T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEDİ VE KÖPEKLERİN MEME TÜMÖRLERİNDE HİPOKSİ, ANJİYOGENEZ VE TÜMÖR MİKROÇEVRESİNİN, İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Erdinç GÜNER

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU

KONYA-2020

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEDİ VE KÖPEKLERİN MEME TÜMÖRLERİNDE HİPOKSİ, ANJİYOGENEZ VE TÜMÖR MİKROÇEVRESİNİN, İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Erdinç GÜNER

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 18202064 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2020

ÖNSÖZ

Kanser sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) paylaştığı verilere göre sadece 2018 yılında 18.1 milyon insana kanser teşhisi konulurken, 9.9 milyon kişi kanserden hayatını kaybetti. TÜİK'in verilerine göre, Türkiye'de kanser tüm ölümlerin yaklaşık yüzde 20'sini oluşturuyor. Sağlık bakanlığının raporunda, 2030 yılında 22 milyon yeni vakanın ortaya çıkmasının beklendiği kaydedilmektedir. Dünya Kanser Araştırma Fonu (DKAF) verilerine göre ise 2018'de dünyada en çok görülen kanser türleri arasında 2 milyon 88 bin kişi ile meme kanseri akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Ülkemizde her 4 kadın kanser hastasından birine meme kanseri teşhisi konulmaktadır.

Meme tümörleri insanlarda olduğu kadar köpek ve kedilerde de en çok görülen tümörler arasındadır. Köpek ve kedi meme tümörlerinin insan meme tümörleri ile çok yakın benzerlikler göstermesi nedeniyle onkologların ilgisini çekmektedir. Geriye dönük olarak kırk yıllık dönem incelendiğinde birçok araştırmacı, köpek ve kedi meme tümörlerinin insan meme tümörleri için bir model oluşturabileceğini bildirmektedir. Son yıllarda yapılan keşiflerle tümör mikroçevresi ve tümör hücrelerinin kendi mikroçevrelerine karşı verdiği yanıtlar hakkında önemli bilgiler elde edilmiş, böylece tümör olgularının sağaltım stratejileri her geçen gün yeni boyutlar kazanmıştır. Kedi ve köpeklerin meme tümörleri histopatolojik özellikleri ve klinik davranışları bakımından her ne kadar insan meme tümörlerine benzese de heterojen yapı göstermektedir. Bu yüzden köpek ve kedilerin meme tümörlerinin uygunsuz ve gereksiz tedaviden kaçınılması, bireye özgü tedavi programının uygulanması, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve sebeplerinin anlaşılmasında insan tümörlerine model oluşturması bakımından önemli olduğu unutulmamalıdır.

Sunulan tez projesi Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: 18202064).

Doktora öğrenimim boyunca yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU'na, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. M. Kemal ÇİFTÇİ'ye, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI, Prof. Dr. Ertan ORUÇ, Doç Dr. Özgür ÖZDEMİR

ile Arş. Gör. Dr. M. Burak ATEŞ, doktora öğrencisi Gökhan AKÇAKAVAK'a, ayrıca çalışmam boyunca bana verdikleri destek ve yardımlardan dolayı Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Patoloji Labratuvar birim şefimiz Dr. Öznur YAZICIOĞLU'na, Dr.M. Ziynet GÜNEN'e, Dr. Gülçin ERDAL'a, Veteriner Hekim Bora BEKTAŞ ve Veteriner Hekim Mehmet KARABOĞA'ya tez materyallerine ait dokuların kesit alımında yardımcı olan Laborant İlker AYBULUS'a, istatistik analizleri konusunda destek olan Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme Diyetetik bölüm başkanı Doç.Dr. Reci MESERİ hocama ve Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Veteriner Biyolojik Ürün Kontrolü Bölüm Şefi Dr. Ahmet ARSLAN'a, doktora eğitimimin başından sonuna yanımda olan sevgili eşim Hacer GÜNER'e ve oğlum Görkem GÜNER'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE VE KISALTMALAR ……v
ÖZET……..vii
SUMMARY……viii
1. GİRİŞ……1
1.1. Köpek ve Kedilerde meme bezleri anatomisi ve histolojisi……...3
1.2. Köpek ve Kedilerin meme tümörlerinde epidemiyoloji……..……4
1.3. Köpek ve Kedilerin meme tümörlerinde etiyoloji…….……..5
1.4. Köpek ve Kedilerde meme tümörlerinde klinik bulgular ve tanı……....6
1.5. Köpek ve Kedilerde meme tümörlerinin sınıflandırılması……...7
1.6. Tümör Mikroçevresi……..……..9
1.6.1. Tümör mikroçevresinde Hipoksi……..……12
1.6.2. Anjiyogenez……...……..……14
1.6.3. Tümör ilişkili makrofajlar……...……18
2. GEREÇ ve YÖNTEM…….……24
2.1. Gereç…….……24
2.2. Yöntem…….……24
2.2.1. Histopatolojik inceleme……...24
2.2.2. Meme tümörlerinin derecelendirilmesi…….....27
2.2.3. İmmunohistokimyasal boyama..……..28
2.2.4. İmmunohistokimyasal boyanmaların değerlendirmesi……29
2.2.5. İstatistiksel analiz…….……31
3. BULGULAR……..……32
3.1. Histopatolojik bulgular…….……36
3.2. İmmunohistokimyasal bulgular……..……42
3.2.1. Mikrodamar dansitesi…….……..44
3.2.2. VEGF…….……..47
3.2.3. HİF-1A…….……50
3.2.4. CD68…….……...53
3.2.5. CD163…….……56
3.2.6. MDD, VEGF, HİF-1A, CD68 ve CD163 seviyeleri arasındaki korelasyon…….. 59
4. TARTIŞMA……..……60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER…….……69
6. KAYNAKLAR……...……72
7. EKLER……..……83
EK-A: Etik Kurul Onayı…….……...83
8. ÖZGEÇMİŞ…….……84

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADM : Adrenomedullin
ANG : Angiopoietinler
BBA : Büyük büyütme alanı
BVKE : Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü
CA : Karbonik anhidraz
CAF : Kanser ilişkili fibroblast
CSC : Kanser kök hücreleri
CTGF : Bağ dokusu büyüme faktörü
DAB : 3,3'-diamino benzidine tetrahydrochloride
DNA : Deoksiribonükleik asit
ECM : Ekstraselüler matriks
EGF : Epidermal büyüme faktörü
EGFR : Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EPO : Eritropoietinin
ET : Endotelin
FGF : Fibroblast büyüme faktörü
GCSF : Granülosit koloni uyaran faktör
GLUT : Glikoz taşıyıcı
HA : Hiyalüronik asit
HGF : Hepatosit büyüme faktörü
HIF : Hipoksinin uyardığı faktör
HK : Hekzokinaz
HRE : Hipoksiye cevap elementi
IGF-2 : İnsülin benzeri büyüme faktörü-2
iNOS : Uyarılabilir nitrik oksit sentetaz
LDH : Laktat dehidrojenaz
LOX : Lizil oksidaz
LPS : Lipoplisakkarit
LVİ : Lenfovasküler invazyon
MCT : Monokarboksilat taşıyıcıları
MDD : Mikrodamar dansitesi
MMPs : Metalloproteinazlar
mRNA : Messenger ribonükleik asit
NGF : Sinir büyüme faktörü
NHE : Na^+ / H^+ eşanjörü
NOS : Nitrik oksit sentetaz
OPN : Osteopontin
OXPHOS : Oksijen bağımlı oksidatif fosforilasyon
PDGF : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PDH : Pirüvat dehidrogenaz
PEGF : Plasental endotelyal büyüme faktrörü
PHD : Pirolin hidroksilaz

PlGF : Plasental büyüme faktörü
pVHL : von Hippel-Lindau proteini
ROS : Reaktif oksijen türleri
SCF : Kök hücre faktörü
SÜVF : Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
TAM : Tümör ilişkili makrofajlar
TBS : Tris-buffered saline
TCA : Trikarboksilik asit
Tf : Transferrinin
TGF-α : Değiştirici büyüme faktörü-α
TLR : Toll benzeri reseptör
TNF-α : Tümör nekroz faktör-α
TMYP : Timidin fosforilaz
uPA : Urokinase-tip plasminojen aktivatör
VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VPF : Vaskülar permeabilite faktörü
WHO-AFIP : Dünya Sağlık Örgütü– Silahlı Kuvvetler Patoloji Enstitüsü

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kedi ve Köpeklerin Meme Tümörlerinde Hipoksi, Anjiyogenez ve Tümör Mikroçevresinin, İmmunohistokimyasal ve Histopatolojik Yöntemlerle Araştırılması

Erdinç GÜNER

Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2020

Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne 2015-2019 yılları arasında getirilen kedi ve köpeklerin meme tümörü biyopsi örneklerine ait parafin doku kesitlerinin tümör mikroçevresi, hipoksi ve anjiyogenez ile ilişkisi immunohistokimyasal yöntemle belirlenerek boyamada kullanılan CD31, VEGF, HİF-1a, CD68, CD163 antikorlarının birbirleri ile ve gözlenen histopatolojik değişikliklerle ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmanın materyalini teşhis amacıyla getirilen değişik ırk ve yaşlarda 34 köpek ve 12 kediye ait toplam 46 olgunun meme dokusu örneği oluşturdu. Köpeklerde incelenen olguların 28'i malign, 6'sı benign olarak sınıflandırıldı. Kedilerdeki olguların ise 9'u malign, 3'ünü benign tümörler oluşturuyordu. Köpeklerin yaşları 4-15 yaş (ort. 9.24) ve kedilerin yaşları 1-14 yaş (ort. 9.6) arasında değişti. Köpeklerde en yüksek meme tümörü insidensi 5-8, kedilerde ise 9-12 yaş aralığında görüldü. Köpek ırkları çeşitlilik göstermekle birlikte en fazla tümör saptanan köpek ırkının (n:14) Terrier olduğu ve bunların çoğunluğu malign özellik (n:13) gösterirken; tümör tipi olarak da miks karsinomların (n:9) çok sayıda olduğu dikkati çekti. Kedilerde ise en fazla Melez (n:7) ırkta tümör tespit edildi. Köpeklerde ve kedilerde incelenen tümörlerde CD31, VEGF, HİF-1a, CD68, CD163 antikorları ile benign ve malign tümörler arasına anlamı bir ilişki yoktu ($p>0,05$). Köpeklerin malign tümörlerinde MDD'si ile tümör büyüklüğü ve tümör nekrozu arasındaki ilişki anlamlıyken ($p<0,05$), histolojik grade, mitotik skor, LVİ bakımından anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Ayrıca köpeklerde Grade'ler ayrı ayrı değerlendirildiğinde Grade 2 ile Grade 3 arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıyken ($p<0,05$), Grade 1 ile Garde2 ve Garde 1 ile Grade3 arasındaki ilişki anlamsızdı ($P>0,05$). Kedilerin malign tümörlerinde histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ, nekroz özellikleri bakımından anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Köpeklerin malign tümörleri içerisinde CD68 ve CD163 arasında pozitif korelasyon saptanırken ($p<0,01$), diğer veriler arasında korelasyon belirlenmedi.

Tümör mikroçevresindeki toplanan immun hücrelerin tipleri, anjiyogenez ve hipoksi, malignitelerin önemli bir bileşeni ve bazı çalışmalarda kötü prognozun bir göstergesi olarak değerlendirilmesine rağmen CD31, HIF-1a, VEGF, CD68 ve CD163'ün immünhistokimyasal olarak tesbitinin tümördeki dinamik süreci doğru temsil edip edemediği de önemli bir tartışma konusudur. Daha fazla materyalle, ayrıntılı olarak klinik, histopatolojik ve klinikopatolojik özelliklerinin yanı sıra prognozun da incelendiği çok merkezli çalışmaların yapılmasının uygun olacağı görüşündeyiz.

Anahtar Sözcükler: Tümör Mikroçevresi; Hipoksi; Anjiyogenez; Tümör İlişkili Makrofajlar.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of Tumor Microenvironment, Hypoxia and Angiogenesis by Immunohistochemical and Histopathological Methods in Mammary Tumors of Dogs and Cats

ERDİNC GUNER

Department of Veterinary Pathology
PHD THESİS / KONYA-2020

In this study, it was aimed to investigate the relationship between tumor microenvironment, hypoxia and angiogenesis of the paraffin tissue sections of cats and dogs brought to Selcuk University Veterinary Faculty and Bornova Veterinary Control Institute between 2015-2019 by using immunohistochemical method and used in staining CD31, VEGF, HIF-1a, CD68, CD163 antibodies with each other and histopathological changes observed.

The material of the study consisted of 46 mammary tissue samples of belonging to 34 dogs and 12 cats of different breed and ages brought for diagnostic purposes. Of the cases examined in dogs, 28 were classified as malignant and 6 as benign, while 9 of the cases in cats were malignant and 3 were benign tumors. The ages of dogs ranged from 4-15 years (average 9.24) and cats ages ranged from 1-14 years (avarage 9.6). The highest incidence of mammary tumors in dogs was between 5-8 years and in cats between 9-12 years. Although the dog breeds are diverse, the dog breed (n: 14) with the most tumors detected is the Terrier and most of them show malignant features (n: 13); it was noteworthy that there were many mixed carcinomas (n: 9) as tumor types. In cats, most tumors were detected in the crossbred (n: 7). In tumors examined in dogs and cats, there was no significant relationship between CD31, VEGF, HIF-1a, CD68, CD163 antibodies and benign and malignant tumors ($p>0,05$). While the relationship between MDD and tumor size and tumor necrosis was significant ($p<0,05$) in malignant tumors of dogs, no significant relation was found in terms of histological grade, mitotic score, and LVI ($p> 0,05$). In addition, when the grades and were evaluated separately in dogs, the relationship between Grade 2 and Grade 3 was statistically significant ($p<0,05$), while the relationship between Grade 1 and Grade 2 and between Grade 1 and Grade 3 was meaningless ($p>0,05$). No significant relation was found in malignant tumors of cats in terms of histological grade, tumor size, mitotic score, LVI, necrosis characteristics ($p> 0,05$). While there was a positive correlation between CD68 and CD163 in the malignant tumors of dogs ($p<0,01$), no correlation was determined between other data.

Although the types of immune cells collected in the tumor microenvironment are considered as an important component of angiogenesis and hypoxia malignancies and as an indicator of poor prognosis in some studies, it is also important subject of discussion whether the immunohistochemically detection of CD31, HIF-1a, VEGF, CD68 and CD163 can accurately represent the dynamic process in the tumor. We think that it would be appropriate to carry out multicentre studies with more materials, beside detailed clinical, histopathological and clinicopathological features as well as prognosis are examined.

Keywords: Tumor Microenvironment; Hypoxia; Angiogenesis; Tumor associated Macrophages.

1. GİRİŞ

Meme tümörleri dişi köpeklerde en sık görülen tümörler arasında, kedilerde ise hematopoietik tümörler ve deri tümörlerinden sonra 3. sırada yer alır (Misdrop 2002).

Tümörün sadece kanser hücrelerini içermediği 1800'lü yıllardan beri bilinmektedir. 1889 yılında Stephen Paget ilk kez tümör mikroçevresinin tümör hücrelerinin malign karakter kazanmalarındaki anahtar rol oynadığını belirtmiş ve tohum ve toprak (seed and soil) isimli hipotezi ortaya atmıştır. Bu hipoteze göre bir tohumun (tümör hücresinin) büyüyebilmesi için mutlaka verimli bir toprağa (mikroçevre) ihtiyaç duyduğunu söylemiştir (Paget 1889). Mikroçevre tümör dokusu içindeki kanser hücreleri haricindeki hücre ve yapıları tanımlamaktadır (Babacan 2015). Bu alanda tümör hücrelerinin yanında tümöre ait damar sistemi ve lenfatikler, fibroblastlar, perisitler bazende adipositler bulunur (Blakwill ve ark 2012). Tümörün davranışları sadece tümör hücreleri tarafından belirlenmez. Yapılan çalışmalar tümör mikroçevresinde bulunan tümör hücresi olmayan çeşitli hücrelerin de tümörün davranışlarını etkilediğini göstermiştir. Böylece tümör mikroçevresinde bulunan bu hücrelerin etkilerine dayanan yeni tedavi stratejileri ve terapötik ajanların geliştirilmesi kanser araştırmalarının odak noktası haline gelmiştir (Sun ve ark 2014). Bugün tümör dokusuna infiltre olmuş lökositlerin büyük bir kısmının makrofajlardan oluştuğu bilinmektedir (Murdoch ve ark 2004). Dokularda yerleşik olarak bulunabilen ya da enflamasyonda görev alabilen bu makrofajların kaynağı kemik iliğinden köken alan dolaşımdaki monositlerdir. Bu hücreler mikroçevresel değişikliklere cevap olarak olgun makrofajlara dönüştükleri ve farklı fenotipleri olan çeşitli alt gruplara kutuplaştıkları hedef dokulara sızarlar (Chanmee ve ark 2014). Tümör ilişkili makrofajlar olarak isimlendirilen bu hücreler aktivasyon durumuna bağlı olarak antitümoral (M1) ve protümoral (M2) makrofajlar olarak sınıflandırılırlar (Mantovani ve Locati 2013). Yıllar önce tümör mikroçevresinde makrofajların bulunma sebebinin kanser hücrelerine karşı oluşan inflamatuar yanıt olduğu düşünülürdü. Bugün inflamatuvar hücrelerin kan dolaşımından kanser dokusuna göç etmesinin kanserin ilerlemesine katkı sağladığı bilinmektedir (Król ve ark 2011). Tümör ilişkili makrofajlar (TAM), tümör mikroçevresinde ekstraselluler matriks yıkımı ve yeniden yapılanmasında, tümör hücre motilitesinde, anjiyogenezin

tetiklenmesinde, tümör hücrelerinin metastaz ve invazyonunda önemli rol oynamaktadır (Zhang ve ark 2012, Chanmee ve ark 2014).

Tümör hücreleri mikroçevrelerindeki değişiklikleri algılayabilir ve bunlara cevap verebilirler. Besinler ve oksijen, tümör içerisinde arz ve talep halindedir ve oksijen kaynağının talebi karşılayamadığı durumlarda hipoksi şekillenir (McNeil ve ark 2016). Solid tümörlerin yaklaşık %50-60'ının mikroçevresinde heterojenik olarak dağılmış şekilde ve değişik düzeylerde hipoksik alanlar bulunduğu gösterilmiştir ve klinik araştırmalar hipoksiyi kötü bir prognostik faktör olarak tanımlamaktadır (Eskiizmir 2015,Vaupel 2004). Hücreler, hipoksiye gen ekspresyonunda ve fonksiyondaki bir dizi adaptasyon ile yanıt verir. Hipokside gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin birçoğu hipoksi indüklenebilir faktör (HIF)'ün aktivasyonundan kaynaklanmaktadır (McNeil ve ark 2016). Bu transkripsiyon faktörü tümör hücrelerinin tümör mikroçevresindeki hipoksik koşullara uyum sağlaması ve hayatta kalması için anjiyogenez, glikoliz metabolizmasında, oksijen tüketiminde, invazyon ve migrasyonunda görev alan genlerin yeniden programlanmasını sağlar (Rapisarda ve Melillo 2009). Hipoksik yeniden programlamanın tümörlerin büyümesi için kritik olduğu deneysel olarak birçok çalışmada gösterilmiştir (McNeil ve ark 2016).

