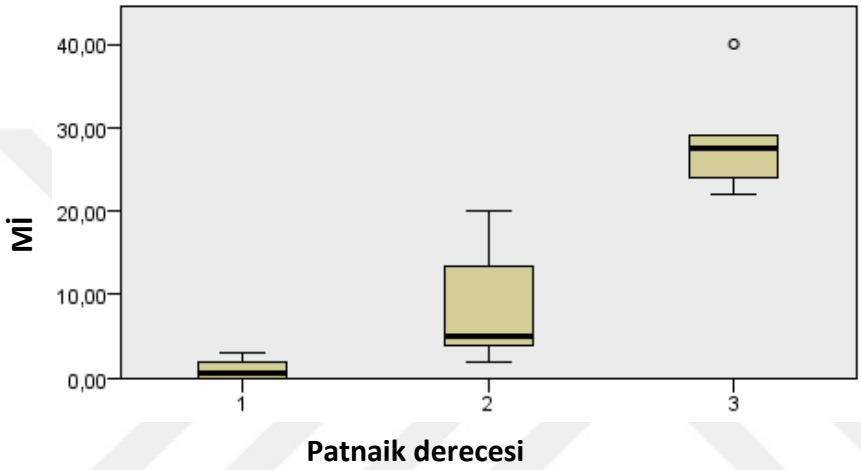
Kiupel derecelendirme sistemine ilişkin veriler incelendiğinde Kiupel derecelerinin yaş ile önemli bir ilişkisi olmadığı görüldü (t=-0,79, P=0,93). Kiupel dereceleri ve boyut verileri incelendiğinde ise aralarında p=0,08 düzeyinde ilişki olduğu belirlendi (t=-1,78). Bu verilere ilişkin bilgiler Tablo 4-14'te verildi.

Tablo 4-14: Kiupel derecesi ile yaş ve boyut verilerinin dağılımı

	Kiupel derecesi	N	Ortalama	Ortalamanın Standart hatası	T	p
Yaş (ay)	Düşük	37	8,91	0,55	-0,79	0,93
	Yüksek	17	9,00	0,90		
Boyut	Düşük	28	48,32	14,50	-1,78	0,08
	Yüksek	13	10,81	30,06		

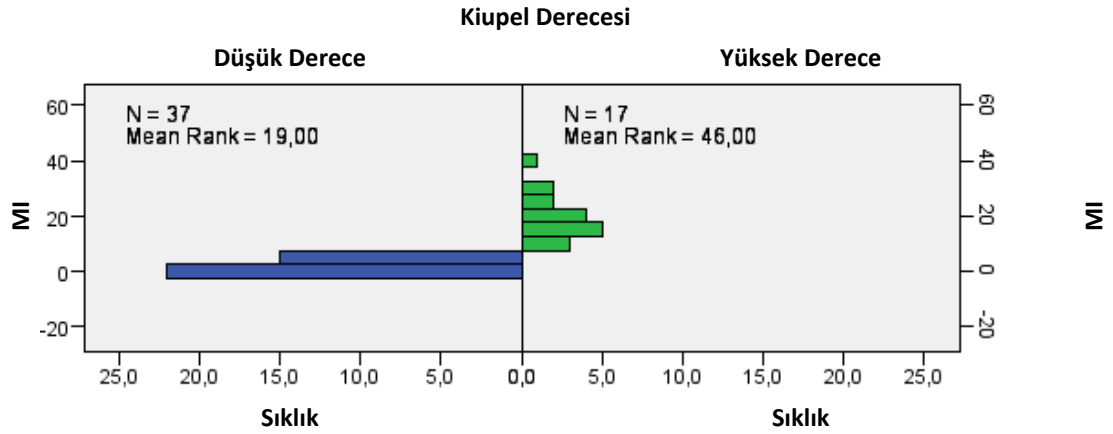
4.2.3. Mitotik İndeks

Patnaik derecelendirme sisteminde derecelendirilen tümörlerin, mitotik sayımları incelendiğinde ortalama Mİ değerleri sırasıyla, I. derece için 0,86 (0-3 aralığında), II. derece için 8,7 (2-16 aralığında), III. derece için 28,3 (22-40 aralığında) olduğu bulundu (Şekil 4-7). Bu sayımların Patnaik derecesi arttıkça arttığı ve gruplar arasında, $p<0,001$ düzeyinde, bir fark olduğu saptandı (KW=41,69). Bu durum derecelendirme yönteminin doğası gereği normal karşılanmaktadır.



Şekil 4-7: Mİ'in Patnaik derecelerine göre dağılımı

Kiupel derecelendirme sisteminde derecelendirilen tümörlerin mitotik sayımları incelendiğinde ortalama Mİ değerleri sırasıyla, düşük derece için 2,1 (0-6 aralığında), yüksek derece için 19,7 (8-40 aralığında) bulundu. Bu sayımların ortalama değerlerinin yüksek Kiupel derecesiyle, $p<0,001$ düzeyinde, ilişkili olduğu görüldü (Şekil 4-8) (U=629).

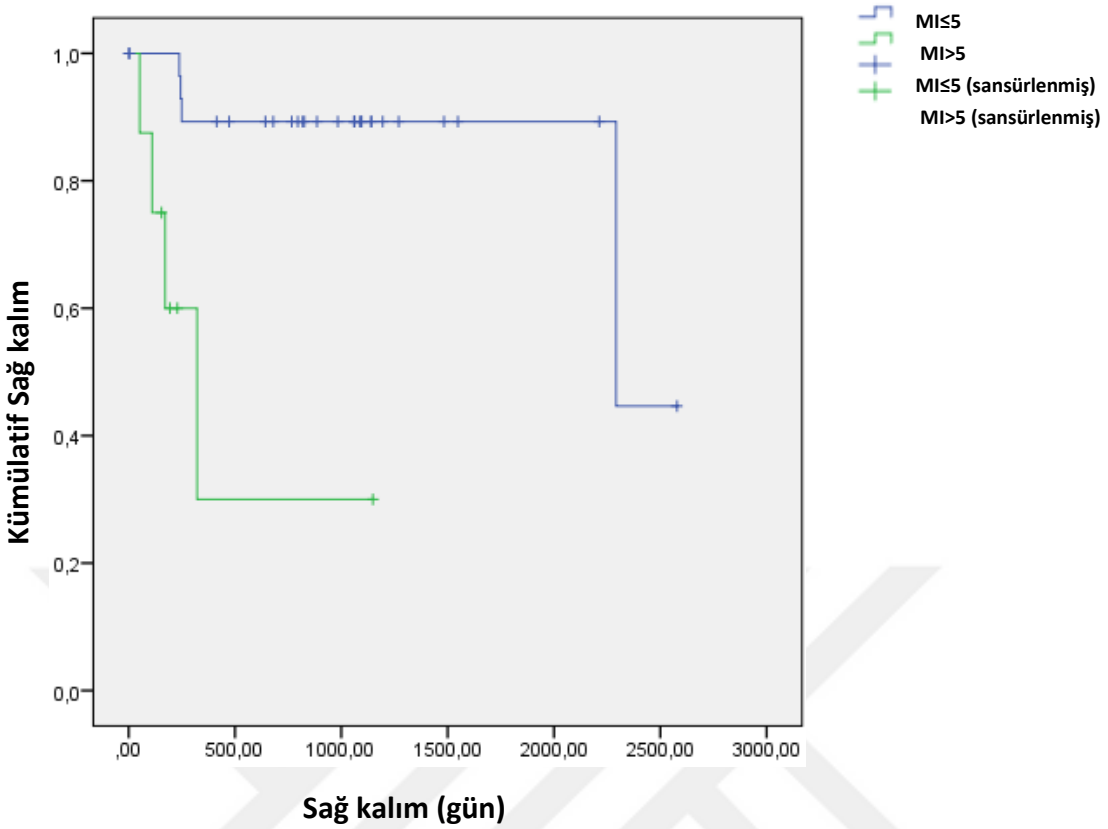


Şekil 4-8: Kiupel dereceleri ile Mİ sıklık dağılımları

Olguların Mİ değerleri, Romansik ve ark.'nın (2007) bildirdikleri baz alınarak Mİ≤5 (n:35) ve Mİ>5 (n:19) olmak üzere gruplandırıldı, sağ kalım verileri bulunan ve sadece cerrahi yöntemle tedavi edilen 38 olgu üzerinden yapılan değerlendirme sonucunda Mİ için belirlenen 5 eşik değerinin sağ kalım açısından gruplar arasında, p<0,001 düzeyinde, önemli bir farkı belirlediği saptandı (X^2=13,68; Tablo 4-15; Şekil 4-9). Buna göre, Mİ≤5 olan olgularda ortalama yaşam süresi 73 ay, Mİ>5 olan hastalarda 16 ay olarak belirlendi. Ortanca değerlere bakıldığında bu sürenin sırası ile 76 ay ve 11 ay olduğu görülmüştür.

Tablo 4-15: Mİ gruplarına göre sağ kalım süreleri verileri

MI	Ortalama		%95 Güven Aralığında		Ortanca		%95 Güven Aralığında		X^2	p
	Yaşam Süresi	Standart Hata	En az	En çok	Yaşam Süresi	Standart Hata	En az	En çok		
MI≤5 n:30	2200,21	156,70	1893,06	2507,36	2292,00	1450,79	,000	5135,56		
MI>5 n:8	487,35	208,32	79,03	895,66	322,00	115,38	95,856	548,14	13,68	0,00
Toplam n:38	1974,26	175,02	1631,21	2317,31	2292,00	1403,698	,000	5043,248		

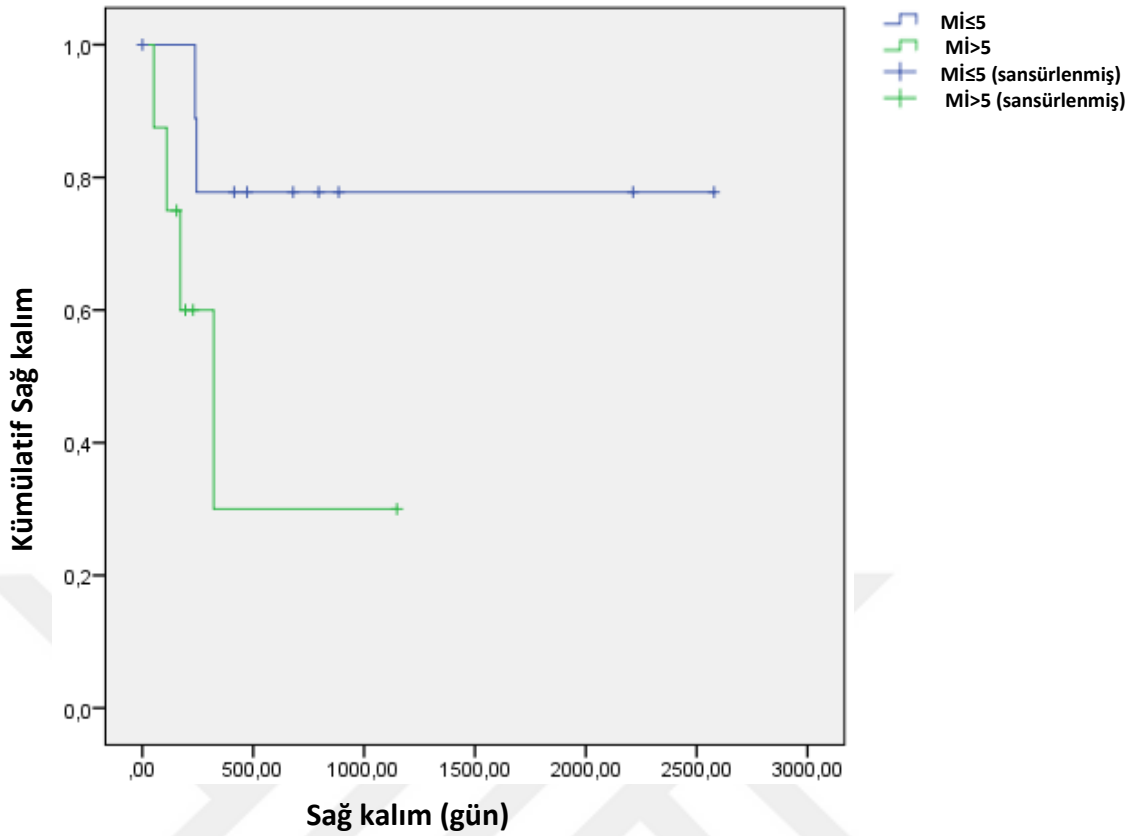


Şekil 4-9: Mİ gruplarının yaşam süresi grafiği

Sağ kalıma ilişkin veriler, Mİ için belirlenen 5 eşik değeri ile gruplandırıldığında, Patnaik II. derece tümör görülen olgularda sağ kalım süresi ile ilişkisi ayrıca incelendi ve Mİ'nin Patnaik II. derece tümörlerde yaşam süresiyle ilişkili olduğu görüldü (X^2=3,76; p=0,052; Tablo 4-16). Teşhisten sonraki ortalama yaşam süresi Mİ≤5 olan grupta 69 ay iken Mİ>5 olan grupta 16 ay oldu. Mİ'nin Patnaik II. derece tümörlerde sağ kalım süresi ile ilgili fonksiyon Şekil 4-10'de verildi.

Tablo 4-16: Patnaik II. derece tümörlerin Mİ gruplarına göre yaşam süreleri

Mİ	Ortalama		% 95 Güven Aralığında		X^2	p
	Yaşam Süresi	Standart Hata	En az	En çok		
Mİ≤5 n:10	2058,66	323,86	1423,89	2693,43		
Mİ>5 n:8	487,35	208,32	79,03	895,66	3,76	0,052
Toplam n:18	1616,42	307,80	1013,11	2219,72		



Şekil 4-10: Mİ'nin Patnaik II. derece tümörlerde sağ kalım süresi ile ilgili fonksiyon

MI ile nüks verileri incelendiğinde, aralarında anlamlı birilişki bulunmadı (Tablo 4-17; t=1,36; p=0,18).

Tablo 4-17: Nüks bulunan ve bulunmayan tümörlerde Mİ dağılımı

Nüks	N	Ortalama Mİ	Ortalamanın Standart Hatası	T	p
Var	13	10,15	2,99	1,36	0,18
Yok	31	5,90	1,58		

Olgular Mİ 5 eşik değerine göre gruplandırılarak mortalite ile ilişkisi incelendiğinde, genel olarak tüm olgular için yüksek bir ilişki görülürken (Tablo 4-18; X^2=9,99; p=0,001) sadece Patnaik II. derece tümörler açısından bakıldığında Mİ ile mortalitenin arasında yüksek bir ilişki saptanmadı (Tablo 4-19; X^2=3,23; p=0,07).

Tablo 4-18: Mİ'nin (n) ölüm nedenlerine göre değişimi (tüm olgular)

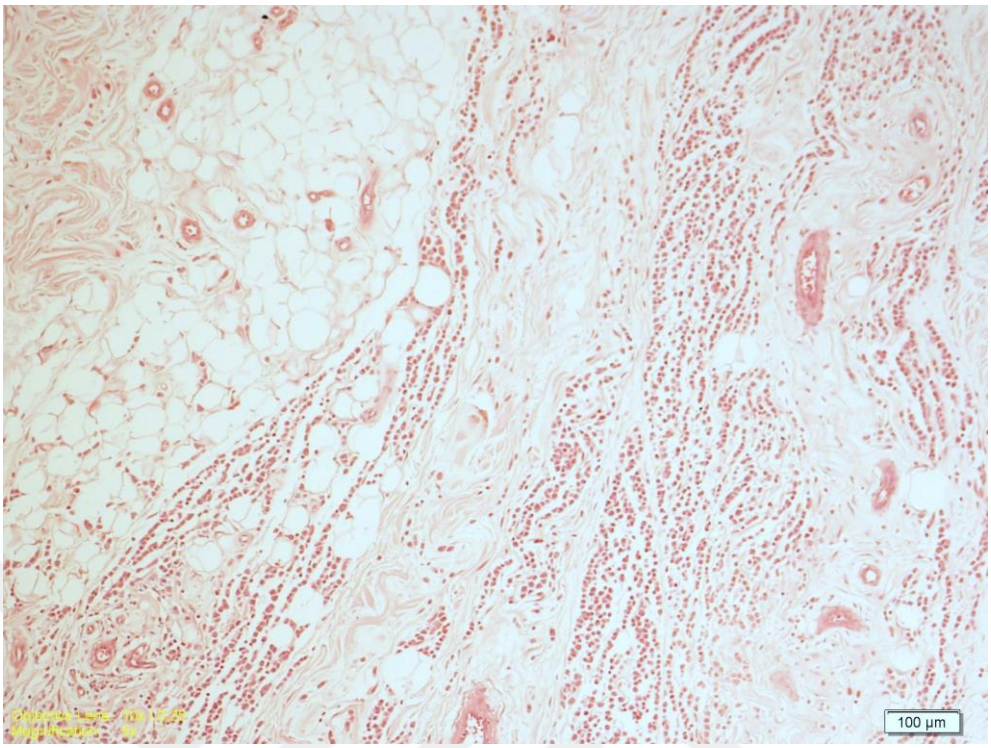
Durum	MI ≤5	MI >5	X^2	p
MCT nedeniyle ölüm	4	8		
Hayatta kalan olgular	22	4	9,99	0,001
Toplam	12	26		

Tablo 4-19: Mİ'nin (n) ölüm nedenlerine göre değişimi (Patnaik II. derece tümörler)

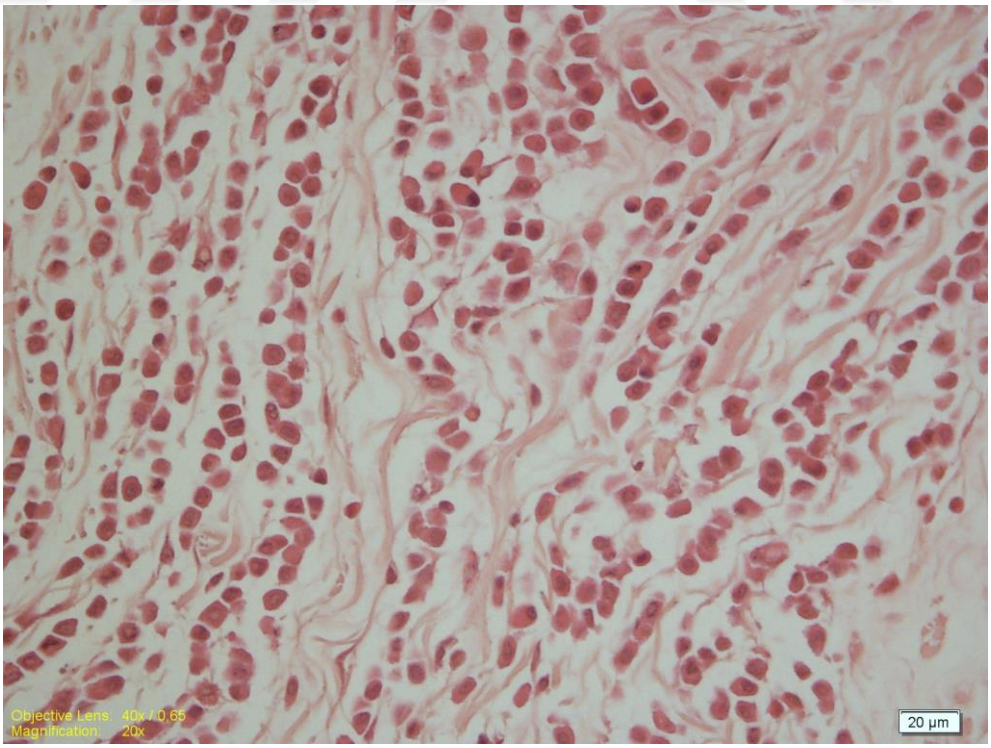
Durum	MI ≤5	MI >5	X^2	p
MCT nedeniyle ölüm	2	6		
Hayatta kalan olgular	5	2	3,23	0,072
Toplam	7	8		

Bu çalışmada olgular mitotik indeks yönünden Elston ve ark.'ın (2009) önerdiği 1 ve 7 eşik değerleri (MI=0, MI=1-7 ve MI>7 olmak üzere) kullanılarak oluşturulan üç gruplu yaklaşıma göre de değerlendirilmek istenmiş ancak sağ kalım süresi olan olgular arasındaki örnek dağılımı yeterli olmadığından değerlendirme yapılamamıştır.

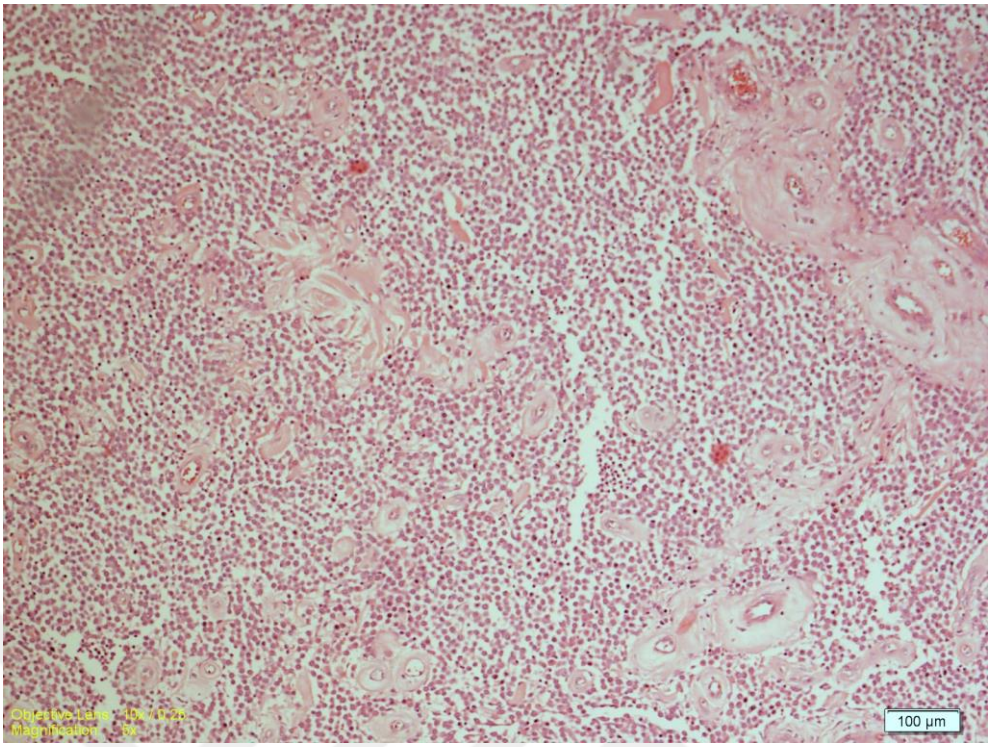
4.2.4. Histopatolojik Bulgular ile İlgili Şekiller



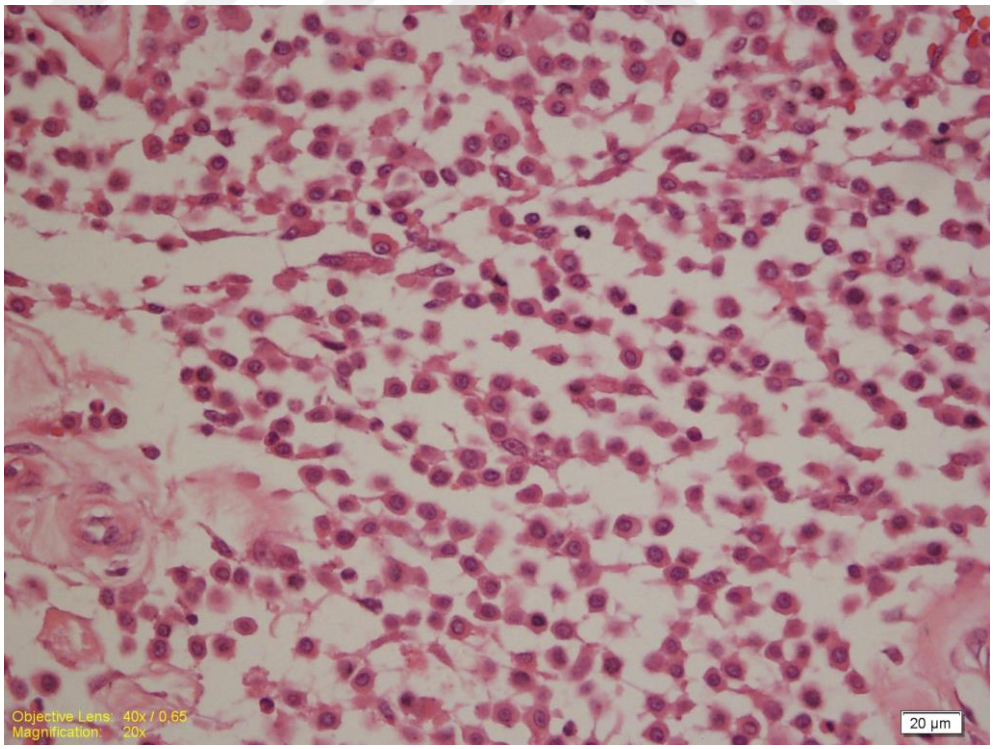
Şekil 4-11: Olgu no:5, Patnaik derecesi: I, Kiupel derecesi: I, Hematoksilen Eosin, 10×, Bar: 100µm



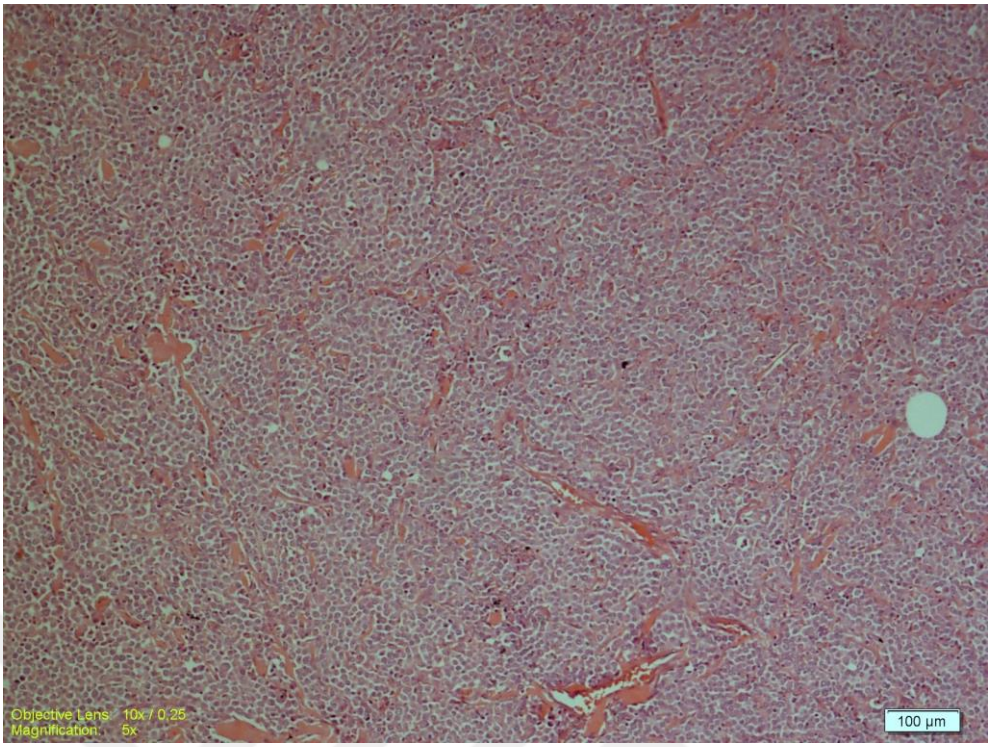
Şekil 4-12: Olgu no:5, Patnaik derecesi: I, Kiupel derecesi: I, Hematoksilen Eosin, 40×, Bar: 20µm



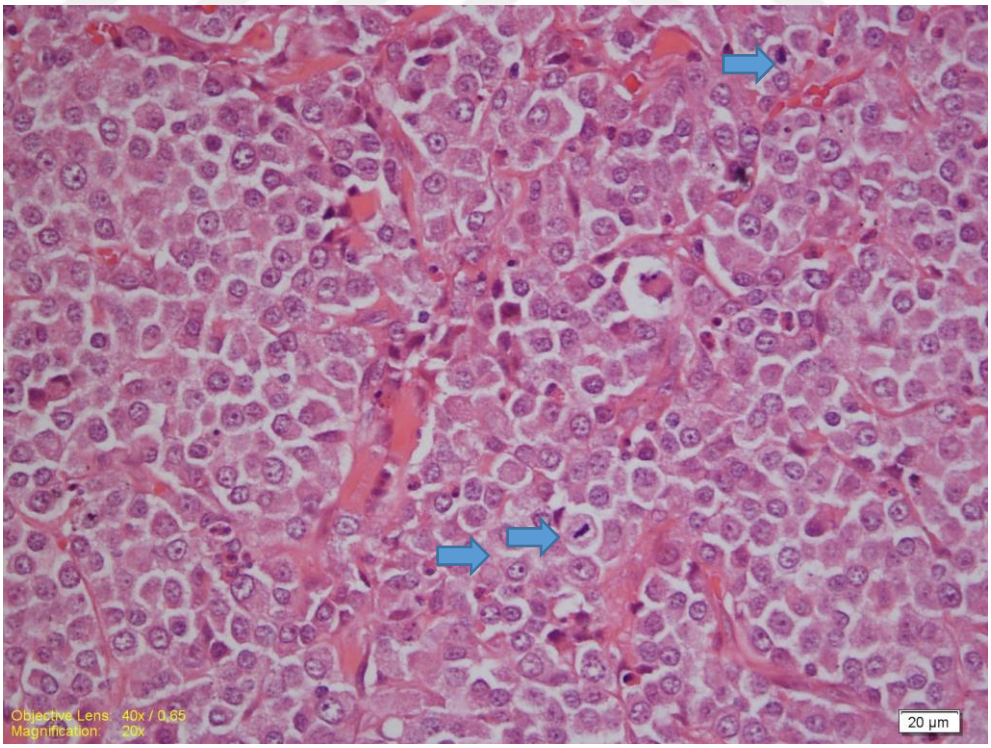
Şekil 4-13: Olgu no:2, Patnaik derecesi: II, Kiupel derecesi: I, Hematoksilen Eosin, 10×, Bar: 100µm