Büyüyen ve gelişen kan damarları tümör mikroçevresinin en önemli bileşenleri arasında yer alır (Betof ve Dewhirst 2011). Çünkü tümörler 1-2 mm'den fazla büyüyebilmeleri için yeni kan damarlarına ihtiyaç duyarlar. Anjiyogenezis olarak isimlendirilen yeni damar oluşumlarının tümör dokusunun ihtiyaç duyduğu oksijen, büyüme faktörleri ve besin maddelerinin sağlanabilmesinin yanı sıra progresyon, metastaz ve invazyonunu kolaylaştıdığı düşünülmektedir (Folkman 1990, Ferrara 2000, Fernandez ve Rickles 2002, Tonini ve ark 2003).

1.1. Köpek ve Kedilerde Meme Bezleri Anatomisi ve Histolojisi

Meme bezleri ter bezlerinden modifiye olan içerisinde alveolleri, kanalları, damarları ve sinirleri barındıran bağ doku ile çevrili tubulo-alveolar yapıda organlardır (Gültiken 2016, Benavente ve ark 2016). Üzerlerinde deri örtüsü olan memeler, ventral torakal bölgeden inguinal bölgeye kadar uzanmış şekilde kendilerini vücuda bağlayan ve askıda tutan bir derialtı fasiyası ile sarılı halde, sulkus intermammarius'un sağında ve solunda simetrik ve sıralı olarak bulunurlar (Evans 1993, Tanyolaç 1999). Meme bezlerini saran kollagen ve elastik ipliklerden zengin muskuler fibroelastik kapsül derinlere doğru uzantılar vererek organı loplara ve lopçuklara ayırır (Tanyolaç 1999, Aughey ve Frye 2001). Çoğu köpekte 5 çift meme bezi mevcut olmasına rağmen 4 ya da 6 çift meme bezine sahip köpeklerde mevcuttur. Bunlardan iki adedi torasik (M1 ve M2), iki adedi abdominal (M3 ve M4) ve biri de inguinal (M5) olarak isimlendirilir. Kedilerde ise axiller (M1), torasik (M2), abdominal (M3) ve inguinal (M4) olarak adlandırılan 4 çift meme bezi bulunurken, 5 çift meme bezine sahip kediler de mevcuttur. Bu meme bezleri ayrıca kranial (T1) ve caudal (T2) torasik, kranial abdominal (A1) ve kaudal abdominal (A2) olarak da tanımlanmaktadır (Goldschmidt ve ark 2017).

Memelerin parankimi (gl. mammaria) alveol ve interlobuler kanalcıklar taşıyan lobçuk (lobuli glandulae mammariae) ve loblardan (lobi glandulae mammariea) oluşmaktadır. Alveoller (korpus glandule) fonksiyonlarına bağlı olarak yassı ile prizmatik arasında değişen tek katlı epitelle döşelidir. Dış kısmında ise sırası ile miyoepitel hücreleri ve bazal membran mevcuttur (Artan 1988). Prizmatik, kübik ya da çok katlı prizmatik epitel ile döşeli olan laktiferöz kanalların etrafında devamlılık göstermeyen miyoepitel hücre tabakası bulunur (Artan 1988, Aughey ve Frye 2001, Kierszenbaum 2006). Bu kanallardan gelen süt sinüs laktiferus denilen bir bölümde toplanır daha sonra parankimin son bölümü olan meme başı içindeki duktus papillarislere aktarılır ve meme başı derisindeki ostium papillare ile dış ortama çıkar. Her bir meme başındaki duktus papillaris sayısı köpekte 8-20, kedide 1-7 adet olabilir (Tanyolaç 1999, Artan 1988).

Meme bezlerinin kan dolaşımına bakıldığında ise kraniyalde bulunan torasik meme bezleri ile kraniyal abdominal meme bezinin arteriyel kan akımını kraniyal süperfisiyal epigastrik arter sağlarken, kaudalde bulunan kaudal abdominal ve inguinal meme bezlerininkini kaudal süperfisiyal epigastrik arter sağlamaktadır.

Venöz drenaj ise arteriyel damarlara paralellik göstermektedir (Silver 1966, Argyle 2006).

Meme bezlerindeki lenf sisteminin anatomisi tümör hücrelerinin yayılımının izlenmesi açısından önemlidir (Silver 1966). Genel olarak kranialde bulunan bezlerin lenf atık drenajı aksiller lenf düğümü, kaudal bölgede bulunan bezlerin lenfatik drenajı ise süperfisyal inguinal lenf düğümü ile gerçekleştirilir (Silver 1966, Evans 1993, Patsikas ve ark 2006). Meme bezlerinin lenf damarları arasında anastomoz bulunmamasına rağmen lenf sıvısı ilgili lenf yumrusundan geri akımla bir bezden diğerine geçebilmektedir. Ayrıca meme tümörü ile beraber lenf drenajı değişebilir ve yeni drenaj yolları oluşabilir (Pereira ve ark 2003, Patsikas ve ark 2006)

1.2. Köpek ve Kedilerin Meme Tümörlerinde Epidemiyoloji

Meme tümörleri köpeklerde en sık karşılaşılan tümör tipidir, kedilerde ise lenfoma ve deri tümörlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır (Moulton 1990). Dişilerde yaygın görülmesine karşın erkeklerde nadiren bildirilmiştir (Misdorp 2002, Meuten 2017). Erkek köpekler dişi köpeklere göre tahmini olarak %1'den daha az risk taşımaktadır (Murphy 2008). Görülme sıklığı kedilerde köpeklere oranla daha düşüktür (Meuten 2017). Dişi köpeklerde meme tümörü insidensi, görülen tüm tümörlerin yaklaşık %50'sini oluştururken dişi kedilerde bu oran %17'ye karşılık gelir (Misdorp 2002). Köpeklerde meme tümörlerinin %50'si, kedilerde ise %80'i malign karakterdedir (MacEwen ve Withrow 1996, Argyle ve ark 2008, Morris 2013). Meme tümörleri en çok kaudal abdominal ve inguinal bezlerde görülmektedir (Gültiken 2016). Yapılan çalışmalarda köpeklerde yıllık insidans oranı 198/100,000 iken kedilerde bu oran 25.4/100,000 olarak rapor edilmiştir (Meuten 2017). İnsanlar ve köpekler kıyaslandığında aynı coğrafi bölgede yaşa bağlı olarak meme tümörlerindeki insidans köpeklerde kadınlara göre 3 ila 4 kez daha fazla olduğu kaydedilmiştir (Schneider 1970). Yaygın olarak ovaryohisterektomi uygulanan Avrupa ülkelerinde hastalığın insidansı giderek azalmasına rağmen, ülkemizde kısırlaştırma bilincinin yeterince oluşmamış olması ve bilinçsizce yapılan ekzojen hormon uygulamaları insidansı artırmaktadır (Gültiken 2016).

1.3. Köpek ve Kedilerin Meme Tümörlerinde Etiyoloji

Meme tümörlerinin etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte tümör gelişimi için hormonal, genetik ve beslenme vb. çeşitli faktörlerin etkili olduğu ileri sürülmektedir (Benavente ve ark 2016). Köpeklerde ilk östrustan önce yapılan ovaryohisterektomi insidansı %0.5'e, ilk östrustan sonra yapıldığında ise %8'e, ikinci östrustan sonra ise %26'ya indirmektedir (Murphy 2008). Kedilerde de benzer şekilde 1 yaştan önce yapılan ovaryohisterektominin meme tümörü riskini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Overlay ve ark 2005). Ekzojen progestagen ve östrojen uygulamaları tümör oluşumuna yol açabilmektedir (Sorenmo 2003, Keskin ve ark 2009, Meuten 2017). Düşük dozlarda uygulanan progestinler benign tümörlerin gelişimine katkıda bulunurken, progestin ve östrojen kombinasyonlarının malign tümörlerin gelişimini tetiklediği bildirilmiştir (Misdrop 1991). Normal meme bezlerinde ve benign meme tümörlerinde bulunan östrojen ve progesteron reseptörlerinin sayısı malign tümörlerde daha azdır ya da hiç yoktur (Geraldes ve ark 2000, Cardazzo ve ark 2005, Yang ve ark 2006).

Meme tümörü gelişmesinde önemli faktörlerden biri de yaştır. Meme tümörleri 2 yaş altındaki köpeklerde ender görülmesine rağmen insidens 7-13 yaşları arasında pik yapar (Moulton 1990, Meuten 2017). Kedilerde ise insidens 9 yaşından sonra artmakla birlikte en çok 10-12 yaşlarında şekillenmektedir (Meuten 2017). Ayrıca malign meme tümörlerinin ileri yaşlarda rastlanma oranının oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir (Zaninovic ve Simcic 1991). Meme tümörlerinde ırk yatkınlığı tam olarak bilinmemekle birlikte saf ırklarda daha çok görüldüğü vurgulanmıştır. Irk predispozisyonuna bakıldığında ise Poodle, English Springer Spaniels, Brittany Spaniel, Cocker Spaniel, Alman Çoban Köpeği, Maltese, Yorkshire Terrier ve Dachshunds ırklarında daha yaygın görüldüğü ileri sürülmüştür (Sleeckx ve ark 2011). Kedilerde ise Siyam ırkında daha çok rastlandığı rapor edilmiştir (Meuten 2017).

1.4. Köpek ve Kedilerde Meme Tümörlerinde Klinik Bulgular ve Tanı

Meme tümörlü köpeklerin çoğunda herhangi bir sistemik hastalık belirtisi bulunmamaktadır (Meuten 2017). Çoğu zaman meme bezlerinde bir veya birden fazla kitle şikâyetiyle getirilirler veya rutin kontrollerde hekim tarafından muayene edilirken kitleler fark edilirler (Sleeckx ve ark 2011). Eğer metastaz varsa halsizlik, kilo kaybı, dispne, öksürük, lenf bezlerinde ödem ve topallık daha az olarak da egzersiz intölerans gibi nonspesifik semptomlar bulunabilir. Metastazın yeri ve büyüklüğü klinik bulguların şiddetini belirler (MacEwen and Withrow 1996, Misdorp 2002, Sorenmo 2003, Zapulli ve ark 2005). En çok metastaz bölgesi akciğerler olmakla birlikte karaciğer, kemik, beyin, dalak, böbrek, deri, göz, adrenal bezler, uterus, kalp, kas ve pankreas dokularında da metastaz rapor edilmiştir (MacEwen and Withrow 1996). Kedilerde de klinik görünüm genel olarak köpeklerdekine benzer olmakla birlikte kediler daha ziyade bölgeyi aşırı derecede yalamaya ve tırmalamaya meyillidirler (Antunes 2014, Gültiken 2016). Sonuç olarak bölge nekrotik bir hal alıp ülserleşerek enfekte olabilir ve koku oluşturabilir (Antunes 2014). İnflamatuvar meme karsinomlarında meme bezleri geniş lenfatik tutulumla beraber sıcak, şişkin ve ağrılı olabilir. Bu durumu kedilerde özellikle ekzojen progestagen uygulamalarından sonra sıklıkla karşılaşılan fibroadenomatöz hiperplaziden ayırmak zordur (Morris 2013, Sorenmo ve ark 2013).

Meme tümörleri genellikle sert, iyi sınırlandırılmış, birkaç milimetreden 10-20 cm'ye kadar değişen büyüklükte bazen travmatik ve ülserasyonlu nodüllerdir. Fiziksel muayene sırasında her meme bezi mutlaka palpe edilmeli ve bunlara bağlı regional lenf yumruları da metastaz açısından değerlendirilmelidir (Sleeckx ve ark 2011). İnce iğne aspirasyonu ile sitolojik değerlendirme yapılabilmektedir. Sitolojik muayene kolay ve ucuz olmasına rağmen malign tümörleri benignlerden ayırt etmek ve histolojik grade'ini değerlendirmek için güvenilir bir yöntem değildir (Sleeckx ve ark 2011, Klopfleisch 2016). Kesin tanı için histopatolojik muayene mutlaka gereklidir (Sorenmo ve ark 2009, Klopfleisch 2016).

1.5. Köpek ve Kedilerde Meme Tümörlerinin Sınıflandırılması

Köpek ve kedilerde meme bezi tümörlerinin sınıflandırılmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Histopatolojik sınıflandırma tümördeki morfolojik özelliklerin çeşitliliğine dayanmaktadır. Köpekler için kullanılan WHO-AFIP (World Health Organization–Armed Forces Institute of Pathology) sınıflandırma sistemi revize edilmiştir (Goldschmidt ve ark 2011). Kedilerde ise yine aynı sistem temel alınarak birkaç yeni histoplojik alt tipin bu sınıflandırmaya eklenmiş olduğu bildirilmiştir (Goldschmidt ve ark 2017). Bu sınıflandırmalara göre köpek ve kedi meme bezi tümörleri Tablo 1.1'de verilmiştir.

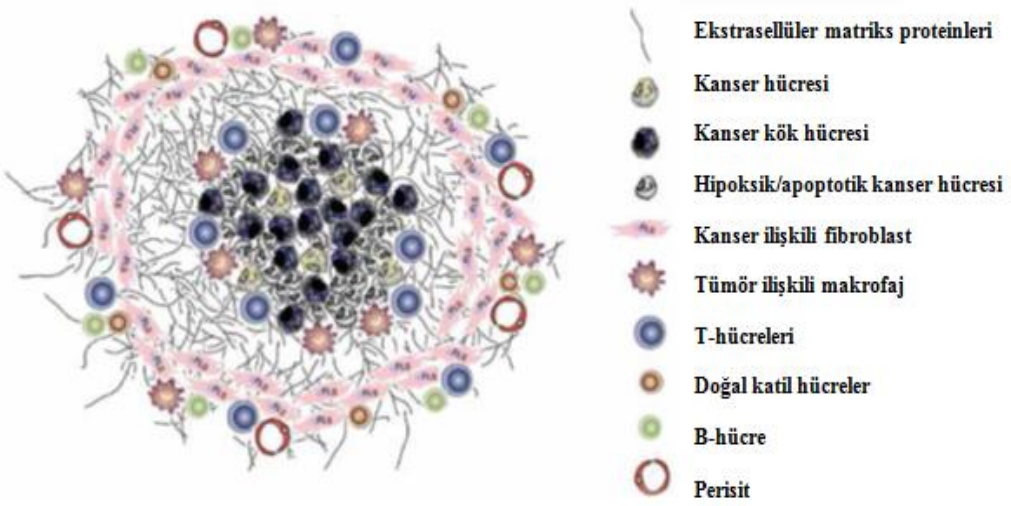
Tablo 1.1. Köpek ve kedi meme tümörlerinin histolojik sınıflandırması (Goldschmidt ve ark 2011, Goldschmidt ve ark 2017).

Köpek	Kedi
1. Hiperplazi/displazi	**1. Hiperplazi/displazi**
Dukt ektazi	Dukt ektazi
Lobular hiperplazi (adenozis)	Lobular hiperplazi (adenozis)
Düzenli	Düzenli
Sekretorik aktiviteli	Sekretorik aktiviteli
Fibrosizli	Fibrosizli
Atipili	Atipili
Epitelyozis	Epitelyozis
Papillomatosis	Papillomatosis
Fibroadenomatöz değişiklik	Fibroadenomatöz değişiklik
Jinekomasti	Jinekomasti
2. Benign tümörler	**2. Benign tümörler**
Basit adenom	Basit adenom
Intraduktal papillar adenom	Intraduktal papillar adenom
Duktal adenom	Duktal adenom
Skuamöz differansiyasonlu duktal adenom	Fibroadenom
Fibroadenom	**3. Malign epitelyal tümörler**
Myoepithelioma	Karsinom insitu
Kompleks adenom (adenomyoepitelyom)	Basit Karsinom
Benign mix tumor	a. tubular
3. Malign epitelyal tümörler	b. tubulopapillar
Karsinom insitu	c. kistik - papillar
Basit Karsinom	d. kribriform
a. tubular	Mikropapiller invaziv karsinom
b. tubulopapillar	Solid karsinom
c. kistik-papillar	Komedokarsinom
d. kribriform	Anaplastik karsinom
Mikropapiller invaziv karsinom	Intraduktal papillar karsinom
Solid karsinom	Duktal karsinom
Komedokarsinom	**4. Malign epitelyal tümörlerin özel tipleri**
Anaplastik karsinom	Yassı hücreli karsinom
Kompleks adenom/miks tümörden doğan karsinom	Adenoskuamöz karsinom
Kompleks karsinom	Müsinöz karsinom
Karsinom ve malign myoepithelyom	Lipid-rich (sekretorik) karsinom
Mikst karsinom	İğ Hücreli Karsinom
Duktal karsinom	Yassı hücreli karsinom – spindle cell variant
Intraduktal papillar karsinom	Karsinom – spindle cell variant
4. Malign epitelyal tümörlerin özel tipleri	İnflamatuar karsinom
Yassı hücreli karsinom	**5. Malign mezenkimal tümörler – sarkomlar**
Adenoskuamöz karsinom	Fibrosarkom
Müsinöz karsinom	Diğer sarkomlar
Lipid-rich (sekretorik) karsinom	
İğ hücreli karsinom	
Malign myoepitelyom	
Yassı hücreli karsinom - spindle cell variant	
Karsinom - spindle cell variant	
İnflamatuar karsinom	
5. Malign mezenkimal tümörler – sarkomlar	
Osteosarkom	
Kondrosarkom	
Fibrosarkom	
Hemangiosarkom	
Diğer sarkomlar	
6. Karsinosarkom – malign miks tümör	
7. Meme başı tümörleri	
Adenom	
Karsinom	
Epitel infiltrasyonlu karsinom (Paget benzeri hastalık)	
8. Meme başında hiperplazi/displazi	
Meme başı derisinde melanozis	

1.6. Tümör Mikroçevresi

Yıllarca kanser araştırmaları kanser hücreleri üzerine yoğunlaşırken hücresel mikroçevrenin tümör oluşumundaki rolü geniş ölçüde gözardı edilmiştir. Tıpkı çocukların büyüdükçe çevrelerinden etkilendikleri gibi kanser hücreleri de mikroçevrelerinden etkilenmektedirler. Tümör mikroçevresinin iyi anlaşılması doğru tanı ve tümör saldırganlığının tahmin edilmesi bakımından önem taşımaktadır. Böylece bireye özgü tedavi stratejileri geliştirilmesinde yardımcı olur. Tümör mikroçevresi; kanserlerin başlamasında, ilerlemesinde, tedaviye cevap oluşturmasında ve metastaz gelişiminde önemli rol oynamaktadır (García-Zepeda ve ark 2011, Siemann 2011).

Kanserli doku sadece kanser hücrelerini içermez aynı zamanda birçok farklı hücre ve doku tipinide barındırır (Şekil 1.1) (Eskiizmir 2015). Tümör mikroçevresi olarak adlandırılan bu yapı kanser hücreleriyle beraber birçok farklı hücresel ve biyokimyasal yapının birbiriyle etkileşim halinde olduğu dinamik ve kompleks bir ortamdır (Blakwill ve ark 2012). Bu alanda parenkim, stroma, immun hücreler, kan damarları ve lenfatikler, ekstrasellüler matrix (ECM), bağ doku, perisitler, bazen adipositler, ayrıca hücreler arası iletişimi sağlayan sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, yangı ve matriks remodeling enzimleri bulunur (Blakwill ve ark 2012, Hanahan ve Coussens 2012). Tümör mikroçevresi hücresel olarak ise fibroblastlar, kanser ilişkili fibroblastlar (CAF), myofibroblastlar, düz kas hücreleri, endotelial hücreler ve bunların öncülleri, perisitler, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, mast hücreleri, T ve B lenfositler, doğal katil hücreler ve dentritik hücreler ile makrofajlar gibi birçok farklı hücre tipini içerir (Koontongkaew 2013). Bu hücreler genellikle hücre yüzeyinde bulunan hücre tipine özgü belirteçler ile ayırt edilmektedir (Blakwill ve ark 2012). Tümör mikroçevresinde heterojen olarak dağılım gösteren bu hücrelerden granülositler, mast hücreleri ve makrofajlar tümör çevresinde, doğal katil hücreler stromada ve T-lenfositler ise mikroçevre marjininde ve lenf nodlarında bulunmaktadır (Senovilla ve ark 2012).



Şekil 1.1: Tümör mikroçevresinin şematik görünümü (Eskiizmir 2015).

T-lenfositler, sitotoksik CD8+ T-lenfositler ve CD4+ T- lenfositler olmak üzere iki gruptur. CD4+ T- lenfositlerde kendi içinde farklı özellikleri barındıran T_{helper} hücreler ve $T_{regulator}$ hücreler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Fridman ve ark 2012). Tümör hücrelerinin hatırlanmasında ve yok edilmesinde büyük rolleri olan sitotoksik CD8+ T-lenfositlerin tümör mikroçevresinde bulunmaları sıklıkla iyi prognozu işaret etmektedir (Blakwill ve ark 2012). $T_{regulator}$ hücreler, immunosupresif etkileri ve sitotoksik CD8+ T-lenfositlerin işlevlerini inhibe etmeleri ile tümör progresyonunda etkili olurken T_{helper} hücreler de CD8+ T-lenfositlere yardımcı ve antitümör etkisini arttırıcı rol oynamaktadır (Senovilla ve ark 2012). Tümör mikroçevresinde $T_{regulator}$ hücre sayısının yüksek olması birçok kanser tipinde kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Curiel 2004, Bates 2006, Gao 2007, Tao 2011).

Tümör ilişkili makrofajlar solid tümörlerde özellikle hipoksik ve nekrotik ortamlara toplanmakla birlikte tümör mikroçevresinde ekstrasellüler matriks yıkımı ve yeniden yapılanmasında, tümör hücre motilitesinde ve anjiyogenezin tetiklenmesinde, invazyon ve metastazda, kemoteröpatik direnç oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Zhang ve ark 2012, Chanmee ve ark 2014).

B-lenfositler tümör marjinlerinde bulunmakla birlikte daha yaygın olarak lenf düğümlerinde ve tümör mikroçevresi ile ilişkili lenfoid dokularda bulunurlar. Tümör mikroçevresine B-lenfosit infiltrasyonu göğüs ve ovarian kanserlerde iyi prognozla ilişkilendirilmiştir (Coronella ve ark 2001, Milne ve ark 2009).

Tümör stromasına infiltre olan doğal katil hücreler kanser hücrelerinin saptanması ve yok edilmesinde rol almalarına rağmen nadiren kanser hücreleriyle temas halindedirler. Kolorektal, akciğer, renal, mide kanseri gibi birçok kanser türünde bulunmaları iyi prognozu işaret etmektedir (Blakwill ve ark 2012).

Tümör mikroçevresinde bulunan immun hücrelerden biri olan mast hücreleri özellikle meme, pankreas ve melanomların stromasında bulunurlar. Mast hücreleri yeni damar oluşumlarını tetikleyen Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), anjiyogenin ve heparin üretimi, ECM'in yapısının bozulmasını ve metastazı kolaylaştıran proteazlerın üretimi ve EGF, NGF, PDGF, SCF, histamin, IL-10, TGF-β gibi immunbaskılayıcı sitokinler salgılayarak tümör gelişimini teşvik edebilmektedirler (Theoharides ve ark 2010).

Nötrofiller tümör mikroçevresinde tespit edilen bir başka hücre grubudur. TGF-β varlığı ve farklılaşma durumuna göre nötrofiller de makrofajlara benzer şekilde N1 ve N2 fenotipleri ile sınıflandırılırlar ve tümörün destekleyicisi veya tümöre karşı olabilirler (Fridlender ve ark 2009).

Fibroblastlar normal dokularda tip 1, tip 3 ve tip 5 kollajen ve fibronektin, bazal membranın yapısına katılan tip IV kollajen, laminin gibi ekstraselüler matriksin önemli parçalarının yapımına katılan maddeleri üretirler (Li ve ark 2007). Dokular hasara uğradığında doku yerleşik fibroblastlar parakrin sinyallerle aktifleşerek α-düz kas aktini ekspresyonu ile karakterize myofibroblastlara dönüşürler. Birçok tümör mikroçevresinde bol miktarda bulunan myofibroblastlar kanser ilişkili fibroblastlar (KİF) olarak da adlandırılırlar (Blakwill ve ark 2012, Eskiizmir 2015). Kanser ilişkili fibroblastlar aynı zamanda endotelyal hücreler, düz kas hücreleri, myoepitel hücreleri ya da mezenşimal kök hücrelerinden de köken alabilirler (Blakwill ve ark 2012). Tümör mikroçevresinde kritik önemi olan kanser ilişkili fibroblastlar, hepatosit büyüme faktörü (HGF), fibroblast büyüme faktörü (FGFs) ve insülin benzeri büyüme faktörü1 (IGF1) gibi tümör hücreleri için mitojen olan birçok büyüme faktörü salgılamaktadır. Ayrıca yine söz konusu bu hücrelerin remodeling denilen extraselüler matriksin yeniden şekillenmesinde ve tümör hücrelerinin invaziv karakter kazanmasında etkili olan birçok proteaz enzimin (Membran tip 1-matriks metalloproteinaz (MMP), MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, ürokinaz, vs.) üretiminde önemli rolü vardır (Rosenthal ve ark 2004, Blakwill ve ark 2012)

Mikroçevrenin önemli bileşenlerinden birisi de kendine özgü fiziksel, biyokimyasal ve biyomekanik özelliklere sahip kompleks makromoleküller ağını içeren 3-boyutlu dinamik bir yapı olan ekstraselüler matrikstir (ECM) (Lu ve ark 2012). ECM tümör mikroçevresindeki hücreler için yapısal bir iskele olmasının yanısıra aynı zamanda hücrelerin mikroçevre içerisine ve dışarısına hareketinde önemli olan adezyonu için gerekli ortamı sağlamaktadır (Blakwill ve ark 2012). Yapılan araştırmalarda kolajen, fibronektin ve elastik lifler gibi yapısal ECM proteinlerinin, tümör hücrelerinin invazyon özelliklerini güçlü bir şekilde etkilediği ortaya konmuştur (Sieman 2011). Ayrıca inflamasyonu, anjiyogenez ve tümör hücrelerinin metastazlarını destekleyen anahtar birçok büyüme faktörü, kemokin ve anjiyogenik faktörüde bünyesinde barındırmaktadır (Blakwill ve ark 2012).

1.6.1. Tümör Mikroçevresinde Hipoksi

Tümör mikroçevresinde meydana gelen metabolik değişikliklerden en önemlisi hipoksidir (Vaupel 2004). Bir dokunun gereksinimi olan oksijen miktarının karşılanamadığı durumlarda hipoksi şekillenir (Razorenova ve Giaccia 2010). Yapılan çalışmalarda solid tümörlerin %50-60'ında tümör kitlesi içersine heterojen şekilde dağılmış hipoksik ve anoksik alanlar bulunduğu kaydedilmiştir. Solid tümörlerde hipoksi oluşumunda rol oynayan temel mekanizmalar:

(i): Tümör mikrodamarının fonksiyonel ve yapısal bozuklukları sonucunda gelişen hipoksi (perfüzyon sınırlamalı oksijen iletimi). İskemik hipoksiye sebep olur genellikle geçicidir akut hipoksi olarak da adlandırılır.

(ii): Kanser hücrelerinin mikrodamarlara uzaklığı (>70 mikron) nedeniyle gelişen hipoksi (difüzyon sınırlamalı oksijen iletimi). Kronik hipoksi olarak da adlandırılır.

(iii): Tümör ilişkili ya da tedaviler sonucunda ortaya çıkan, kanın O_2 taşıma kapasitesini düşmesine bağlı hipoksi (anemik hipoksi) (Vaupel ve Mayer 2007).

Doku ve organlarda fizyolojik ve patofizyolojik birçok olayın genetik düzenlenmeleri, hücrelerin oksijensiz ortamda oksijenlenmeyi sağlayacak yeni damar oluşturması, alyuvar üretiminde artış ve anaerobik glikoliz dahil metabolizmadaki pek çok değişikliğin yanı sıra tümör hücre proliferasyonu/sağ kalımı, hücre adezyonu, ECM yapımı gibi tümörogenez üzerine etkili 100'den fazla genin tarskripsiyonel

uyarımı hipoksiyle düzenlenmektedir (Bahadori ve ark 2010, Finger ve Giaccia 2010, Semenza 2010, Avni ve ark 2011).

Tümör mikroçevresinde hipoksi (*p*O2<10-15 mmHg) gelişimi Hipoksi İndusibl Faktörlerin (HİF) aktivasyonuna sebep olur (Milosevic 2011) . HİF'ler 1990'lı yıllarda keşfedilmiş, tümör mikroçevresinde O_2 ye duyarlılıkta ve cevapta kritik rol oynayan önemli proteinlerdir (Wang ve Semenza 1995). Günümüzde HİF-1, -2 ve -3 olmak üzere üç adet HİF sınıflandırılmıştır (Koh ve Powis 2012). Bu transkripsiyonel kompleksler HİF-α ve HİF-β olmak üzere iki heterodimerden oluşmaktadır ve en çok araştırma ve klinik çalışma yapılan HİF-1'dır (Eskiizmir 2015). HİF-1, hücre sağ kalımı ve kök hücre koruması, genetik instabilite, glukoz ve enerji mekanizması, vaskülarizasyon, otokrin büyüme faktör sinyalizasyonu, invazyon ve metastaz, immün sistemden kaçış yeteneği ile kemoterapi ve radyoterapi tedavilerine direnç gibi birçok genin fonksiyonunun pozitif veya negatif yönde düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Semenza 2010).

Normoksik ortamlarda hücreler sürekli olarak HİF-1α sentezlemektedir. HİF-1α Pirolin hidroksilaz (PHD) enzimleri yardımıyla oksijene bağlı bir reaksiyonla hızla hidroksile olur. Hidroksile olan bu HİF-1α proteini, von Hippel-Lindau proteini (pVHL) tarafından tanınır, ona bağlanır ve ubiquitinasyon işlemi sonrasında proteozom sistemince parçalanarak yıkılır. Bundan dolayı yarı ömürleri kısa sürelidir ve seviyeleri düşük kalır (Shin ve ark 2015). Ancak hipoksik koşullarda PHD aktivitesi O_2 bağımlı olduğu için HİF-1α pVHL tarafından tanınamaz, hidroksile olamaz ve yıkılamadığı için ortamdaki konsantrasyonu giderek artar (Semenza 2001).

Memelilerde bugüne kadar 100'den fazla olası HIF-1 hedef geni olduğu gösterilmiştir ve insan genomundaki tüm genlerin %2'sinden fazla bir kısmının direkt veya indirekt regülasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Semenza 2000, Semenza 2010).

Normal hücrelerde enerji ihtiyacının %90'ı mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan %10'luk kısmı ise glikolizden sağlanmaktadır. Hipoksi durumunda ise hücreler ATP üretimini oksijen bağımlı mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan (OXPHOS), sitoplazmadaki oksijenden bağımsız metabolik yol olan glikolize değiştirir (Pastör etkisi) (Semenza 2010). Tümörlerde hipoksi durumunda glikolitik yolaktaki neredeyse bütün enzimlerin ve hücresel glikoz alımına aracılık eden

GLUT-1 ve GLUT-3 gibi glikoz taşıyıcılarının ifadelenmesi HİF-1 tarafından arttırılmaktadır (Lok ve Ponka 1999).

Hipoksiye cevaben, eritropoez ve demir metabolizmasıyla ilgili genlerin ekspresyonu ile oksijeni taşıyan kırmızı kan hücrelerinin kapasitesinde artış olur (Tacchini ve ark 1999). Ayrıca hipoksik dokuya eritrositlerin ulaşmasına yardımcı olmak için, vasküler tonusu ve kalp frekansını yöneten genlerin içinde olduğu genler düzenlenir. Bu düzenlemelerin hepsi HİF-1 tarafından ayarlanır (Brown ve Wilson 2004).

Hipoksi ile HİF-1 sayesinde insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2) ve transforme edici büyüme faktörü-α (TGF-α) gibi büyüme faktörleri indüklenir. Bu büyüme faktörlerinin reseptörlerine bağlanması ile hem HIF-1'in ekspresyonunu hem de hücre çoğalması ve hayatta kalımını sağlayan sinyal iletim yolakları aktive olur (Li ve ark 1996).

Varolan damarlardan yeni kan damarlarının şekillenmesi olarak adlandırılan anjiyogenez tümör büyümesi için kritiktir. Yeni oluşan damarlar tümör hücrelerinin hızlıca çoğalmasını sağlayacak oksijen ve besin sağlar (Carmeliet ve Jain 2000). Anjiogenezin uyarılması vasküler yoğunlukta bir artışa yol açar ve oksijen difüzyon mesafesinde bir azalmaya neden olur (Melillo ve ark 1995). Yeni kılcal damarlar oluşturmak için endotel hücreleri önceden var olan kan damarlarından filizlenir ve göç ederler. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) en güçlü endotel spesifik mitojendir ve HIF-1'in en önemli hedef genlerinden birisidir. VEGF hipoksik ve anoksik bölgelerde endotel hücrelerin toplanmasını ve proliferasyonunu sağlayarak doğrudan anjiyogeneze katılır (Goliasova ve Denko 2011).

1.6.2. Anjiyogenez

Anjiyogenez ile ilgili çalışmalara bakıldığında yaklaşık 100 yıl önce tümör içerisinde yeni damar gelişimlerinden bahsedildiği görülmektedir. Başlangıçta bu durumun tümör metabolitlerine bağlı basit bir dilatasyon olduğu düşünülmüş ve o günlerde tümör hiperemisi olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki dönemde tümörlerin anjiyogenez ile bağlantılı olup olmadığı tartışma konusu olmuştur (İde ve ark 1939). Algire ve ark. (1945) tarafından yapılan bir çalışmada tümör implantındaki yeni damarların konakçı damarlardan köken aldığı belirtilmiştir. 1971 yılında Folkman

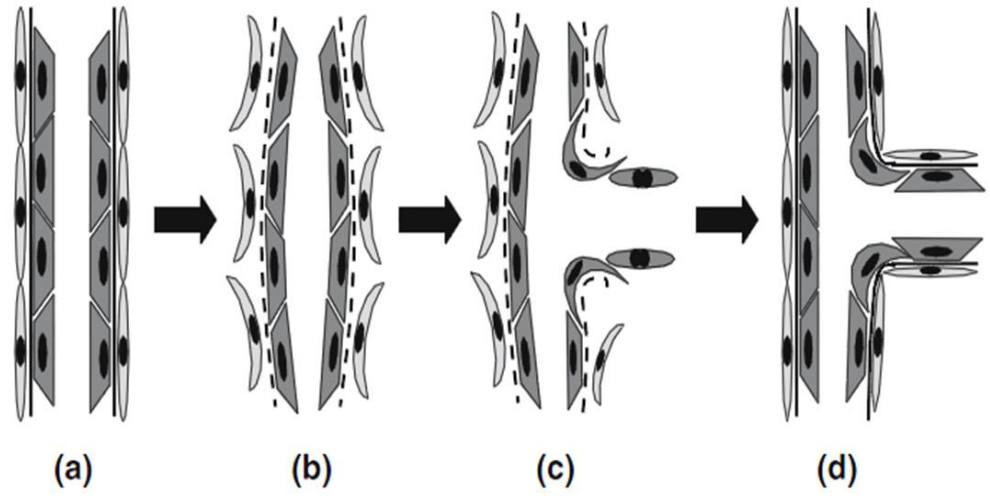
tümör gelişiminin anjiyogeneze bağımlı olduğunu savunarak bu konudaki gelişmelere ivme kazandırmıştır (Folkman 1971). 1980'li yılların ortalarına gelindiğinde tümör gelişiminin anjiogenezise bağımlı olduğuna dair pek çok veri elde edilmiştir (Chodak ve ark 1980, Folkman 1984). Tümör dokusunun 2–3 mm^3 den fazla büyüyebilmesi, metastaz ve invazyonu için gerekli olan büyüme faktörleri, besin maddeleri ve oksijenin iletilmesinin yanı sıra katabolitlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak için yeni damar oluşumlarının gerekli olduğu bildirilmektedir (McNamara ve ark 1998).

Var olan kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi anlamına gelen anjiyogenez, fizyolojik ya da patolojik olabilir (Carmeliet 2003). Fizyolojik olarak yara iyileşmesi, embriyogenez, menstrüel siklus vb. durumlarda; patolojik olarak ise kollajen doku hastalıkları (romatoit artrit vb.), retinopatiler, neovasküler glokom gibi göz hastalıkları ve psöriasis gibi anjiyogenik hastalıklarda olduğu gibi tümör büyümesi için de önem taşımaktadır (Folkman ve Klagsbrun 1987).