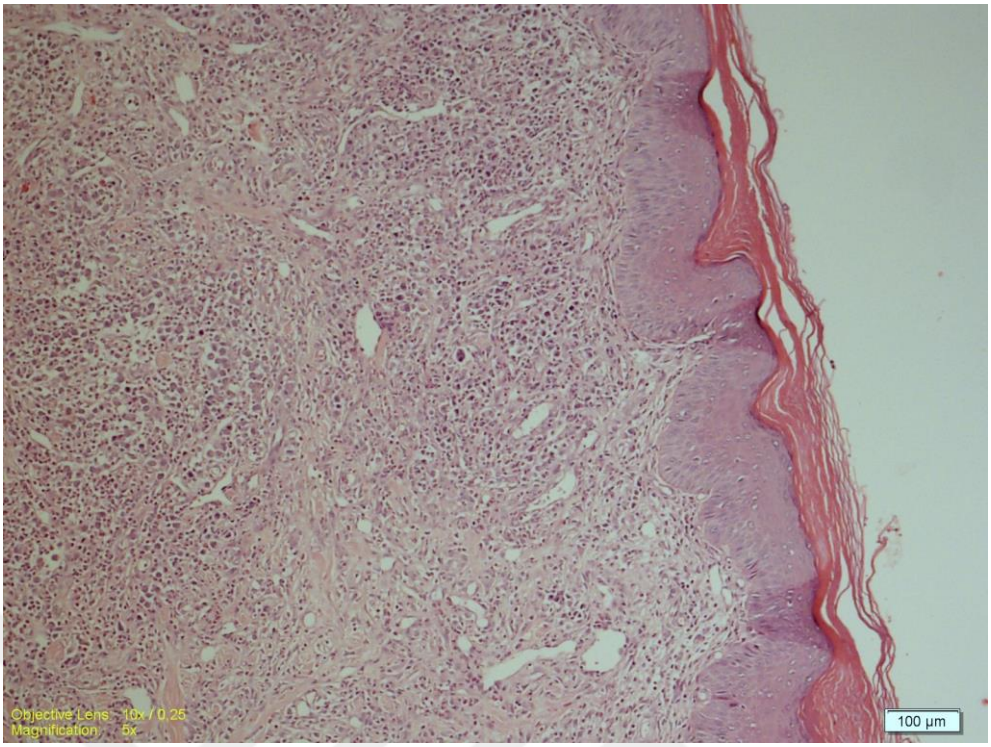
Şekil 4-14: Olgu no:2, Patnaik derecesi: II, Kiupel derecesi: I, Hematoksilen Eosin, 40×, Bar: 20µm



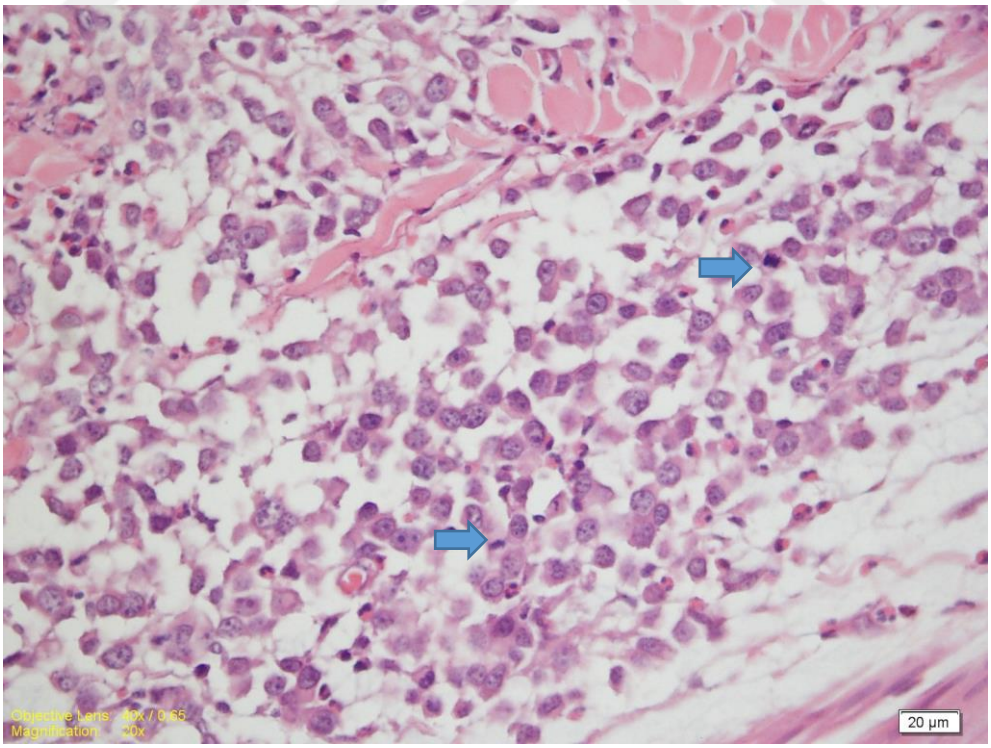
Şekil 4-15: Olgu no:7, Patnaik derecesi: II, Kiupel derecesi: II, Hematoksilen Eosin, 100×, Bar: 100µm



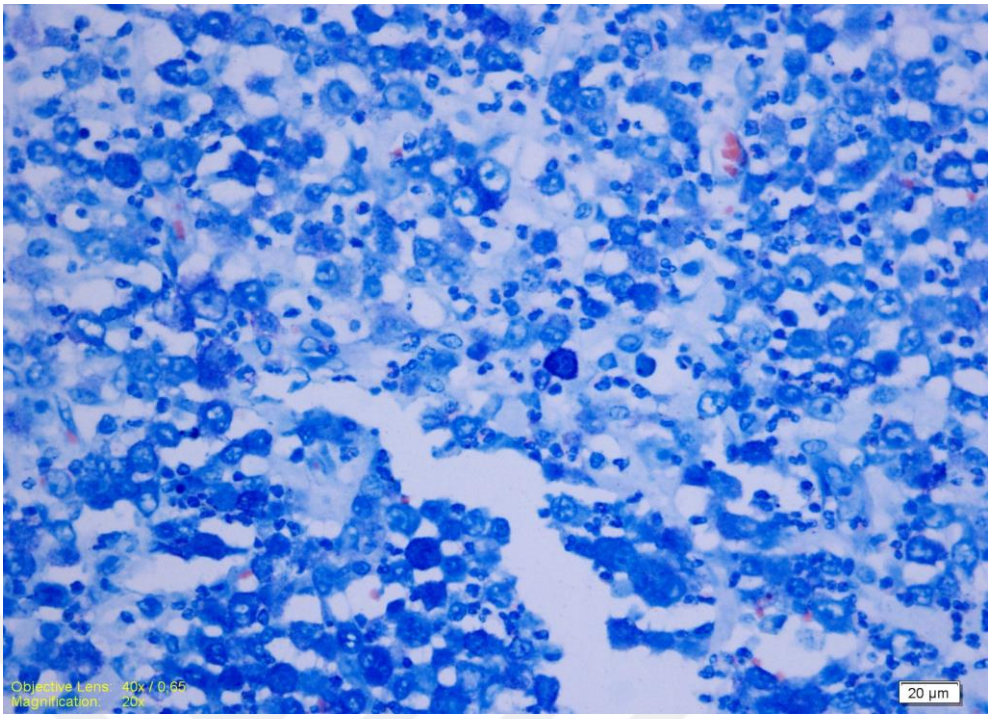
Şekil 4-16: Olgu no:7, Patnaik derecesi: II, Kiupel derecesi: II, Hematoksilen Eosin, 40×, Bar: 20µm, Oklar: mitotik figürler.



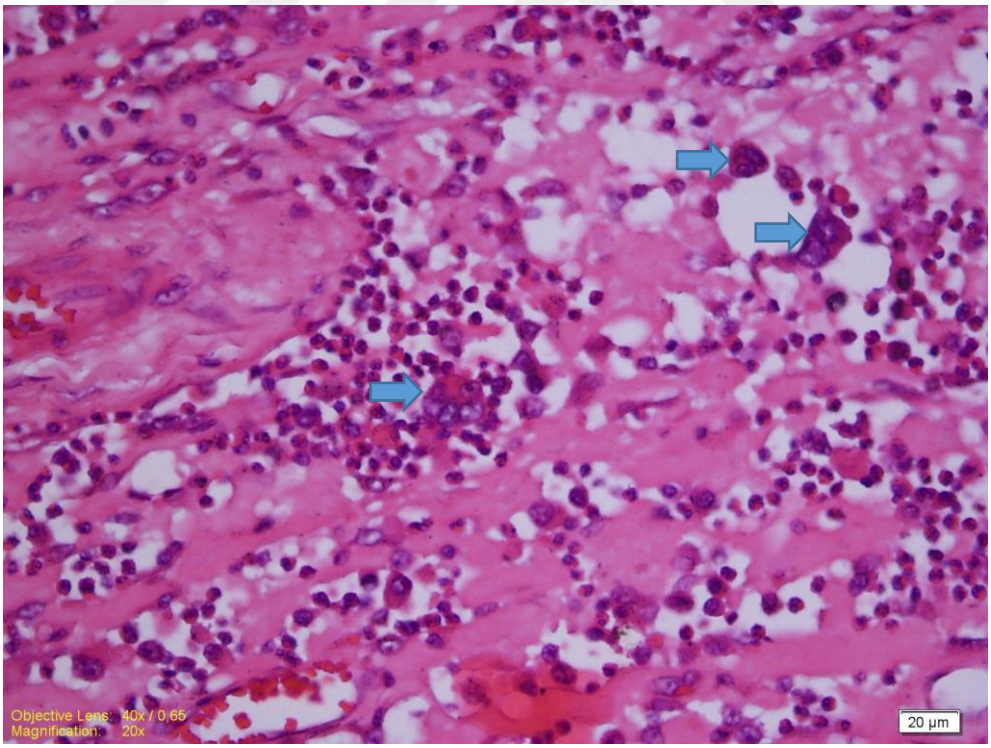
Şekil 4-17: Olgu no:10, Patnaik derecesi: III, Kiupel derecesi:II, Hematoksilen Eosin, 10×, Bar: 100µm,



Şekil 4-18: Olgu no:10, Patnaik derecesi: III, Kiupel derecesi: II, Hematoksilen Eosin, 40×, Bar: 20µm, Oklar: mitotik figürler.



Şekil 4-19: Olgu no:32, Patnaik derecesi: III, Kiupel derecesi: II, Giemsa, 40×, Bar: 20µm



Şekil 4-20: Olgu no:32, Patnaik derecesi: III, Kiupel derecesi: II, Hematoksilen Eosin, 40×, Bar: 20µm, Oklar: Çok çekirdekli hücreler.

4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.3.1. KIT

KIT proteini immunohistokimyasal (IHK) boyanması intrasitoplazmik olarak granüler görünümde saptandı. Preparatlarda epidermal hücreler ve diğer hücrelerde boyanma görülmedi. Çalışmamızda kullanılan 54 olgudan 53'ünde immunohistokimyasal boyanma sonucunda KIT protein ekspresyonu pozitif bulundu. Çalışmaya dahil edilen bu olguların birine ait preparatın ise İHK boyama sırasında dökülmesi nedeni ile sonuçları alınamadı. KIT İHK boyanma paternleri 17 olguda (% 32) patern I (Şekil 4-33), 20 olguda (% 38) patern II (Şekil 4-34) ve 16 olguda (% 30)' patern III (Şekil 4-35) olarak belirlendi.

Nükse ilişkin bilgileri mevcut olan olguların KIT boyanma paternleri incelendiğinde, nüks görülen 13 olgudan 2 tanesinde (% 15,4) patern 1, 6 tanesinde (%46,2) patern 2 ve 5 tanesinde (% 38,5) patern 3 gözlendi. Ancak KIT paterni ile nüks arasında herhangi bir ilişki bulunamadı (p>0,05, Tablo. 4-20).

Tablo 4-20: Nüks ve KIT boyanma paternlerinin dağılımı

KIT Paterni	Var		Yok		X^2	p
	n	%	n	%		
Patern 1	2	15,4	12	40,0		
Patern 2	6	46,2	11	36,7	2,66	0,28
Patern 3	5	38,5	7	23,3		
Toplam	13	100,0	30	100,0		

Patnaik derecelendirme sistemi ile derecelenen tümörler ve bunların KIT paternleri arasında ilişkiye bakıldığında, p=0,002 düzeyinde, yüksek bir ilişki olduğu gözlendi (X^2=15,33; Tablo 4-21).

Tablo 4-21: Patnaik derecelendirme sistemine göre tümörler ve KIT paternlerinin dağılımı

	KIT 1		KIT 2		KIT 3		X^2	P
	N	%	n	%	n	%		
Patnaik I	9	42,9	3	14,3	9	42,9		
Patnaik II	8	30,8	15	57,7	3	11,5	15,33	0,002
Patnaik III	0	0,0	2	33,3	4	66,7		
Toplam	17	32,1	20	37,7	16	30,2		

Kiupel derecelendirme sistemi ile derecelenen tümörler ve bunların KIT paternleri arasında ilişkiye bakıldığında da yine, p=0,005 düzeyinde, güçlü bir ilişki olduğu görüldü (X^2=10,18; Tablo 4-22).

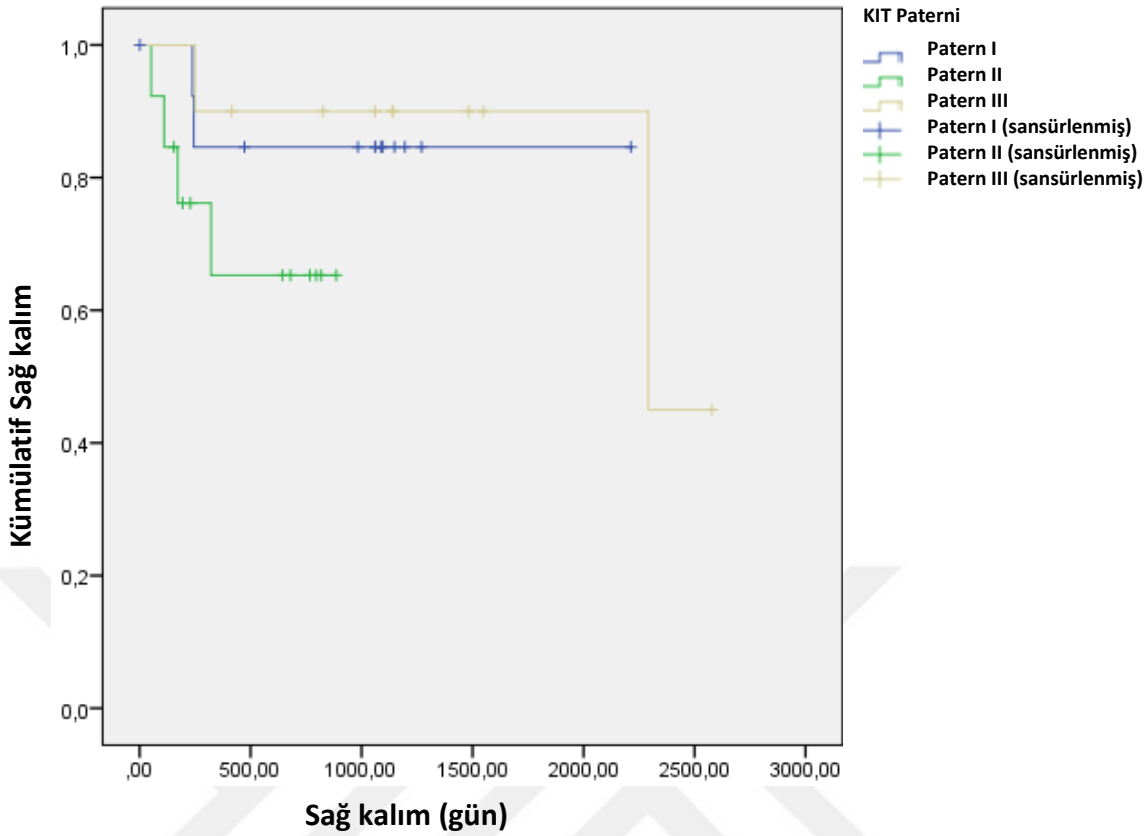
Tablo 4-22: Kiupel derecelendirme sistemine göre tümörlerin KIT paternlerinin dağılımı

Kiupel Derecesi	KIT 1		KIT 2		KIT 3		X^2	P
	n	%	n	%	n	%		
Düşük	16	44,4	9	25,0	11	30,6		
Yüksek	1	5,9	11	64,7	5	29,4	10,18	0,005
Toplam	17	32,1	20	37,7	16	30,2		

Uyguladığımız immunohistokimya yöntemi ile KIT antikoruna yönelik boyamaları yapılan preparatların değerlendirilmesine ve yaşam sürelerine ilişkin veriler incelendiğinde, istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamakla birlikte (X^2=2,95; p=0,22; Tablo 4-23; Şekil 4-21) I. ve III. boyanma paternlerinde teşhisten sonraki ortalama yaşam süreleri, sırasıyla 1909 ve 2216 gün olarak tespit edilmiş ve II. boyanma paternlerinde bu sürenin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (640 gün).

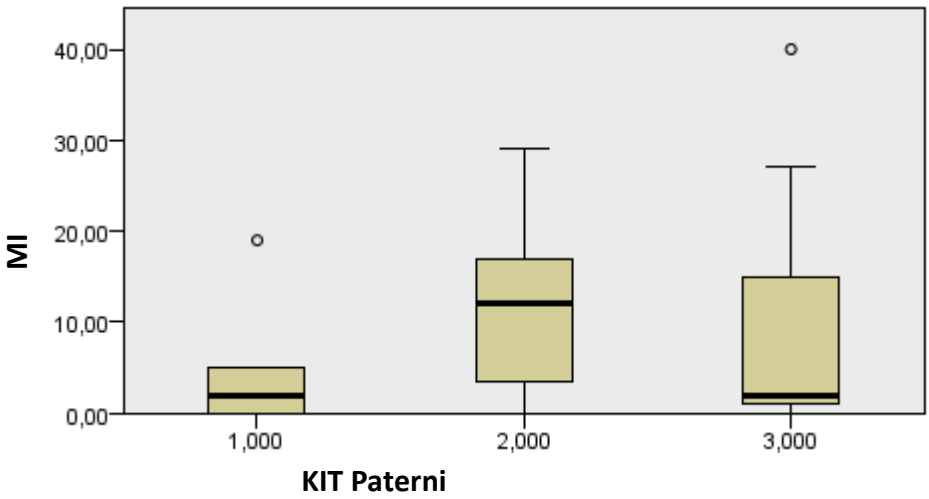
Tablo 4-23: KIT paterni ile yaşam süresi verilerine göre dağılımı

KIT Paterni	Ortalama		%95 Güven Aralığında		X^2	P
	Yaşam Süresi	Standart Hata	En az	En çok		
Patern I n:14	1909,61	197,33	1522,83	2296,39		
Patern II n:13	640,38	100,98	442,44	838,31	2,95	0,22
Patern III n:10	2216,4	226,47	1772,51	2660,28		
Toplam n:37	1974,26	175,02	1631,21	2317,31		



Şekil 4-21: KIT paternindeki değişiminin yaşam süresine etkisi

KIT paternleri ile Mitotik indeks incelendiğinde ise gruplar arasında fark, p=0,017 düzeyinde bulundu (Şekil 4-22; KW=8,12).



Şekil 4-22: Olguların KIT paternlerine göre Mİ dağılımının kutu çizgi grafiği

4.3.2. Ki67

Ki67 ekspresyonunu saptamak için yapılan immunohistokimyasal boyama işlemi sırasında diğer parametrelerde olduğu gibi antijen açığa çıkarma sırasında dökülmüş olan 20 no'lu olguya ait preparat Ki67 yönünden boyanamadı. Ayrıca, 29 no'lu olgu negatif sonuç verdi. Pozitif boyanan preparatların hepsinde tümöral hücrelerde intranükleer immun reaksiyon görülürken (Şekil 4-36, 4-37, 4-38), intrasitoplazmik boyanma görülmedi.

Hastaların yaşam/ölüm verileri ile Ki67 ekspresyonu bulguları arasındaki ilişkiyi gösteren veriler (Tablo 4-24) incelendiğinde yaşayan ve MCT nedeniyle ölen ya da diğer sebeplerden ölen hastaların Ki67 indeksleri arasında önemli fark gözlenmedi.

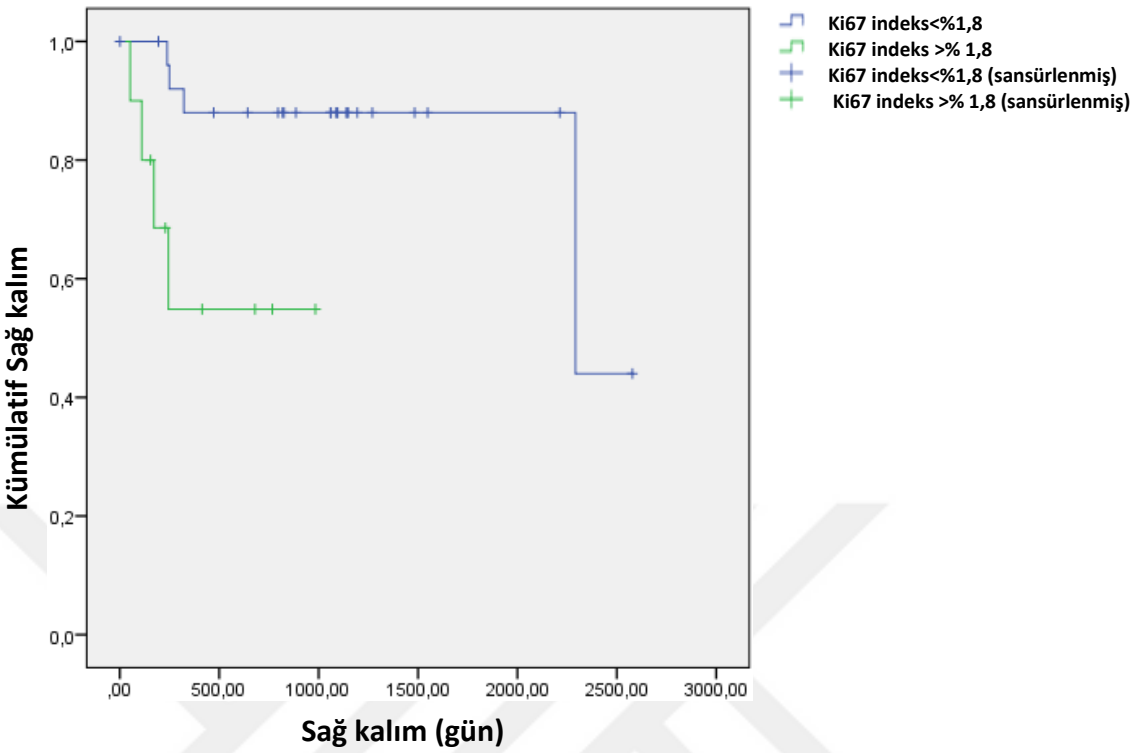
Tablo 4-24: Ki67 indeksinin ölüm/yaşam bilgisine göre dağılımı

	n	Ortalama Ki67 indeksi	Standart Hata	F	p
Diğer Sebeplerden ölüm	4	1,10	0,57		
MCT Nedeniyle Ölüm	13	1,42	,35	0,04	0,95
Halen yaşıyor	27	1,52	0,69		
Toplam	44	1,45	,41		

Ancak, Ki67 indeksi verileri, daha önce Scase ve ark.'nın (2006) belirlediği 0,018 Ki67 indeksi eşik değeri üzerinden değerlendirildiğinde, yaşam süresi bakımından istatistiksel olarak p=0,012 düzeyinde bir ilişki saptandı (X^2=6,31, Tablo 4-25, Şekil 4-23).

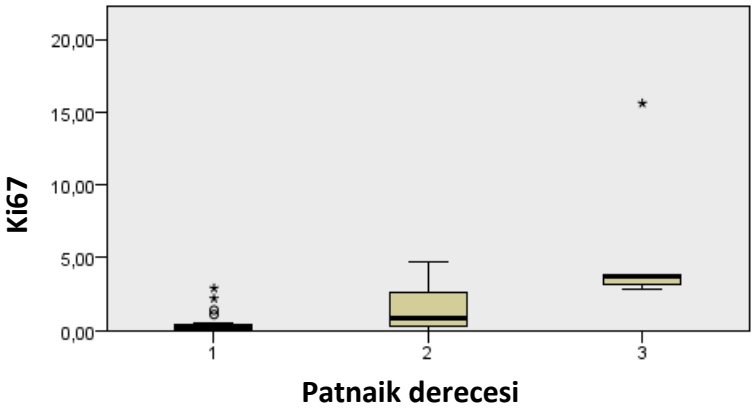
Tablo 4-25: 0,018 eşik değerine göre Ki67 indeksi ve yaşam süresi verileri

Ki67 indeksi	Ortalama		% 95 Güven Aralığında		X^2	p
	Yaşam Süresi	Standart Hata	En az	En çok		
<% 1,8	2175,16	166,52	1848,77	2501,54	6,31	0,012
>% 1,8	609,11	142,00	330,78	887,44		
Toplam	1974,26	175,02	1631,21	2317,31		

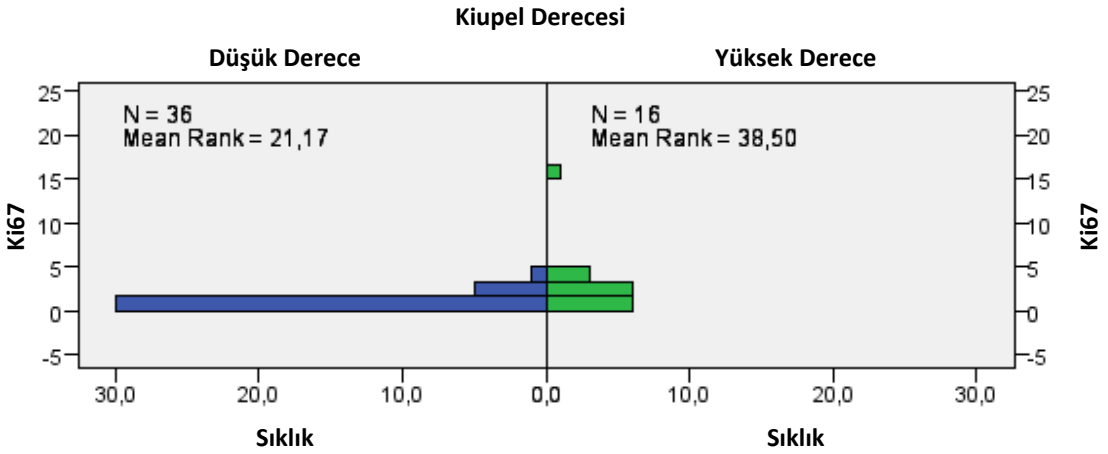


Şekil 4-23: 0,018 eşik değerine göre Ki67 indeksi ve yaşam süresi grafiği

Patnaik ve Kiupel dereceleri ile Ki67 indeks arasındaki ilişki incelendi (Sırasıyla Şekil 4-24 ve 4-25). Hem Patnaik derecesi ile, p<0,001düzeyinde, (KW=19,56) hem de Kiupel derecesi ile (U=480) Ki67 indeksi arasında, p<0,001 düzeyinde, önemli bir ilişki saptandı.

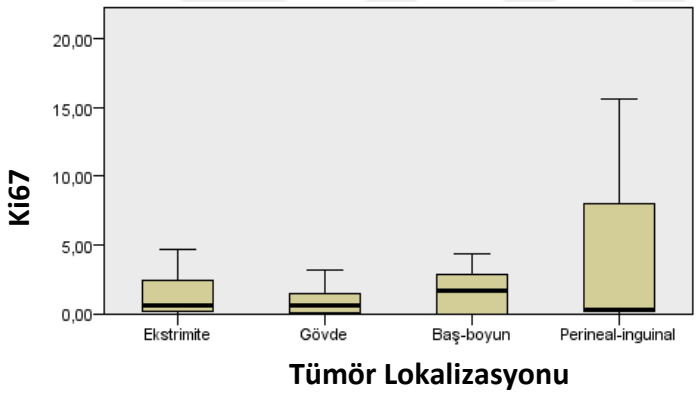


Şekil 4-24: Ki67 indeksinin Patnaik derecelerine göre dağılımı



Şekil 4-25: Ki67 indeksinin Kiupel derecelerine göre sıklılık dağılımı

Tümör lokalizasyonunun Ki67 indeksi ile bir ilişkisi olup olmadığı incelendi, aralarında bir ilişki saptanmadı (KW:0,41, p=0,93; Şekil 4-26).