Hızlı çoğalan tümör hücrelerinin artan metabolik aktiviteleri ve oksijen tüketimleri nedeniyle ortaya çıkan tümör hipoksisi, mikroçevrede lokal pH değişikliklerine ve oksidatif strese sebep olur. Genişleyen tümör kitlesinde lokal kapillarlara olan difüzyon mesafesindeki artıştan dolayı azalan O_2 konsantrasyonu ayrıca hipoksik tümör mikroçevresine katkıda bulunur (Liao ve Johnson 2007). Hipoksinin en önemli ve en çok çalışılan sonuçlarından biri anjiyogenezin indüklenmesi ve proanjiyogenik faktörlerin etkisi altında mevcut olanlardan yeni kan damarlarının oluşmasıdır (Sleeckx ve ark 2011). Kan damarlarının gelişmesi proanjiojenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki dengeye bağlıdır (Folkman 1995). Hipoksi ve henüz tam olarak belirlenememiş bazı uyaranlar, tümör hücreleri, inflamasyonda rol alan hücreler ve bağ dokusu hücrelerini uyararak anjiyogenez özelliği taşıyan bir takım moleküllerin (VEGF: vasküler endotelyal büyüme faktörü, FGF: fibroblast büyüme faktörü, TGF-beta: değiştirici büyüme faktörü, PDGF: trombosit kaynaklı büyüme faktörü..vb.) salınımına yol açarlar (Battegay 1995). Böylece anjiogenik faktörlerle inhibitör faktörler arasındaki denge anjiogenez aktivatörleri lehine kayar ve anjiyogenez gelişir (Folkman 1971).

Anjiyogenez, vazodilatasyon ve damar geçirgenliğinin artması ile başlar. Plazma proteinleri damar dışına sızar ve endotel hücrelerinin göçü için gerekli olan

ortam oluşturulur (Carmeliet 2000). Endotel hücrelerinin göç etmesinden önce olgun damar duvarının dengesizleşmesi ve çevreleyen ekstraselüler matriksin yıkımlanması gerekir (Distler ve ark 2002). Anjiogenik büyüme faktörleri endotel hücrelerinde bulunan kendilerine özgün reseptörlere bağlanırlar ve aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ECM bileşenlerinin yıkımına neden olur (Mignatti ve Rifkin 1996). Böylece endotel hücreleri interendotelyal hücre bağlantılarını ve onları destekleyen düz kas hücre bağlantılarını kaybederler ve damarlar kararsız hale gelir (Bergers ve Benjamin 2003). Enzimatik yıkımı, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izler (Ausprunk ve Folkman 1977). Kısa bir süre sonra endotel hücreleri aktive edilir ve ekstraselüler matrikse göç ederek çoğalırlar. Bu süreçte en etkili anjiogenik faktör VEGF'dir (Ferrara ve ark 2003). Perisitler göç eden tarafa çekilir ve yeni oluşan kan damarlarını çevreleyen bazal lamina oluşturulur (Bergers ve Benjamin 2003) (Şekil 1.2). ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Ayrıca damar olgunlaştıktan ve uygun anjiyogenez ortaya çıktıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece endotel hücreleri inaktive olurlar ve damarlar kan akımı için hazır hale gelmiş olur (Haroon ve ark 1999, Pepper ve ark 1996).



Şekil 1.2. Anjiyogenezin basamakları: a) Normal kan damarı endotel hücreleri (koyu gri), perisit (açık gri) ve bazal lamina (siyah çizgi), b) Bazal membranın bozulmasını takiben vazodilatasyon ve perisit ayrılması, c) Anjiyogenik uyarıyı takiben endotel hücrelerinin göçü ve çoğalması, d) Lümen oluşumu, perisitlerin tutunması ve bazal membranın pozisyon alması (Liao ve Johnson 2007)

Anjiojenezde birçok ajan rol alır. Anjiojenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı VEGF'dir (Ferrara 2000). VEGF ilk olarak vaskülar permeabilite faktörü (VPF) olarak tanımlansa da ve son zamanlarda VEGF-A olarak adlandırılmaktadır. VEGF ailesinin tanımlanan diğer üyeleri; VEGF-B, C, D, E ve Plasental büyüme faktörü (PlGF)'dır (Podar ve Anderson 2005). Bu glikoproteinler spesifik transmembran triozin kinaz reseptörleri sayesinden etkilerini gösterirler. Bu reseptörler VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) olarak sıralanabilir. Bunlardan VEGF-R1 ve R2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGF-R3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (Stacker ve ark 2001, Kliche ve Waltenberger 2001). VEGF-A'nın artması endotel hücre proliferasyonu, göç ve sağ kalımın yanısıra damar geçirgenliğini de arttırmaktadır. Ayrıca VEGF; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile urokinaz ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyararak invazyon ve metastazı da kolaylaştırır (Ferrara ve Davis-Smyth 1997).

Son yirmi yılda veteriner hekimlikte de anjiyogenez ilgi alanı haline gelmiştir. Köpek tümörlerinde yapılan çalışmalar, bu türdeki tümörlerin insan tümörlerindeki anjiyojenik faktörler ile yolaklarının büyük benzerlikler gösterdiğini belirtmektedir (Sleeckx ve ark 2011). VEGF ile ilgili köpek ve kedilerde meme tümörlerinin de içinde olduğu değişik tip tümörlerde birçok çalışma yapılmıştır (Millanta ve ark 2002, Restucci ve ark 2002, Millanta ve ark 2006, Wolfesberger ve ark 2007, Clemente ve ark 2013, Millanta ve ark 2016).

Anjiyogenezin değerlendirilmesinde mikrodamar dansitesi (MDD) ölçümleri kullanılmaktadır. MDD küçük büyütmede "vasküler hot spot (sıcak nokta)" denilen alanlardaki damar sayımı ile saptanır ve ilk olarak Weidner ve arkadaşları tarafından 1991'de tanımlanmıştır. Vasküler sıcak noktaların, anjiyogenik potansiyeli yüksek olan ve dolaşıma girebilecek tümör hücrelerinin hematojen metastazlarına zemin hazırladıklarından dolayı biyolojik önemi olan lokal alanları temsil ettiği düşünülmektedir (Weidner ve ark 1991).

Tümör damarları normal kan damarlarına kıyasla morfolojik ve fonksiyonel olarak anormaldir. Tümörlerde damarlarlanma oldukça düzensiz ve heterojendir. Bu damarlar oldukça kıvrımlı ve kaotik dallanma gösteren, dilate, çoklu çatallanmaların yanı sıra ilmekler ve kör biten filizleri barındırır. Bu durum oksijen, besin maddeleri,

bağışıklık hücreleri ve ilaçları dengesiz dağıtan arterio-venöz şant, ters akım ve dalgalı akım sebebi ile kan akımının heterojen olmasına sebep olur. Bu değişiklikler hipoksi, asidoz ve yüksek interstisyel sıvı basıncı içeren, düşman bir mikroçevre ortamı yaratır. Anjiyogenez daha fazla tetiklenir ve tümör hücrelerinin damarlar içersine girmeleri ve yayılmaları kolaylaşır. Bir tümör hücresi metastaz yapabilmek için, damar sistemine girmek, dolaşımda canlı kalabilmek, damar sisteminden dışarı çıkabilmek, hedef organda büyüyebilmek ve anjiyogenezi uyarmak gibi çeşitli bariyerleri aşabilmelidir. (Nicolson 1988, Sleeckx ve ark 2011)

1.6.3. Tümör İlişkili Makrofajlar

İnsan tümörlerinde lökositlerin bulunduğu ilk kez Virchow tarafından 1863 yılında gösterilmiştir. Günümüzde, tümör dokusunda bulunan lökosit infiltrasyonunun büyük bir kısmını makrofajların oluşturduğu bilinmektedir (Murdoch ve ark 2004). Özellikle meme kanserlerinde, makrofajlar tümör kitlesinin yarısından fazlasını oluşturabilirler (Lewis ve Pollard 2006). Yıllardır, tümör mikroçevresi üzerine yapılan araştırmalar inflamatuvar hücrelerin sitotoksik özellikleri üzerine odaklanmıştır. Bu gün kan damarlarından çıkıp tümör dokusuna göç eden bu inflamatuvar hücrelerin karsinogenezde ve tümör ilerlemesinde önemli rol aldığı bilinmektedir. Bununla birlikte bu hücrelerin kanser biyolojisi üzerine etkileri tamamen aydınlatılmış değildir (Król ve ark 2011).

Makrofajlar konakçı savunmasında ve doku hemostazisinde geniş rol oynayan doğuştan bağışıklık hücreleridir (Gordon ve Martinez 2010). Doku yerleşik ya da inflamatuvar makrofajlar dolaşımdaki kemik iliği kaynaklı monosit öncüllerinden köken alırlar (Davies ve ark 2013). Bu öncül hücreler mikroçevre sorunlarına yanıt olarak farklı fenotipleri olan çeşitli alt gruplara kutuplaştıkları ve olgun makrofajlara dönüştükleri hedef dokulara sızarlar (Murray ve Wynn 2011). Tümörlerde bulunan bu makrofajlar genellikle tümör ilişkili makrofajlar (TAM) olarak isimlendirilirler (Comito ve ark 2014). Genelde M1 ve M2 olarak 2 alt gruba sınıflandırılan makrofajlar sitokinlerin, enzimlerin ve hücre yüzey işaretçilerinin farklı ifadelerini sergiler (Mantovani ve ark 2002). M1 ve M2 olarak kutuplaşan makrofajlar ürettikleri sitokin ve kemokinler ile fonksiyonları açısından da farklılıklar göstermektedir (Mantovani ve ark 2002, Allavena ve ark 2008). M1 fenotipi Th1 sitokin interferon-γ, lipoplisakkarit (LPS) gibi bakteri parçaları ve toll

benzeri reseptör (TLR) agonistleri ile uyarılırlar. Bunlar IL-6, IL-12, IL-23, tümör nekroz faktör-α(TNF-α), reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) gibi enflamasyon öncesi faktörler üretimi ile karakterizedir. Ek olarak tümöre özel antijenlerin sunumu için gerekli olan MHC I ve MHC II moleküllerini yüksek düzeyde sunarlar. Bu yüzden M1 makrofajlar tümöre karşı oluşan immun yanıtta ve enflamatuar yanıtta kritik bir hücresel bileşen olarak görev alır. M2 makrofajlar ise M1'lerin aksine enflamasyona karşı tümör öncesi aktivite gösterirler. Ayrıca M2a, M2b, M2c ve M2d adı verilen alt gruplara ayrılırlar. IL-4, IL-13 gibi Th2 sitokinleri makrofajların M2a fenotipine dönüşmelerini uyarırken immun komplekslerin ve TLRs aktivasyonu M2b makrofajlara ve IL-10'da M2c alt grubuna kutuplaştırır (Hao ve ark 2012, Sica ve Mantovani 2012, Singh ve ark 2017).

Büyüyen tümör dokusuna infiltre olan M1 makrofajlar genellikle IL-12^{yüksek} IL-10^{düşük} fenotiple karakterizedir ve tümör hücresi bozulmasına yol açan bağışıklık tepkilerini destekler. Tümör ilerlemesinin geç evrelerinde TAM'lar genelde IL-12^{düşük} IL-10^{yüksek} ile karakterize M2 benzeri fenotipe dönüşürler ve düşük tümör öldürücü aktivitededirler (Sica ve Mantovani 2012). Tümör dokusunda yer alan tümör ilişkili makrofajlar (TAM) çoğunlukla M2 makrofaj yapısındadır ve M2d alt tipi olarak nitelendirilebileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Murdoch ve ark. 2004, Allavena ve ark 2008, Hao ve ark 2012, Sica ve Mantovani 2012). Yapılan çalışmalarda TAM yoğunluğu yüksek olan hastalarda sağ kalım oranının önemli derecede düşük olduğu belirtilmiştir. Bu yüzden TAM infiltrasyonu kanser hastaları için önemli olumsuz bir prognostik faktör olarak bilinmektedir (Tsutsui ve ark 2005, Zijlmans ve ark 2006).

Tümör Dokusu İçerisine Monosit/Makrofaj Toplanması

Tümör dokusu içerisine monosit/makrofaj toplanması sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, extraselüler matriks (ECM) komponentleri ve hipoksi gibi çoklu mikroçevresel uyaranlar ile düzenlenir (Chanmee ve ark 2014). Monositlerin kan akımından çekilmesinden sorumlu tutulan kemokinler 4 gruba ayrılmaktadır: CXC, CC, C ve CXC3. Bazı CC kemokinler, özellikle CCL2 (MCP-1 olarak da bilinir) ve CCL5 (RANTES) özel olarak monositlerin tümör bölgesine çekilmesinde ve aktivasyonunda görev yapmaktadır. CCL2 ve CCL5, tümör hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreler, hatta TAM tarafından üretilmekte olup tümör dokusunda bulunan

TAM infiltrasyonu ile pozitif bir ilgileşim göstermektedir (Murdoch ve ark. 2004). Bunlar dışında birçok değişik kemokinin (CXCL12, CXCL1, CXCL13, CCL5, CCL17, CCL22) neoplastik dokularda ve stromal hücrelerde varlığı tespit edilmiş ve tümörlere monosit toplanmasıyla ilişkilendirilmiştir (Mantovani ve ark 2002).

Kemokinlerin yanı sıra bazı sitokinler de monositlerin tümör dokusunda toplanmasında rol oynamaktadır. Bu sitokinler arasında yer alan koloni stimüle edici faktör 1 (CSF-1), monosit ve makrofajlarında dahil olduğu pek çok hücreden salgılanmaktadır. Bu faktörün en önemli rolü mononükleer hücre olgunlaşmasını, farklılaşmasını ve hücre yaşamını düzenlemektir (Murdoch ve ark 2004). Ayrıca güçlü bir monosit makrofaj uyarıcısıdır (Wang ve ark 1988). Yapılan çalışmalarda meme kanserinde CSF-1 ifadelenmesi ile TAM infiltrasyonu arasında güçlü bir ilgileşim olduğu gösterilmiştir (Tang ve ark 1990, Lin ve ark 2001).

Monositlerin tümör dokusunda toplanmasında önemli olan bir diğer sitokin VEGF'tir. Bu büyüme faktörünün asıl rolü endotel hücreleri üzerindeki güçlü mitojenik etkilerinden dolayı fizyolojik ve patolojik vaskülarizasyonda rol almasıdır. (Murdoch ve ark 2004). VEGF ayrıca VEGF-R1 (flt-1) reseptörleri ile monosit ve makrofajları için kemotaktik etkiye sahiptir (Barleon ve ark 1996, Sawano ve ark 2001). Meme tümörlerinde yapılan çalışmalarda VEGF ekspresyonu ile tümörlere TAM infiltrasyonu arasında pozitif bir ilgileşim olduğu gösterilmiştir (Leek ve ark 2000, Levis ve ark 2000).

Daha az tanımlanmış proinflamatuvar bir sitokin olan endotelyal monosit-aktive edici polipeptid II (EMAP II) de tümörlere monositlerin toplanmasıyla ilişkilendirilmiştir (Kao ve ark 1994). Endotelyal monosit aktive edici polipeptid II'nin üretilmesi, makrofajların apoptoz ve nekroz alanlarına toplanmasını sağlamaktadır (Knies ve ark 2000).

Küçük vazojenik ve mitojenik peptid olan endotelin 1-3 (ET-1,2 ve 3) çok çeşitli hücrelerden salgılanmaktadır ve etkilerini kemokinler gibi kendilerine özgü reseptörlere bağlanarak gösterirler. Örneğin endotelin-1 monositler üzerinde bulunan kendilerine özgü ET-RA reseptörüne bağlanarak kemoatraktan özellik gösterirler (Murdoch ve ark 2004).

Yukarıda sayılan faktörlerin yanında ECM komponentleri ve fragmentlerinin makrofaj toplanması ve kutuplaşmasında rolleri vardır (Chanmee ve ark 2014). Örneğin temel bir ECM bileşeni olan Hiyalüronik asit (HA) monosit/makrofaj toplanması ile ilişkilendirilmiştir ve monositlerin erken geçiçi aktivasyonunu tetiklemesi ile de immun baskılayıcı M2 makrofajları desteklediği gösterilmiştir (Kobayashi ve ark 2010, Kuang ve ark 2009). Makrofaj kaynaklı matriks metalloproteinaz MMP-9/12 tarafından üretilen elastin fagmentleri monosit kemotaktik etki gösterir (Houghton ve ark 2006). Denatüre olmuş ve parçalanmış kollogen I ayrıca makrofajlar için güçlü kemotaktik etki göstermektedir (Solinas ve ark 2010).

TAM'lar genellikle tümör dokusunun avasküler, nekrotik ve hipoksik bölgelerine toplanırlar. VEGF, endothelin-2 ve EMAPII vb. birçok faktör hipoksik bölgelere makrofaj toplanması ile ilişkilidir (Murdoch ve ark 2004). TAM'lar hipoksik bölgeye ulaşır ulaşmaz hipoksi makrofajların gen ifade profillerini değiştirerek protümörgenik fenotipe doğru yönlendirir. Bu düzenlemeler hipoksinin tetiklediği gen ifadelenmesini ayarlayan anahtar transkripsiyon faktörü olan Hypoxia-inducible faktör (HIF)-1α tarafından yapılır (Chanmee ve ark 2014). Ayrıca yapılan birçok çalışmada hipoksik koşullarda HİF-1α'nın TAM'lardan VEGF salınımını arttırdığı rapor edilmiştir (Eubank ve ark 2011). Schioppa ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada hipoksik koşullarda monosit ve makrofajlardaki CXC reseptör 4 (CXCR4) uyarılmasının CXCL12 özel bağına artan kemotaktik cevabına paralellik gösterdiğini belirtmişlerdir. Hipoksik koşullarda CXCL12, CXCR4 ifadelenmesi HIF-1α tarafından düzenlenir. Böylece CXCL12, CXCR4 sunan dolaşımdaki monosit/makrofajlar tümör içerisindeki hipoksik alanlara toplanır.

Tümör İlişkili Makrofajların Görevleri

TAM'lar anjiyojenezin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır ve makrofaj infiltrasyonu ile anjiyojenez arasında pozitif korelasyon olduğu çeşitli kanser türlerinde bildirilmiştir (Guruvayoorappan 2008). TAM'lar tümör anjiyojenezini kolaylaştırmak için bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), angiopoietinler (ANG1 ve ANG2), IL-1, IL-8, timidin fosforilaz (TMYP), MMP-9, MMP-2, NO, urokinase-tip plasminojen aktivatör (uPA) ve adrenomedullin (ADM) de içeren birçok proanjiyojenik mediyatörler salarlar (Pollard 2004, Chanmee ve ark

2014). Bu moleküllerin salınımı endotel hücrelinin proliferasyonuna ve göçüne, matriksin yeniden şekillenmesine ve yeni damarların oluşmasına neden olur (Pollard 2004). Ayrıca yapılan çalışmalarda makrofaj kaynaklı VEGF-A'nin solid tümörlerde artan sayıda damarlar ve kollarıyla anjiyojenez başlamasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Bingle ve ark 2006).

TAM'ların doğrudan ve dolaylı olarak tümör mikroçevrelerini değiştirerek tümör hücrelerinin metastatik sürecini etkilediklerine inanılmaktadır (Chanmee ve ark 2014). TAM'lar uPA, katepsin, serin proteazlar ve özellikle MMP-7, MMP-9'u da içeren birtakım proteazların önemli kaynağıdır. Makrofaj kaynaklı bu proteazlar ECM'nin ve bazal membranın yıkımlanmasına sebep olur ve bu tümör hücrelerinin metastazı için anahtar basamaktır (Pollard 2004, Gocheva 2010). TAM'lar ayrıca fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve değiştirici büyüme faktörü-β (TGF-β) gibi çeşitli büyüme faktörleri üreterek tümör hücrelerinin büyüme ve motilitesini uyarmaktadır (Pollard 2004).

Tümör hücrelerinin immun sistemden kaçışı tümör büyümesini, hayatta kalımını ve metastazını ayarlayan önemli olaylardan biridir. Tümörlere karşı oluşan immun yanıt CD8+ T hücreleri, NK hücreleri ve M1 makrofajların fonksiyonuyla gerçekleşir. TAM'lar CCL22, IL-10 ve TGF-β gibi birçok faktör salgılayarak immun baskılanmaya sebep olur. Ayrıca IL-10 ve TGF-β M1 makrofajların M2 ye kutuplaşmasına sebep olur. TAM'lar ayrıca direk PD-L1/PD1 sinyal bağlantısı ile T hücre proliferasyonunu ve sitotoksisitesini inhibe ederek immun disfonkisyonu uyarır ve tümör büyümesini destekler (Kryczek ve ark 2006, Kuangve ark 2009, Chanmee ve ark 2014).

Kanser metastazı, primer tümörlerle uzak organlar arasında uyumlu eylem gerektiren çok aşamalı bir süreçtir. Metastatik tümör hücreleri kolonize olmadan önce, ikincil organların yerel mikroçevreleri erken değişikliklere uğrar bu "pre-metastatik niş" olarak adlandırılır. Son çalışmalar makrofaj toplanmasının metastatik hücrelerin hayatta kalma ve premetastatik niş oluşumu için önemli bir adım olduğunu göstermiştir (Chanmee ve ark 2014)

Kanser kök hücreleri (CSCs) kendi kendini yenileme yeteneği olan ve maligniteyi arttıran kanser hücre popülasyonudur. CSCs ayrıca kemoterapötik

ajanlara karşı direnç nedeniyle tümör nüksünü düzenleyen önemli bir itici güç olarak görülür. TAM'lar CSCs'nin hem kendi kendini yenileme hem de ilaç direncini sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve hücre dışı matris moleküllerinin karmaşık bir ağı aracılığıyla kontrol ettiği rapor edilmiştir (Chanmee ve ark 2014).

Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne 2015-2019 yılları arasında getirilen kedi ve köpeklerin meme tümörü biyopsi örneklerine ait parafin doku kesitlerinin tümör mikroçevresi, hipoksi ve anjiyogenez ile ilişkisi immunohistokimyasal yöntemle belirlenerek boyamada kullanılan CD31, VEGF, HİF-1a, CD68, CD163 antikorlarının birbirleri ile ve gözlenen histopatolojik değişikliklerle ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.Gereç

Çalışmanın materyalini Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne 2015-2019 yılları arasında teşhis amacıyla getirilen değişik ırk ve yaşlarda 34 köpek ve 12 kediye ait toplam 46 olgunun meme dokusu örneği oluşturdu. Olgulara ait tüm kesitler incelenerek tümörü en iyi temsil eden kesitlerinin parafin blokları seçilerek CD68, CD163, CD31, VEGF, HIF-1α antikorları kullanılarak tümör mikroçevresindeki hipoksi, anjiogenez, tümör ilişkili makrofajlar değerlendirildi.

Çalışma için T.C. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK)'ndan onay alındı (Tarih: 31.01.2019, Karar No:2019/04) (Bkz. EK A)

2.2.Yöntem

2.2.1. Histopatolojik İnceleme

Meme biyopsi örneklerinden rutin yöntemlere göre hazırlanmış ve Hematoksilen-Eozin (HxE) ile boyanmış histolojik doku kesitleri ışık mikroskobu (Olympus, BX51) altında incelendi. Olguların histopatolojik sınıflandırması köpeklerde (Goldschmidt ve ark 2011) ve kedilerde (Goldschmidt ve ark 2017) ayrı ayrı yapıldı. Bu sınıflandırmalara göre tümör tipleri, kitlelerin boyutları ve lokalizasyonu, hayvan türleri, yaş ve ırk bilgileri Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de sırasıyla gösterildi. Daha sonra bu olgulara ait parafin doku bloklarından Poly-L-lysin kaplı lamlara alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitler immunohistokimyasal incelemeler için kullanıldı.

Mikroskobik incelemeler sonucunda gerekli olguların fotoğrafları (Olympus, BX51) çekildi.

Tablo 2.1. Köpeklerden alınan meme tümörleri ve hayvanlara ait bilgiler.

No	Teşhis	Irk	Yaş	Lokalizasyon	Boyut
1*	İntraduktal papillar adenom	Pincher	11	Sağ kranial abdominal meme lobu	5,5 x 4,5 x 1,5 cm
2*	Kompleks karsinom	Melez	13	Bilgi kaydı yok	3 x 4 x 5,2 cm
3*	Miks karsinom	Terrier	12	Bilgi kaydı yok	8,5 x 6,5 x 4,5 cm
4*	Benign miks tümör	Rus Finosu	14	Bilgi kaydı yok	7 x 5,5 x 4 cm
5*	Basit adenom	Yorkshire terrier	5	Bilgi kaydı yok	2 x 1,3 x 1cm
6*	Miks karsinom	Setter	6,5	Bilgi kaydı yok	5 x 5 x 3 cm
7*	Miks karsinom	Terrier	8,5	Bilgi kaydı yok	1 x 1,5 x 1,8 cm
8*	Tubulopapillar karsinom	Yorksire terrier	7,5	Bilgi kaydı yok	0,5 x 0,6 x 0,8 cm
9*	Intraduktal papillar karsinom	Kurzhoar	7,5	Bilgi kaydı yok	11 x 8 x 3 cm
10*	Tubulopapillar karsinom	Bull terrier	5	Bilgi kaydı yok	0,8 x 1,2 x 1,3 cm
11*	Tubulopapillar karsinom	Pinchers	9	Bilgi kaydı yok	1,4 x 2 x 1,3 cm
12*	Miks karsinom	Terrier	12	Bilgi kaydı yok	4 x 5 x 5,5 cm
13*	Miks karsinom	Rus finosu	10	Bilgi kaydı yok	24 x 25 x 6 cm
14*	Kompleks karsinom	Sibirian husky	9	Bilgi kaydı yok	1 x 1,5 x 2 cm
15*	Miks karsinom	Terrier	11	Bilgi kaydı yok	2,5 x 1,8 x 1,1 cm
16*	Miks karsinom	Bilgi kaydı yok	Bilgi kaydı yok	Bilgi kaydı yok	4 x 2,5 x 2,3 cm
17*	Miks karsinom	Terrier	14	Bilgi kaydı yok	1 x 2 x 3 cm
18*	Benign miks tümör	Cocker	6	Bilgi kaydı yok	1,5 x 1 x 0,8 cm
19*	Miks karsinom	Golden	5	Bilgi kaydı yok	1 x 1,1 x 0,9 cm
20*	Karsinosarkom	Belçika kurdu	12	Bilgi kaydı yok	11 x 12 x 7 cm
21*	Solid karsinom	Terrier	7	Bilgi kaydı yok	5 x 3,5 x 4,2 cm
22*	Tubular karsinom	Alman kurdu	7	Bilgi kaydı yok	8 x 6,5 x 1 cm
23*	Miks karsinom	Cocker	8	Bilgi kaydı yok	3 x 1 x 2 cm
24*	Miks karsinom	Terrier	11	Bilgi kaydı yok	0,9 x 0,7 x 0,8 cm
25**	Basit adenom	Melez	13	Kranial meme lobu	5 x 6 x 4 cm
26**	Miks karsinom	Terrier	12	İnguinal meme lobu	5 x 3,5 x 2,1 cm
27*	İntraduktal papillar adenom	Golden	8	Bilgi kaydı yok	10,5x7,5x 4,5 cm
28*	Karsinosarkom	Terrier	15	Bilgi kaydı yok	10,5 x7,5*4,5 cm
29*	Mikst karsinom	Terrier	10	İnguinal meme lobu	11 x 12 x 7 cm
30*	Miks karsinom	Setter	5	İnguinal meme lobu	9 x 4,5 x 2,8 cm
31*	Kompleks karsinom	Pincher	7	Sol kranial meme lobu 2 parça	3,5 x 3,9 x 2,8 cm
32*	Miks karsinom	Terrier	13	Sağ inguinal	1 x 0,5 x 0,2 cm
33*	Tubulopapillar karsinom	Golden	4	Sağ arka meme lobu ve kasık bölgesi lobu	7,5 x 3,5 x 3,4 cm
34*	Kompleks karsinom	Kurzhoar	7	Sol arka meme lobu	6 x 5 x 4,2 cm

(*) BVKE
(**) SÜVF

Tablo 2.2. Kedilerden alınan meme tümörleri ve hayvanlara ait bilgiler.

No	Teşhis	Irk	Yaş	Lokalizasyon	Boyut
1*	Tubular karsinom	Melez	14	Bilgi kaydı yok	2x2,7x2,5 cm
2*	Solid karsinom	Melez	10	Bilgi kaydı yok	3,5x1,5x1 cm
3*	Kistik-papillar karsinom	Bilgi kaydı yok	10	Bilgi kaydı yok	3x1,4x3,1 cm
4*	Solid karsinom	Melez	11	Bilgi kaydı yok	2,5x2x1 cm
5*	Müsinöz Karsinom	Melez	11	Kranial meme lobu	8x3,5x2,5 cm
6*	Tubular karsinom	Siyam kedisi	8	Bilgi kaydı yok	3,5x3,2x1 cm
7*	Tubulopapillar karsinom	Melez	13	Bilgi kaydı yok	2x2x1,2 cm
8*	Duktal adenom	Bilgi kaydı yok	11	Bilgi kaydı yok	2x0,8x1,2cm
9*	Basit adenom	Melez	9	Bilgi kaydı yok	1,5x2x2,1cm
10*	Komedokarsinom	Melez	9	Bilgi kaydı yok	5x3,6x1,1 cm
11**	Anaplastik karsinom	Siyam kedisi	8	İnguinal meme lobu	1,5x2x1,3 cm
12**	Basit adenom	İran	1	Kranial ve kaudal torasik meme lobu	4x1,2x3 cm

(*) BVKE
(**)SÜVF

2.2.2. Meme Tümörlerinin Derecelendirilmesi

Tümörlerin malignite derecesi köpeklerde Nottingham (Elston-Ellis) sisteminin köpeklere uyarlanmış şekline göre (Pena ve ark 2013), kedilerde ise yeni bildirilen sayısal derecelendirme sistemine göre belirlendi (Mills ve ark 2015). Bu derecelendirme sistemleri Tablo 2.3 ve Tablo 2.4'de sırasıyla gösterildi. Histomorfolojik değerlendirme için Olympus BX51 mikroskop (x400 görüntü alanı çapı 0.55 mm) kullanıldı.

Tablo 2.3. Köpek meme tümörlerinin histolojik derecelendirilmesi (Pena ve ark 2013).

		PUAN
A.Tubul formasyonu	Tümörün büyük kısmında tubul yapısı >%75	1
	Solid alanlarla birlikte %10-75 arasında tubul yapısı	2
	Tubul yapısı <%10 (minimal yada hiç tubul yapısı yoksa)	3
B.Nüklear polimorfizm	Nükleusları uniform, düzenli ve küçük	1
	Nükleuslar orta derecede farklılık gösteriyor ve yer yer nükleolleri seçilebiliyorsa	2
	İleri derecede farklılık gösteriyor ve bir ya da birkaç belirgin nukleol içeriyorsa	3
C.Mitoz sayısı	0-9/10 BBA	1
	10-19/ 10 BBA	2
	≥20/ 10 BBA	3

Histolojik Malignite Derecesi	
Toplam skor(A+B+C)	Evre
3-5	1
6-7	2
8-9	3

(BBA: x400 büyütme; 0,55 mm çap, Olympus BX51 mikroskop)

Tablo 2.4. Kedi meme tümörlerinin histolojik derecelendirilmesi (Mills ve ark 2015).

Histolojik özellik		**SKOR**
A.Lenfovasküler invazyon(LVİ)	Yok	0
	Var	1
B.Nüklear form	<5% abnormal	0
	≥5% abnormal	1
C.Mitoz sayısı (Ardışık 10 BBA)	≤62	0
	>62	1
Toplam Skor(A+B+C)	**EVRE**	
0	1	Düşük derece
1	2	Orta derece
2-3	3	Yüksek derece

(BBA: x400 büyütme; 0,55 mm çap, Olympus BX51 mikroskop)

2.2.3. İmmunohistokimyasal Boyama

İmmunohistokimyasal incelemeler için Poly-L-lysin kaplı lamlara alınan kesitlere The Novolink™ Polymer Detection System (RE7150-K- Leica Microsystems) ilgili firmanın önerdiği şekilde dokulara uygulandı. Kesitler 15 dakika 60 ^{0}C'lik etüvde kurutuldu. Daha sonra ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinize ve rehidre edildi. Bu işlemlerin ardından, önce 5 dakika distile su daha sonra da pH 7,6'lık Tris Buffer solüsyonunda (TBS) bekletildi. Daha sonra 15 dakika antijen retrieval işlemi sitrat buffer solüsyonunda (pH: 6.0) 600 W'lık güçte mikrodalga fırında gerçekleştirildi. Oda ısısına kadar soğutulan lamlar deiyonize suda yıkandıktan sonra peroksidaz blok solüsyonu (Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7101) ile 30 dakika süreyle inkübe edilerek dokuların endojen peroksidaz aktivitesi engellendi. Daha sonra nonspesfik boyamaları engellemek amacıyla protein blok (Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7102) solüsyonu damlatıldı ve 30 dakika beklendi. Takipler arasında kesitler 2x5 dakika süreyle 50mM tris-buffered saline (TBS pH 7.6) ile yıkandı. Sonraki adımda, lamlar HİF-1a, CD68, CD163, CD31, VEGF primer antikorları ile kaplandı ve inkübasyona bırakıldı. Kullanılan primer antikorlara ait klon numaraları, dilüsyon oranları, inkübasyon süreleri Tablo 2.5'de özetlendi. Daha sonra lamlar post primer blok solüsyonu (Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7111) ile kaplanarak 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra Novolink Polimer solüsyonu damlatılarak 30 dk daha inkübasyona bırakıldı. Kesitler tekrar 2 kez 5'er dakika TBS'le yıkandı. DAB (3,3'-diamino benzidine tetrahydrochloride) (NovolinkTM Polymer Detection Systems, RE7162) prosedürüne uygun olarak hazırlandıktan sonra 0,2 µm'lik filtre

kâğıdından süzüldü ve her lama 100 µl olacak şekilde damlatılarak 1-2 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra distile suyla yıkanıp 5 dakika dinlendirilen kesitlere hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Daha sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilip dehidre edilerek şeffaflandırılan kesitler yapıştırıcı (Entellan-Merck) ile kapatıldı. Her boyamada kullanılan negatif kontroller de aynı prosedüre göre boyandı. Ancak primer antikor yerine TBS kullanıldı. Pozitif kontrol olarak CD31 için bir köpeğe ait hemanjiyosarkom dokusu, VEGF için sağlıklı karaciğer dokusu, HİF-1a, CD68 ve CD163 için yine bir köpeğe ait pnömonili akciğer dokusu kullanıldı. Tüm kesitlerin aynı prosedürde boyanmasından sonra ışık mikroskobunda (Olympus BX51) incelendi ve semikantitatif olarak değerlendirildi.

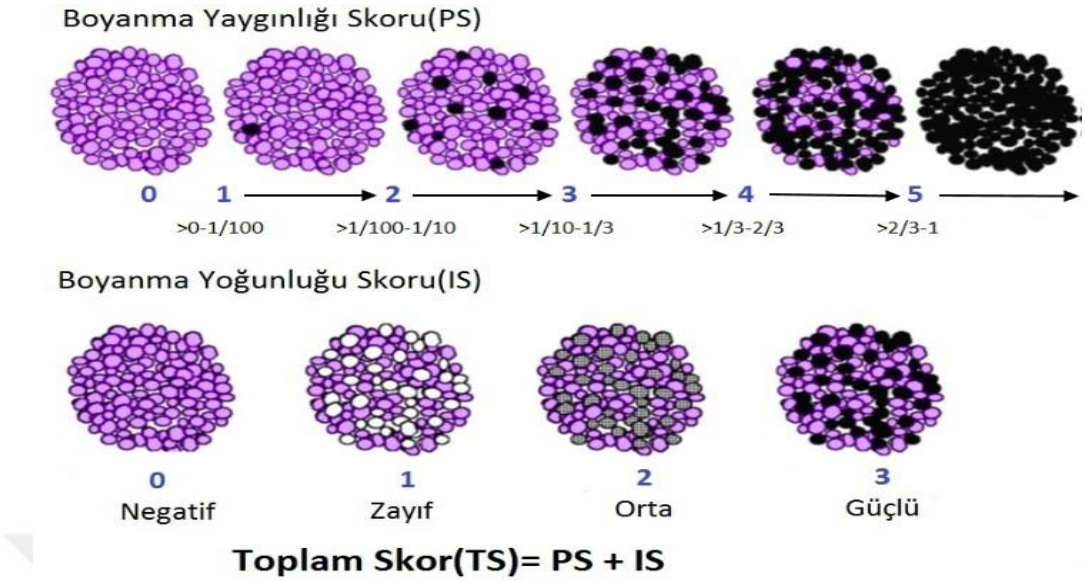
Tablo 2.5. Antikor Paneli

Antikor	Klon numarası	Firma	Sulandırma oranı	İnkübasyon Süresi	Hücresel lokalizasyon
CD31	H-3 (Mouse Monoklonal)	Santa Cruz	1:400	Oda sıcaklığı/ 1 saat	Sitoplazmik
CD68	3F103 (Mouse Monoklonal)	Santa Cruz	1:50	+4°C/ Gece	Sitoplazmik
CD163	GHI/61 (Mouse Monoklonal)	Santa Cruz	1:50	+4°C/ Gece	Sitoplazmik
VEGF	VG-1 (Mouse Monoklonal)	Santa Cruz	1:250	Oda sıcaklığı/ 1 saat	Sitoplazmik
HİF-1a	28b (Mouse Monoklonal)	Santa Cruz	1:100	+4°C/ Gece	Nükleer/ Sitoplazmik

2.2.4. İmmunohistokimyasal boyanmaların değerlendirmesi

VEGF ve HİF-1a ile işaretlenen örneklerin değerlendirilmesi Allred skorlama metoduna göre yapıldı (Choudhury ve ark 2010, Hameed ve ark 2015). Bu skorlama sistemine göre boyanma yoğunluğu ve boyanma yaygınlığı standart skorlama sistemlerine benzer şekilde iki kategoride değerlendirildi. Bu metoda göre; boyanma yoğunluk (koyuluk) skoru; 0 (boyanma yok), 1 (zayıf), 2 (orta), 3 (yoğun/koyu) olarak belirlendi. Boyanma yaygınlığı ise, boyanan hücrelerin incelenen alandaki tüm hücrelere oranı temel alınarak şu şekilde belirlendi: 0 (boyanma yok), 1 (>0-1/100), 2 (>1/100-1/10), 3 (>1/10-1/3), 4 (>1/3-2/3), 5 (>2/3-1). Boyanma yoğunluğu skoru ile boyanma yaygınlığı değeri toplanarak her bir olgu için 0-8 arasında Allred skoru belirlendi. (Tablo 2.6, Şekil 2.1)

Şekil 2.1. Allred skorlama metodu (Choudhury ve ark (2010)'dan uyarlanmıştır).