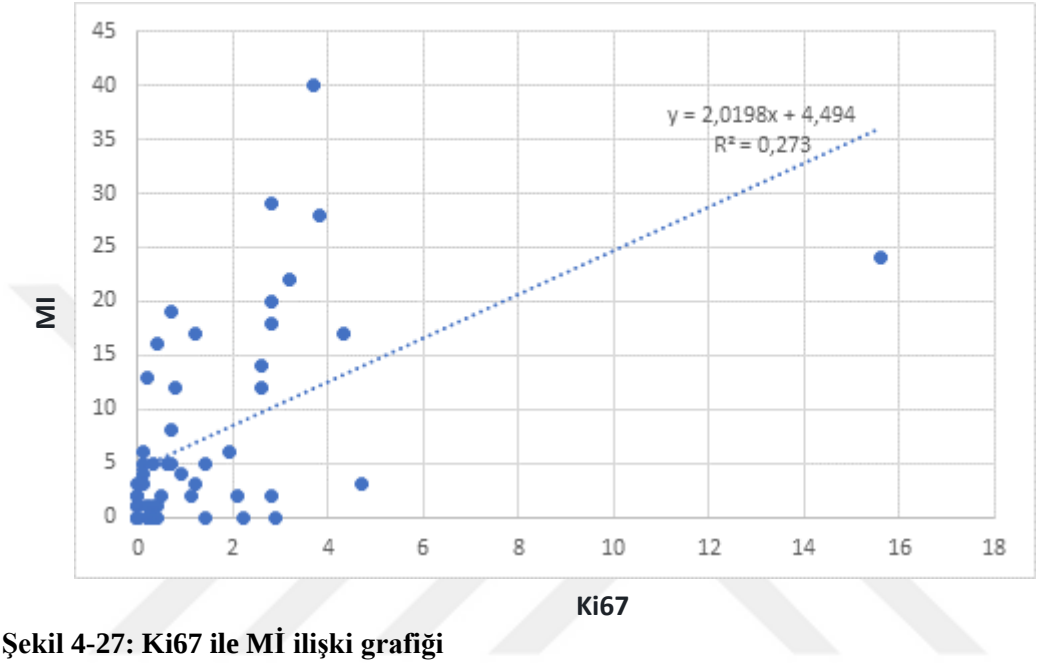
Şekil 4-26: Ki67 indeksinin tümör lokilazyonuna göre gruplandırması

Ki67 ekspresyonu ile nüks verileri incelendiğinde aralarında anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 4-26; t=,18; p=0,85).

Tablo 4-26: Ki67 ve nüks verilerinin ilişkisi

Nüks	n	Ortalama	Standart Hata	T	p
Yok	30	1,56	0,53	0,18	0,85
Var	13	1,43	0,41		

Ki67 ekspresyonu ve mitotik indeks arasındaki ilişki incelendiğinde elde edilen bilgilerin istatiksel açıdan, $p<0,001$ düzeyinde, anlamlı olduğu görüldü (Şekil 4-27; $r=0,52$).



Şekil 4-27: Ki67 ile Mİ ilişki grafiği

4.3.3. CD25

İmmunohistokimyasal boyama sonucunda tümör hücrelerinde CD25 protein ekspresyonu diffuz intrasitoplazmik boyanma şeklinde izlendi.

Tümörler, Meyer ve ark. (2012)'nın çalışmalarında bildirdikleri, semi-kantitatif derecelendirme sistemine göre Grup 0 (% 5'ten az pozitif tümör hücresi, Şekil 4-40), Grup 1 (% 5 ile % 39 arasında pozitif tümör hücresi, Şekil 4-40), Grup 2 (% 40 ile % 69 arasında pozitif tümör hücresi, Şekil 4-41 ve Şekil 4-42) ve Grup 3 (% 70 ve üzeri pozitif tümör hücresi, Şekil 4-43 ve Şekil 4-44) olmak üzere gruplandırıldı. Ardından, Patnaik ve Kiupel derecelendirme sistemlerine göre ayrı ayrı değerlendirildi. CD25 ekspresyonu ile Patnaik derecelendirme sistemine göre bir ilişki gözlenirken Kiupel derecelendirme sistemine göre bir ilişki gözlenmedi (Sırasıyla Tablo 4-27 ve Tablo 4-28).

Tablo 4-27: CD25 ekspresyonu ile Patnaik derecelerinin incelenmesi

Patnaik Derecesi	CD25 Ekspresyonu								X^2	p
	<% 5		% 5-39		% 40-69		>% 70			
	N	%	N	%	N	%	N	%		
Grade I	0	0	1	11,1	7	35,0	13	56,5	11,75	0,03
Grade II	1	100	5	55,6	10	50,0	10	43,5		
Grade III	0	0	3	33,3	3	15,0	0	0		
Toplam	1	100	9	100	20	100	23	100		

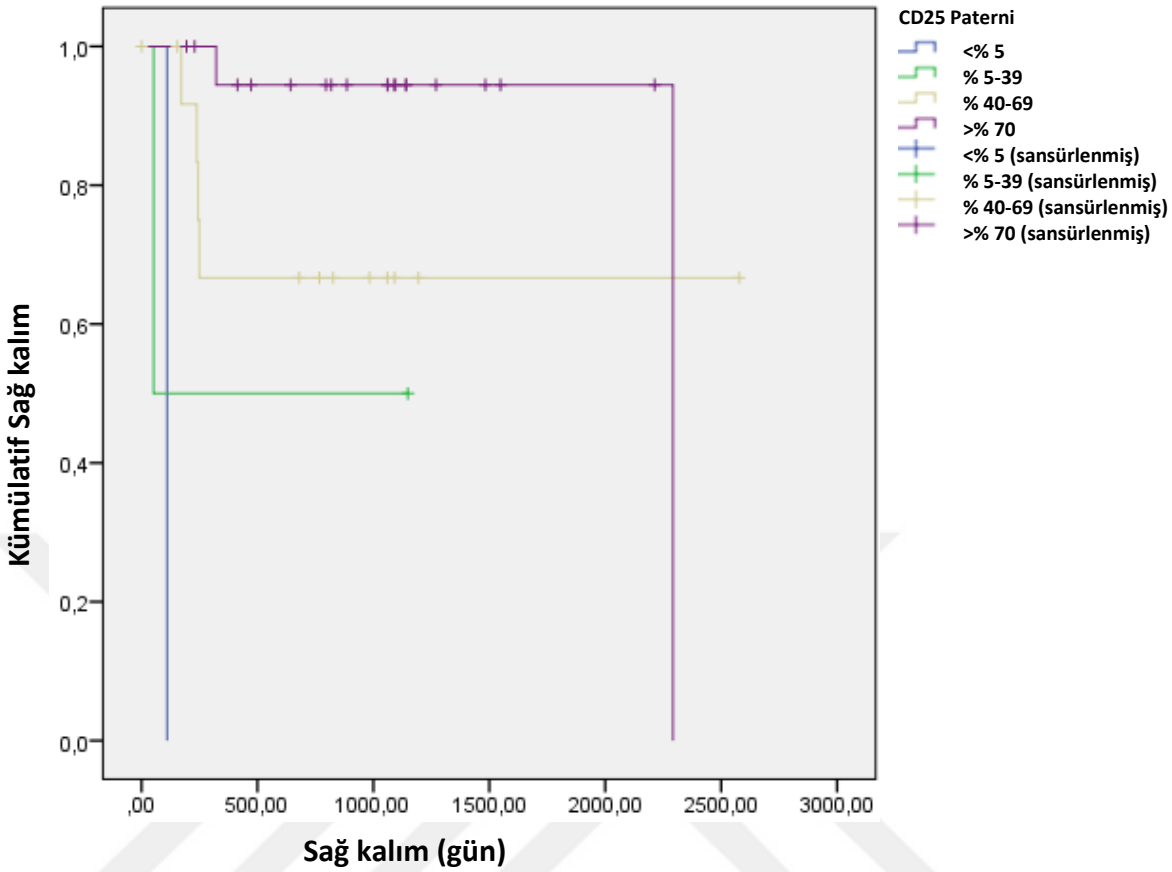
Tablo 4-28: Kiupel derecelerinin CD25 ekspresyonuna göre dağılımı

CD25 Ekspresyonu	Kiupel düşük derece		Kiupel yüksek derece		X^2	p
	n	%	n	%		
<% 5	0	0	1	100	3,87	0,24
% 5-39	5	55,6	4	44,4		
% 40-69	13	65,0	7	35,0		
>% 70	18	78,3	5	21,7		
Toplam	36	67,9	17	32,1		

Sağ kalım süreleri ile CD25 protein ekspresyonu arasındaki ilişki incelendiğinde, hastalarda saptanan CD25 % oranı azaldıkça teşhisten sonraki ortalama sağ kalım süresinin de p<0,001 düzeyinde azaldığı gözlendi (Tablo 4-29; Şekil 4-28).

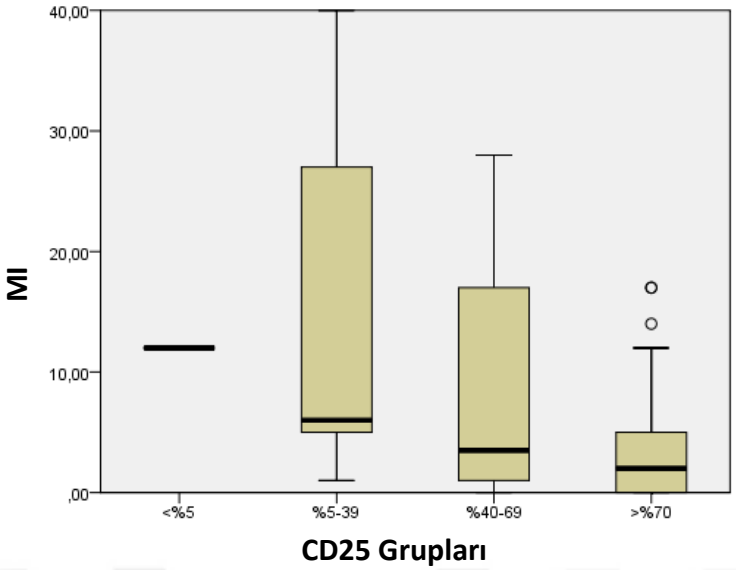
Tablo 4-29: CD25 ekspresyonu gruplarının yaşam süresi verileri

CD25 Ekspresyonu (%)	Ortalama		% 95 Güven Aralığında		X^2	P
	Yaşam Süresi	Standart Hata	En az	En çok		
<% 5 n:1	110,00	,000	110,00	110,00	20,42	0,000
% 5-39 n:2	600,50	387,84	,000	1360,68		
% 40-69 n:14	1793,91	320,14	1166,43	2421,39		
>% 70 n:20	2182,55	150,41	1887,73	2477,37		
Toplam n:37	1974,26	175,02	1631,21	2317,31		



Şekil 4-28: CD25 gruplarının yaşam süreleri grafiği

CD25 paternleri ile Mitotik indeks incelendiğinde gruplar arasında fark, p=0,033 düzeyinde bulundu (Şekil 4-29; X^2=8,76;). Ancak, Mİ için 5 eşik değerine göre gruplandırılan olguların CD25 ekspresyonu ile ilişkisi incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi (Tablo 4-30; X^2 =4,35; p=0,20).



Şekil 4-29: Mİ'nin CD25 gruplarına göre dağılımı

Tablo 4-30: Mİ 5 eşik değerine göre grupların CD25 ekspresyonu dağılımları

		CD25 ekspresyonu				X^2	P
		< %5	% 5-39	% 40-69	>% 70		
MI≤5	n	0	3	13	18	4,35	0,20
	%	0,0	50,0	76,5	78,3		
MI>5	n	1	3	4	5		
	%	100,0	50,0	23,5	21,7		
Toplam	n	1	6	17	23		
	%	100,0	100,0	100,0	100,0		

Nüks ile CD25 verileri arasında ilişki olup olmadığı incelendi ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (Tablo 4-31; X^2 =2,7; p=0,31).

Tablo 4-31: Nüks varlığının CD25 ekspresyonuna göre dağılımı

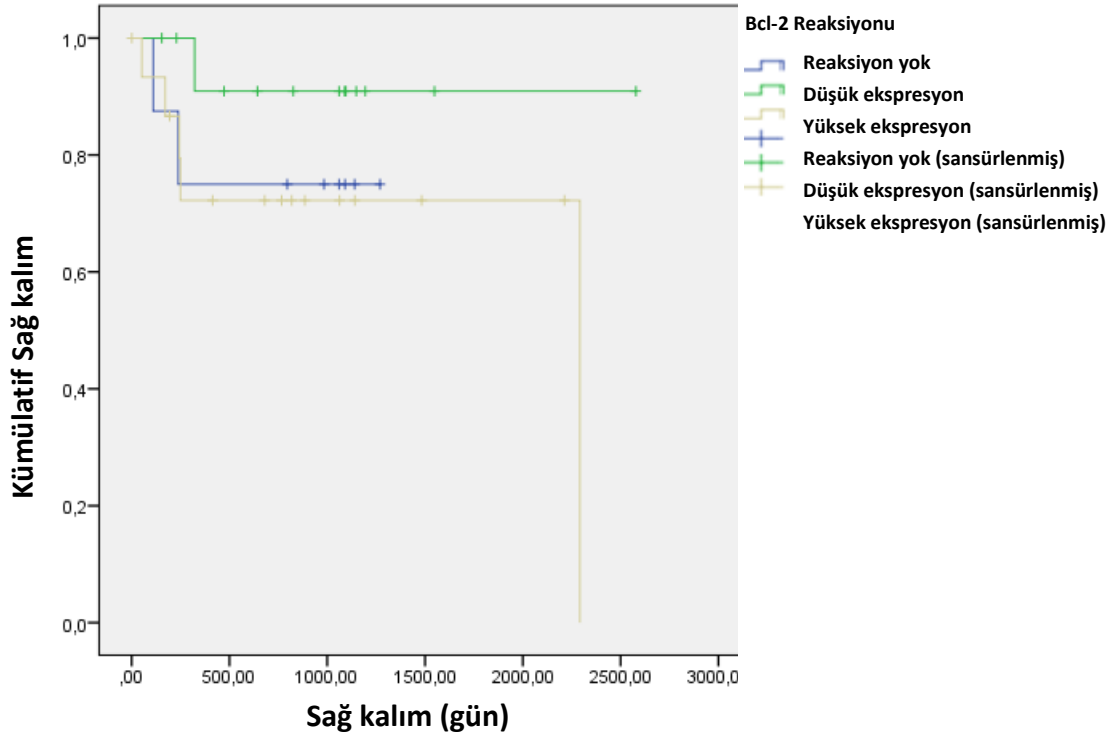
Nüks		**CD25 ekspresyonu**				**X^2**	**p**
		<% 5	**% 5-39**	**% 40-69**	**>% 70**		
Yok	n	0	3	11	16	3,7	0,31
	%	0,0	60,0	64,7	80,0		
Var	n	1	2	6	4		
	%	100,0	40,0	35,3	20,0		
Toplam	n	1	5	17	20		
	%	100,0	100,0	100,0	100,0		

4.3.4. Bcl-2

Bcl-2 proteini ekspresyonu tümoral mast hücrelerinde intrasitoplazmik yerleşimli olarak tespit edildi (Şekil 4-45, 4-46, 4-47, 4-48). Bcl-2 reaksiyonunun teşhisten sonraki sağ kalım süresi ile ilişkisi Tablo 4-32'de gösterildi ve bunlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (X^2=3,41; p=0,55). Bcl-2 Ekpresyonu ve sağ kalım fonksiyonu ise Şekil 4-30'de verilmiştir.

Tablo 4-32: Bcl-2 reaksiyonu ile teşhisten sonraki ortalama sağ kalım süreleri

Bcl-2 Reaksiyonu	N	Ortalama Yaşam Süresi	Standart Hata	% 95 Güven Aralığında En az	En çok	X^2	p
Reaksiyon yok	8	996,00	168,17	666,38	1325,61		
Düşük ekspresyon	13	2372,90	195,54	1989,63	2756,18	3,41	0,55
Yüksek ekspresyon	16	1705,87	279,42	1158,20	2253,54		
Toplam	37	1974,26	175,02	1631,21	2317,31		



Şekil 4-30: Bcl-2 Ekpresyonu ve sağ kalım süresi grafiği

Bcl-2 ekspresyonu verileri ve mitotik indeks arasındaki ilişki Tablo 4-33'te verilmiş olup aralarında yakın bir ilişki saptanmadı.

Tablo 4-33: Mİ'nin Bcl-2 ekspresyonu verilerine göre dağılımı

Bcl-2 Reaksiyonu	n	Mitotik indeks Ortalama	Standart Hata	F	P
Yok	11	4,63	2,46		
Düsük	21	7,80	1,68	0,90	0,41
Yüksek	21	9,42	2,53		

Tümörlerin Patnaik dereceleri (Tablo 4-34) ve Kiupel dereceleri (Tablo 4-35) ile Bcl-2 ekspresyonları arasındaki ilişki incelendi ancak önemli bir ilişki saptanmadı.

Tablo 4-34: Bcl-2 ekspresyonunun Patnaik derecelerine göre dağılımı

Patnaik Derecesi	Reaksiyon Yok		Düşük ekspresyon		Yüksek ekspresyon		X^2	P
	n	%	n	%	N	%		
Grade I	7	33,3	7	33,3	7	33,3		
Grade II	3	11,5	13	50,0	10	38,5	5,34	0,23
Grade III	1	16,7	1	16,7	4	66,7		
Toplam	11	20,8	21	39,6	21	39,6		

Tablo 4-35: Bcl-2 ekspresyonunun Kiupel derecelerine göre dağılımı

Bcl-2 Ekspresyonu	Kiupel düşük derece		Kiupel yüksek derece		X^2	P
	N	%	N	%		
Yok	9	81,8	2	18,2		
Düşük ekspresyon	13	61,9	8	38,1	1,33	0,56
Yüksek ekspresyon	14	66,7	7	33,3		
Toplam	36	67,9	17	32,1		

Bcl-2 ekspresyonu ile nüks verileri arasındaki ilişki Tablo 4-36'da verilmiş olup aralarında anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 4-36: Bcl-2 Ekspresyonu ile nüks verilerinin dağılımı

Nüks		Bcl-2 ekspresyonu			Toplam	X2	P
		Reaksiyon yok	Düşük	Yüksek			
Yok	**Sayı**	5	11	14	30	0,90	0,74
	Nüks içinde %	16,7	36,7	46,7	100,0		
Var	**Sayı**	3	3	7	13		
	Nüks içinde %	23,1	23,1	53,8	100,0		
Toplam	**Sayı**	8	14	21	43		
	Nüks içinde %	18,6	32,6	48,8	100,0		

4.3.5. Bax

Genel olarak, Bax yönünden İHK yapılan preparatlarda yoğun diffuz boyanmalar görüldü ve bu durum testin optimizasyonunu son derece zorlaştırdı. 54 olgudan bir tanesine ait preparat immunohistokimyasal boyama sırasında döküldüğünden değerlendirilemedi. Bax için immunohistokimyasal boyama yapılan tüm preparatlarda (n:53) pozitif reaksiyon görüldü. Bu tümörlerin 33 tanesinde (% 62,3) yüksek Bax ekspresyonu (Şekil 4-49, ve 4-50) izlenirken 20 tanesinde (% 37,7) düşük Bax ekspresyonu (Şekil 4-51 ve 4-52) izlendi.

Bu tümörlerin Patnaik derecelerine göre dağılımı Tablo 4-37'de, Kiupel derecelerine göre dağılımı Tablo 4-38'de verildi. Tablolardan da görüleceği gibi düşük Bax ekspresyonu saptanan grupta Patnaik III. derece tümör yer almamakta ve sadece 1 adet Kiupel yüksek dereceli tümör bulunmaktadır. Bax ekspresyonunun derecelendirme sistemleri ile ilişkilerine bakıldığında istatistiksel olarak Patnaik derecelendirme sistemine göre p=0,005 düzeyinde, Kiupel derecelendirme sistemine göre p=0,003 düzeyinde anlamlılık saptandı.

Tablo 4-37: Bax ekspresyonunun Patnaik derecelerine göre dağılımı

Patnaik Derecesi	Düşük ekspresyon		Yüksek ekspresyon		X^2	p
	n	%	N	%		
I. Derece	13	61,9	8	38,1	9,73	0,005
II. Derece	7	26,9	19	73,1		
III. Derece	0	0,0	6	100,0		
Toplam	20	37,7	33	62,3		

Tablo 4-38: Bax ekspresyonunun Kiupel derecelerine göre dağılımı

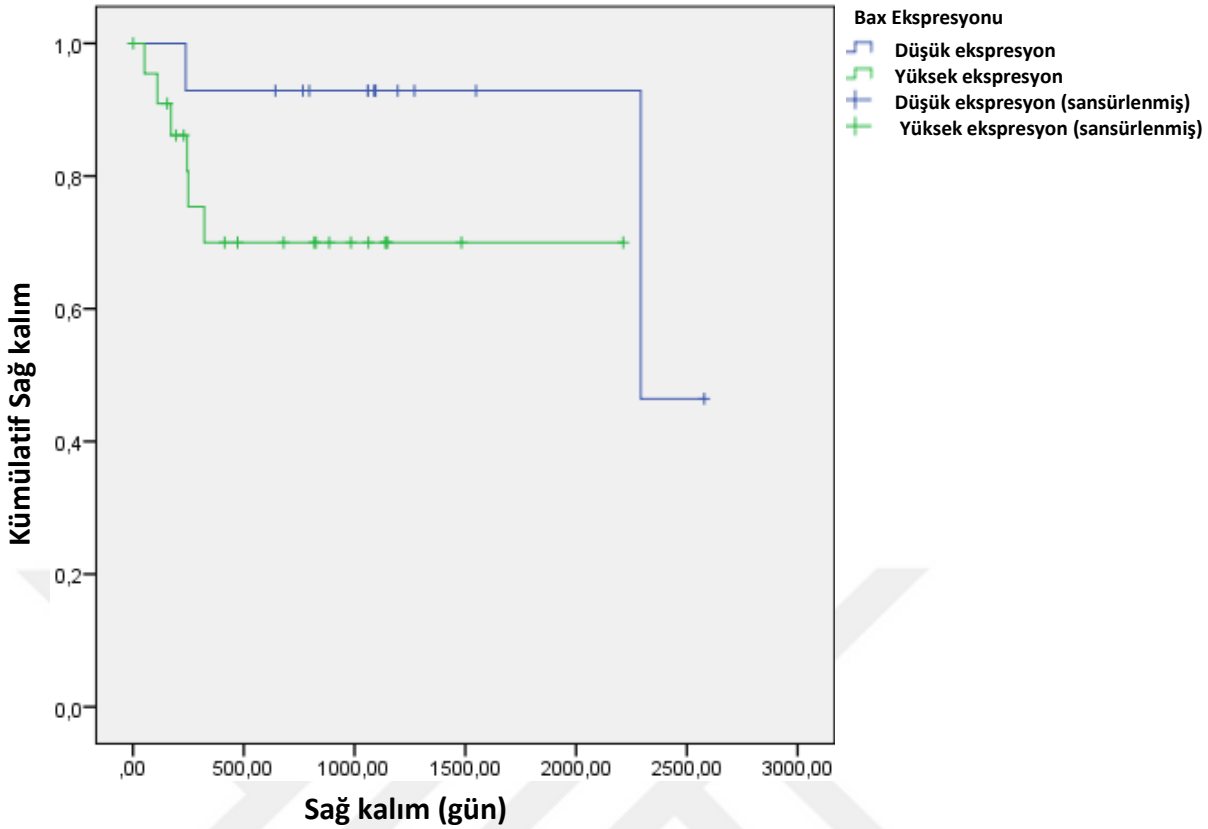
Bax Ekspresyonu	Kiupel I. derece		Kiupel II. derece		X^2	p
	n	%	N	%		
Düşük ekspresyon	19	95,0	1	5,0		
Yüksek ekspresyon	17	51,5	16	48,5	8,90	0,003
Toplam	36	67,9	17	32,1		

Yüksek Bax ekspresyonu görülen 33 olgudan 28'i takip edilebildi. Bunların 4 tanesi diğer sebeplerden ölürken 10 tanesi MCT sebebiyle öldü; 14 tanesi ise halen yaşamaktadır. Düşük Bax ekspresyonu gösteren 20 olgudan 5'i takip edilemedi diğer 2'si MCT nedeni ile, 1 tanesi ise diğer sebeplerden öldü, 12 tanesi halen yaşamaktadır.

Düşük Bax ekspresyonu görülen olgularda teşhisten sonraki ortalama yaşam süresi 2278 gün iken yüksek Bax ekspresyonu gösteren olgularda teşhisten sonraki ortalama yaşam süresi 1608 gündür (X^2=2,50; p=0,11; Tablo 4-39; Şekil 4-31).

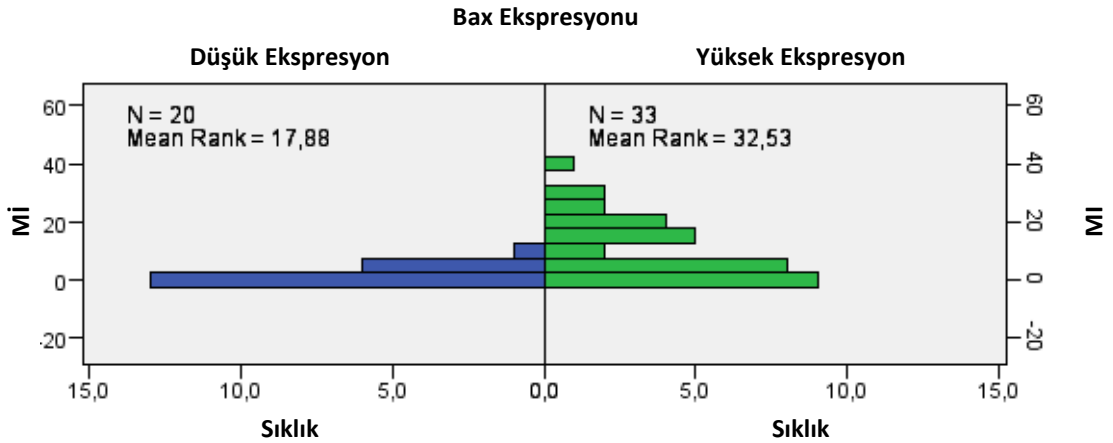
Tablo 4-39: Bax ekspresyonunun teşhisten sonraki yaşam sürelerinin dağılımı

Bax Ekspresyonu	N	Ortalama		%95 Güven Aralığında		X^2	p
		Yaşam Süresi	Standart Hata	En az	En çok		
Düşük ekspresyon	14	2278,07	177,99	1929,19	2626,94	2,50	0,11
Yüksek ekspresyon	23	1608,03	208,15	1200,04	2016,02		
Toplam	37	1974,26	175,02	1631,21	2317,31		



Şekil 4-31 Düşük ve yüksek Bax ekspresyonu gösteren olguların sağ kalım grafiği

Mitotik indekslerin ortancaları düşük ve yüksek Bax ekspresyonları gösteren olgularda değişkenlik saptandı (U=512,5; p=0,001; Şekil 4-32).



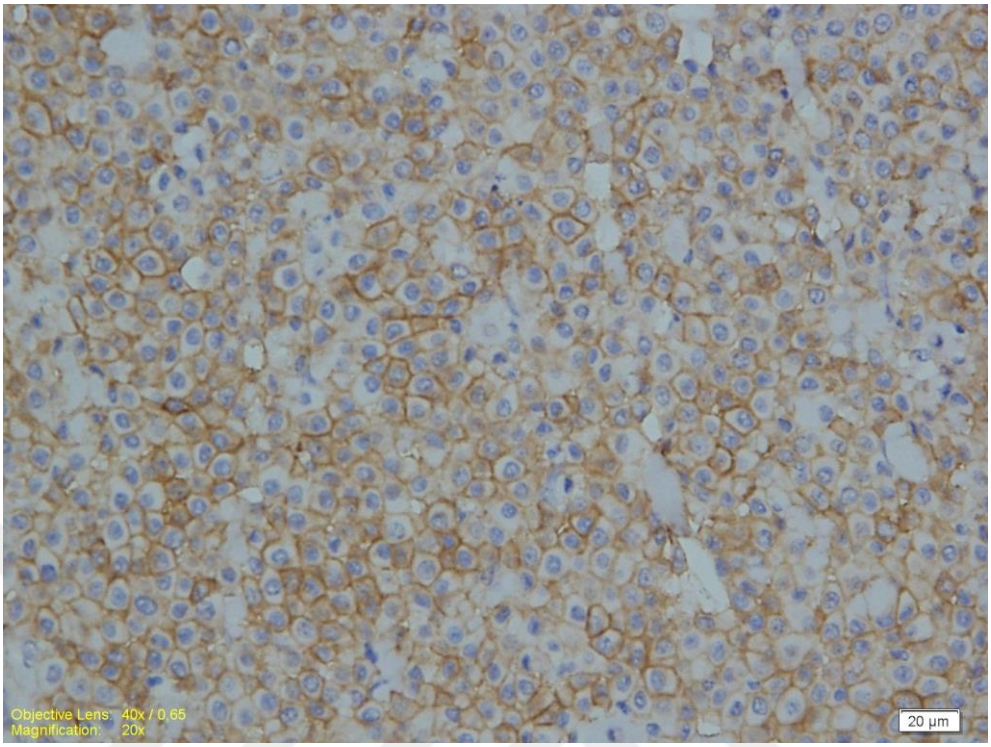
Şekil 4-32: Mİ verilerinin Bax ekspresyonları gruplarına göre sıklık dağılımları

Nüks ile Bax ekspresyonları incelendiğinde aralarında önemli bir ilişki gözlenmedi (Tablo 4-40, X^2=0,001, p=0,98).