Tablo 2.6. Allred skorlama metodu (Hameed ve ark (2015)'dan uyarlanmıştır).

Boyanma yaygınlık skoru	**PS***	**Boyanma yoğunluk skoru**	**IS***
0	0	Boyanma yok	0
>0-1/100	1	Zayıf	1
>1/100-1/10	2	Orta	2
>1/10-1/3	3	Yoğun	3
>1/3-2/3	4		
>2/3-1	5	**Allred Skoru= PS+IS**	

* PS: Paint Score, IS: Intensity score

Mikrodamar dansitesini (MDD) belirlemek için örnekler immünohistokimyasal olarak CD31 boyanması ile değerlendirildi. MDD'nin belirlenmesinde Weidner ve ark. (1991) kullandıkları tekniğin modifikasyonu kullanıldı. Buna göre kesitler ilk olarak ışık mikroskobunun küçük büyütmesinde (x40 ve x100) tarandı. Daha sonra en çok vaskülarizasyona sahip 'hot spots'olarak adlandırılan alanlar x100'lük büyütmede seçildi. Mikrodamar sayımı ×200'lük büyütmede 5 farklı 'hot spots'alanında yapıldı. CD31 ile pozitif boyanan endotel hücre veya hücre kümeleri sayıma dahil edildi. Normal meme dokusu, fibrozis, nekroz ve inflamasyon olan alanlar ile kas duvarları olan damarlar değerlendirilmedi. Kesitlerde beş yüksek vaskülarizasyon alanında sayılan mikrodamar sayısının ortalaması alınarak MDD hesaplandı.

Makrofajlar immünohistokimyasal olarak CD68 ve CD163 boyanması ile değerlendirildi. Makrofaj sayısının belirlenmesinde Monteiro ve ark. (2018) kullandıkları teknik kullanıldı. Buna göre kesitler ilk olarak ışık mikroskobunun küçük büyütmesinde (x40 ve x100) tarandı ve en yüksek makrofaj olan 'hot spots'olarak adlandırılan 5 alan belirlendi. Makrofaj sayımı her alan için ×400'lük büyütme alanında yapıldı. Her alanda CD68 ve CD163 ile boyanan makrofaj hücrelerinin toplamı sayıma dahil edildi.

3.2.5. İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS for Windows 25 paket programında yapılmıştır.

Gruplanabilen klinikopatolojik verilerin birbirleri ve immünohistokimyasal veriler ile karşılaştırılmasında Ki-kare testi, ortalama değerler ile diğer klinikopatolojik verilerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi (iki grup arasındaki karşılaştırma) ve Kruskal Wallis testi (ikiden fazla grup arasındaki karşılaştırma) kullanılmıştır. Kantitatif değişkenler için değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Belirteçlerin benign ve malign tümörlerde birbiriyle aralarında anlamlı korelasyon olup olmadığı Sperman'ın Korelasyon testiyle araştırılmış, $p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmistir.

3. BULGULAR

İncelenen meme tümörü olgularının 34 adedi köpek ve 12 adedi kedilere ait olıp çoğunlukla mastektomi materyallerinden oluşmuştu. Bu materyallerin çoğunluğunun lokalizasyon bilgileri bildirilmemişti.

Olguların en küçüğü köpeklerde 1x0,5x0,2 cm kedilerde ise 2x0,8x1,2 cm boyutlarındaydı. En büyüğü ise köpeklerde yaklaşık 3600g ve 24x25x6 cm boyutlarında, kedilerde ise 8x3,5x2,5 cm boyutlarındaydı.

Köpeklerde (Şekil 3.1) ve kedilerde 1'er olguda aynı meme zincirinde 1'den fazla kitle ile karşılaşıldı Ayrıca köpeklerde 2 adet olguda kasık bölgesi (iyi diferensiye mast hücre tümörü) ve sırt bölgesi (intrakutanöz kornifiye epitelyoma) olmak üzere farklı tümör tespit edildi (Şekil 3.2).

Köpeklerde ve kedilerde incelenen tümörler genellikle elastik kıvamlı kesit yüzeyleri taşkın (Şekil 3.5), hemorajik ve bazıları ise kistik görünümdeydi. Kistik olan olguların içlerinde genellikle sarımsı kahverenkli bazende yeşil renkli kötü kokulu eksudat mevcuttu ve bir kısmında da lümene doğru papillar üremeler olduğu dikkati çekti. Bazı olguların kesit yüzleri boz beyaz renkli nemli ve lobüler görünümdeydi. Bazı olgularda ise dış kısımları elastik iç kısımlarında ise yer yer sert odaklar mevcuttu. Bunların kesit yüzleri boz beyaz renkli ve kemik benzeri kalsifiye alanlar mevcuttu (Şekil 3.4). Bu alanlar zor kesiliyordu ve çıtırtı sesi duyuluyordu. Bazı olgularda deri yüzeyinde yer yer ülser alanlarının olduğu dikkati çekti (Şekil 3.2).



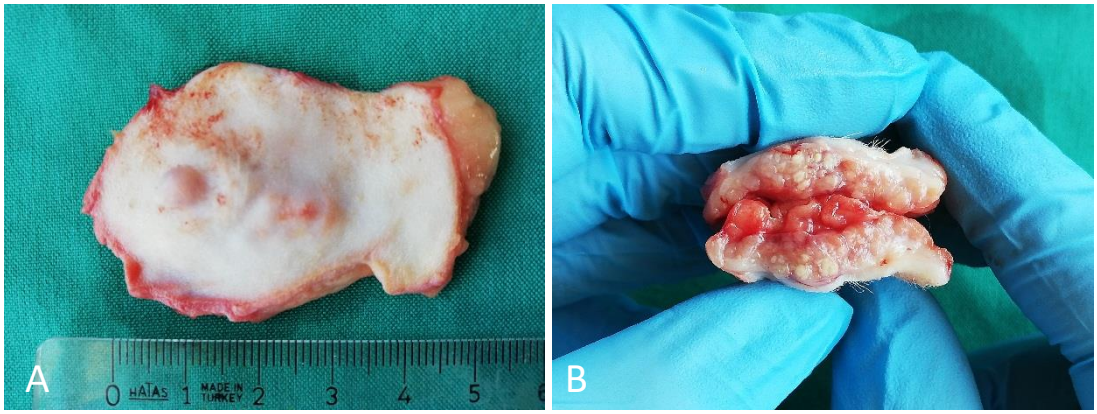
Şekil 3. 1. Miks karsinom, Köpek; aynı meme zincirinde karşılaşılan birden fazla kitle, olgu no:30



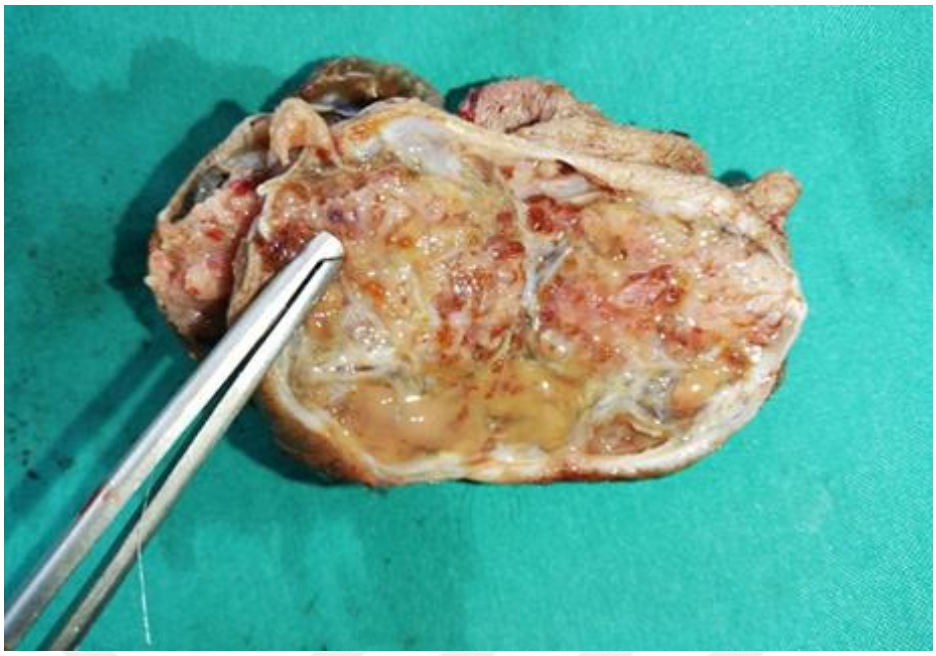
Şekil 3.2. Kompleks karsinom, köpek. Deride ülseratif alanlar (sol) ve sırt bölgesinden alınmış kitle (sağ) (intrakutanöz kornifiye epitelyoma), olgu no:34



Şekil 3.3. Miks karsinom, köpek. Hemorajik görünümlü (A), kesit yüzünde kalsifiye odak (B), olgu no:32



Şekil 3.4. Komedokarsinom, kedi. Solgun (A), kesit yüzü boz beyaz renkli ve lobuler görünümlü kitle (B), olgu no:10



Şekil 3.5. Kompleks karsinom, köpek. Kesit yüzü taşkın görünümde ve kesit yüzünde sarımsı kahverenkli eksudat, olgu no:34

Köpeklerde incelenen olguların 28'i malign, 6'sı benign olarak sınıflandırıldı. Kedilerdeki olguların ise 9'u malign, 3'ünü benign tümörler oluşturuyordu. Köpeklerin yaşları 4-15 yaş (ort. 9.24) ve kedilerin yaşları 1-14 yaş (ort. 9.6) arasında değişti. Köpeklerde en yüksek meme tümörü insidensi 5-8, kedilerde ise 9-12 yaş aralığında görüldü (Tablo 3.1). Ancak 1 köpeğin ırk ve yaş bilgisi bildirilmemişti.

Köpek ırkları çeşitlilik göstermekle birlikte en fazla tümör saptanan köpek ırkının (n:14) Terrier olduğu ve bunların çoğunluğu malign özellik (n:13) gösterirken; tümör tipi olarak da en çok miks karsinom (n:9) olduğu dikkati çekti. Bunu Golden (n:3), Pinchers (n:3), Cocker (n:2), Rus finosu (n:2), Setter (n:2), Kurzhoar (n:2), Melez (n:2) ve Alman çoban, Belçika Kurdu, Husky (n:1'er) ırkları izliyordu (Tablo 3.2). Kedilerde ise en fazla Melez (n:7) ırkta tümör tespit edildi. Bu ırkta görülen tümör tipi olarak da solid karsinom (n:2), Basit adenom, tubular karsinom, tubulopapillar karsinom, müsinöz karsinom ve komedikarsinom (n:1'er) olduğu görüldü. Ancak 2 kedinin ırk bilgisi bildirilmemişti (Tablo 3.3).

Tablo 3.1. Köpek ve kedilerde meme tümörlerinin yaşa göre dağılımı

	0-4 yaş	5-8 yaş	9-12 yaş	13-16 yaş	Y.B	Toplam
Köpek (ort. yaş 9.24)	1	15	12	5	1	34
Kedi (ort. yaş 9.6)	1	2	**7**	2	-	12

YB: Yaşı bilinmeyen

Tablo 3.2. Köpeklerde meme tümörlerinin histolojik sınıflandırması ve ırklara göre dağılımı.

BENİGN	**Terrier**	**Pinchers**	**Golden**	**Diğer**	**Bilinmeyen**	**Toplam**
Basit Adenom	1	-	-	1	-	2
İntraduktal papillar adenom	-	1	1	-	-	2
Benign miks tümör	-	-	-	2	-	2
Toplam adet	**1**	**1**	**1**	**3**		**6**
MALİGN						
Tubular Karsinom	-	-	-	1	-	**1**
Tubulopapillar Karsinom	2	1	1	-	-	**4**
Solid Karsinom	1	-	-	-	-	**1**
Karsinosarkom	1	-	-	1	-	**2**
Kompleks Karsinom	-	1	-	2	-	**3**
Miks Karsinom	9	-	1	5	1	**16**
İntraduktal Papillar Karsinom	-	-	-	1	-	**1**
Toplam adet	**13**	**2**	**2**	**10**	**1**	**28**
GENEL TOPLAM	**14**	**3**	**3**	**13**	**1**	**34**

Tablo 3.3. Kedilerde meme tümörlerinin histolojik sınıflandırması ve ırklara göre dağılımı.

BENİGN	**Melez**	**Siyam**	**İran**	**Bilinmeyen**	**Toplam**
Basit Adenom	1	-	1	-	2
Duktal adenom	-	-	-	1	1
Toplam	**1**	**-**	**1**	**1**	**3**
MALİGN					
Tubular Karsinom	1	1	-	-	2
Tubulopapillar Karsinom	1	-	-	-	1
Papillar Kistik Karsinom	-	-	-	1	1
Solid Karsinom	2	-	-	-	2
Müsinöz Karsinom	1	-	-	-	1
Anaplastik Karsinom	-	1	-	-	1
Komedokarsinom	1	-	-	-	1
Toplam	**6**	**2**	**-**	**1**	**9**
GENEL TOPLAM	**7**	**2**	**1**	**2**	**12**

3.1. Histopatolojik bulgular

Çalışmada kullanılan meme tümörleri histopatolojik olarak incelenerek sınıflandırıldı. Bu sınıflandırmada köpeklerde Goldschmidt ve ark (2011) ve kedilerde Goldschmidt ve ark (2017)'nın sınıflandırması ve kriterleri esas alındı (Tablo 3.2 ve 3.3).

Basit adenom olarak sınıflandırılan tümörlerde yuvarlak, oval çekirdekli eozinofilik sitoplazmalı genellikle uniform şekilde dizilmiş tubuller oluşturan neoplazik epitel hücreleri gözlendi.

Duktal adenom olarak değerlendirilen tümörde şeritler ya da demetler halinde dizilmiş uniform yuvarlak kübik şekilli bazaloid epitel hücrelerinin belirgin bir fibrovasküler stromayla desteklendiği gözlendi.

İntraduktal papillar adenomda ise hücre yapısı basit adenoma benzemekle birlikte kanal lümenlerinin sekresyon ile dolu olduğu ve kistik genişlemeler gözlendi. Kistik genişlemelerden ise yer yer kanal lümenlerine doğru oval çekirdekli, eozinofilik sitoplazmalı neoplastik hücrelerin papillar tarzda hiperplaziler yaptığı gözlendi.

Benign mix tümörlerde çoğu üniform yapıda oval ya da yuvarlak çekirdekli eozinofilik sitoplazmalı tubul ve kordonlardan oluşan neoplazik epitel hücreleri dikkati çekti. Bu hücrelere yer yer kıkırdak ve kemik dokuya metaplazi alanları eşlik etmekteydi.

Tubular karsinomlarda genellikle tubular dizilim gösteren hipokromatik çekirdekli ve eozinofilik sitoplazmalı değişik büyüklükte neoplastik hücre proliferasyonları gözlendi. Mitotik aktivite köpeklerde görülen bir olguda orta seviyedeyken kedilerde görülen 2 olguda düşüktü.

Papillar-kistik karsinomda hücresel özellikleri tubular karsinoma benzemekle birlikte belirgin şekilde genişlemiş kistik tubular yapılar ve bu yapıların etrafında fibroz bağ doku ile desteklenmiş olduğu gözlendi. Genişlemiş tubul lümenlerinin eozinofilik bir materyalle dolu olduğu ve yer yer de dejenere yangı hücrelerinin varlığı dikkati çekti.

Tubulopapillar karsinom olarak teşhis edilen olgularda hücreleri farklı büyüklüklerde ve yuvarlaktan silindiriğe kadar değişen şekillerde anaplastik hücrelerin değişik büyüklüklerde lümenleri bulunan tubuler yapılar oluşturdukları ve bu yapıların da yer yer lümenlerine doğru atipik epitel hücre proliferasyonlarından oluşan papiller tarzda çıkıntılar oluşturduğu dikkati çekti. Köpeklerde tubulopapillar karsinom olarak sınıflandırılan olgularda mitotik skor orta ve yüksek seviyedeyken kedilerde teşhis edilen tek olguda mitotik aktivite düşüktü.

Kompleks karsinom olarak değerlendirilen olguların genelinde belirgin eozinofilik sitoplazmalı anizositozis ve anizonükleozis gösteren düzensiz tubuler ve solid yapılar oluşturan atipik epitel hücrelerine sıklıkla iğ, bazende yıldız şekilli myoepitel hücrelinin eşlik ettiği gözlendi. Köpeklerde teşhis edilen olguların genelinin grade 1 ve 2 olduğu dikkati çekti.