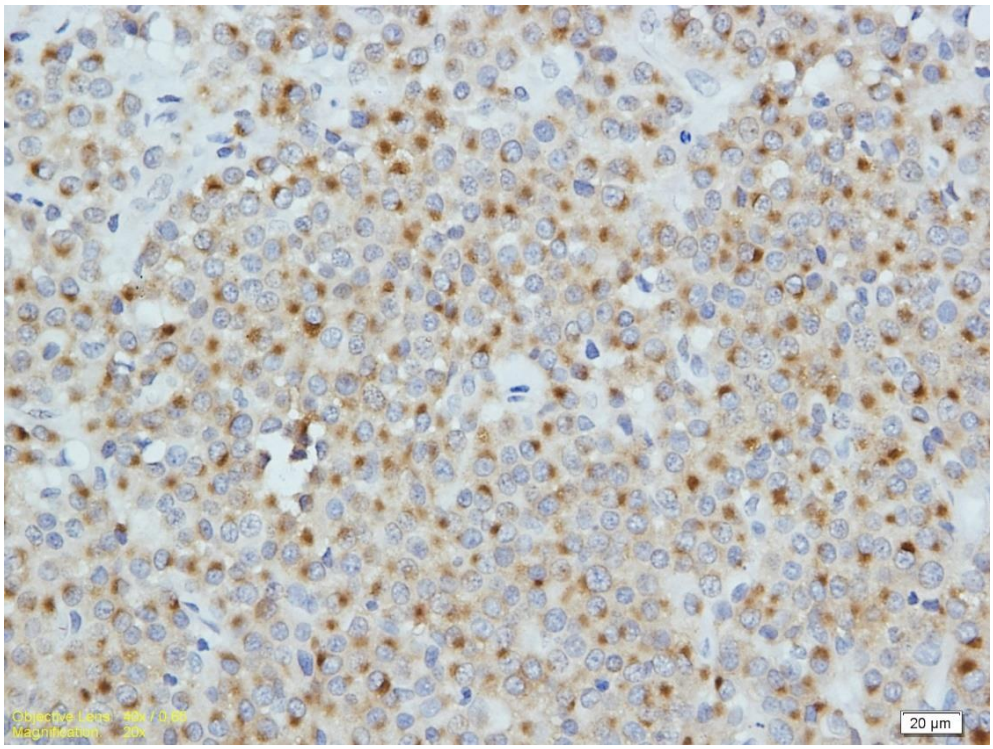
Tablo 4-40: Nüks ve Bax ekspresyonunun ilişkisi

			Bax Ekspresyonu		Total	X^2	p
			Düşük	Yüksek			
Nüks	Yok	Sayı	11	19	30	0,001	0,98
		Nüks verisi içinde%	36,7%	63,3%	100,0%		
	Var	Sayı	4	9	13		
		Nüks verisi içinde%	30,8%	69,2%	100,0%		
	Total	Sayı	15	28	43		
		Nüks verisi içinde%	34,9%	65,1%	100,0%		

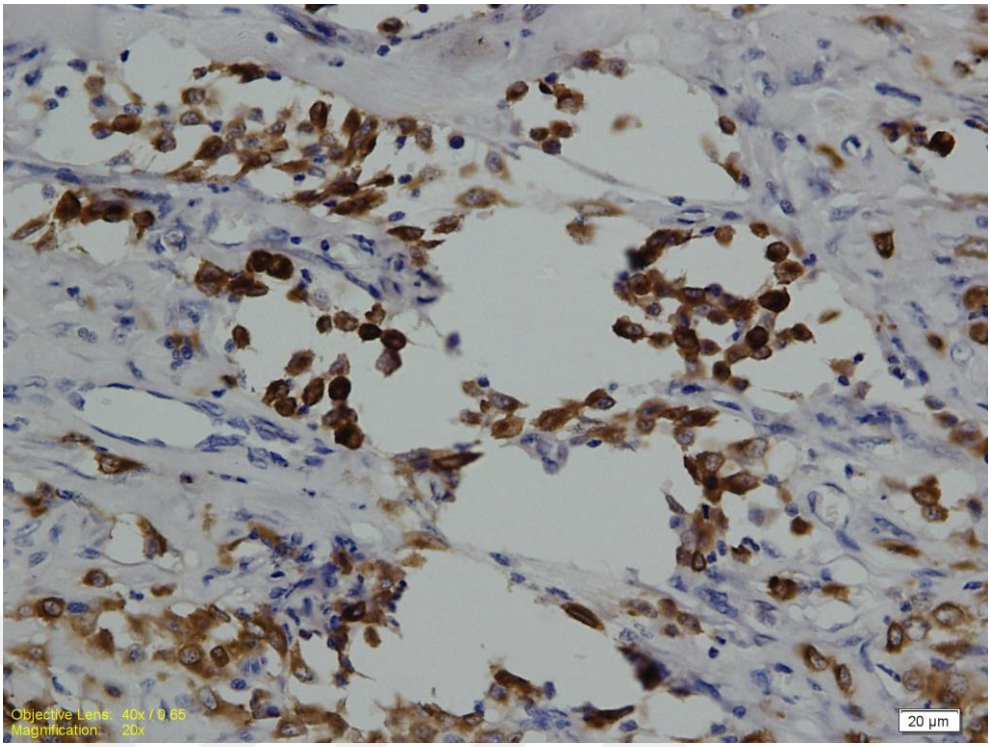
4.3.6. İmmunohistokimyasal (İşaretlenmiş Streptavidin-Biyotin-Peroksidaz Tekniği) Boyama ile İlgili Şekiller



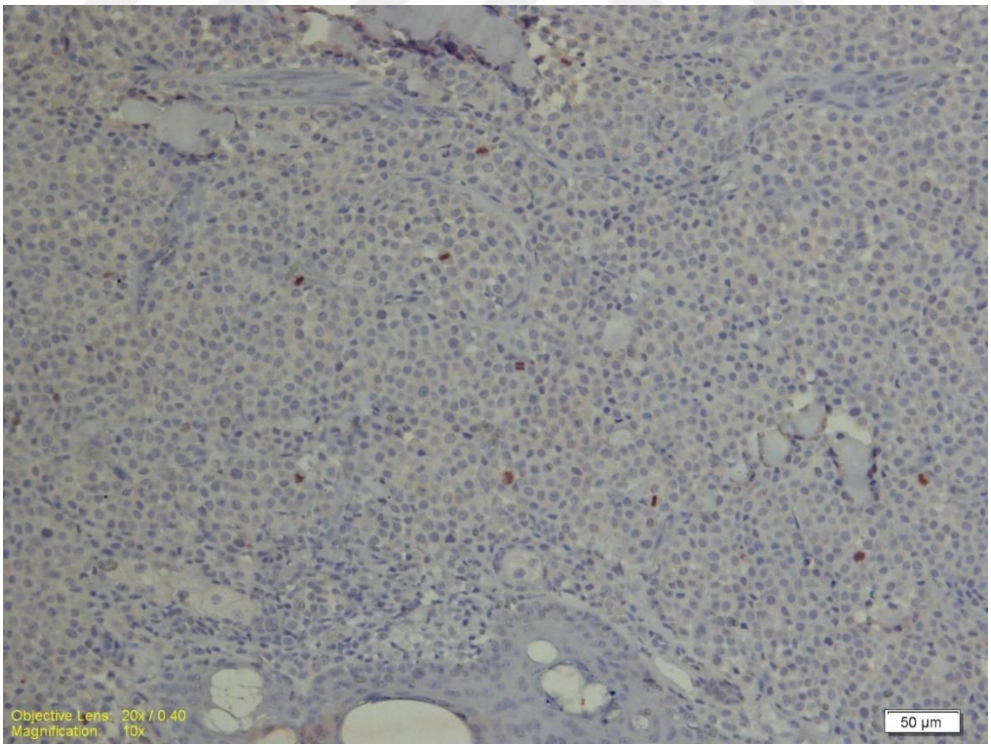
Şekil 4-33: Olgu no:3, KIT ekspresyonu, Patern:1, DAB. 40×, Bar: 20µm



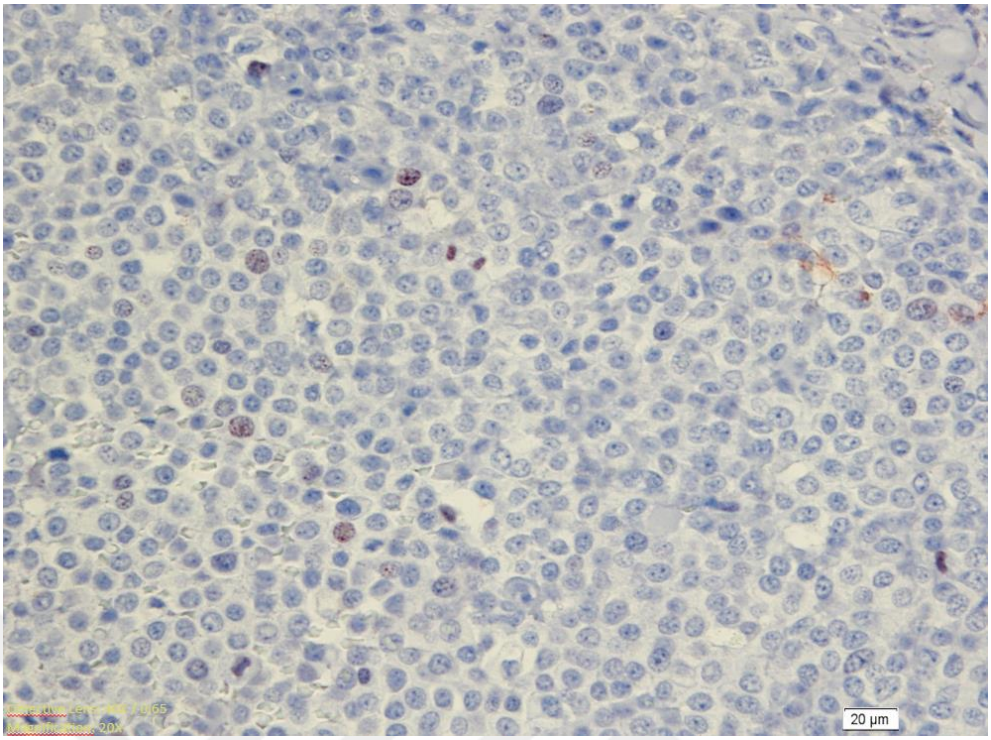
Şekil 4-34: Olgu no:7, KIT ekspresyonu, Patern:2, DAB. 40×, Bar: 20µm



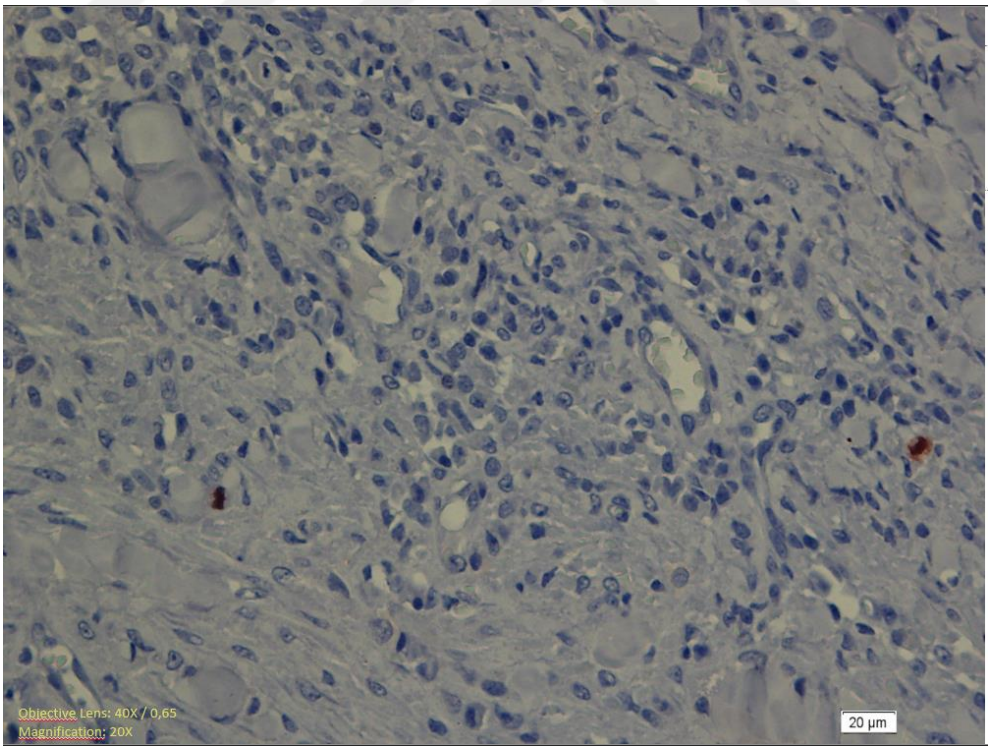
Şekil 4-35: Olgu no:30, KIT ekspresyonu, Patern:3, DAB. 40×, Bar: 20µm



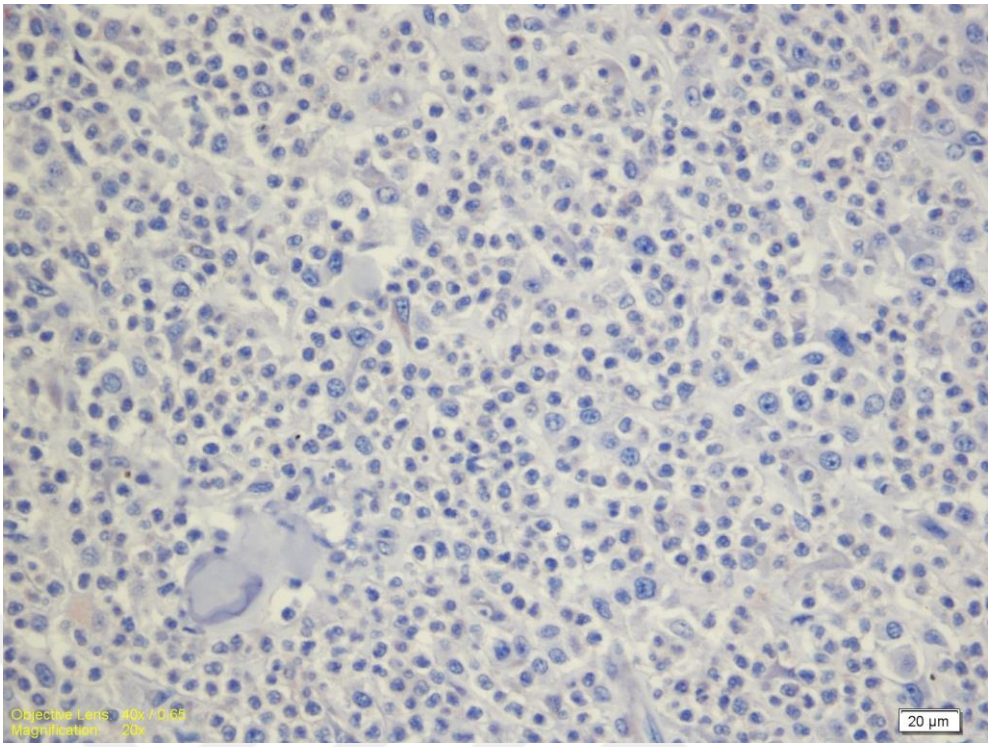
Şekil 4-36: Olgu no: 24, Ki67 ekspresyonu, DAB. 20×, Bar: 50µm



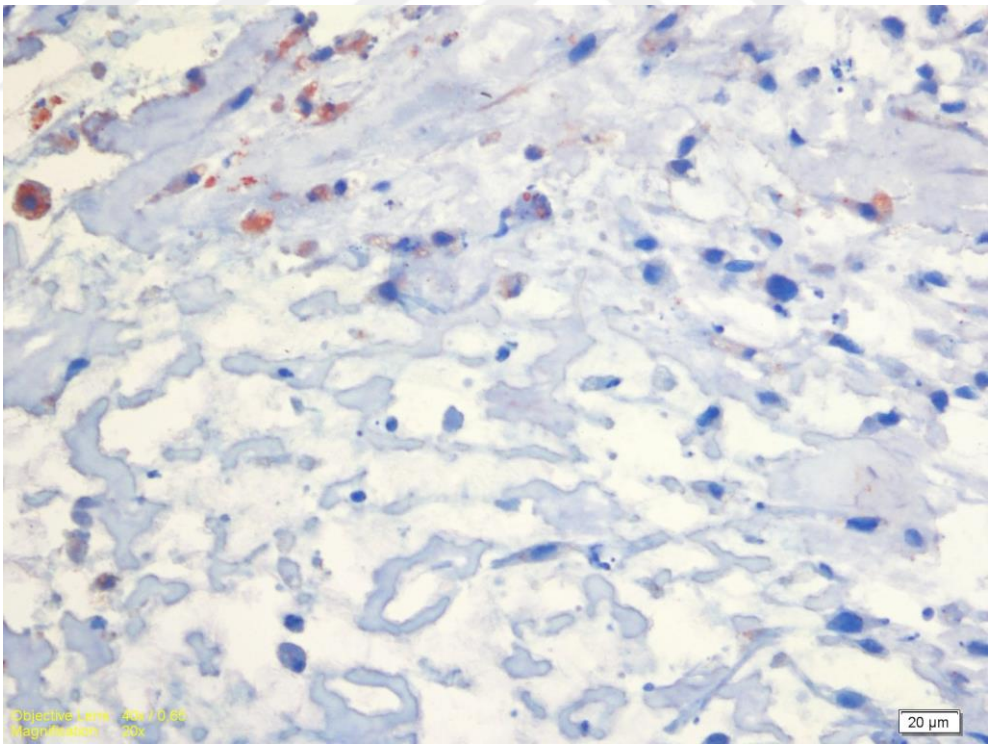
Şekil 4-37: Olgu no: 15, Ki67 ekspresyonu, DAB. 40×, Bar: 20µm



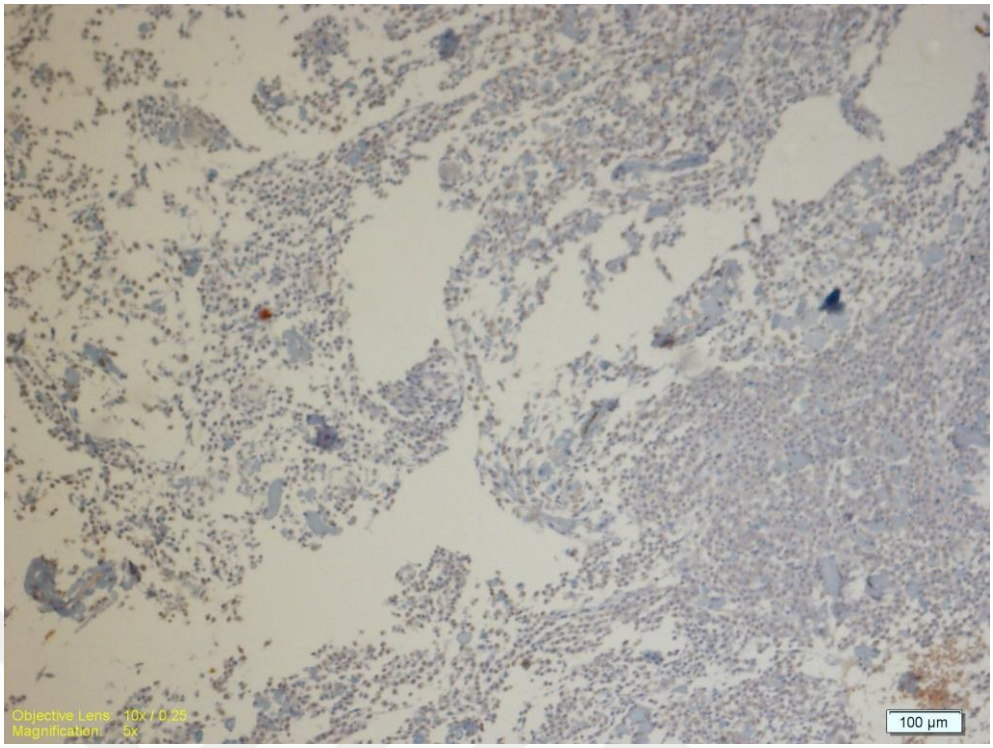
Şekil 4-38: Olgu no: 13, Ki67 ekspresyonu, DAB. 40×, Bar: 20µm



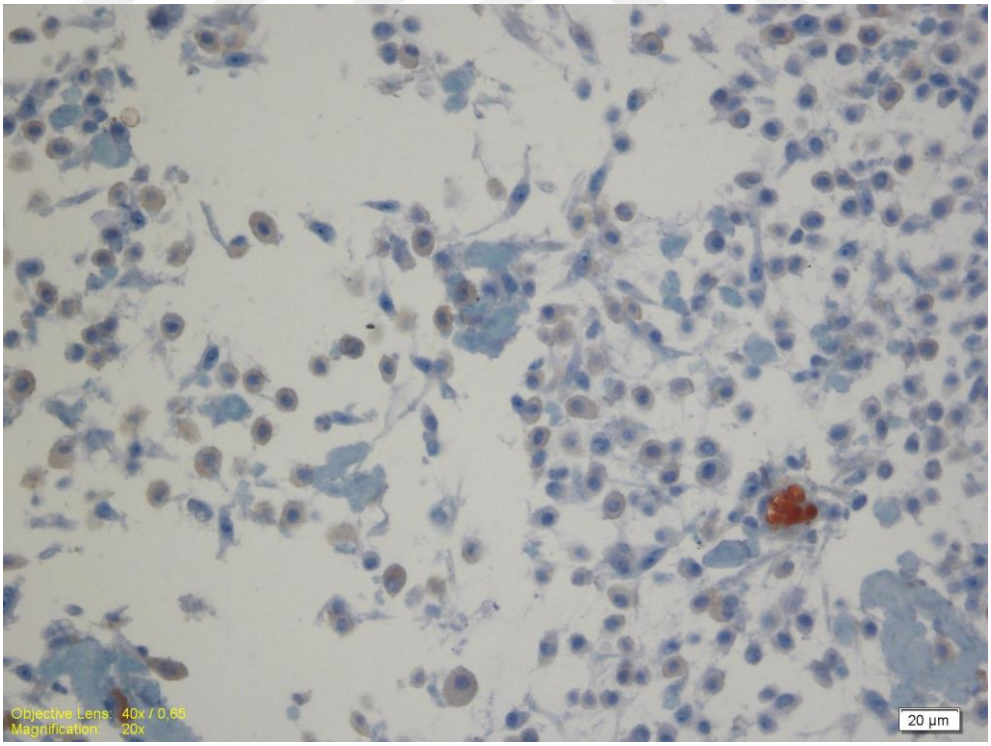
Şekil 4-39: Olgu no:34 CD25 ekspresyonu <%5, AEC. 40×, Bar: 20µm



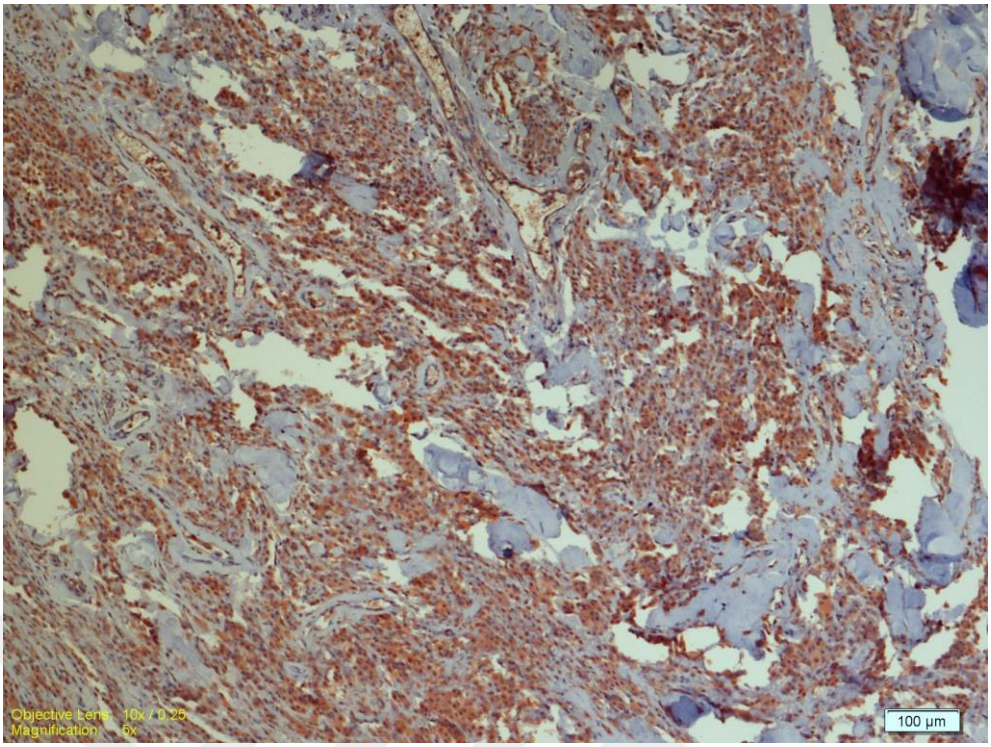
Şekil 4-40: Olgu no:53 CD25 ekspresyonu %5-%39, AEC. 10×, Bar: 100µm



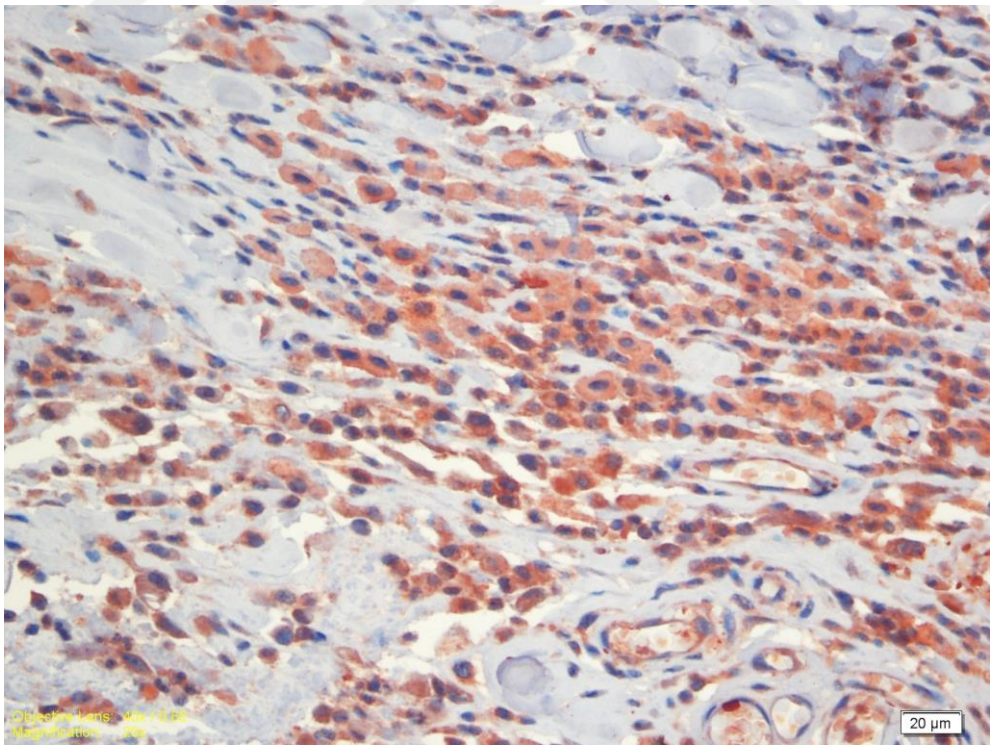
Şekil 4-41: Olgu no:28 CD25 ekspresyonu %39-%79, AEC. 10×, Bar: 100µm



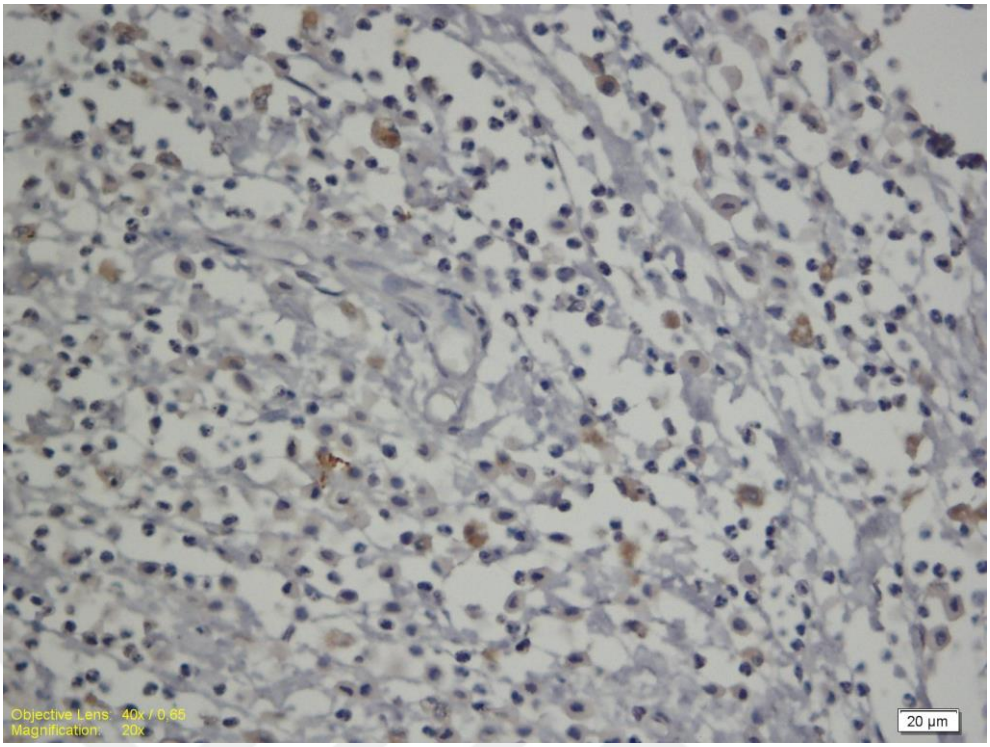
Şekil 4-42: Olgu no: 28 CD25 ekspresyonu %39-79, AEC. 40×, Bar: 20µm



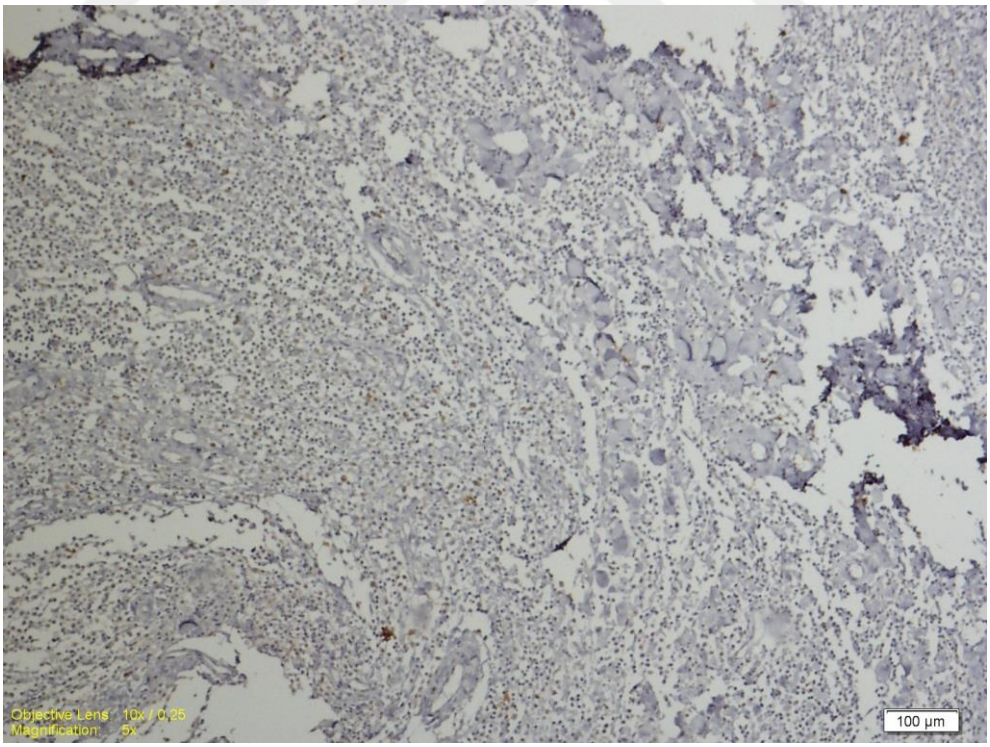
Şekil 4-43: Olgu no: 27, CD25 ekspresyonu >%79, AEC. 10×, Bar: 100µm



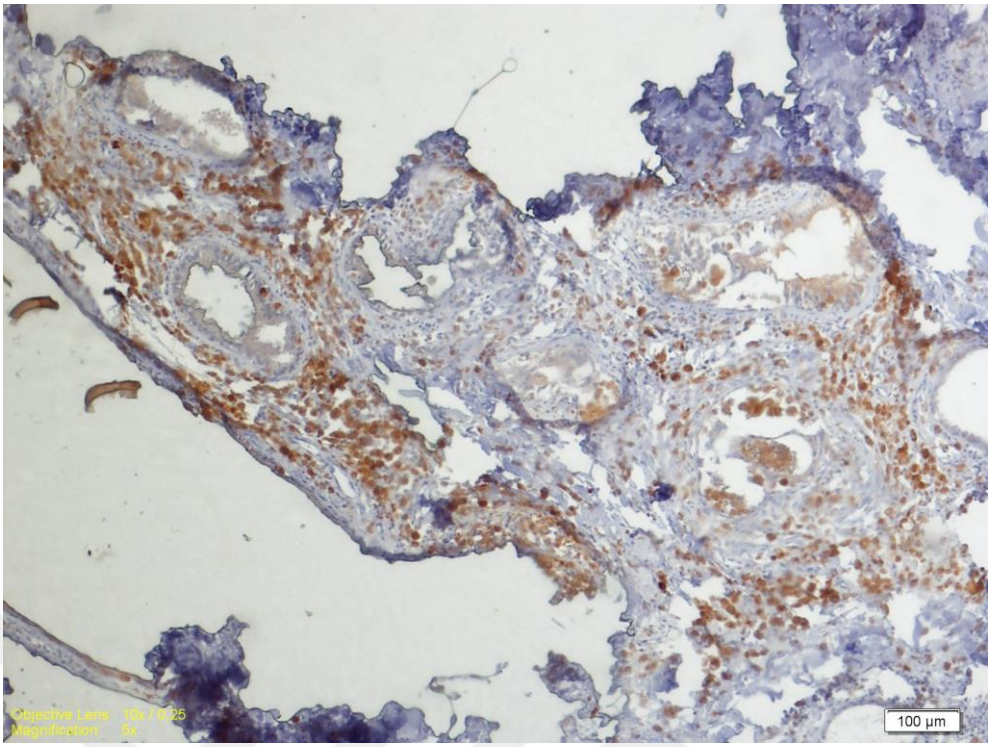
Şekil 4-44: Olgu no: 27, CD25 ekspresyonu >%79, AEC. 40×, Bar: 20µm



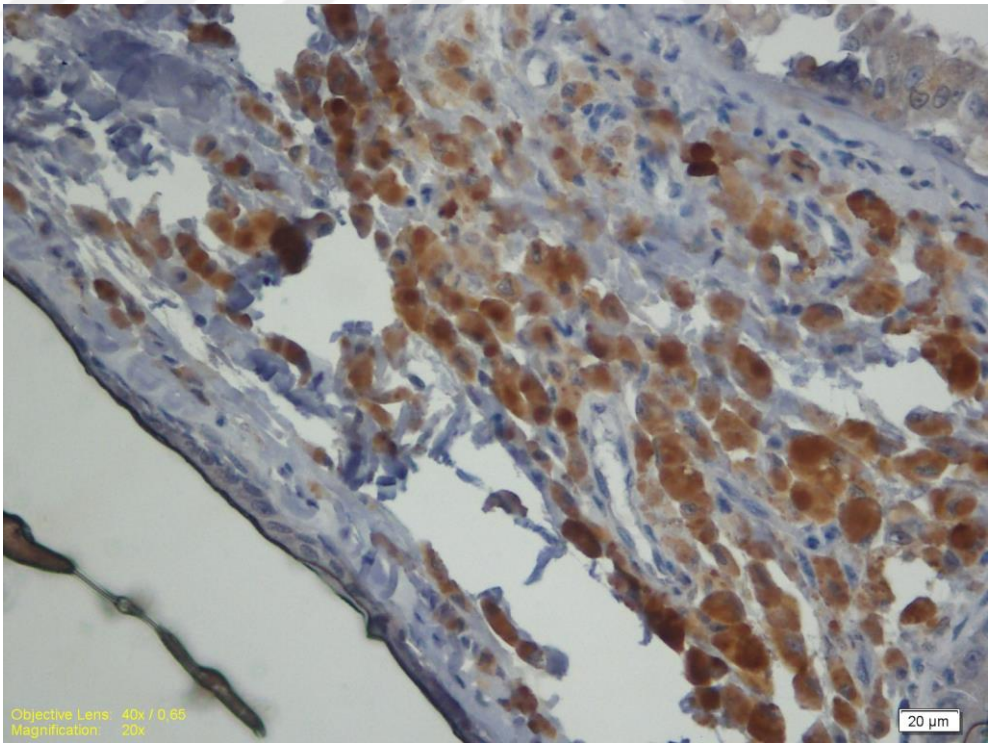
Şekil 4-45: Olgu no:24, Düşük Bcl-2 ekspresyonu, DAB. 40×, Bar: 20µm



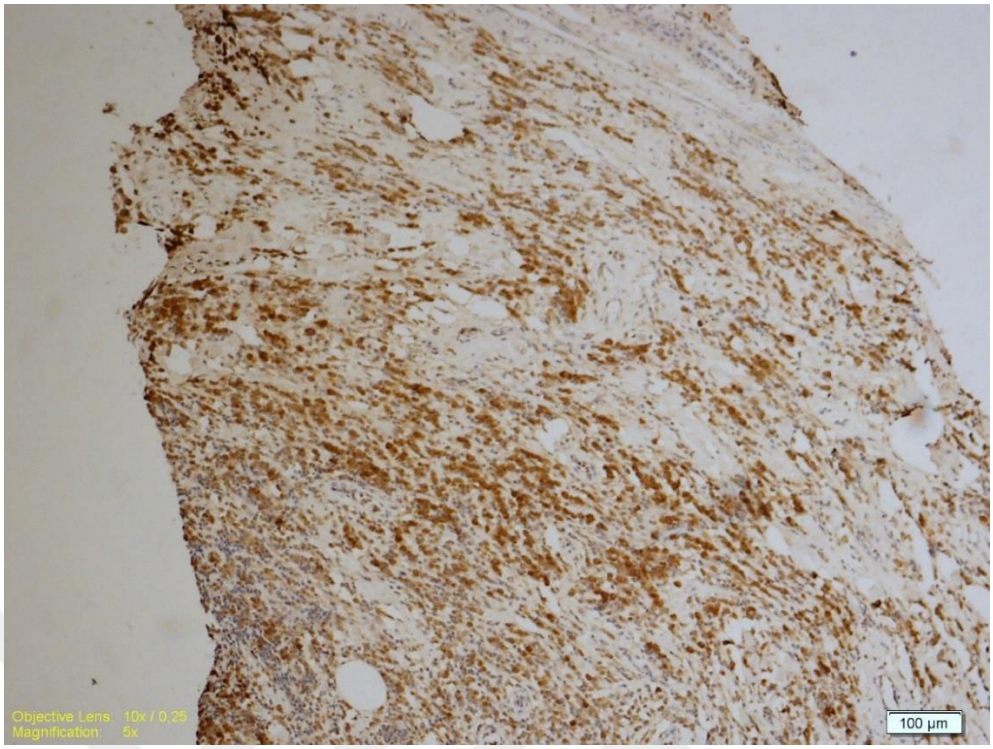
Şekil 4-46: Olgu no:24, Düşük Bcl-2 ekspresyonu, DAB. 10×, Bar: 100µm



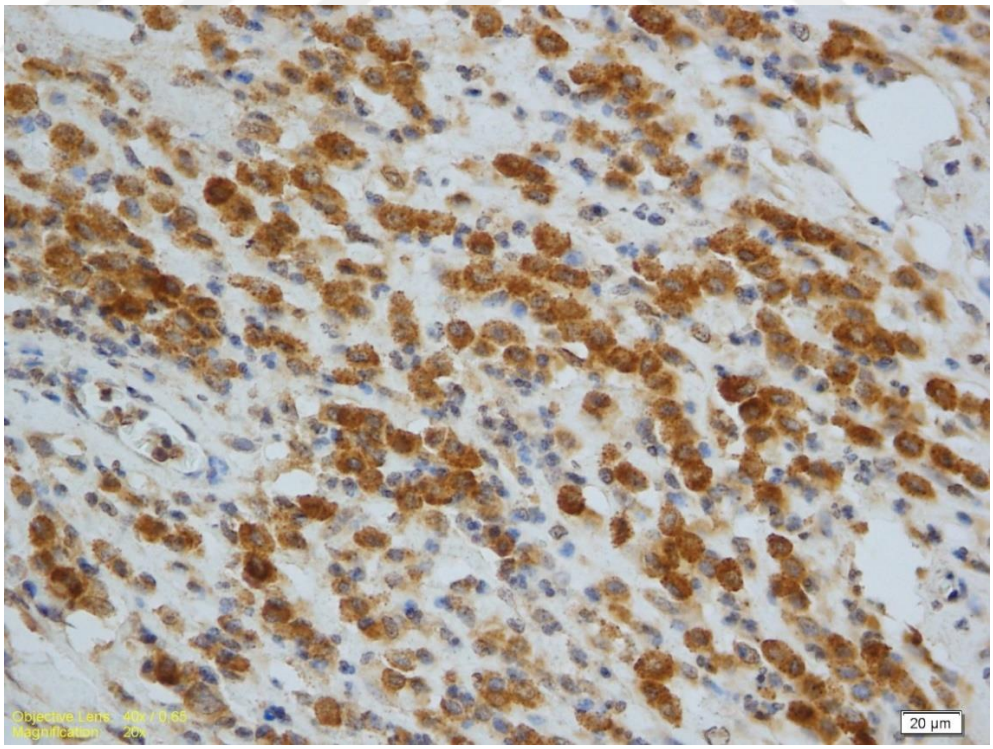
Şekil 4-47: Olgu no:29, Yüksek Bcl-2 ekspresyonu, DAB. 10×, Bar: 100µm



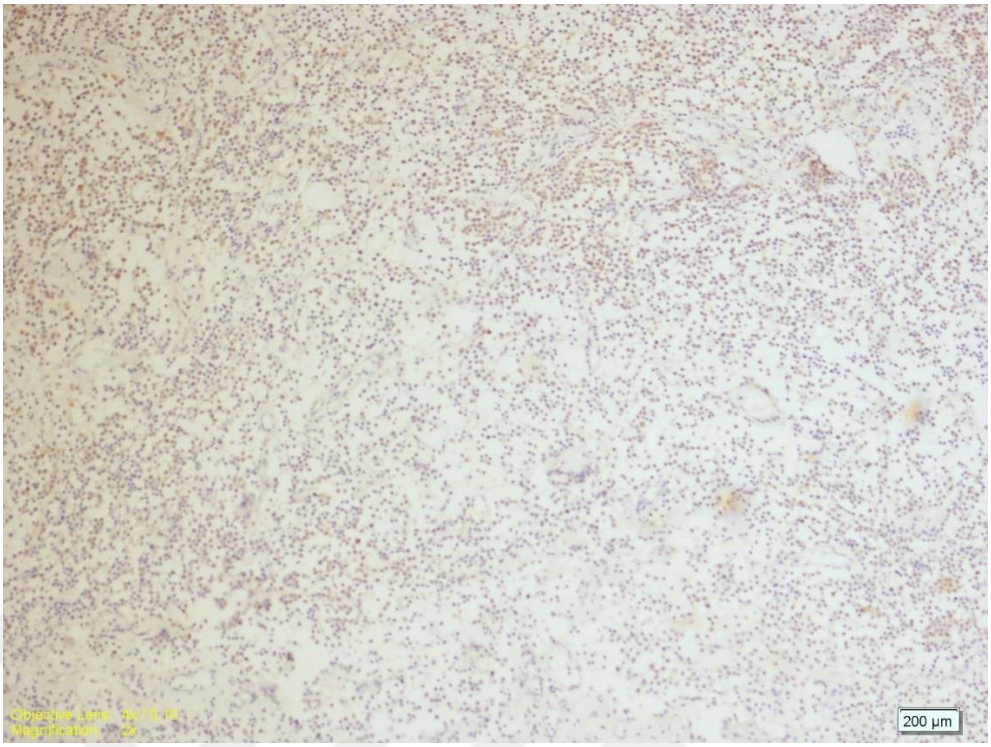
Şekil 4-48: Olgu no:29, Yüksek Bcl-2 ekspresyonu, DAB. 40×, Bar: 20µm



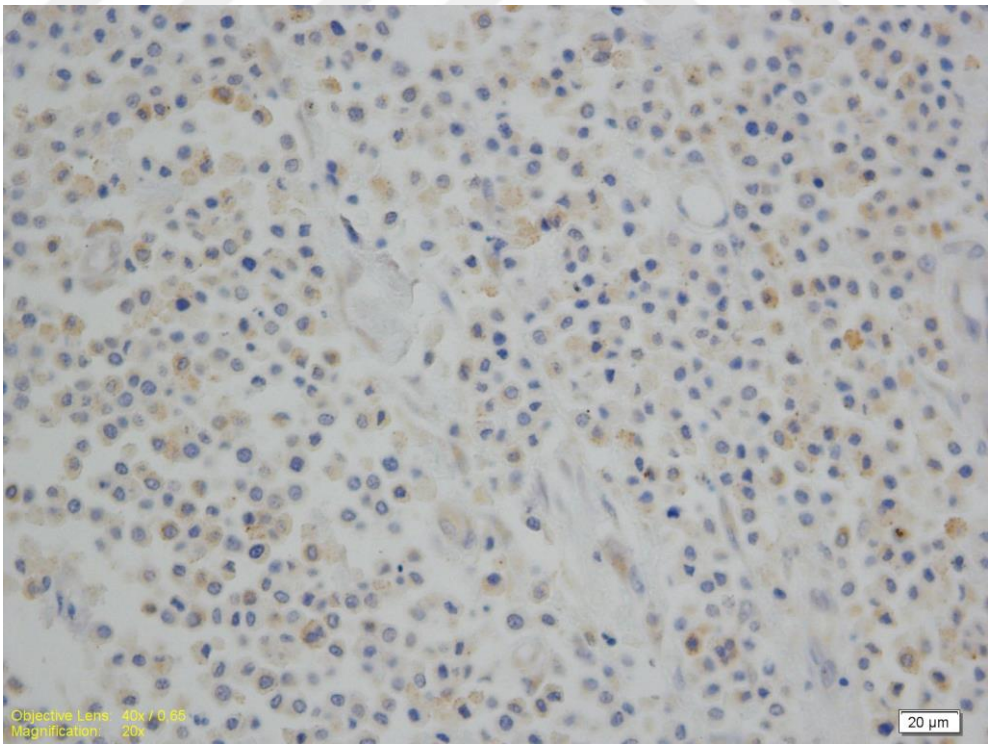
Şekil 4-49: Olgu no:27, Yoğun Bax ekspresyonu, intrasitoplazmik yerleşimli, DAB. 10×, Bar: 100µm



Şekil 4-50: Olgu no:27 Yoğun Bax ekspresyonu, intrasitoplazmik yerleşimli, DAB. 40×, Bar: 20µm



Şekil 4-51: Olgu no:6, Hafif Bax ekspresyonu, intrasitoplazmik yerleşimli, DAB. 4×, Bar: 200µm



Şekil 4-52: Olgu no:6, Hafif Bax ekspresyonu, intrasitoplazmik yerleşimli, DAB. 40×, Bar: 20µm

4.4. Bulgulara İlişkin Özetleyici Tablolar

Çalışmada elde edilen genel bulgulara ilişkin istatistik çalışmalarını özetleyen bilgiler Tablo 4-41'de verilmiştir.

Tablo 4-41: Genel bulgulara ilişkin istatistik sonuçları

	Cinsiyet	**Kısırlaştırma**	**Tümör lokalizasyonu**	**Tümör boyutu**	**Nüks**	**Tümör sayısı**
Yaşam süresi	p=0,29 X^2=1,09	p=0,56 X^2=0,32	p=0,18 X^2=1,78	-	p=0,001 X^2=11,10	p=0,54 X^2=0,36
Lokalizasyon	-	-	-	p=0,48 KW: 2,45	-	-

Çalışma kapsamında elde edilen histopatolojik bulgularla gerçekleştirilen istatistik çalışmalarını özetleyen bilgiler Tablo 4-42'de verilmiştir.

Tablo 4-42: Histopatolojik bulgulara ilişkin istatistik sonuçları

	Patnaik Dereceleri	**Kiupel Dereceleri**	**Patnaik II. derece tümörler**	**Mİ**	**Mİ** ***(5 Eşik değerine göre)***
Nüks	p=0,10 X^2=4,3	p=0,14 X^2=2,10	-	p=0,18 t=1,36	-
Yaşam süresi	p=0,043 X^2=4,8	p=0,01 X^2=6,68	-	-	p<0,001 X^2=13,68
Yaş	p=0,41 F=0,90	p=0,93 t=-0,79	-	-	-
Tümör Boyutu	p=0,89 F=0,11,	p=0,08 t=-1,78	-	-	-
Mİ	p<0,001	p<0,001	-	-	-
Mİ ***(5 Eşik değerine göre)***	-	-	p=0,052 X^2=3,76	-	-
Yaşam/Ölüm	-	-	-	-	p=0,001 X^2=9,99

Çalışma sırasında gerçekleştirilen immunohistokimyasal boyamalara ilişkin istatistik çalışmalarını özetleyen bilgiler Tablo 4-43'te sunulmaktadır.

Tablo 4-43: İmmunohistokimyasal boyamalara ilişkin istatistik sonuçları

	KIT Paterni	**Ki67 İndeksi**	**Ki67 indeksi** *(0,018 eşik değerine göre gruplandırma)*	**CD25**	**Bcl-2**	**Bax**
Patnaik Sistemi	p=0,002 X^2=15,33	p<0,001 KW=19,56	-	p=0,03 X^2=11,75	p=0,23 X^2=5,34	p=0,005 X^2=9,73
Kiupel Sistemi	p=0,005 X^2=10,18	p<0,001 U=480	-	p=0,24 X^2=3,87	p=0,56 X^2=1,33	p=0,003 X^2=8,90
Yaşam Süresi	p=0,22 X^2=2,95	-	p=0,012 X^2=6,31	p<0,001 X^2=20,42	p=0,55 X^2=3,41	p=0,11 X^2=2,50
MI	p=0,017 KW=8,12	p<0,001 r=0,52	-	p=0,033 X^2=8,76	p=0,41 F=0,90	p=0,0001 U=512,5
MI *(5 eşik değerine göre)*	-	-	-	p=0,20 X^2=4,35	-	-
Ölüm/yaşam bilgisine göre	-	p=0,95 F=0,04	-	-	-	-
Tümör lokalizasyonu	-	p=0,93 KW=0,41	-	-	-	-
Nüks	p=0,28, X^2=2,66	p=0,85 t=,18	-	p=0,31 X^2=3,7	p=0,74 X^2=0,90	p=0,98 X^2=0,001

5. TARTIŞMA

CCMCT'nin köpeklerde deride görülen neoplazmaların önemli bir bölümünü teşkil etmekte ve klinikte oldukça sık görülmektedir (Preziosi ve ark. 2004). Bu tümörlerin derecelendirilmesinde şimdiye kadar kullanılan Bostock (Bostock 1973) ve daha sıklıkla kullanılan Patnaik (Patnaik ve ark. 1984) derecelendirme sistemlerinin yanı sıra, bu üçlü derecelendirme sitemindeki II. derece tümörlerde hem malign hem benign tümörlerin görülmesi nedeni ile prognoz belirleme açısından daha iyi olacağı düşünülerek iki kademeli bir sistem de kullanılmaya başlanmıştır (Kiupel ve ark. 2011). Ancak bu derecelendirme sitemlerinin diğer prognostik indikatörlerle desteklenmesi gerektiği bilinmektedir (Kiupel ve ark. 2011).

Şimdiye kadar proliferasyon konusunda Mİ ve Ki67'nin histolojik derecelendirme yöntemleri dışında prognostik bir belirleyici olarak öne çıktığı, (Vascellari ve ark. 2012; Elston ve ark. 2009), apoptoz konusunda en çok çalışılan belirteçlerden olan Bax ve Bcl-2 üzerine çalışmalar yürütüldüğü (Strefezzi ve ark. 2012, Hartmann ve ark. 2003, Vascellari ve ark. 2012), yine CCMCT'lerin gelişimi ile ilişkili bulunan belirteçler olan KIT proteini ve CD25 üzerine yapılan çalışmalarda bu belirteçlerle ilgili bulguların ileriki çalışmalarla desteklenmesi ve diğer prognostik bulgularla da korele edilmesi gerektiğine işaret edilmektedir (Preziosi, Morini ve ark. 2004; Webster ve ark. 2007; Gil da Costa ve ark. 2007; Zemke ve ark. 2002; Kiupel ve ark. 2004; Kiupel 2017; Meyer ve ark. 2012).

Çalışmamızda elde edilen ortalama yaşa ilişkin bulgular diğer çalışmalar ile uyumludur. London (2010), Patnaik ve ark. (1984), Romansik ve ark. (2007) gibi birçok yayına benzer şekilde yaş ortalaması 9 civarındadır (8,94). Yine söz konusu yayınlara benzer şekilde cinsiyetin hastalığa yakalanmada ve yaşam süresinde bir farklılık göstermediği görülmüştür. Ancak, dişilerin hastalığa yakalanma yaşı 1,5 yaş ile başlarken erkeklerde bu 5,5 yaş olarak kaydedilmiş, bu duruma ilişkin diğer yayınlarda benzer bir bilgi bulunamamıştır.

Çalışmamızda saptanan CCMCT'lerin en yoğun görüldüğü ırklar Golden Retriever (% 35,2), Cocker (% 4) ve Terrier (% 4) olup melez köpeklerin (% 11,2) de önemli bir oranda görülmüş olması literatür bilgisi ile uyumludur (London 2010; Leblanc 2016; Romansik ve ark. 2007).

Bostock'un (1973) çalışmasında belirttiği gibi, çalışmamızda da Golden Retriever sayısının fazla olması (n=19, % 35,2) bu ırklarda daha çok MCT görüldüğü yönünde subjektif bir tabloyu ortaya koymaktadır. Ancak bu durum değerlendirilirken Golden Retriever ırkının ülkemizde pet hayvanı olarak yoğun şekilde tercih edilmesinin de göz önünde tutulması gerektiğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada, kısırlaştırma ile ilgili bilgileri tamamlanmış olan 24 hastanın yaşam süreleri ve kısırlaştırılma durumları incelendiğinde kısırlaştırmanın yaşam süresi ile ilişkili olmadığı görüldü. Literatüre bakıldığında ise White ve ark.'nın (2011) 252 olgu ile gerçekleştirdiği çalışmada, kısırlaştırmanın bir risk faktörü olduğu değerlendirilirken; Reynolds ve ark.'ın (2019) yüksek dereceli tümörlerde hastaya bağlı faktörlerin etkisini araştırdıkları çalışmada ise cinsiyet veya kısırlaştırma durumunun etkisi olmadığı belirtilmektedir. Bu konu hakkında daha iyi sonuçlar elde edilebilmesi için bu tür prognostik çalışmalarda kısırlaştırma verisinin de toplanarak daha fazla olgu üzerinden yorum yapabilmenin önemli olacağı düşünmekteyiz.

Uzun zaman boyunca tümörün bulunduğu yerin hem yer aldığı bölge hem de derinlik açısından incelendiği çalışmalarda prognostik açıdan önemli olmadığı raporlanmıştır (Cahalane ve ark. 2004; Kiupel ve ark. 2005; Sfiligoi ve ark. 2005). Reynolds ve ark. (2019) ise yüksek dereceli tümörleri inceledikleri çalışmalarında, inguinal bölgede yüksek dereceli tümör gelişiminin daha fazla olduğunu, baş bölgesinde de yüksek dereceli tümör riskinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ancak daha önce de belirtildiği gibi bu çalışmaların çoğunun kutanöz/subkutanöz MCT ayrımı yapılmadan gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Çalışmamızda yalnızca Kutanöz MCT'ler değerlendirilmiş olup, daha önceki çalışmalarda olduğu gibi tümörlerin lokalizasyonlarına ilişkin yapılan istatistiksel çalışmalarda prognostik açıdan bir önemi olmadığı ortaya konulmuştur. Ancak ortalama değerlere bakıldığında, baş-boyun bölgesinde tümör saptanan hastaların diğer bölgelerde tümör saptanan hastalara göre daha kısa sağ kalım süresinin olması dikkat çekmektedir. Bu durumun, Kiupel ve ark.'nın (2005) baş ve boyun bölgelerinde CCMCT saptanan köpeklerin uzak bölgelerde yeni MCT gelişimi konusunda daha yüksek risk taşıdıklarına ilişkin verisi ile Reynolds ve ark.'ın (2019) çalışmasına katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz.

Kiupel ve ark.'nın (2005) 100 köpekten alınan MCT dokuları ile gerçekleştirdikleri çalışma, senkronize çoklu tümör gelişiminin (aynı zamanda birden

fazla tümör oluşması) sadece cerrahi yöntemlerle tedavi edilen köpeklerde azalmış sağ kalım süresi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. İki veya daha fazla spontan tümörü olan 54 olgu ile yürütülmüş bir başka çalışmada ise doğru bir şekilde eksizyonları gerçekleştirildiğinde, çoklu kutanöz MCTlerin düşük metastaz oranı, uzun sağ kalım süresi ve iyi prognozları olduğunu ve orta dereceli tekil tümörlerle kıyaslanabileceğini bildirmektedir (Mullins ve ark. 2006) Çalışmamızda, tümörlerin tek veya çoklu oluşunun tek başına yaşam süresi ile önemli bir ilişkisi bulunmadığı görülmüştür (p=0,54).

Reynolds ve ark'ın (2019), retrospektif çalışmasında tümör boyutu ile histopatolojik derece arasıda bir bağlantı olmadığını belirtmektedir. Çalışmamızda, tümör boyutu ile Patnaik derecelendirme sistemi arasında bir ilişki olmadığı (F=0,11, p=0,89) saptandı. Ancak, Kiupel dereceleri ve boyut verileri incelendiğinde istatistiksel açıdan net bir ilişki ortaya koyulamamış olsa da (t=-1,78, P=0,08) elde edilen sonuçlar ışığında, tümör boyutuna ilişkin verilerin sadece retrospektif çalışmalarla değil daha büyük örnek gruplarını içeren gerçek zamanlı ve tüm kayıtları sistematik olarak takip edilen setler içinde de incelenmesini önermekteyiz.