Anaplastik karsinom olarak teşhis edilen olguda tek tek ya da küçük demetler halinde büyük sitoplazmalı son derece pleomorfik şekilli epitel hücreleri gözlendi. Yer yer çok çekirdekli hücrelere yangı hücreleri eşlik ediyordu ve mitotik aktivite yüksekti.

Solid karsinom olarak teşhis edilen olgularda geneli uniform olan epitel hücrelerinin tubul ya da lümen oluşturmadan, solid yapılar şeklinde proliferasyonu dikkati çekti. Mitotik aktivite düşüktü.

Müsinöz karsinom olarak sınıflandırılan olguda vakuollü tümör hücrelerinin etrafında bol miktarda müsinöz materyalle çevrili oldukları görüldü. Mitotik aktivite düşük, grade ise orta seviyedeydi.

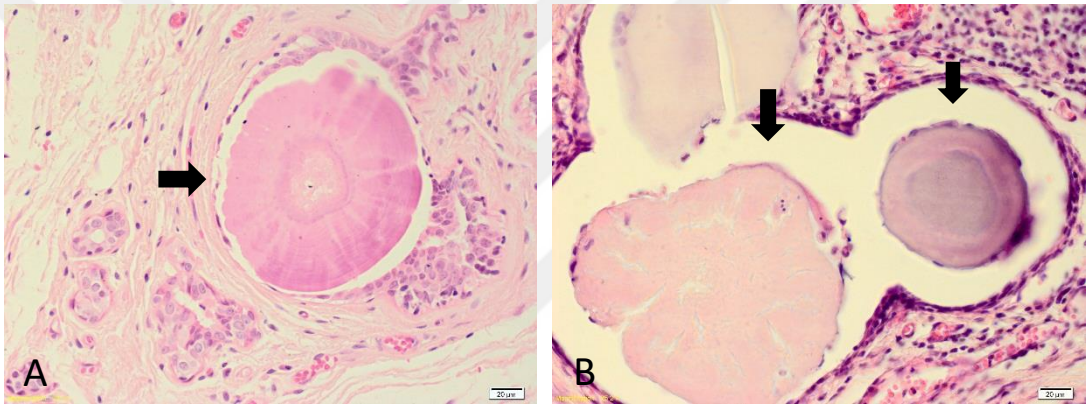
Komedokarsinom teşhis edilen olguda ise neoplastik hücre kümelerinin merkezinde yangı hücrelerinin de dahil olduğu adacıklar halinde nekroz alanlarının olduğu dikkati çekti. Kedide teşhis edilen bu olguda mitotik aktivite düşüktü ve lenfovasküler invazyon mevcuttu.

Miks karsinom teşhis edilen olgular yuvarlak, iri çekirdekli, eozinofilik sitoplazmalı, anizositozis gösteren atipik epitel hücre proliferasyonlarından oluşuyorlardı. Bu hücrelere her kesitte iğ ve mekik şekilli myoepitel hücreleri ile atipi göstermeyen kemik ve kıkırdak dokuya metaplazi ve kireçlenme alanları eşlik ediyordu. Bazı olgularda çok çekirdekli tümör tipi dev hücreleri gözlendi (Şekil 3.8).

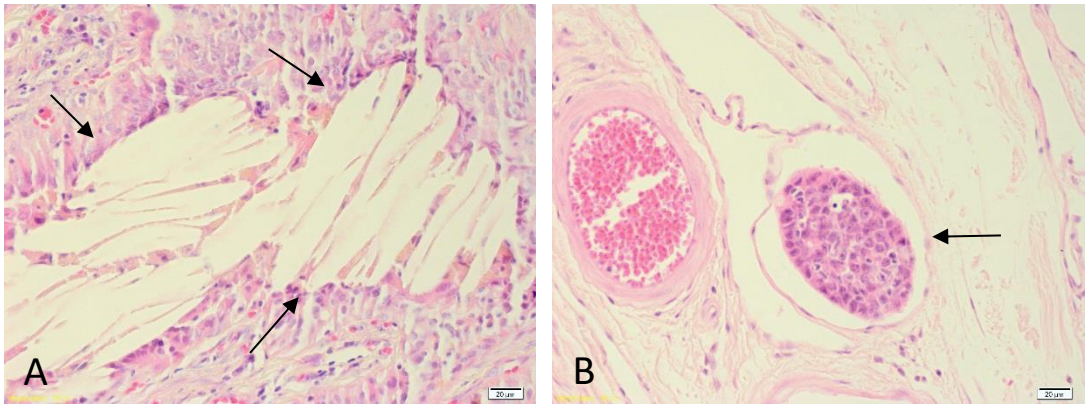
Miks karsinomların çoğunluğunu (n:7) grade 3 tümörler oluşturuyordu. Mitotik aktivite ise orta ve yüksekti seviyedeydi.

Karsinosarkomlarda ilk dikkati çeken osteoid üretimiyle karakterize kıkırdak ve kemik dokuya metaplazi alanları oldu. Bu alanlarda belirgin anisositozis ve anizonükleozis gösteren atipik anaplastik epitel hücre proliferasyonları içeren karsinomatöz alanlar gözlendi. Bazı olgularda bez ve kanal lümenerinde dökülmüş atipik epitel hücreleri ve yangısal hücreler gözlendi. Mitotoik aktivite olguların hepsinde yüksekti.

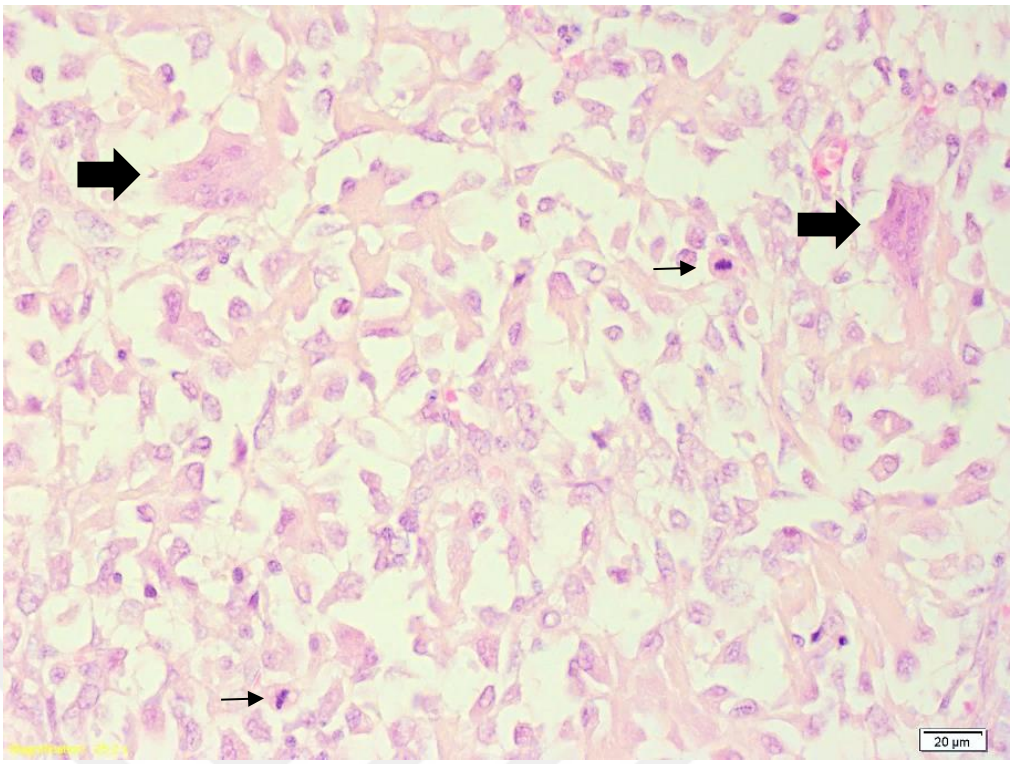
Olguların 2'sinde ektazik bez ve kanal lümenlerinde farklı büyüklüklerde corpora amilasealar (Şekil 3.6) ile kolesterol kristalleri (Şekil 3.7) rastlandı.



Şekil 3.6. Basit adenom, Kedi, (A), olgu no:9. Anaplastik karsinom, kedi, (B) olgu no:11 ektazik bez ve kanal lümenlerinde farklı büyüklüklerde korpora amilasealar (oklar).



Şekil 3.7. Miks karsinom köpek, kolesterol kristalleri (oklar) (A), olgu no:19. Karsinosarkom, köpek, lenf damarında tümör hücre embolisi (ok) (B) olgu no:28.



Şekil 3.8. Miks karsinom, köpek; çok çekirdekli tümör tipi dev hücreler (kalın oklar) ve mitotik figürler (ince oklar), olgu no:3.

Olguların histopatolojik sınıflandırmaları ile klinikopatolojik özellikleri; tümör büyüklüğü, nekroz varlığı, mitoz sayısı, histolojik grade, lenfovasküler invazyon bakımından kedi ve köpeklerde ayrı olarak değerlendirildi (Tablo 3.4 ve Tablo 3.5). Benign tümörlerde histolojik grade ve mitotik skor malignite kriteri olduğu için değerlendirilmezken, malign tümörler köpeklerde Pena ve ark (2013)'ın, kedilerde ise Mills ve ark (2015)'ın önerdiği şekilde irdelendi. Buna göre köpeklerde 10 farklı alanda x40'lık büyütmedeki mitoz sayıları köpeklerde 0-9, 10-19, ≥20 olmak üzere 3 grup, kedilerde ise ≤62 ve >62 olmak üzere iki grup şeklinde değerlendirildi. Köpeklerde 0-9 gruptaki olgu sayısı 5, 10-19 gurubundaki olgu sayısı 9 ve ≥20 olgu sayısı ise toplam 14 adetti. Kedilerdeki olguların ise ≤62 olan olgu sayısı 6 iken, 3 adet olguda >62 idi. Köpek ve kedilerdeki her grade'deki olgu sayıları Tablo 3.6'da özetlendi.

Olgular tümör boyutları bakımından değerlendirilirken köpeklerde <3cm, 3-5cm ve >5cm; kedilerde ise <2cm, 2-3cm, >3cm olmak üzere 3'er katagoride değerlendirildi. Köpeklerde en fazla olgu (n:17) 5 cm'den büyük tümörlerde

bulunurken; bunun 4 tanesini benign tümörlerin oluşturduğu görüldü. Kedilerde ise 2 cm'den küçük olgunun bulunmadığı dikkati çekti.

Köpeklerde 15 olguda (13 malign 2 benign) tümör içerisinde lokal ve bazı tümörlerde de geniş alanlar şeklinde nekroz mevcutken, yanlızca 2 olguda lenfovasküler invazyon tespit edildi. Kedilerde ise benign tümörlerde nekrotik alan gözlenmezken malign tümürler arasında 8 olguda nekroz gözlendi. Ayrıca 5 olguda lenfovasküler invazyon mevcuttu.

Çalışma materyalini oluşturan herbir olguya ait IHC sonuçları, lenfovasküler invazyon (LVİ) durumu, tümör nekrozu, mitotik skor ve grade bilgileri ile histopatolojik teşhis bilgileri köpek ve kediler için ayrı olarak Tablo 3.4 ve Tablo 3.5 'de gösterildi. Ayrıca köpek ve kedilerde her gradedeki vaka sayıları Tablo 3.6' da özetlendi.

Tablo 3.4. Köpeklerden alınan meme tümörlerinin İHC skorları ve histopatolojik özellikleri

No	TEŞHİS	MDD (CD31)	VEGF TS	HİF-1A TS	CD68	CD163	LVİ	Nekroz	Mitotik skor	Grade
1	İntraduktal papillar adenom	45,6	8	5	103	95	-	-	-	-
2	Kompleks karsinom	108,2	5	4	30	24	-	+	14	1
3	Miks karsinom	37,6	8	6	30	66	-	+	110	3
4	Benign miks tümör	69,2	3	2	93	102	-	-		-
5	Basit adenom	53,2	6	2	17	7	-	-		-
6	Miks karsinom	43,4	4	6	103	115	-	-	60	3
7	Miks karsinom	56,8	8	6	80	20	-	-	6	1
8	Tubulopapillar karsinom	28,4	5	4	13	11	-	-	16	1
9	Intraduktal papillar karsinom	33	4	6	62	35	-	-	30	2
10	Tubulopapillar karsinom	62,6	4	2	40	25	-	+	13	2
11	Tubulopapillar karsinom	61,8	4	5	10	30	-	-	18	2
12	Miks karsinom	103,8	3	2	0	90	-	+	85	3
13	Miks karsinom	177,4	3	4	26	80	-	+	150	3
14	Kompleks karsinom	40	5	6	8	13	-	+	7	2
15	Miks karsinom	28,8	4	7	61	85	-	-	13	3
16	Miks karsinom	20,8	3	4	12	92	-	-	16	2
17	Miks karsinom	32,4	4	7	6	11	-	+	30	2
18	Benign miks tümör	67,2	7	6	5	9	-	+	-	-
19	Miks karsinom	37,4	6	5	36	10	-	-	13	2
20	Karsinosarkom	192,2	6	4	93	0	-	+	100	3
21	Solid karsinom	45,6	6	6	38	90	+	+	8	1
22	Tubular karsinom	95,6	3	6	98	90	-	-	5	1
23	Miks karsinom	46	7	6	42	83	-	+	35	3
24	Miks karsinom	28,2	7	4	12	20	-	-	40	3
25	Basit adenom	15,4	3	6	118	123	-	-		-
26	Miks karsinom	27,2	5	5	96	125	-	-	12	2
27	İntraduktal papillar adenom	38,8	6	6	78	108	-	+	-	-
28	Karsinosarkom	64,4	8	7	101	118	+	+	100	3
29	Miks karsinom	58,2	8	7	14	41	-	-	50	3
30	Miks karsinom	26,8	5	6	15	18	-	-	8	2
31	Kompleks karsinom	23,2	7	5	54	91	-	-	14	1
32	Miks karsinom	65,6	6	3	23	48	-	+	80	3
33	Tubulopapillar karsinom	16,8	4	3	90	96	-	+	30	2
34	Kompleks karsinom	62,2	6	7	120	118	-	-	45	2

LVİ: Lenfovasküler invazyon +=var, - = yok

Nekroz: +=var, - = yok

Mitotik skor (BBA: x400 büyütme; 0,55 mm çap, Olympus BX51 mikroskop)

TS:Toplam Skor= Boyanma yaygınlığı skoru(PS)+Boyanma yoğunluğu skoru(IS)

Tablo 3.5. Kedilerden alınan meme tümörlerinin İHC skorları ve histopatolojik özellikleri

No	TEŞHİS	MDD (CD31)	VEGF TS	HİF-1A TS	CD68	CD163	LVİ	Nekroz	Mitotik skor	Grade
1	Tubular karsinom	51	5	2	0	41	+	+	50	3
2	Solid karsinom	37,6	6	2	29	75	+	+	82	3
3	Kistik-papillar karsinom	34,4	3	3	0	48	-	-	45	1
4	Solid karsinom	28,2	8	6	0	7	-	-	25	2
5	Müsinöz Karsinom	52,2	5	4	68	65	-	+	30	2
6	Tubular karsinom	64,8	3	3	3	0	+	+	70	3
7	Tubulopapillar karsinom	73,2	5	6	0	0	-	-	35	2
8	Duktal adenom	55,2	5	5	0	0	-	-	-	-
9	Basit adenom	19,6	6	4	10	5	-	-	-	-
10	Komedokarsinom	62,8	6	6	0	0	+	+	35	3
11	Anaplastik karsinom	42,6	6	6	0	0	+	+	85	3
12	Basit adenom	47,8	6	2	5	4	-	-	-	-

LVİ: Lenfovasküler invazyon +=var, - = yok
Nekroz: +=var, - = yok
Mitotik skor (BBA: x400 büyütme; 0,55 mm çap, Olympus BX51 mikroskop)
TS: Toplam Skor= Boyanma yaygınlığı skoru(PS)+Boyanma yoğunluğu skoru(IS)

Tablo 3.6. Köpek ve kedilerde histolojik grade ve vaka sayıları.

Grade	**1**	**2**	**3**
Köpek	6	11	11
Kedi	1	3	5

3.2. İmmunohistokimyasal bulgular

Çalışma materyalini oluşturan olguların ortalama IHC sonuçları ile klinikopatolojik parametreler köpek ve kediler için Tablo 3.7, Tablo 3.8 ve Tablo 3.9'da özetlendi.