Veteriner Kanser Derneği ve Amerikan Veterier Patologlar Koleji'nin Onkoloji-Patoloji Çalışma Grubu'nun CCMCT'lerin derecelendirilmesine ilişkin 2017 tarihli konsensüs dokümanında, halen Patnaik ve Kiupel sistemlerini aynı gruplara uygulayan az sayıda yayının olduğu, bu yayınlarda tüm I. derece tümörlerin aynı zamanda düşük dereceli tümörler olduğu ve tüm III. derece tümörlerin ise yüksek dereceli olduğu, her iki sistemin de CCMCT'nin sonuçlarını belirleyebildiğini ancak agresif hastalığı belirlemede Patnaik sisteminin sensitivitesinin, Kiupel sisteminin ise spesifitesinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Berlato ve ark. 2017). Çalışmamızda, aynı olgular hem Patnaik hem Kiupel derecelendirme sistemlerine göre değerlendirilmiş olup, nüks ile aralarında bir ilişki görülmezken sağ kalım konusunda gruplar arasında önemli fark olduğu (sırasıyla p= 0,043 ve p=0,01), Kiupel sisteminin biraz daha yüksek bir farkı belirlediği saptandı.

Bu çalışmada elde edilen Patnaik II. derece tümörlerde prognozu belirlerken, Romansik ve ark.'a göre (2007) Mİ değeri belirlenmesinin, yaşam süresi ile ilişkili olduğu (p=0,05) bulgusu, önemli bir veri olarak değerlendirilmektedir. Berlato ve ark. (2013) Mİ ve Ki67 indeksinin II. derece tümörleri iki alt gruba ayırarak iyi veya kötü prognoz konusunda klinik yaklaşımı belirlemede faydalı olduğunu belirtmektedir. Çalışmamızdan elde edilen veriler, bu görüşü desteklemektedir.

Bu çalışmada Patnaik ve Kiupel derecelendirme sistemi ile Mİ arasındaki ilişki incelendiğinde, Patnaik derecesi arttıkça Mİ'nin arttığı ve gruplar arasında $p<0,001$ düzeyinde fark olduğu ve yine ortalama Mİ değerlerinin yüksek Kiupel derecesiyle $p<0,001$ düzeyinde ilişkili olduğu görüldü. Elde edilen bu veri daha önce bu konuda yapılan yayınlarda bildirilen sonuçlarla uyumludur (Romansik ve ark. 2007; Vascellari ve ark. 2012; Kandefer-Gola ve ark. 2015; Berlato ve ark. 2013; Elston ve ark. 2009).

Romansik ve ark.'nın (2007) çalışmasında ortalama Mİ değerleri sırasıyla, I. derece için 1.2 (0-6 aralığında), II. derece için 2.0 (0-45 aralığında), III. derece için 19.3 (0-87 aralığında) bulunmuştur. Söz konusu çalışmada yapılan istatistik analizleri sonucu Mİ için eşik değer 5 olarak belirlenmiştir. Kandefer-Gola ve ark.'nın (2015) çalışmasında Patnaik I. derece MCT'ler için 0,2, II. derece MCT'ler için 2,9 ve III. derece MCT'ler için 6,8 olarak; Kiupel düşük derece için 1 ve yüksek derece için 5,6 olarak belirlenirken aynı değerler Elston ve ark. (2009) tarafından sırasıyla 0.6 (0–3 aralığında), 2.2 (0–16 aralığında) ve 7.4 (0–21 aralığında) bildirilmiştir. Çalışmamızda ise bu değerler Patnaik sistemine göre sırasıyla 0,86 (0-3 aralığında), 8,7 (2-16 aralığında) ve 28,3 (22-40 aralığında), Kiupel sistemine göre düşük derece için 2,1 (0-6 aralığında), yüksek derece için 19,7 (8-40 aralığında) bulunmuştur. Olguların bireysel karakteristiğinin, çalışmaya dahil edilen örnek sayılarının, olguların derecelere göre dağılımlarının ve Mİ hesaplama yöntemlerinin bu ortalamalarda farklılıklar yarattığı görülmektedir.

Mİ'ye ilişkin bu veriler incelenirken, Romansik ve ark. (2007), Vascellari ve ark. (2012) ve çalışmamızda en yoğun mitotik aktivitenin bulunduğu 10 adet 40X büyütmeli alanda Mİ sayılırken, Kandefer-Gola ve ark.'nın (2015) Mİ sayımını 5 adet rastgele seçilmiş yüksek büyütmeli alanda ortalama mitoz sayısını hesaplayarak yaptıkları görülmüştür. Bu şekilde Mİ sayımları arasında bir kıyaslama yapılmasının mümkün olmadığı, statndart bir yöntemin yaygın olarak benimsenmesi gerektiği düşünülmektedir. Farklı sayım yöntemlerinin değerlendirme açısından sıkıntı yaratmaması için literatürde yaygın olarak kullanılan en yüksek mitotik aktivite görülen 10 yüksek büyütmeli alanda toplam mitozun sayılması yönteminin pratikte kullanımının kolay olduğu düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda Romansik ve ark. (2007)'nın mitotik indeks için uyguladıkları 5 eşik değeri kullanıldığında Mİ'nin sağ kalım açısından gruplar arasında önemli bir farkı belirlediği görülmüştür ($p<0,001$). Bu durum daha önce literatüre giren

çalışmaları destekler niteliktedir (Berlato ve ark. 2013; Romansik ve ark. 2007; Vascellari ve ark. 2012; Berlato ve ark. 2018)

Vascellari ve ark.'nın (2012) çalışmasında çalışmamıza benzer sayıda (n:53) olgu Mİ 5 eşik değerine göre değerlendirilmiş, mortalite oranının bu iki grup arasında anlamlı şekilde farklı olduğu gözlemlenmiştir. Berlato ve ark. (2013) MCT'den ölüm riskinin Mİ için 5 eşik değeriyle yakın ilişkisini ortaya koymuştur. Çalışmamızdan elde edilen veriler her iki çalışmanın sonuçlarıyla da uyumludur.

Çalışmamızda Mİ ile nüks arasında anlamlı bir ilişki gözlemlendi. Ancak nüks verisinin lokal ya da uzak olarak ayrılmadı. Nüksle ilgili elde edilen veri sadece lokal nüksü değerlendiren Romansik ve ark.'ın (2007) bildirdikleri ile uyumludur.

Literatürde Patnaik II. derece tümörlerin biyolojik davranışlarının belirlenmesinde yaşanan zorluklar nedeniyle bu olgulara özel önem atfedildiği görülmekte (Romansik ve ark. 2007; Berlato ve ark. 2013), bu olgularda Mİ prognostik değeri özellikle incelenmektedir. Romansik ve ark. (2007) 81 adet II. derece tümörde, Mİ 5 eşik değerinin üstündeki olgularda sağ kalım süresinin çok ciddi oranda azaldığını, Mİ<5 olan olgularda ortalama yaşam süresi 80 ayken Mİ>5 olan olgularda bu sürenin 3 aya düştüğünü belirtmiştir. Çalışmamızda ise yaşam süresi ile Mİ arasında önemli bir ilişki bulunduğu, sürelerin sırasıyla 69 ay ve 16 ay olduğu görülmüştür. Bu farkın II. derece tümör grubunda takibi yapılmış olan sadece 18 hasta olmasından kaynaklandığı düşünüyoruz.

Berlato ve ark. (2013) Patnaik II. derece tümörlerin MCT dolayısıyla ölümüne ilişkin değerlendirmenin Mİ ile gerçekleşebileceğini belirtmektedir. Çalışmamızda ise böyle bir ayrım yapılamamıştır ($p>0,05$). Bu veriler ışığında II. derece tümörlerin prognozunun yalnızca Mİ ile belirlenebilmesi noktasında daha fazla çalışma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Romansik ve ark. (2007), Mİ ile ilgili muhtemel bir endişenin granülasyon nedeniyle nükleer detayların yeterince iyi izlenememesi ve bunun da mitotik figürlerin belirlenmesini etkileyebileceği olup bu bariyerin aşılması için toludin mavisi gibi nükleer detayları gizlemeyen boyalarla çalışılabileceği fikri desteklenmiştir. Çalışmamızda Mİ sayımı sırasında bu konuda önemli bir bariyerle karşılmadığı için, özellikle Ki67 ve KIT gibi İHK preparatlarının da CCMCT lerde Mİ belirlenmesinde kullanılabileceği yönünde

bir düşünce ortaya çıkmıştır. Bu fikrin bu konudaki daha fazla çalışma ile desteklenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Literatürdeki çalışmaların çoğunda (Vascellari ve ark. 2012) Mİ eşik değeri olarak Romansik ve ark. (2007) tarafından önerilen 5 mitoz sayısının kullanıldığı görülmekle birlikte, çalışmamızda, Elston ve ark.'nın (2009) belirlediği 0, 1-7 arası ve 7 eşik değerlerinin de kullanılarak prognostik açıdan Romansik ve ark.'nın (2007) bulgularıyla bir karşılaştırma yapmak istenmiştir. Ancak, olgu sayısı ve bu olguların Mİ'lerine göre üç gruba ayrıldığında dağılımdaki yetersizlik nedeniyle bu istatistik gerçekleştirilememiştir. Bu durum, Romansik ve ark. (2007) tarafından belirlenen eşik değerin klinik açıdan daha kullanışlı olduğunu belirten yayınları (Berlato ve ark. 2013) desteklemektedir.

Bu çalışmada CD25 ve Bcl-2 ekspresyonları ile mitotik indeks incelendiğinde istatistiki olarak anlamlı bir sonuç bulunamakla birlikte, KIT, Bax ve Ki67 ekspresyonları ile ilişki bulundu. Ki67 ile Mİ ilişkisini değerlendiren Kandefer-Gola ve ark. (2015) da daha önce benzer bir ilişkiyi bildirmiştir.

Çalışmamızda elde edilen verilerle de desteklendiği gibi, Mİ 5 eşik değerinin genel olarak fikir vermesi ve H.E. preparatlar üzerinde kullanımının genel olarak kolay olması, hasta sahibine ek bir masraf yaratmaması nedeniyle CCMCT değerlendirmesi yapılırken klinik tedaviye ışık tutmak adına rutinde her iki derecelendirme sistemi ile birlikte ek bir prognostik belirteç olarak raporda mutlaka yer alması gerektiği düşünülmektedir.

Reguera ve ark. (2000), Patnaik sistemini kullandıkları çalışmalarında KIT ekspresyonunun III. derece tümörlerde yoğun şekilde olduğunu I. derecelerde ise en az ekspresyonun gözlendiğini ve hücresel diferensiasyonla KIT ekspresyonu arasında negatif bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Preziosi, Morini ve ark. (2004) ise bunun tam tersi şekilde KIT paterni ile histolojik derece arasında anlamlı bir istatistiksel korelasyon olduğunu ($P < 0.00000$), patern belirlenmesinin boyanma yoğunluğundan daha kullanışlı bir metot olduğunu, diffuz sitoplazmik paternin I. derece tümörlerle yakın ilişkili olduğunu, sitoplazmik perinükleer paternin ise sadece III. derece tümörlerde görüldüğünü, bu nedenle III. derece tümörlerin teşhisinde kullanılabileceğini belirtmiştir. Söz konusu çalışmada II. derece tümörlerin ise membranöz ve membranöz/perinükleer paternleri gösterdiği belirtilmektedir. Kiupel ve ark.'ın (2004) Patnaik sistemine göre, 17

I. derece, 72 II. derece, 11 III.derece MCT değerlendirdikleri çalışmalarında ise, çoğu tümörün KIT ekspresyon paternini patern I (% 42,9) veya patern II (% 43,9) olarak sınıflandırmıştır. Patern II ve III, CCMCT nedenli ölüme dayalı azalmış sağ kalım ile ilişkili bulunurken bu sonuç Patern I için geçerli olmamıştır. Webster ve ark. (2006), 60 MCT'de KIT boyanma paternleri ve c-kit mutasyonları ile aralarındaki ilişkiyi incelemiş, tümörlerin 25'inde neoplastik olmayan (inflamatuar) mast hücrelerde görülen perimembran lokalizasyonlu I. paterni, 24'ünde II. paterni, 11'inde ise III. paterni gözlemlemiş ve elde ettikleri verileri İTD (Internal Tandem Duplikasyon) c-kit mutasyonları ile kıyasladıklarında, mutasyon varlığı ile artmış sitoplazmik lokalizasyon arasında anlamlı bir fark olduğunu bildirmişlerdir. Onkoloji-Patoloji Çalışma Grubu'nun son konsensüs dokümanına göre KIT lokalizasyonunun histolojik olarak en "belirsiz" tümörlerde en faydalı belirteç olabileceği, c-kit mutasyonunun histolojik olarak düşük dereceli ancak biyolojik olarak agresif tümörlerin belirlenmesinde, membran KIT lokalizasyonunun ise progresif hastalık olasılığı düşük tümörlerin belirlenmesinde kullanılabileceği belirtilmektedir (Thamm ve ark. 2019). Vucicevic ve ark (2018) ise düşük dereceli olan tümörlerin hepsinin membran yerleşimli KIT ekspresyonu gösterdiğini, yüksek dereceli tümörlerin çoğunun ise sitoplazmik ekspresyon gösterdiğini belirtmiştir.

Çalışmamızda KIT boyanma paternleri hem Patnaik hem Kiupel dereceleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında, sırasıyla p=0,002 ve p=0,005 düzeyinde, önemli fark bulunmuştur. Örnek sayısındaki farklılıklar dolayısıyla net olarak ifade edilememekle birlikte, Patnaik III. derece tümörlerde Patern I'e rastlanmamasının, Kiupel yüksek dereceli tümörlerde ise sadece bir adet Patern I olgu bulunmuş olmasının bu konudaki yukarıda verilen literatür bilgisini desteklediği düşünülmektedir.

Morini ve ark. (2004), daha fazla araştırmaya ihtiyaç olmakla birlikte kendi kişisel tecrübelerine dayanarak sitoplazmik-perinükleer KIT paterni görülen Mast hücrelerden oluşan tümöre sahip hastalarda yaşam süresinin kısaldığını belirtmişlerdir. Preziosi, Morini ve ark. (2004) KIT ekspresyonunun sağ kalım süresi ile P=0.037 düzeyinde anlamlı şekilde ilişkili olduğunu ve olgular arasında sitoplazmik perinükleer paterni gösteren hücrelerden oluşan tümöre sahip hastaların sitoplazmik diffuz paterne göre daha zayıf prognozlu olduğunu bildirmiştir. Webster ve ark. (2004), tümör hücrelerindeki artmış sitoplazmik KIT boyanmasının, lokal nüks ve azalmış sağ kalım süresi ile ilişkili

olduğunu bildirmiş ve CCMCT'lerin rutin prognostik değerlendirmesinde KIT immunohistokimyasının kullanımını önermişlerdir. Kiupel ve ark (2004), artmış sitoplazmik KIT boyanmasının artan lokal nüks ve azalan sağ kalım süresi ile ilişkili olduğunu belirtmektedir.

Çalışmamızda ise tümöral hücrelerdeki KIT ekspresyon paterni ile hastanın teşhisten sonra sağ kalım süresi ile anlamlı bir ilişki bulunmamakla birlikte, sitoplazmik perinükleer paterni (Patern II) gösteren tümöral hücrelere sahip hastaların diğerlerine göre oldukça kısa yaşam süresine sahip oluşu bu konuda yukarıda verilen literatürde bildirilenlerle uyumludur. Ancak nüks ile KIT ekspresyon paterni arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Hücrelerdeki KIT lokalizasyon paternleri ile mitotik indeks verileri arasında ise önemli bir fark olduğu saptandı. Özellikle Patern II'nin mitotik indeksinin diğer gruplara göre oldukça yüksek olduğu görülmüş olup, bu durum Webster ve ark. (2007) tarafından da bildirilen anormal KIT lokalizasyonunun artmış hücresel proliferasyonla ilişkisi olabileceği hipotezini destekler nitelikte ve önemdedir.

Sakai ve ark. (2002) Patnaik I. ve II. derece ile II. ve III. derece grupları arasında Ki67 indeksi açısından anlamlı farklılık gösterdiğini bildirmiş, Vascellari ve ark. (2012) ise çalışmalarında, Patnaik derecelendirme sistemine göre Ki67 indeksi ortanca değerlerinin I., II. ve III.derece için sırasıyla 2.5, 6.0 ve 20.6 olarak belirlendiğini, I. derece ile II. ve III. derece karşılaştırıldığında Ki67 ekspresyonu ile derece arasında anlamlı bir ilişki saptadıklarını (P=0.024) ancak bu ilişkinin I. ve II. derece tümörler kıyaslandığında biraz daha düşük olduğunu (P=0.092) bildirmişlerdir. Sonuçları Kiupel sistemine göre değerlendirdiklerinde ise Ki67 indeksinin düşük derece tümörlerde yüksek dereceli tümörlere göre önemli ölçüde farklı olduğunu belirtmişlerdir (P=0,002). Berlato ve ark. (2013) ise Patnaik histolojik derecesi ile Ki67 indeksi arasında anlamlı bir ilişki görmediklerini belirtilmişlerdir. Kandefer-Gola ve ark.'ın (2015) 60 MCT'den oluşan çalışmalarında, bu tümörlerin 14'ünde (% 23,3) Ki67'ye karşı reaksiyon gelişmediğini bildirmişler ve Ki67 ekspresyonu ile Patnaik ve Kiupel derecelendirme sistemleri arasında güçlü pozitif bir korelasyon bulduklarını (sırasıyla R=0,63 ve R=0,85) bildirmişlerdir.

Çalışmamızda İHK ile boyanabilen 53 olgudan yalnıca birinde Ki67'ye karşı reaksiyon görülmedi. Hem Patnaik derecesi ile ($p<0,001$) hem de Kiupel derecesi ile ($p<0,001$) Ki67 indeksi arasında önemli bir ilişki saptandı.

Ozaki ve ark. (2007), çalışmalarında yüksek büyütmeli 3 ila 10 alanda 500 hücreden fazla hücrede Ki67 ekspresyonu saptanan pozitif hücreleri bilgisayar yazılımı aracılığıyla sayarken, Sakai ve ark. (2002), Ki67 indeksini 10 yüksek büyütmeli alanda 1000 hücre üzerinden saymıştır. Scase ve ark. (2006), Maglennon ve ark. (2008), Berlato ve ark. (2013) ve Berlato ve ark. (2018) ise Ki67 indeksini 20X objektifle çekilen fotoğraflar üzerinden bilgisayar yazılımı kullanarak her bir fotoğrafta Ki67 pozitif hücrelerin toplam mast hücre sayısındaki yüzdeleri ile hesaplamışlardır. Bununla birlikte, Webster ve ark. (2007) 10X objektifte en yüksek immunopozitif alanları seçmiş ardından en az 5 adet yüksek büyütmeli alanda (40X objektif) ızgara retikül kullanarak 10X10 mm alandaki pozitif hücreleri saymış, saydıkları alan sayısına göre ortalamalarını almışlar, Vascellari ve ark. (2012) ise rastgele seçilmiş 5 yüksek büyütmeli alanda toplam 500 hücre sayarak 100 hücredeki ortalama Ki67 pozitif hücre sayısını hesaplayarak Ki67 indeksini belirlemişlerdir. Kandefer-Gola ve ark (2015) ise bu yayınlardan farklı olarak semikantitatif bir skala ile değerlendirme yapmış, yüksek büyütmeli rastgele seçilmiş beş alanda boyanan çekirdeklerin oranı % 0-5 ise reaksiyon yok (-), % 6- 25 ise zayıf reaksiyon (+), % 26-50 ise orta reaksiyon (++), % 50 üzerinde ise yoğun reaksiyon (+++) olarak değerlendirmişlerdir.

Çalışmamızda ise uygulanabilirliği açısından Ozaki ve ark.'ın (2007) metodu tercih edilmiş ve preparatlar elverdiği ölçüde 40X'lik büyütmede 10 farklı alandaki Ki67 pozitif hücrelerin sayılması ve yüzde olarak hesaplanması tercih edilmiştir. Ancak Vascellari ve ark. (2012) ile Berlato ve ark.'ın (2013) da dikkat çektiği gibi, metot farklılıkları çalışmalardaki eşik değerlerin de farklı şekillerde belirlenmesine neden olmuştur. Metot standardizasyonunun zayıflığından kaynaklanan bu durum sonuçları karşılaştırarak yorumlamayı oldukça zorlaştırmaktadır.

Webster (2007), kullandığı metoda göre 23 eşik değerini belirlerken; Vascellari ve ark. (2012) eşik değer olarak 10,6 değerini belirlemiş, bu değerden yüksek Ki67 indeksi olan hstaların daha düşük olanlara göre ölüm olasılığının 8 kat fazla olduğunu bildirmiştir. Scase ve ark. (2006) 1,8 eşik değerinin Patnaik II. derece tümörlerde sağ kalım için anlamlı bir belirteç olduğunu raporlamışlar, ancak yapılan ilk çalışma olduğundan başka gruplarda da denenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Ayrıca 1,8 eşik değerinin üzerinde II. derece tümörlere göre daha fazla I. derece tümör olduğu, bunların çoğunun çoklu tümöre sahip olduğu, bu nedenle tek ve çoklu tümörleri oluşturan

neoplastik mast hücrelerde farklılık olabileceğini düşünmüşlerdir. Maglennon ve ark. (2008) bu eşik değeri kullanarak benzer sonuçlar elde etmiş, Ki67'nin klinisyene Patnaik II. derece tümörleri değerlendirmede kolaylık sağlayacağını belirtmiştir. Ozaki ve ark. (2007) ise Ki67'nin II. derece tümörlerde tam olarak eksize edilememiş grupta bir prognostik faktör olarak değerlendrilebileceğini ancak bunun nüks ve metastaz için geçerli olmadığını, yine de Ki67'nin kanin MCT'lerde histopatolojik derece ve klinik sonuçla önemli bir ilişkisi olduğundan, prognostik bir potansiyele sahip olduğunu belirtmektedir. Berlato ve ark. (2018), daha önce Scase ve ark.'nın (2006) belirlediği 0,018 Ki67 indeksi eşik değeri üzerinden Patnaik II. derece tümörler üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, Ki67 indeksinin arttığı durumlarda ölüm riskinin de arttığını ve Ki67'nin iyi bir prognostik belirleyici olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, Scase ve ark. (2006) ile Berlato ve ark. (2013), Ki67 indeksi ile sağ kalım arasında anlamlı bir ilişki olduğunu da raporlamışlardır. Webster ve ark. (2007) ile Vascellari ve ark. (2012) artan Ki67 indeksinin MCT nedenli ölüm ve azalan sağ kalım ile anlamlı bir ilişkisi olduğunu bildirmektedir.

Çalışmamızda ise yaşayan, MCT nedeniyle ölen ya da diğer sebeplerden ölen hastaların Ki67 indeksleri arasında önemli fark gözlenmedi (P=0,95). Ancak, Ki67 indeksi verileri, daha önce Scase ve ark.'nın (2006) belirlediği 0,018 Ki67 indeksi eşik değeri üzerinden değerlendirildiğinde, yaşam süresi bakımından istatistiksel olarak p=0,012 düzeyinde bir ilişki saptandı (X^2=6,31, Tablo 4-26, Şekil 4-24). Bu değerin Scase ve ark. (2006) ile Berlato ve ark. (2013) tarafından yalnıca Patnaik II. derece tümörlerde denenmiş olması göz önünde bulundurulmakla birlikte, bizim çalışmamızda olgu sayısının azlığı nedeni ile analize tüm örnekler dahil edilmiş, elde edilen sonuç, 0,018 eşik değerinin Patnaik veya Kiupel derecesi gözetmeksizin kullanılabileceği fikrini ortaya koymuştur. Ancak bu görüşümüzün doğrulanabilmesi için daha fazla olgu ve farklı setlerle çalışmanın desteklenmesi gerekmektedir.

Literatürde nüks ve Ki67 ilişkisine dair bir karşılaştırma görülmemekle birlikte, çalışmamızda Kİ67 ile nüks verileri incelendi ancak aralarında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Berlato ve ark. (2013) Mİ ve Ki67 indeksleri ile CCMCT'lerde histolojik dereceden bağımsız olarak, sağ kalım oranını tahmin edebildiğini ortaya koymuş, her ikisinin de sensitivite ve spesifite açısından benzerlik göstermesi nedeniyle birini

seçmenin kolaylaştırıcı olacağını belirtmişlerdir. Mİ'nin H.E. preparatlarda gerçekleştirilebilmesi nedeniyle tercih edilebileceğini, Ki67 indeksi incelemesinin ise hastanın geçmişi, tümörün karakteri ve Mİ arasında bir uyumsuzluk gözlendiğinde talep edilmesi gerektiğini eklemişlerdir. Hatta eğer hastada lenf yumrusuna metastaz veya uzak metastaz saptanmışsa, hasta zaten en kötü prognoza sahip olacağından ilave Ki67 indeksine bakılmasının terapötik yaklaşım açısından ek bir faydası olmayacağını, buna karşın proliferatif aktvitenin incelenmesinin çoklu tümör görülen köpeklerde lenf yumrusuna metastaz yoksa tümörün karakterinin saptanmasında faydalı olacağından, prognozu belirlemede endike olacağını belirtmişlerdir.

Başka bir görüş ise Ki67 ile Mİ arasında da anlamlı bir korelasyon olduğu ve Ki67'nin kötü diferensiye mast hücre tümörlerinde prolifresyon oranının gösterilmesi için iyi bir immunohistokimyasal parametre olduğu yönündedir (Kandefer-Gola ve ark. 2015). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, Ki67 ve mitotik indeks arasındaki ilişkiyi gösteren bu bulguyu desteklemektedir.

Literatürde Ki67 ve diğer proliferasyon belirteçleriyle ilgili çalışmalar, hücresel proliferasyonun prognostik anlamını ve önemini vurgulamakta ancak, hücresel proliferasyonun CCMCT'ler için tek bir prognostik belirteçolarak ele alınmaması ve diğer belirteçlerle birlikte değerlendirilerek hastalığın geniş kapsamda incelenmesinin tedavi için en iyi kararın verilmesini sağlayacağını belirtmektedir (Webster ve ark. 2007; Vascellari ve ark. 2012). Çalışmamızın bulguları da bu görüşleri doğrular niteliktedir.

Ki67 indeksi ve eşik değeri için patologlar arasındaki varyasyonu önleyerek sonuçların standardizasyonunun sağlanması adına çalışmalar yapılması klinisyenlerin prognozu daha iyi değerlendirmesinde önemli rol oynayacaktır.

CD25 daha önce CCMCT'lerde görülen, ancak dinlenme halindeki bağ doku hücrelerinde rastlanmayan, nadiren sadece allerjik dermatitte aktive olan mast hücrelerinde görülen bir MCT belirteci olarak tanımlanmış, ancak tümör derecesiyle negatif korelasyonu dolayısıyla erken tümör gelişimi fazında etkin olabileceği ve malign davranış için yeterince etkin bir rol üstlenmeyebileceği düşünülmüştür (Meyer ve ark. 2012). Söz konusu çalışma moleküler ağırlıklı bir çalışma olup sağ kalıma ilişkin bir veri sunulmamıştır. Aynı çalışmada, negatif korelasyonun pozitif malignite belirteci olarak değerlendirilmesiyle karşıtlık oluşturduğu da belirtilmiştir.

Aynı ekibin başka bir çalışmasında ise, IL-2 reseptörlerinin diğer alt ünitelerinin de MCT gelişminde etkili olup olmadığı değerlendirilmiş, MCT'lerin büyük çoğunluğunda hem IL-2R α hem de β zincirlerinin ve IL-2 ligandının eksprese edildiği ancak özellikle IL-2R α ve IL-2 ekspresyonunun tümör derecesi yükseldikçe dikkate değer biçimde azaldığı belirlenmiştir. Bu nedenle erken tümör gelişimiyle ilişkilerinin olabileceği ama malignitenin ileri aşamalarında daha az önemli oldukları belirtilmiştir (Meyer ve ark. 2013).

Çalışmamızda ise Meyer ve ark.'nın yukarıda refere edilen çalışmalarından farklı olarak CD25 eksprese eden hücrelerin yüzdelerinin Patnaik derecelendirme sistemiyle ilişkiliyken Kiupel derecelendirme sistemiyle ilişkili olmadığı gözlendi. Bu durumun örnek sayılarındaki dağılımdan kaynaklanabileceği göz ardı edilmemekle birlikte, Meyer ve ark.'ın (2012) çalışmalarında Kiupel yüksek derece tümörlerde % 70'in üzerinde CD25 ekspresyonu gösteren hücre izlenmezken çalışmamızda 5 adet Kiupel yüksek derece tümörde % 70'in üzerinde CD25 ekspresyonu izlenmesi gibi tümör derecelerine ve CD25 ekspresyon paternlerine ilişkin bulgular önemli olarak değerlendirilmiştir. Kiupel'in (2017) ortaya koyduğu köpeklerde CD25'in neoplastik olmayan çok sayıda mast hücresinden de eksprese edildiği bilgisi yönünden de, yapılan çalışmaların detaylı inceleme gerektirdiği düşünülmektedir.

Ancak çalışmamızda ortaya koyulan sağ kalım süreleri ile CD25 arasındaki ilişki incelendiğinde, hastalardan alınan MCT'lerde saptanan CD25 pozitif hücre oranı (%) azaldıkça teşhisten sonraki ortalama sağ kalım süresinin de önemli ölçüde azaldığı gözlendi. Meyer ve ark.'ın yukarıda refere edilen her iki çalışmasında da (2012, 2013) teşhisten sonra sağ kalım sürelerine ilişkin veri bulunmamakla birlikte, çalışmamızda elde edilen teşhis sonrası sağ kalım sürelerine ilişkin bulgular, söz konusu her iki çalışmada da belirtildiği gibi CD25'in malignite ile negatif korelasyonunu ve prognostik önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Çalışmamızda ayrıca, CD25 paternleri ile Mitotik indeks incelendiğinde gruplar arasında fark bulunması (X^2=8,76; p=0,033) ve CCMCTlerde CD25 ekspresyonu azaldıkça MI'de artış görülmesi daha önceki çalışmalarda gösterilmemiş olup bu ilişkinin bilimsel açıdan daha net olarak belirlenmesi için daha fazla materyal ile daha çok çalışmanın yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Ayrıca, çalışmamız süresince CD25 için köpek dokusunda daha önce çalıştığı Meyer ve ark. (2013) tarafından refere edilen antikorun artık üretilmiyor oluşu nedeni ile

bazı zorluklar yaşanmış, başka antikor klonları aranmıştır. Bu nedenle çalışmanın ilk başında antikor temininde yaşanan sıkıntılar nedeni ile köpek pratiğinde rutinde kullanımının pratik olmayabileceği düşünülmüştür. Ancak daha sonra çalışmada elde edilen bulgular ışığında CCMCT'lerde CD25 ekspresyonunun sağ kalım süresi üzerinden prognostik bir değeri olduğu ortaya konulmuş olup, CD25 immunohistokimyasının hem manuel yöntemle kolaylıkla optimize edilmesi hem de ülkemizde beşeri patoloji laboratuvarlarında rutinde kullanımı nedeniyle kolaylıkla gerçekleştirilebilceği görülmüştür. CD25'in CCMCT'lerin prognozunun belirlenmesine yönelik kullanımı açısından ileri çalışmaların desteklenmesinin faydalı olacağı, bu amaçla, prognoz takibi yapılabilecek çok sayıda olgunun katıldığı CD25 immunohistokimyasına yönelik bir çalışmanın teşhis sonrasında yaşam süresinin tahmini açısından daha net veriler ortaya koyabileceği düşünülmektedir.

Vascellari ve ark. (2012), immunohistokimya ve moleküler yöntemlerle gerçekleştirdikleri çalışmalarında, immunohistokimyasal boyamada Bcl-2 ekspresyonu ile derecelendirme sistemleri ya da sağlık durumu arasında korelasyon bulunmadığını ancak moleküler çalışmalarda mRNA seviyelerinin tümör dokularında daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Barra ve ark. (2017)'nın çalışmasında ise ikili sisteme göre yüksek dereceli tümörler daha düşük Bcl-2 ekspresyonu göstermiş, MCT sonucu ölüm oranının altı kat arttığı bu durumun iki dereceli değerlendirme sistemine ek bir prognostik bilgi sağladığı belirtilmiştir. Ancak söz konusu çalışmada üç dereceli sisteme ilişkin anlamlı bir farklılık rastlanmamıştır. Çalışmamızda ise Vascellari ve ark (2012)'nın bulgularını destekler şekilde tümöral doku hücrelerinde Bcl-2 immunohistokimya boyanmaları ile her iki derecelendirme sistemi arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Vascellari ve ark (2012), Bcl-2 proteininin ekspresyonu ile ilgili bulgularının prognozla ilişkili görünmediğini belirtmiştir. Bu durum gruplar arasındaki yüksek değişkenliğe ve göreceli olarak az sayıdaki kötü prognozlu olguya bağlanmaktadır. Yine de farklı gruplardaki median ekspresyonlara bakıldığında, G2 ve G3 tümörlerin G1 tümörlere göre, yüksek dereceli tümörlerin düşük dereceli tümörlere göre, ölen köpeklerin hayatta kalan köpeklere göre artan bir eğilim gösterdiğini belirtmiştir.

Çalışmamızda Vascellari ve ark.'nın (2012) çalışması ile uyumlu olarak Bcl-2 ekspresyonu ve prognoz arasında ilişki olmadığı görüldü. Söz konusu çalışmada olgu sayılarına ilişkin ele alınan kısıtların bu çalışma için de geçerli olduğu düşünülmektedir.

Bu verilerin daha iyi yorumlanabilmesinin, Bcl-2 grubu proteinlerin mast hücre apoptozunda oynadığı rolün daha iyi anlaşılmasıyla mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Yaptığımız literatür taramalarında, CCMCT'lerde Bax immunohistokimyasına ilişkin sadece iki makale tespit edilmiştir. Bunlardan ilki olan ve üçlü derecelendirme sistemi ile korelasyon yapmış olan Strefezzi ve ark. (2012), düşük Bax ekspresyonu görülen tümörlerin daha çok I. ve II. derece tümörler olduklarını ve sadece bir tümörün III. derecede tümör olduğunu, yüksek ekspresyon görülen tümörlerinin ise II. ya da III. derece tümörler olduğunu ve Bax ekspresyonu ile dereceler arasında anlamlı bir korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bir diğer çalışma olan Barra ve ark. (2017)'nın CCMCT'lerde apoptotik proteinlerin immunohistokimyasal boyanmasına ilişkin çalışmasında ise Bax ekspresyonu III. derece tümörlerde II. derece tümörlere göre (Patnaik sistemi) ve Yüksek dereceli tümörlerde düşük dereceli tümörlere göre (Kiupel sistemi) anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

İkili ve üçlü derecelendirme sistemleri açısından bakıldığında, çalışmamızın sonuçları da, daha önce bildirilen sonuçlarla benzer niteliktedir. Düşük Bax ekspresyonu izlenen grupta Patnaik III. derece tümör yer almaması ve sadece 1 adet Kiupel yüksek dereceli tümörün bulunması ile istatistiksel olarak Bax ekpresyonu ve derecelendirme sistemleri arasındaki yoğun bir ilişkinin varlığı saptanmıştır.

Strefezzi ve ark. (2012)'nın çalışmasında, çalışma boyunca MCT nedeni ile ölen hayvanlarda yüksek Bax ekspresyonu izlendiği, düşük Bax ekspresyonu gösteren olgularda ölüm görülmediği, Bax ekspresyonunun MCT nedeniyle ölüm için % 100 prognostik indikatör olduğu, yüksek Bax ekspresyonu olan köpeklerin düşük olanlara göre MCT nedenli ölüm açısından 4.25 kat risk altında oldukları belirtilmektedir. Barra ve ark. (2017)'ın çalışmasında da Strefezzi ve ark. (2012) ile uyumlu olarak, Yüksek Bax ekspresyonu görülen köpeklerin MCT sonucu ölümünün beş kat fazla olduğu bildirilmiş ve yaşam sürelerinin anlamlı şekilde daha kısa olduğu, yüksek oranda Bax ekspresyonunun hastalık sonucu ölüm riskini 5 kata kadar arttırdığı ve dolayısıyla Bax'ın tek başına sağ kalım ve ölüm konusunda kullanışlı bir indikatör olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda ise, yüksek Bax ekspresyonu görülen 33 olgudan 28'i takip edilebilmiştir. Bu olgulardan 4'ü diğer sebeplerden olmak üzere toplam 14 tanesi ölmüş, 14 tanesi ise halen yaşamaktadır. Düşük Bax ekspresyonu gösteren 20 olgudan ise 5 tanesi

takip edilememiş, 2 tanesi MCT nedeni ile 1 tanesi ise diğer sebeplerden ölmüştür. 12 tanesi ise halen yaşamaktadır. Yani, Strefezzi ve ark.'ın (2012) bulgularından farklı olarak, takip edilebilen hayvanlardan MCT sebebi ile ölenlerin 10 tanesinde yüksek Bax ekspresyonu görülürken 2 tanesinde ise düşük Bax ekspresyonu gözlenmiştir. Teşhisten sonraki yaşam sürelerine bakıldığında ise düşük ve yüksek Bax ekspresyonu görülen olgular arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülmemekle birlikte, ortalama yaşam sürelerine bakıldığında bu sürelerin sırasıyla 2278 ve 1608 gün olarak tespit edilmesinin yaşam süresi açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda ayrıca, olgular prognoz yönünden değerlendirilirken diğer çalışmalardan farklı olarak, Bax ekspresyonlarına göre gruplandırılan tümörler ile nüks verilerinin arasında bir ilişki olup olmadığı da incelenmiş, ancak önemli bir ilişki gözlenmemiştir. Barra ve ark.'ın (2017) da raporladığı gibi, çalışmamıza dahil edilen tümörlerde de proteinlerin boyanmalarında yoğunluk ve yüzdeler açısından fark görülmekle birlikte, antijen retrieval işlemi sırasında dökülen tek bir preparat haricinde tüm preparatlarda pozitif boyanma görülmüş, boyanma paterni preparatların hepsinde diffuz ve intrasitoplazmik olarak izlenmiştir.

Bir pro-apoptotik protein olan Bax'ın kanser hücrelerinin çoğunda inaktif yapıda sentezlendiği ya da anti-apoptotik proteinler tarafından baskılandığı, farklı tümörlerde Bax inaktivasyonuna neden olan mutasyonlar gözlenebildiği bilinmektedir (Reyna ve Gavathiotis 2018). Bu olaylara ilişkin farklı birçok hipotez olmakla birlikte halen hücre içinde artan Bax ekspresyonun kesin açıklaması yapılamamakta, bu konuda ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmanın amaçlarından biri de veteriner patoloji laboratuvarlarında rutinde kullanılabilecek şekilde CCMCTlerin prognozunun belirlenmesinin iyileştirilmesidir. İmmunohistokimya prosedürlerinin standardize/optimze edilebildiğinde rutinde başarıyla kullanılabileceği görülmüştür. İlerleyen dönemde immunihistokimya çalışmalarının PCR gibi yöntemlerle de desteklenebilmesi mümkündür.

Bu çalışma planlanırken, taze doku örneklerine ulaşmakta yaşanabilecek zorluklar dolayısı ile PCR gibi moleküler teknikler çalışmaya dahil edilmemiştir. Çalışmanın ülkemizdeki çoğu patoloji laboratuvarında hızlı bir şekilde İHK yapılabileceği göz önüne alındığında ülkemiz şartlarında prognoz belirlemede yardımcı olacağı düşünülmekle birlikte, çalışma sonuçlarının prognozu takip edilebilecek yeni hastalardan alınan taze

doku örnekleriyle yapılacak moleküler çalışmalarla desteklenmesi güvenilirliği arttıracaktır.

Literatür incelendiğinde, ülkesinde bu tür bir standardizasyonu hedefleyen tek ekibin bizim ekibimiz olmadığı fark edilmiştir. Brezilya'da Flores ve ark.'ın (2016) benzer bir çalışma yürüttüğü, mast hücrelerinde KIT ve Ki67 için bu tür bir standardizayon hedefiyle çalışmalar yaptığı görülmüştür. Söz konusu çalışmada bizim çalışmalarımızla paralel şekilde histopatoloji ve iyi optimize edildiğinde IHK'nin birlikte kullanılmasının kolaylıkla uygulanabilir olduğu görülmekte, bizim çalışmamızın konusu olmayan PCR denemelerinde elde ettikleri en önemli tecrübenin ise standardize edilemediğinde formolde fikse edilip parafine gömülmüş dokulardan yapılan PCR çalışmalarında önemli zorluklarla karşılaşıldığı raporlanmaktadır. İlerideki çalışmalarımızda bu zorluk dikkate alınarak, laboratuvarımızda yapılacak PCR çalışmaları için rutinde toplanan örneklerle paralel çalışmalar yapmanın mumkünatı da denenecektir.

Ülkemizde evcil hayvanlarda yapılacak kanser araştırmaları için veteriner fakültelerimizin hasta bilgi sistemlerinin hasta takibi daha verimli olacak şekilde düzenlenmesi ve patolojik numunelerinin saklanması için bir veri tabanı oluşturulması ileride yapılabilecek çalışmalar için önem arz etmektedir. Yapılan literatür incelemelerinde birçok gelişmiş ülkede ülke genelinde işleyen sistemler olduğu görülmüştür. Veteriner patolojide standardizasyon çalışmalarının önemi büyük olup, ilk aşama olarak kurumlar arası standardizasyonun sağlanabileceği, ardından ulusal bir tümör doku bankası ağının düşük bütçeler ile kurulabileceği düşünülmektedir.

Diğer taraftan, çalışma süresince karşılaşılan zorlukların ileriki çalışmalara yardımcı olacağı düşünüldüğünden bu zorlukların belirtilmesinin de faydalı olacağı düşünülmüştür:

- Çalışmada karşılaşılan kısıtlardan biri retrospektif özelliği nedeniyle bazı olgulara ait bilgilerin tam olarak elde edilememesi olmuştur. Bu duruma literatürdeki diğer bazı çalışmalarda da rastlanmaktadır (Seguin ve ark. 2006).
- Çalışmanın bir diğer minör kısıtı ise çalışmaya katılan 20 nolu olgudan alınan kesitlerin immunohistokimya prosedürünün ardından lamın üzerinden dökülmesi ve bu nedenle sonuç verilememesi olmuştur. Bu durumun dokunun fiksasyonundan kaynaklı olduğu, çalışma açısından önemli bir sorun teşkil

etmediği düşünülmüş, diğer preparatlarda böyle bir sıkıntı yaşanmadığından bu durum göz ardı edilmiştir.

- Bu tez çalışması Türkiye'de CCMCT'lerde prognostik kriterleri içeren detaylı bir çalışma olması açısından bir ilk sayılabilecek niteliktedir. Çalışma süresince karşılaşılan zorlukların bundan sonra yapılacak çalışmalar için önemli yol göstericiler olduğu düşünülmektedir. Bu yaklaşımın desteklenmesi için hazırlanan hasta takip formu, "Formlar" başlığı altında sunulmuştur.

Sonuç

Çalışmamızda, incelenen CCMCT'lerden elde edilen; mitotik indeks, Ki67, Bax, Bcl-2, KIT ve CD25 proteinleri ekspresyonu verilerinin, hem Patnaik hem Kiupel derecelendirme sistemleri ile ilişkilerine bakılarak prognozunun değerlendirilmesine ve tedaviye yönelik farklı prognostik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmada 54 CCMCT örneği kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda,

- Tümörlerin tek veya çoklu oluşunun tek başına yaşam süresini etkilemediği görüldü.
- MI ile hem Patnaik hem Kiupel derecelendirme sistemleri arasında, teşhis sonrası sağ kalım süresi açısından önemli bir ilişki olduğu saptandı. Ayrıca, Mİ için 5 eşik değerine göre gruplanan olgular arasında sağ kalım ve mortalite gibi prognoz belirleyiciler açısından önemli farklılıklar gözlendi.
- KIT paternleri ile hem Patnaik ve Kiupel derecelendirme sistemleri, hem de Mİ değerleri arasında yüksek bir ilişki olduğu, yaşam süreleri ile ilişkisi incelendiğinde ise istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamakla birlikte II. boyanma paterninde yaşam süresinin I. ve III. boyanma paternlerine göre önemli ölçüde azaldığı gözlendi.
- Genel olarak ele alındığında; yaşayan, MCT nedeniyle ölen ya da diğer sebeplerden ölen hastaların Ki67 indeksleri arasında yapılan gruplamada, gruplar arasında yaşam süresi açısından önemli fark gözlenmezken; Ki67 indeksi verileri 0,018 Ki67 indeksi eşik değeri üzerinden değerlendirildiğinde, yaşam süresi ile ilişkili bulundu.

- CD25 ekspresyonu ile Patnaik derecelendirme sistemi ve Mİ arasında bir ilişki gözlenirken Kiupel derecelendirme sistemi ve nüks ile ilişki gözlenmedi. Ancak, hastalarda saptanan CD25 % oranı azaldıkça teşhisten sonraki ortalama sağ kalım süresinin de önemli ölçüde azaldığı gözlendi.
- Bcl-2 reaksiyonunun teşhisten sonraki sağ kalım süresi ile ilişkili olmadığı görüldü.
- Bax ekspresyonunun her iki derecelendirme sistemiyle de ilişkili olduğu, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, düşük Bax ekspresyonu görülen olgularda teşhisten sonraki ortalama yaşam süresinin yüksek Bax ekspresyonu gösteren olgulara göre daha uzun olduğu gözlendi.

Bu bağlamda, KIT, Ki67, CD25 ve Bax immunohistokimyasının kötü prognozun ortaya koyulmasında tamamlayıcı olarak kullanılabilirliği doğrulandı.

Bu çalışmanın amaçlarından biri de derecelendirme sistemlerini en çok kullanılan Patnaik sistemi ve son dönemde önerilmiş olan Kiupel'in iki dereceli sistemi özelinde değerlendirerek ülkemizde rutinde kullanabilecek bir prognostik yaklaşımı belirlemek ve önermekti. Bu kapsamda, çalışma sonucunda, özellikle IHC gibi teknikler mümkün değilse, H.E. preparatlar üzerinden Patnaik ve Kiupel derecelendirme sistemleri ile standardize edilmiş Mİ değerlerinin her bir tümör için değerlendirilmesinin en etkin, kolay, hızlı ve az maliyetli yöntem olduğu değerlendirilmesinin klinisyene tedavi önerme açısından en sağlıklı verileri vereceği, rutinde immunohistokimya yapılabilen bir laboratuvarda ise prognoza ilişkin görüşlerin KIT, CD25 ve Bax immunohistokimyası ile desteklenebileceği görüldü.

KAYNAKLAR

Albanese, F. (2017). *Canine and Feline Cytology.* Cham,Switzerland:Springer; 1-39.

Aslan, Ş. (2010). Örtü Sistemi. İçinde A. Özer (Ed.), *Veteriner Özel Histoloji.* (2nd ed.) Ankara: Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd. Şti; 117-133.

Atalay Vural, S., Aydın, Y. (2001). Köpeklerin mast hücre tümörleri: 19 olguya ait patolojik survey. *Turk J Vet Anim Sci*, ***25***, 887-893.

Ayl, R.D., Couto, C.G., Hammer, A.S., Weisbrode, S., Ericson J.G., Mathes, L. (1992). Correlation of DNA ploidy to tumor histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors. *Vet Pathol*, ***29***, 386-390.

Barra, C.N., Macedo, B.M., Cadrobbi, K.G., Pulz, L.H., Huete, G.C., Kleeb, S.R., Xavier, J.G., Catao-Dias, J.L., Nishiya A.T., Fukumasu, H., Strefezzi, R.F. (2017). Apoptotic intrinsic pathway proteins predict survival in canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, ***0***, 1–7. Erişim 15.10.18, https://doi.org/10.1111/vco.12330.

Berlato, D., Murphy, S., Monti, P., Stewart, J., Newton, J.R., Flindall, A., Maglennon, G.A. (2013). Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*. Erişim 24.03.19, doi: 10.1111/vco.12029

Berlato, D., Rasotto R., Clifford, C., Garret, L., Hershey, B., Intile, J., Jones, P., Bulman-Fleming, J., Powel, R., Kamstock, D., Peauroi, J., Pavuk, A., Liptak, J. (2017). VCS/ACVP Oncology-Pathology Working Group summary and subgroup recommendation for grading of canine cutaneous mast cell tumors. Erişim 24.03.2019,https://pdfs.semanticscholar.org/2ea0/fcea5153f26969963272d26ebea8df577b6e.pdf

Berlato, D., Murphy, S., Laberke, S., Rasotto, R. (2018). Comparison of minichromosome maintenance Protein 7, Ki67 and Mitotic Index in the prognosis of intermediate Patnaik grade cutaneous mast cell tumours in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, ***16***(4), 535-543. Erişim 24.03.19, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vco.12412.

Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., De Vos, J., De Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J., Kessler, M., Pastor, J., Ponce, F., Savary-Bataille, K., Argyle, D.J. (2012). European consensus document on mastcell tumours in dogs and cats.

Vet Comp Oncol, ***10***(3), 1-29. Erişim 24.03.19, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x

Bostock, D.E. (1973). The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J. Small Anim. Pract.*, ***14***(1), 27-40.

Brønden, L.B., Eriksen, T., Kristensen, A.T. (2010). Mast cell tumours and other skin neoplasia in Danish dogs - data from the Danish Veterinary Cancer Registry. *Acta Veterinaria Scandinavica*, ***52***, 6. Erişim 03.12.17, http://www.actavetscand.com/content/52/1/6

Cahalane, A.K., Payne, S., Barber, L.G., Duda, L.E., Henry, C.J., Mauldin, G.E., Frimberger, A.E., Cotter, S.M., Moore, A. (2004). Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994–2002). *JAVMA, **225***(3), 401-408.

Cockerell, G.L., MacCoy, D.M. (1978). Clinicopathological manifestations of selected neoplasms. *Cornell Vet, **68***(Suppl 7), 133-150.

Donnelly, L., Mullin, C., Balko, J., Goldschmidt, M., Krick, E., Hume, C., Brown, D.C., Sorenmo, K. (2013). Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol.*, ***13***(1), 70-76.

Ehrhart, E., Kamstock, D., Powers, B. (2013). The pathology of neoplasia. İçinde S. Withrow, D. Vail, R. Page (Ed.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5th ed.). Elsevier Saunders; 51-67.

Elston, L.B., Sueiro, F.A.R., Cavalcanti, J.N., Metze, K. (2009). Letter to the Editor: The importance of the mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors: A validation study. *Veterinary Pathology Online, **46***, 362-365. Erişim: 03.12.17, https://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.46-2-362

Finnie, J.W., Bostock, D.E. (1979). Skin neoplasia in dogs, *Aust Vet J, **55***:602–604.

Flores, M.M., Mazaro, R.D., Langohr, I.M., Roy, A., Strother, K., Fighera, R.A. (2016) Ancillary techniques on the evaluation of canine cutaneous mast cell tumors from Brazil. Cienc. Rural [online], ***46***(10), 1804-1810. Erişim 29.09.18, http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160255.

Fox, L.E., Rosenthal, R.C., Twedt, D.C., Dubielzig, R.R., MacEwen, E.G., Grauer, G.F. (1990). Plasma histamine and gastrin concentrations in 17 dogs with mast cell tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine, **4***(5), 242-246.

Fulcher, R.P., Ludwig, L.L., Bergman, P.J., Newman, S.J., Simpson, A.M., Patnaik, A.K. (2006). Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association, **228***(2), 210-215.

Garrett, L.D. (2014). Canine mast cell tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. *Veterinary Medicine: Research and Reports, **5***, 49-58.

Gerbaulet, A., Hartmann, K., Mekori, Y.A. (2006). Mast cell apoptosis. *Methods in Molecular Biology, **315***, 407-423.

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology, **133***(4), 1710-1715.

Gil da Costa, R.M. (2015) C-kit as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumours: From laboratory to clinic. *The Veterinary Journal, **205***(1), 5-10.

Gil da Costa, R.M., Matos, E., Rema, A., Lopes, C., Pires, M.A., Gartner, F. (2007). CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Veterinary Research, **3***(19), Erişim 06.10.19, http://www.biomedcentral.com/1746-6148/3/19

Ginn, P.E., Mansell, J.E.K.L., Rakich, P.M. (2007). Skin and appendages. İçinde M.G. Maxie (Ed.), *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals.* (5th ed.). Saunders Ltd; 553-781.

Gudan-Kurilj, A., Šoštarić-Zuckermann, I.C., Hohšteter, M., Beck, A., Artuković, B., Severin, K., Džaja, P., Grabarević, Ž. (2012). A retrospective study of canine cutaneous tumors in croatia. *Acta Clin Croat, **51***, 169-188.

Hartmann, K., Artuc, M., Baldus, S.E., Zirbes, T.K., Hermes, B., Thiele, J., Mekori, Y.A., Henz, B.M. (2013). Expression of Bcl-2 and Bcl-xL in cutaneous and bone marrow lesions of mastocytosis. *The American Journal of Pathology, **163***(3), 819-826.

Harvey, R.G., McKeever, P.J. (2006). Kedi ve Köpeklerde Deri Hastalıkları. O. Deprem, T. Yeşildere (Ed.), Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri.

Hazıroğlu, R., Milli, Ü. (2000) Deri. İçinde Ü. Milli, R. Hazıroğlu (Ed.), *Veteriner Patoloji*, Ankara: Medipres; 728-748.

Hergt, F., von Bomhard, W., Kent, M.S., Hirschberger, J. (2016). Use of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors on cytology specimens. *Vet Clin Pathol*, ***0***(0), 1–7. Erişim 29.09.2018, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vcp.12387

Horny, H. (2007). State-of-the-science in mast cell disorders. *2007 Workshop of Society for Hematopathologu and European Association for Haematopathology*. Indianapolis, Indiana. Erişim 15.10.18, http://www.iupui.edu/~pathol/HematopathologyWorkshop/pdf/State-of-the-science%20in%20mast%20cell%20disorders%20HORNY.pdf

Horta, R.S., Gleidice, E., Lavalle, G.E., Monteiro, L.N., Souza, M.C.C., Cassali, G.D., Araujo, R.B. (2018). Assessment of canine mast cell tumor mortality risk based on clinical, histologic, immunohistochemical, and molecular features. *Veterinary Pathology*, ***55***(2), 212-223.

Hottendorf, G.H., Nielsen, S.W. (1968). Pathologic report of 29 necropsies on dogs with mastocytoma. *Veterinary Pahology*, ***5***(2), 102-121.

Junqueira, L.C., Carneiro, J., Long, J.A. (1971). *Basic Histology*.(2nd ed.), Rio de Janeiro,Brazil: Editora Guanabara Koogan S.A.

Kandefer-Gola, M., Madej, J.A., Dzimira, S., Nowak, M., Janus, I., Ciaputa, R. (2015). Comparative analysis of markers of cell proliferation in canine mast cell tumours according to current classifications. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, ***18***(2), 241–247

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging ımplications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, ***26***(4), 239-257.

Kiupel, M., Webster, J.D., Miller, R.A., Kaneene, J.B. (2005). Impact of tumor depth, tumor location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous MCT. *J. Vet. Med. A*, ***52***, 280-286.

Kiupel, M. (2017). Mast Cell Tumors. İçinde D. Meuten (Ed.), *Tumors in Domestic Animals.* Iowa, Ames: John Wiley & Sons Inc.; 176-202.

Kiupel, M., Webster, J.D., Kaneene, J.B., Miller, R., Yuzbasiyan-Gurkan V. (2004). The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology, **41***, 371-377.

Kiupel, M., Webster, J.D., Bailey, K.L. (2011). Proposal of a 2-Tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology,* **48**,147-155.

Kuş, Ç., Keskin, İ. (2008). Levene ve bartlett testleri üzerine bir inceleme. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, **22**(44), 78-83.

Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K.N., Wood, J.G. (2016). Mast cell: A multi-functional master cell. *Frontiers in immunology*, ***6***(620), 1-12.

Leblanc, A. (2016). Neoplastic and nonneoplastic tumors. İçinde K. Hinilica, A. Patterson (Ed.), *Small Animal Dermatology- A color atlas and therapeutic guide.* Missouri: Elsevier; 448-507.

Letard, S., Yang, Y., Hanssens, K., Palmerini, F., Leventhal, P.S., Guery, S., Moussy, A., Kinet, J.P., Hermine, O., Dubreuil, P. (2008) Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Molecular Cancer Research, **6***(7),1137-1145.

London, C.A., Seguin, B. (2003). Mast cell tumors in the dog. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice, **33***:473-489.

London, C.A. (2010). Mast Cell Cancer. İçinde D. Weiss, K. Wardrop (Ed.), *Schalm's Veterinary Hematology*. Iowa: Wiley-Blackwell; 483-490.

London, C.A., Thamm, D.H., Mast Cell Tumors. İçinde S.J. Withrow, D.M. Vail, R.L. Page (5th Ed.), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. St. Louis, Missouri: Elsevier; 335-355.

London, C.A., Galli, S.J., Yuuki, T., Hu, Z., Helfand, S.C., Geissler, E.N. (1999). Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene C-kit. *Experimental Hematology, **27***, 689-697.

Ma, Y., Longley, B.J., Wang, X., Blount, J.L., Langley, K., Caughey, G.H. (1999). Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *The Journal of Investigative Dermatology, **112***:165-170.

Macy, D.W. (1985). Canine mast cell tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, **15***(4), 783-803.

Maglennon, G.A., Murphy, S., Adams, V., Miller, J., Smith, K., Blunden, A., Scase, T.J. (2008). Association of Ki67 ındex with prognosis for ıntermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology, **6***(4), 268-274.

Maiolino, P., Cataldi, M., Paciello, O., Restucci, B., De Vico, G. (2005). Nucleomorphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology, **133***, 209-211.

Mauldin, E.A., Peters-Kennedy, J. (2016). Integumentary System. İçinde M.G. Maxie (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals.* (6th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier, Inc.; 509-736.

McCaw, D.L., Miller, M.A., Bergman, P.J., Withrow, S.J., Moore, A.S., Knapp, D.W., Fowler, D., Johnson, J.C. (1997). Vincristine therapy for mast cell tumors in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine, **11***(6), 375-378.

McNiel, E.A., Prink, A.L., O'Brien, T.D. (2006). Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in Pug dogs. *Veterinary and Comparative Oncology, **4***(1), 2-8.

Meyer, A., Gruber, A.D., Klopfleisch, R. (2012). CD25 ıs expressed by canine cutaneous mast cell tumors but not by cutaneous connective tissue mast cells. *Veterinary Pathology Online, **49***, 988.

Meyer, A., Gruber, A.D., Klopfleisch, R. (2013). All subunits of the Interleukin-2 receptor are expressed by canine cutaneous mast cell tumours. *J. Comp. Path., **149***,19-29.

Meuten, D.J., Moore, F.M., George, J.W. (2016). Mitotic count and the field of view area: time to standardize. *Veterinary Pathology, **53***(1), 7-9.

Michels, G.M., Knapp, D.W., DeNicola, D.B., Glickmann, N., Bonney, P. (2002). Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histopathologically tumor-free versus nontumor-free margins: a retrospective study of 31 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association, **38***:458-466.

Miettinen, M., Lasota, J. (2005). KIT (CD117): A review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol, **13***(3), 205-220.

Miller, D.M. (1995). The occurrence of mast cell tumors in young Shar-Peis. *J Vet Diagn Invest, **7**,* 360-363.

Misdorp, W. (2004). Mast cells and canine mast cell tumours. a review. *Veterinary Quarterly, **26***(4), 156-169.

Montagna, W., Parakkal, P.F. (1974). *The Structure and Function of the Skin.* New York: Academic Press.

Morini, M., Bettini, G., Preziosi, R., Mandrioli, L. (2004). C-kit gene product (CD117) ımmunoreactivity in canine and feline paraffin sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry, **52***(5), 705–708.

Mullins, M.N, Dernell, W.S., Withrow, S.J., Ehrhart, E.J., Thamm, D.H., Lana, S.E. (2006). evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association, **228***(1), 91-95.

Murphy, S., Sparkes, A.H., Blunden, A.S., Brearley, M.J., Smith, K.C. (2006). Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Record, **158**,* 287-291.

Newman, S.J., Mrkonjich, L, Walker K.K., Rohrbach B.W. (2007). Canine subcutaneous mast cell tumour: diagnosis and prognosis. *Journal of Comparative Pathology, **136**,* 231-239.

Northrup, N.C., Harmon, B.G., Gieger, T.L., Brown, C.A., Carmichael, K.P., Garcia, A., Kenneth, S.L., Munday, J.S., Rakich, P.M., Richey, L.J., Stedman, N.L., Cheng, A., Howerth, E.W. (2005). Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors. *J Vet Diagn Invest, **17**,* 245-248.

Northrup, N.C., Howerth, E.W., Harmon, B.G., Brown, C.A., Carmicheal, K.P., Garcia, A.P., Latimer, K.S., Munday, J.S., Rakich, P.M., Richey, L.J., Stedman, N.L., Gieger, T.L. (2005). Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *J Vet Diagn Invest, **17**,* 561-564.

Noyan, A. (2005). *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji* (15th ed.), Ankara: Meteksan Anonim Şirketi.

Nunez, R. (2001). DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr. Issues Mol. Biol., **3***(3), 67-70.

O'Keefe, D.A., Couto, C.G., Burke-Schwartz, C., Jacobs, R.M. (1987). Systemic mastocytosis in 16 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine, **1***(2), 75-80.

O'Keefe, D.A. (1990). Canine mast cell tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, **20***(4), 1105-1115.

Ozaki, K., Yamagami, T., Nomura, K., Narama, I. (2002). Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. *Journal of Veterinary Pathology, **39***,557-564.

Ozaki, K., Yamagami, T., Nomura, K., Narama, I. (2007). Prognostic significance of surgical margin, Ki-67 and cyclin D1 protein expression in grade II canine cutaneous mast cell tumor. *The Journal of Veterinary Medical Science, **69***,1117-1121.

Özdamar, K. (2015). SPSS ile Biyoistatistik (10th ed.). Eskişehir: Nisan Kitabevi Yayınları.

Öztürk Gürgen, H., Egeden, E., Aytemiz Danyer, I., Calp Egeden, Ö., Akgün, Z., Gürel, A. (2019). Radiotheraphy treatment of canine mast cell tumor: a case report. *21st International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress Abstract Book,* İstanbul; 222-223

Pakhrin, B., Kang, M.S., Bae, I.H., Park, M.S., Jee, H., You, M.H., Kim, J.H., Yoon, B.I., Choi, Y.K., Kim, D.Y. (2007). Retrospective study of canine cutaneous tumors in Korea. *J. Vet. Sci*, ***8***(3), 229-236.

Patnaik, A.K., Ehler, W.J., MacEwen, E.G. (1984). Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs . *Veterinary Pathology, **21***, 469.

Paterson, S. (2008). *Manual of Skin Diseases of the Dog and Cat* (2nd ed.). West Sussex: Wiley-Blackwell Publishing.

Preziosi, R., Morini, M., Sarli, G. (2004). Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumours of the dog. *J Vet Diagn Invest, **16,*** 554-561.

Preziosi, R., Sarli, G., Paltrinieri, M. (2004). Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumours of the dog. *J. Comp. Path., **130***, 143-151.

Preziosi, R., Sarli, G., Paltrinieri, M. (2007). Multivariate survival analysis of histological parameters and clinical presentations in canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Research Communications, **31***, 287-296.

Reguera, M.J., Rabanal, R.M., Puigdemont, A., Ferrer, L. (2000). Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *The American Journal of Dermatopathology, **22***(1), 49-54.

Reyna, D.E., Gavathiotis, E. (2018). Pulling the Bax trigger for tumor cell death. *Oncotarget*; ***9***(9), 8204-8205.

Reynolds, B.D., Thomson, M.J., O'Connell, K., Morgan, E.J., Gummow, B. (2019). Patient and tumour factors ınfluencing canine mast cell tumour histological grade and mitotic ındex. *Vet Comp Oncol.*, ***17***, 338–344.

Ritt, M.G. (2010) Epidemiology of hematopoietic neoplasia. İçinde D.J. Weiss, K.J. Wardrop (Ed.), *Schalm's Veterinary Haematology*. Iowa: Wiley-Blackwell; 427-432.

Romansik, E.M, Reilly, C.M., Kass, P.H., Moore, P.F., London, C.A. (2007). Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, ***44***, 335-341.

Sabattini, S., Scarpa, F., Berlato, D., Bettini, G. (2015). Histologic grading of canine mast cell tumor: ıs 2 better than 3? *Veterinary Pathology*, ***52***(1), 70-73.

Sakai, H., Noda, A., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T. (2002). Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine ıncorporation and Ki67 expression. *J. Comp. Path.*, ***127,*** 233-238.

Sandes, A.F., Medeiros, R.S.S., Rizzatti, E.G. (2013). Diagnosis and treatment of mast cell disorders: practical recommendations. *Sao Paulo Medical Journal*, ***131***(4), 264-74.

Scase, T.J., Edwards, D., Miller J, Henley W, Smith K, Blunden A, Murphy S. Canine Mast Cell Tumors: Correlation of Apoptosis and Proliferation Markers with Prognosis. *J Vet Intern Med* 2006, ***20***:151-158.

Scholzen, T., Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, ***182***, 311-322.

Schultheiss, P.C., Gardiner, D.W., Rao, S., Olea-Popelka, F., Tuohy, J.L. (2011). Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinicaloutcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. *JAVMA*, ***238***(11), 1464-1469.

Seguin, B., Besancon, M.F., McCallan, J.L., Dewe, L.L., Tenwolde, M.C., Wong, E.K., Kent, M.S. (2006). Reccurence rate, clinical outcome, and cellular proliferation

indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). *J Vet Intern Med, **20***, 933-940.

Seguin, B., Leibman, N.F., Bregazzi, V.S., Ogilvie, G.K., Powers, B.E., Dernell, W.S., Fettman M.J., Withrow, S.J. (2001). Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996–1999). *JAVMA, **128***(7), 1120-1123.

Sfiligoi, G., Rassnick, K.M., Scarlet, J.M, Northrup, N.C., Gieger, T.L. (2005). Clinical outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). *JAVMA, **226,***1368-1374.

Simpson, A.M., Ludwig, L.L., Newman, S.J., Bergman, P.J., Hottinger, H.A., Patnaik, A.K. (2004). Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. *JAVMA, **224,*** 236-240.

Sledge, D.G., Webster, J., Kiupel, M. (2016). Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *The Veterinary Journal, **215***, 43-54.

Stefanello, D., Buracco, P., Sabattini, S., Finotello, R., Giudice, C., Grieco, V., Iussich, S., Tursi, M., Scase, T., Di Palma, S., Bettini, G., Ferrari, R., Martano, M., Gattino, F., Marrington, M., Mazzola, M., Vasconi, M.E., Annoni, M., Marconato, L. (2015). Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). *JAVMA, **246***(7), 765-769.

Strefezzi, R. De F., Kleeb, S.R., Xavier, J.G., Fukumasu, H., Catao-Dias, J.L. (2012). The value of ımmunohistochemical expression of Bax in formulating a prognosis for canine cutaneous mast cell tumours. *J. Comp. Path., **146,*** 314-319.

Strefezzi, R. De F., Xavier, J.G., Kleeb, S.R., Catao-Dias, J.L. (2009). Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. *J Vet Diagn Invest, **21***, 821-825.

Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V. (2016). Biyoistatistik (17. ed), Ankara: Hatiboğlu Yayınevi.

Takeuchi, Y., Fujino, Y., Watanabe, M., Takahashi, M., Nakagawa, T., Takahashi, M., Nakagawa, T., Takeuchi, A., Bonkobara, M., Kobayashi, T., Ohno, K., Uchida, K., Asano, K., Nishimura, R., Nakayama, H., Sugano, S., Ohashi, Y., Tsujimoto,

H. (2013). Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-kit mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. *The Veterinary Journal, **196***, 492-498

Tanyolaç, A. (1984). *Özel Histoloji.* Ankara: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları.

Thamm, D.H., Avery, A.C., Berlato, D., Bulman-Fleming, J., Clifford, C.A., Hershey, A.E., Intile, J.L., Jones, P.D., Kamstock, D.A., Liptak, J.M., Pavuk, A., Peauroi, J., Powell, R., Rissetto, K., Valli, V.E.O., Webster, J.D. (2019). Prognostic and predictive significance of KIT protein expression and c-kit gene mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Vet Comp Oncol.*, ***17***, 451–455.

Thompson, J.J., Pearl, D.L., Yager, J.A., Best, S.J., Coomber, B.L., Foster, R.A. (2011). Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. *Veterinary Pathology, **48***(1), 156-168.

Thompson, J.J., Yager, J.A., Best, S.J., Pearl, D.L., Coomber, B.L, Torres, R.N., Kiupel, M., Foster, R.A. (2011). Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and KIT Expression as prognostic indices. *Veterinary Pathology, **48***(1), 169-181.

Tizard, I. (2013). *Veterinary immunology* (9th ed.). St. Louis: Elsevier Health Sciences.

Trere, D. (2000). AgNOR staining and quantification. *Micron, **31***, 127-131.

Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells, **3***, 697-707.

Turin, L., Acocella, F., Stefanello, D., Oseliero, A., Fondrini, D., Brizzola, S., Riva, F. (2006). Expression of c-kit proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study usaing real-time polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest, **18***,343-349.

Vascellari, M., Giantin, M., Capello, A., Carminato, A., Morello, E.M., Vercelli, A., Granato, A., Buracco, P., Dacasto, M., Mutinelli, F. (2012). Expression of Ki67, BCL-2, And COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. *Vet Pathol, **50***(1), 110-21.

Villamil, J.A., Henry, C.J., Bryan, J.N., Ellersieck, M., Schultz, L., Tyler, J.W., Hahn, A.W. (2011). Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. *JAVMA, **239***(7), 960-965.

Vučićević, I., Marinković, D., Kukolj, V., Nešić, S., Aničić, M., Aleksić-Kovačević, S. (2018). Important Histological and Immunochemical Parameters for Classification of Canine Mast Cell Tumors. *Veterinary Journal of Republic of Srpska (Banja Luka), **28***(2), 370 – 391.

Webster, J.D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Kaeene, J.B., Miller, R., Resau, J.H., Kiupel, M. (2006). The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia, **8***(2), 104-111.

Webster, J.D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R., Kaneene, J.B., Kiupel, M. (2007). Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol, **44***, 298-308.

Welle, M.M., Bley, C.R., Howard, J., Rüfenacht, S. (2008). Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology*, ***19***(6), 321-339

Wernersson, S., Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle . *Nature Reviews Immunology, **14,** 478-494.*

Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., Kluck, R.M. (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta, **1813***, 521–531.

White, C.R., Hohenhaus, A.E., Kelsey, J., Procter-Gray, E. (2011). Cutaneous MCTs: associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. *J Am Anim Hosp Assoc, **47***(3), 210-216.

Whitney, M.S., Berent, L.M. (2010). The cytology of neoplasia. İçinde C. Henry, M. Higginbotham (Ed.), *Cancer Management in Small Animal Practice.* Saunders; 47-58.

Zemke, D., Yamini, B., Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2001). Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor using mutation analysis in the proto-oncogene c-KIT. *J Vet Diagn Invest, **13***, 341-345.

Zemke, D., Yamini, B., Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2002). Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet Pathol, **39***(5), 529-35.

HAM VERİLER

FORMLAR

KÖPEK DERİ MAST HÜCRE TÜMÖRÜ HASTA BİLGİ FORMU

Tarih:..../..../.....

I. Anketi Dolduran Kişinin Bilgileri

AdıSoyadı:	□Hasta sahibi □VeterinerHekim
Telefon:	e-posta:
Tercih edilen iletisim sekli:	

II. Hasta Hakkında Genel Bilgiler:

Adı:	Cinsiyeti: □ Dişi □Erkek
Irkı:	Kısırlaştırılmış mı?: □Evet □Hayır
Ağırlığı:	Yası:

III. Hastalığın İlerleyişi ile İlgili Bilgiler

Teşhis tarihi:	□ İlk kez görülüyor □ Nüks
Deriden daha önce herhangi bir kitle alınmış mı? □Evet □Hayır	
Anemnez ve klinik semptomlar:	
Tümörün bulunduğu anatomik bölge: □Baş/boyun □Perineal/inguinal bölge □ Gövde □Ekstremiteler	Tümör Sayısı:□Tek□ Çoklu Tümörün Çapı / Büyüklüğü:
Tümörün morfolojik görünümühakkinda bilgi veriniz: (Sınırları belirgin mi? Saplı mı/Dokuya yapışık mı? Rengi ve kıvamı nasıl? Ülsere mi? vb.)	
Tümörün ilk fark edilmesi ile operasyon arasında geçen süre:	
Örneğin alınma şekli :□Total ekstirpasyon □Biyopsi	
Operasyon öncesinde herhangi bir tedavi yapıldı mı? □Evet □Hayır Yapıldıysa tedavi türünü belirtiniz: □Kemoterapi □Radyoterapi Süresini belirtiniz:	
Operasyon sonrasında herhangi bir tedavi yapıldı mı? □Evet □Hayır Yapıldıysa tedavi türünü belirtiniz: □Kemoterapi □Radyoterapi Süresini belirtiniz:	
Hastalık süresince; Metastaz/Nüks:□Var □Yok Metastaz varsa: □Yakın □Uzak Lenf nodül bölgesine invazyon : □Var □Yok Teşhis ile metastaz/nüks arasında geçen zaman:	
Teşhis koyulduktan sonraki yaşam süresi:.....	
Ölüm nedeni: □ Operasyon sonrası komplikasyon□ Ötenazi □Opere edilemeyen nüks/metastaz □Diğer (Lütfen belirtiniz):..... □Çoklu metastaz	

ETİK KURUL KARARI

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: **2015/** 55 **04/06/2015**

Sayın: Prof. Dr. Aydın GÜREL
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No :2015/ 55

Başvuru :08.05.2015

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Veteriner Hekim İşıl AYTEMİZ**'e ait "Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörlerinde Ki67, BAX, BCL-2, KIT ve CD25 Ekspresyonunun Tümör Derecelendirilmesi ve Prognoz ile İlişkisi " isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Köpek
	Cinsiyeti	Dişi/Erkek
	Sayısı	30
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		Temmuz 2015/Temmuz 2017

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof.Dr.Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç.Dr.Alper OKYAR
Üye

Doç.Dr.İlhan İLKILIÇ
Üye

Yard.Doç.Dr Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak.Yük. Müh.
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu Oda Avcılar –İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KANİN KUTANÖZ MAST HÜCRE TÜMÖRLERİNDE Kİ67, BAX, BCL-2, KİT VE CD25 EKSPRESYONUNUN TÜMÖR DERECELENDİRİLMESİ VE PROGNOZ İLE İLİŞKİSİ

ORIJINALLIK RAPORU

%3	%2	%1	%3
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
2	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to London School of Hygiene and Tropical Medicine Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
6	kefirtanesi.com İnternet Kaynağı	<%1
7	cdn.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Işıl	**Soyadı**	Aytemiz Danyer
Doğ.Yeri	İstanbul	**Doğ.Tar.**	12.06.1988
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	20735479018
Email	isilaytemiz@yahoo.com	**Tel**	05356769127

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	İstanbul Üniverisitesi-Cerrahpaşa Lisans Üstü Eğitim Enstitüsü	2020
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2011
Lise	Kenan Evren Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Avrupa Birliği Uzmanı	Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Avrupa Birliği ve Dış İlişkiler Genel Müdürlüğü (GTHB-ABDGM)	Şubat 2018-
2.	Hayvancılık Uzmanı (GPS)	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü Orta Asya Alt Bölge Ofisi (FAO-SEC)	Eylül 2017-Şubat2018
3.	Hayvancılık Teknik Uzman Yardımcısı (JTO)	FAO-SEC	Eylül 2015-Ağustos 2017
4.	Avrupa Birliği Uzman Yardımcısı	GTHB-ABDGM	Aralık 2011-Eylül 2015
5.	Asistan Öğrenci	İ.Ü. Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı	2009-2010 öğretim dönemi

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		91,25 (YDS)

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
ALES Puanı	83.587	83.804	69.093

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
MS Office Programları	Çok iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

SCI, SCI Expanded, SSCI ve AHCI'ye giren dergilerdeki Yayınları:

Tonay M.A., Yazıcı Ö., Dede A., Bilgin S., Danyer E., Aytemiz I. ve ark. (2016). Is there a distinct harbor porpoise subpopulation in the Marmara Sea?", Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis, 28 (4), 558-564.

Danyer E., Tonay M.A., Aytemiz I., Dede A., Yildirim F. ve Gürel A. (2014). First Report of Infestation By A Parasitic Copepod (Pennella balaenopterae) In A Harbour Porpoise (Phocoena phocoena) From The Aegean Sea: A Case Report, Veterinarni Medicina, 59,403-407.

Uluslararası Hakemli Dergilerdeki Yayınları:

Danyer, E., Danyer, I. A., Tonay, A. M., Erol, U., & Dede, A. (2018). Stranding records of Mediterranean monk seal Monachus monachus (Hermann, 1779) on the Aegean and Mediterranean Sea coasts of Turkey between 2012 and 2018. Journal of the Black Sea/Mediterranean Environment, 24(2).128-139.

Amaha Öztürk A., Dede A., Tonay A.M., Danyer E., Aytemiz Danyer I., Özgür Özbek E., Ercan D., Öztürk B. (2016). The first record of True's beaked whale, Mesoplodon mirus, from the Mediterranean coast of Turkey during multiple strandings in June 2016 - CORRIGENDUM. Journal of Black Sea/Mediterranean Environment, 22 (3), 300.

Amaha Öztürk A., Dede A., Tonay A.M., Danyer E., Aytemiz Danyer I., Özgür Özbek E., Ercan D., Öztürk B. (2016). The first record of True's beaked whale, Mesoplodon mirus, from the Mediterranean coast of Turkey during multiple strandings in June 2016. Journal of Black Sea/Mediterranean Environment, 22 (2), 232-237.

Amaha Öztürk A., Dede A., Tonay M.A., Danyer E. ve Aytemiz I. (2015). Stranding of a Minke Whale on The Eastern Mediterranean Coast of Turkey, Journal of Black Sea/Mediterranean Environment, 21, 232-237.

Danyer, E., Aytemiz, I., Gücü, A.C. ve Tonay, A. M. (2014). Preliminary study on a stranding case of Mediterranean monk seal Monachus monachus (Hermann, 1779) on the Eastern Mediterranean coast of Turkey. Journal of Black Sea/Mediterranean Environment, 20 (2), 152-157.

Danyer, E., Aytemiz, I., Özbek, E. Ö., ve Tonay, A. M. (2013). Preliminary study on a stranding case of Mediterranean monk seal Monachus monachus (Hermann, 1779) on Antalya coast, Turkey, August 2013, Journal of Black Sea/Mediterranean Environment,19 (3), 359-364.

Danyer, E., Özbek, E. Ö., Aytemiz, I. ve Tonay, A. M. (2013). Preliminary report of a stranding case of Mediterranean Monk Seal Monachus monachus (Hermann, 1779) on Antalya coast, Turkey, April 2013, Journal of Black Sea/Mediterranean Environment, 19 (2), 278-282.

Aytemiz, I., Dede, A., Danyer, E., ve Tonay, A.M. (2012). Morphological Identification of Parasites Found in the Stomach Contents of bycaught Striped Dolphins (Stenella coeruleoalba) from Turkish Eastern Mediterranean Sea Coast, Journal of Black Sea/Mediterranean Environment, 18 (2), 238-245.

Uluslararası Kongrelerde Sunulmuş Bildirileri:

Tonay A.M., Karaman K., Dede A., Danyer E., Aytemiz Danyer I., Uzun B., Meray Y., Deval C., Amaha Ozturk A., Bilgin R. (2019). Genetic investigation on Cuvier's beaked whale, Ziphius cavirostris on the coast of Turkey and Northern Cyprus, based on mtDNA sequences. World Marine Mammal Conference, Barselona, İspanya.

Amaha Öztürk A., Tonay A.M., Dede A., Danyer E., Aytemiz Danyer I., Aydinel A., Deval C. Stranding records of Cuvier's beaked whale, Ziphius cavirostris on the coast of Turkey and Northern Cyprus, 2016-2017. 31th Annual Conference of the European Cetacean Society, La Spezia, Italya.

Uzun B., Tonay A.M., Dede A., Danyer E., Aytemiz Danyer I., Amaha Öztürk A., Öztürk B., Bilgin R. (2018) Genetic investigation on the population structure of the harbour porpoises living in Turkish waters by double digest restriction associated DNA (ddRAD) sequencing. 31th Annual Conference of the European Cetacean Society, La Spezia, Italya.

Uzun B., Tonay A.M., Dede A., Danyer E., Aytemiz Danyer I., Bilgin R. ve ark. (2017). Do we need to conserve the harbour porpoise (Phocoena phocoena) population in the Marmara Sea separately?, 31th Annual Conference of the European Cetacean Society, Middelfart, Danimarka.

Tonay A.M., Uzun B., Dede A., Danyer E., Aytemiz Danyer I., Bilgin S. ve ark. (2017). Genetic investigation on the short-beaked common dolphin (Delphinus delphis) and bottlenose dolphin (Tursiops truncatus) in the Turkish seas based on mtDNA sequences, 31th Annual Conference of the European Cetacean Society, Middelfart, Danimarka.

Danyer E., Aytemiz Danyer I., Tonay A.M. (2017). Mediterranean monk seal parasites from Eastern Mediterranean cost of Turkey: Two new records, 31th Annual Conference of the European Cetacean Society, Middelfart, Danimarka.

Aytemiz Danyer I., Danyer E., Tonay A.M., Dede A., (2017). Severe injuries on dolphins observed in two cases from the Turkish coasts, 31th Annual Conference of the European Cetacean Society, Middelfart, Danimarka.

Öztürk A.A., Tonay A.M., Dede A., Danyer E., Aytemiz Danyer I., Popov D. (2017). Unusual mass mortality of harbour porpoises on the coast of the western Black Sea (Bulgaria and Turkey) in summer 2016. 31th Annual Conference of the European Cetacean Society, Middelfart, Danimarka.

Tonay M.A., Uzun B., Dede A., Danyer E., Aytemiz I., Bilgin S., ve ark. (2016) A Preliminary Genetic Investigation on the short-beaked Common Dolphin (Delphinus delphis) in the Turkish Seas based on mtDNA sequences", 30th Annual Conference of the European Cetacean Society, Funchal, Madeira, Portekiz.

Uzun B., Tonay M.A., Dede A., Danyer E., Aytemiz I., Bilgin S., ve ark. (2016) Population genetic structure of harbour porpoise Phocoena phocoena in Turkish Waters – What does mtDNA Control Region, 30th Annual Conference of the European Cetacean Society, Funchal, Madeira, Portekiz.

Aytemiz I., Danyer E., Tonay M.A., Amaha Öztürk A., (2015) A Conjoined Bottlenose Dolphin (Tursiops truncatus) Calf Stranded On The Aegean Sea Coast Of Turkey, 29th Annual Conf. European Cetacean Society, St Julian's Bay, Malta

Danyer E., Tonay M.A., Aytemiz I., Dede A., (2014) First Report on Infestation By A Parasitic Copepod (Pennella balaenoptera) In Harbour Porpoise (Phocoena phocoena) On The Southern Aegean Sea Coast Of Turkey, 28th Annual Conf. European Cetacean Society, Liege, Belçika

Aytemiz I., Danyer E., Akkaya A., Tonay M.A., Peters A., (2014) Marine Wildlife Workshops In Turkey", 28th Annual Conf. European Cetacean Society 2nd workshop on Communicating marine mammal science to the general public, Liege, Belçika

Aytemiz I., Dede A., Danyer E., Tonay A.M., (2011) Morphological Identification of Parasites Found in the Stomach Contents of bycaught Striped Dolphins (Stenella

coeruleoalba) from Turkish Eastern Mediterranean Sea Coast, 23. European Cetacean Society Conference, Cadiz, Spain.

Aytemiz I , Danyer E.; Knight J. A. (2010) Afalina Irkı İki Yunusun Maviye Dönüş Projesi'nde Kullanılan Acil Setase Nakil Tekniği Hakkında Tartışma, 1. Ulusal Veteriner Öğrencileri Bilim Kongresi, Ankara.

Danyer E., Aytemiz I, Bilal T., Erginer K. (2010) Effects of EM (Effective Microorganisms) cocktails on growth of fish, body weight, survival in Symphsodon Discus; World Aquatic Veterinary Medical Association Conference, Athens, Greece.

Danyer E., Aytemiz I., Tonay A. M., Dede A., Akkaya H. (2010) Preliminary Study of Identification of Macroscopic Parasites in the Stomach Content of the Harbour Porpoises (Phocoena phocoena) Bycaught and Stranded in the Turkish Western Black Sea; 12th International Veterinary Medicine Students Research Congress İstanbul.

Danyer E., Aytemiz I., Anıl B., Tok K. D., Uğurlu S. (2010) Importance and Structure of the Search and Rehabilitations Centers for Small Marine Mammals and Sea Turtles; 12th International Veterinary Medicine Students Research Congress İstanbul.

Özsoy S., Olgun Erdikmen D., Danyer E., Aytemiz I., Oğhan B., Özer M. Ö., Erdoğan M. K., Kaplan E., Kuru G. (2010) A half-bred Horse's Metatarsus III Fracture and Curing by Using External Fixation;12th International Veterinary Medicine Students Research Congress İstanbul.

Hasimbegoviç H., Olgun Erdikmen D., Özer K., İnal B., Demirutku A., Devecioğlu Y, Danyer E., Aytemiz I., Selvi N., İçöz, M. Dal H.A. (2010) Poster Presentation Treatment of a Wound in the Metatarsal Region of an Arab Colt Using Full-Thickness Graft Application;12th International Veterinary Medicine Students Research Congress İstanbul.

Danyer E., Aytemiz I., Sönmez K., Gürel A. (2009) Small Cetacean Standard Necropsy Technique and Tissue Sampling; ;11th International Veterinary Medicine Students Research Congress İstanbul.

Diğer Eserleri:

Aytemiz I. (2012) Avrupa Birliği ve Türkiye'de Setaselere Yönelik Uygulamalar, ATAUM 50. Dönem Temel Eğitim Ödev Arşivi, Tasnif No 19.5

Aytemiz I. (2015) AB ve Türkiye'de Hayvanat Bahçelerine İlişkin Uygulamalar, ATAUM 26. Dönem Uzmanlık Eğitim Ödev Arşivi

Aytemiz I. (2015) Deniz Memelilerinin Korunmasına İlişkin Uluslararası Anlaşmalar Ve AB İle Türkiye'nin Olası Politika Ve Uygulamaları, AB Uzmanlık Tezi Arşivi, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Avrupa Birliği ve Dış İlişkiler Genel Müdürlüğü

Yer Aldığı Akademik Projeler:

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa BAP, Araştırmacı, Kanin Kutanöz Mast Hücre Tümörlerinde Ki67, Bax, Bcl-2, KIT ve CD25 Ekspresyonunun Tümör Derecelendirilmesi ve Prognoz ile İlişkisi, Doktora Tez Projesi, 2016-2020

TÜBİTAK 1001-Araştırma, Araştırmacı, Türkiye Denizleri'nde Yaşayan Üç Küçük Cetacea Türünün; Tursiops truncatus (Montagu, 1821), Delphinus delphis Linnaeus, 1758, Phocoena phocoena (Linnaeus, 1758) Genetik Yapılarının İncelenmesi "Cetagen Projesi", Mayıs 2015-Ağustos 2017.

Aldığı Burslar ve Ödüller:

American Veterinary Medical Foundation (AVMF) John Pitts Scholarship Award, Haziran 2010

11. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel Araştırma Kongresi, En iyi poster sunumu ödülü, 2009, Istanbul

Sertifikaları:

EuFMD In-depth online course Risk Analysis along the Value Chain, Kasım 2017

Migratory Water Bird Conservation and Wetland Management Workshop for Developing Countries in Asia, Başarı Sertifikası, Pekin Ormancılık Üniversitesi, Pekin, 10-30 Nisan 2014)

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (Yeditepe Üniversitesi, İstanbul, 2011)

Petrole Bulanmış Yaban Hayatına Müdahale Eğitimi, Başarı Sertifikası (International Bird Rescue Research Centre, Ankara, 2010)

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Sucul yaşam, feng shui, dünya mutfakları