Tablo 3.7. Benign ve Malign tümörlerde ortalama İHC sonuçları **(Ort±sd)**

		n	**MDD**	**VEGF**	**HİF-1A**	**CD68**	**CD163**
Köpek	**Benign**	6	48,23±19,99	5,50±2,07	4,50±1,97	69,00±46,93	74,00±51,95
	Malign	28	58,01±43,14	5,29±1,65	5,11±1,50	46,89±36,65	58,75±40,43
		p	0,843	0,809	0,522	0,341	0,494
Kedi	**Benign**	3	40,87±18,79	5,67±0,58	5,00±1,73	5,00±5,00	3,00±2,65
	Malign	9	49,64±15,22	5,22±1,56	3,44±1,42	11,11±23,35	26,22±31,02
		p	0,600	0,600	0,209	0,600	0,600

Tablo 3.8. Köpeklerdeki malign tümörlerin ortalama İHC sonuçları ile histopatolojik ve klinikopatolojik özellikleri **(Ort±sd)**

		n	MDD	VEGF	HİF-1A	CD68	CD163
Histolojik Grade	1	6	59,63±35,10 [ab]	5,67±1,75	5,17±0,98	52,17±31,95	54,33±39,66
	2	11	38,27±16,75 [b]	4,55±0,93	5,09±1,58	45,00±40,93	52,09±45,66
	3	11	76,87±57,50 [a]	5,82±1,99	5,09±1,76	45,91±37,69	67,82±37,30
	p		0,090	0,208	0,985	0,771	0,817
Tümör Büyüklğü	0-3cm	9	40,80±15,62 [a]	5,56±1,51	4,89±1,45	34,89±26,11	33,89±31,39
	3-5cm	7	34,60±10,32 [a]	4,86±1,35	5,71±0,95	44,57±39,86	76,29±44,74
	>5cm	12	84,58±54,50 [b]	5,33±1,97	4,92±1,78	57,25±41,20	67,17±37,74
	p		**0,013**	0,720	0,525	0,439	0,092
Mitotik Skor	0-9	5	52,96±26,17	5,40±1,82	6,00±0,00	47,80±39,73	46,20±40,06
	10-19	9	44,27±28,62	4,78±1,20	4,56±1,33	39,11±28,05	54,78±43,17
	≥20	14	68,66±53,73	5,57±1,87	5,14±1,75	51,57±41,89	65,79±40,36
	p		0,339	0,602	0,196	0,866	0,622
LVİ	Var	2	55,00±13,29	7,00±1,41	6,50±0,71	69,50±44,55	104±19,80
	Yok	26	58,25±44,74	5,15±1,62	5,00±1,50	49,63±38,93	58,78±41,94
	p		0,529	0,159	0,190	0,339	0,132
Nekroz	Var	13	76,35±54,78	5,31±1,70	4,62±1,80	40,54±33,54	57,23±38,94
	Yok	15	42,12±20,81	5,27±1,67	5,53±1,06	52,40±39,46	60,07±42,99
	p		**0,022**	0,964	0,201	0,440	0,751

a,b Aynı sütundaki farklı harfler istatistik olarak anlamlıdır. p<0,05

Tablo 3.9. Kedilerdeki malign tümörlerin ortalama İHC sonuçları ile histopatolojik ve klinikopatolojik özellikleri **(Ort±sd)**

		n	MDD	VEGF	HİF-1A	CD68	CD163
Histolojik Grade	1	1	34,40±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00	-	48,00±0,00
	2	3	51,20±22,52	6,00±1,73	3,00±1,00	22,67±39,26	24,00±35,68
	3	5	51,76±12,01	5,20±1,30	3,80±1,79	6,40±12,70	23,20±33,97
	p		0,509	0,364	0,820	0,864	0,678
Tümör Büyüklüğü	2-3 cm	4	48,75±18,82	6,00±1,41	3,00±1,15	-	12,00±19,61
	>3cm	5	50,36±14,00	4,60±1,52	3,80±1,64	20±29,47	37,60±35,66
	p		1,000	0,413	0,556	---	0,413
Mitotik Skor	≤62	6	50,30±16,89	5,33±1,63	3,17±1,17	11,33±27,76	26,83±28,07
	>62	3	48,33±14,48	5,00±1,73	4,00±2,00	10,67±15,95	25,00±43,3
	p		1,000	1,000	0,548	0,381	0,905
LVİ	Var	5	51,76±12,01	5,20±1,30	3,80±1,79	6,40±12,70	23,20±33,97
	Yok	4	47,00±20,21	5,25±2,06	3,00±0,82	17,00±34,00	30,00±31,51
	p		0,730	0,730	0,556	0,905	0,556
Nekroz	Var	8	46,70±13,25	5,25±1,67	3,38±1,51	12,50±24,56	29,50±31,45
	Yok	1	73,20±0,00	5,00±0,00	4,00±0,00	-	-
	p		0,222	0,889	0,667	---	---

Aynı sütundaki grup içi veriler arasında istatistiksel fark bulunamamıştır. p>0,05

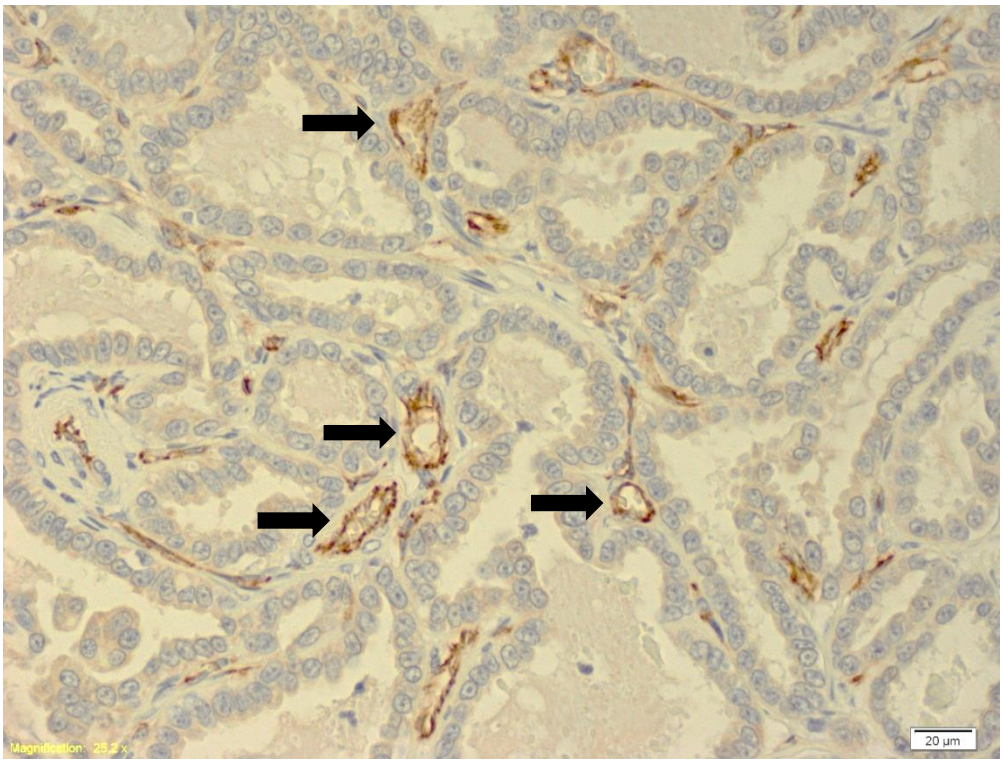
3.2.1. Mikrodamar dansitesi

MDD'sini belirlemek amacıyla CD31 antikoru ile işaretlenen kedi ve köpeklere ait tüm olgularda pozitif immunreaksiyon izlendi. Pozitif kontrol için köpek hemanjiyosarkom olgusu kullanıldı. Sitoplazmik boyanmalar pozitif kabul edildi (Şekil 3.9-12).

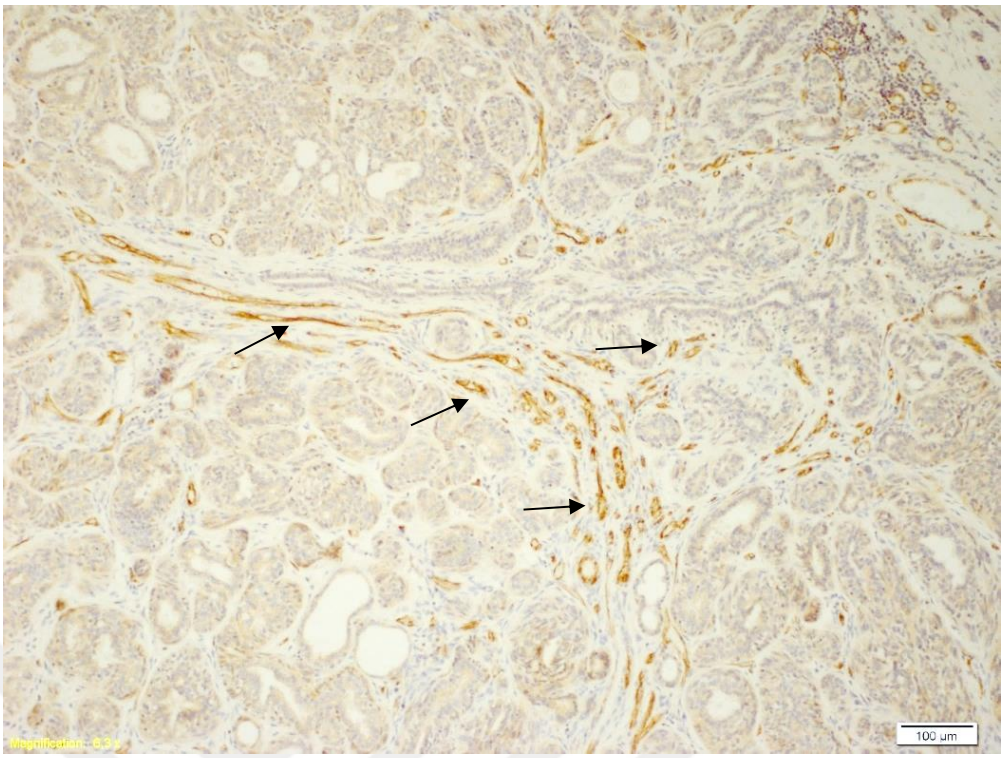
Köpeklerde incelenen benign tümörlerin (48,23±19,99) MDD'si malign tümörlere (58,01±43,14) kıyasla düşük olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı (p>0,05). (Tablo 3.7) Kedilerdede yine köpeklere benzer şekilde incelenen benign tümörlerin (40,87±18,79) MDD'si malign tümörlere (49,64±15,22) kıyasla düşüktü ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı (p>0,05) (Tablo 3.7). İncelenen malign tümörlerde köpekler için MDD derecesi

tümör büyüklüğü arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanırken ($p<0,05$). LVİ, histolojik grade, mitotik skor ile istatiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Ayrıca tümör büyüklüğü 0-3 cm olan tümörlerle 3-5 cm olan tümörler arasında MDD derecesi anlamsızken ($p>0,05$), 0,3 cm ve >5 cm ile 3-5 cm ve >5 cm arasında olan tümörlerde MDD dereceleri arasındaki istatistiksel fark önemliydi ($p<0,05$) (Tablo 3.8). Grade'ler ayrı ayrı değerlendirildiğinde Grade 2 ile Grade 3 arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıyken ($p<0,05$), Grade 1 ile Grade 2 ve Grade 1 ile Grade3 arasındaki ilişki anlamsızdı ($p>0,05$). Ayrıca nekroz görülen olguların MDD'si (76,35±54,78) nekroz görülmeyen olgulara kıyasla daha yüksekti (42,12±20,81) ve istatistiksel fark önemliydi ($p<0,05$) (Tablo 3.8).

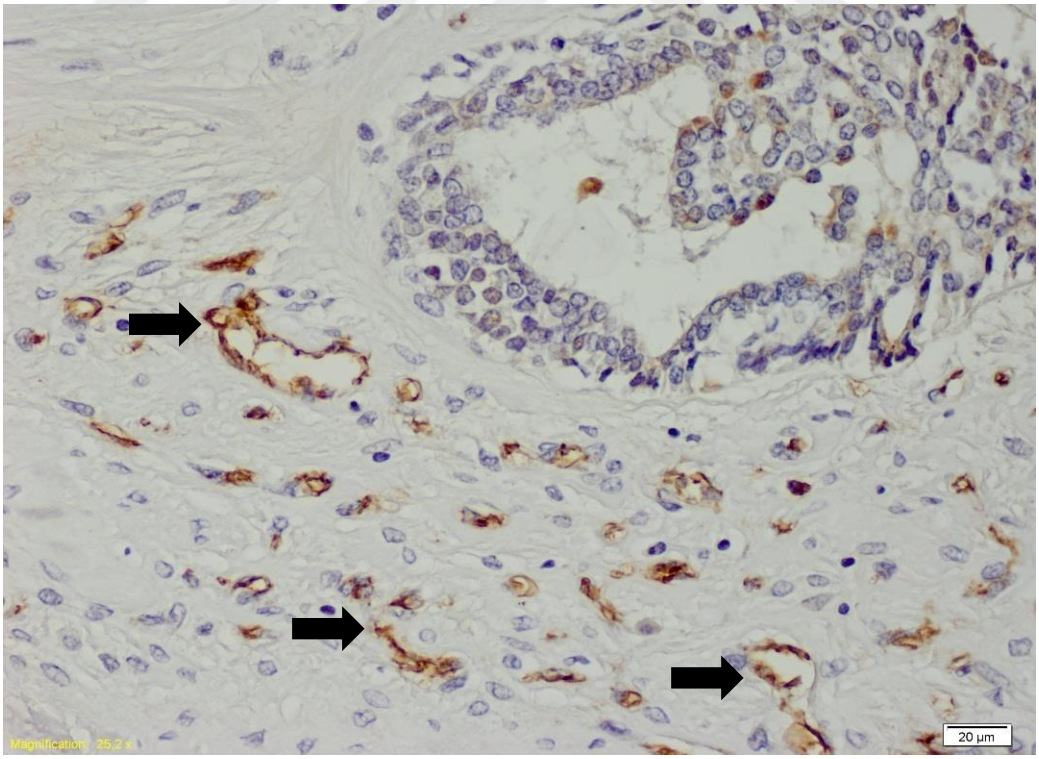
Kedilerde yine köpeklere benzer şekilde incelenen benign tümörlerin (40,87±18,79) MDD'si malign tümörlere (49,64±15,22) kıyasla düşüktü ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0,05$). (Tablo 3.7). Kedilerin malign tümörlerinde MDD'si ile histolojik grade, mitotik skor, LVİ, nekroz özellikleri arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 3.9). Ayrıca kedilerin malign tümörlerinde Garde'ler ayrı ayrı değerlendirildiğinde Grade'ler arasındaki ilişki anlamsızdı ($p>0,05$).



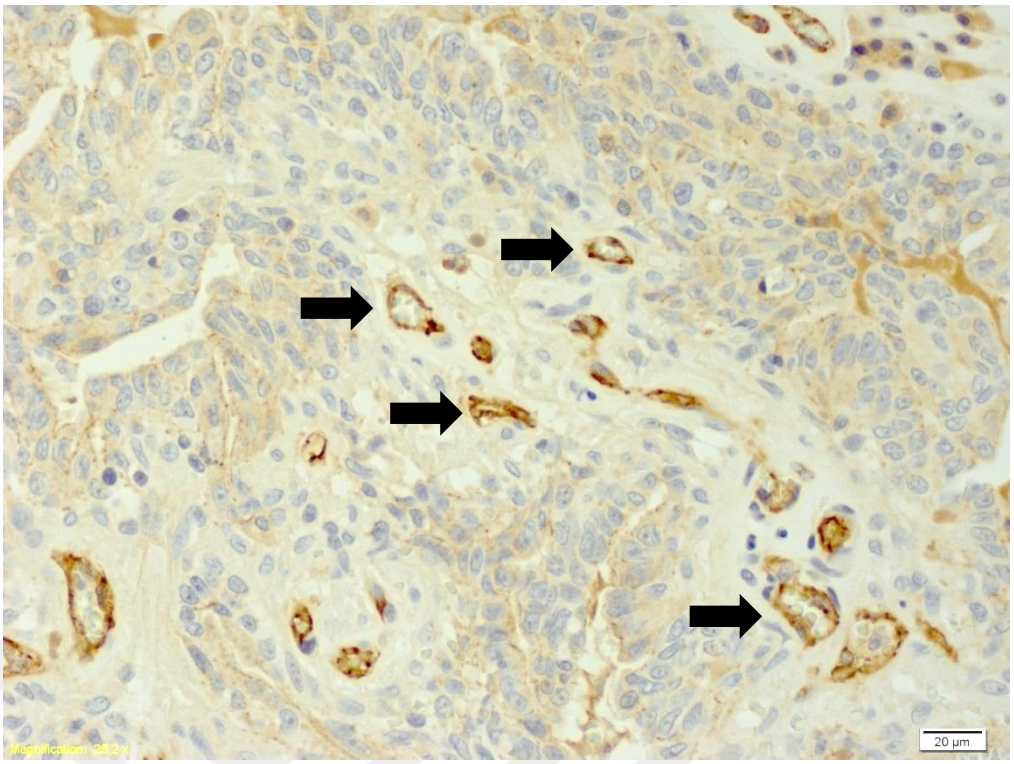
Şekil 3.9. Tubulopapillar karsinom, kedi; tubulopapillar yapılar arasında damar endotellerinde CD31 ekspresyonu (oklar);olgu no:7, Bar=20 µm.



Şekil 3.10. Tubulopapillar karsinom, köpek; tubuller arasında damar endotellerinde CD31 ekspresyonu (oklar);olgu no:11, Bar=100 µm.



Şekil 3.11. Benign miks tümör, köpek; damar endotellerinde CD31 ekspresyonu (oklar); olgu no: 4, Bar=20 µm



Şekil 3.12. Kompleks karsinom, köpek; damar endotellerinde CD31 ekspresyonu (oklar); olgu no: 34, Bar=20 µm

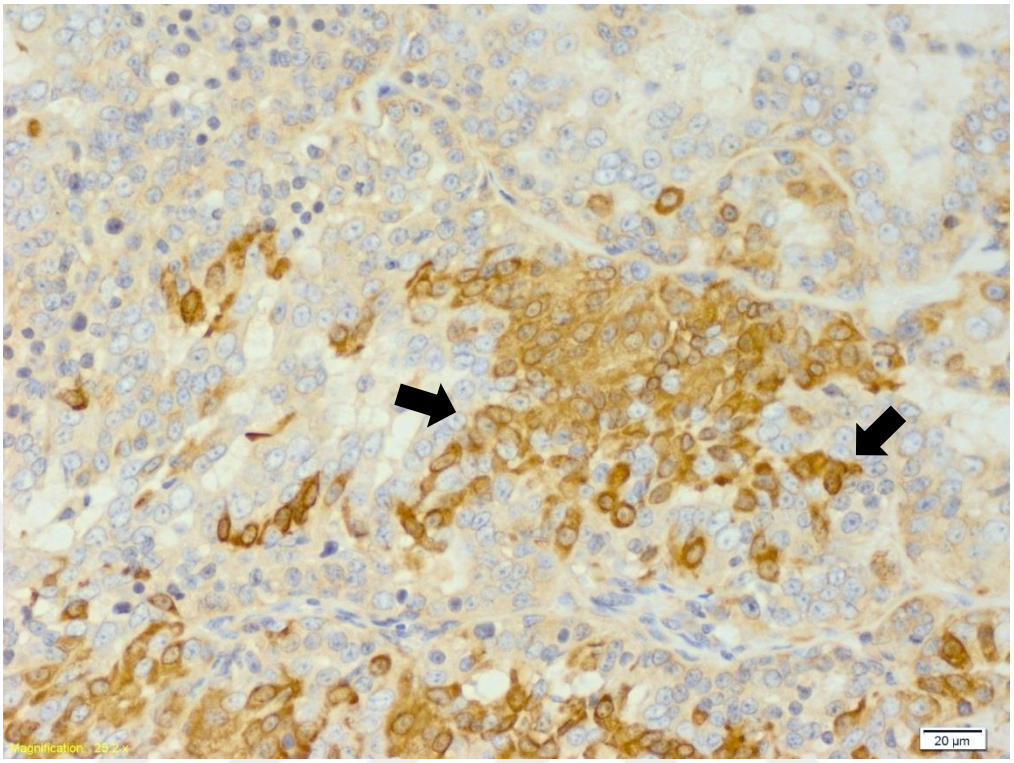
4.2.2. VEGF

VEGF antikoru ile işaretlenen tüm olgular kedi ve köpeklerde pozitif immunreaksiyon gösterdi. Pozitif kontrol olarak sağlıklı bir köpeğe ait karaciğer dokusu kullanıldı. VEGF ekspresyonu tümör hücrelerinin sitoplazmalarında ve zayıf olarak da endotel hücrelerinde yaygın ya da fokal granüller tarzında gözlendi (Şekil 3.13-16).

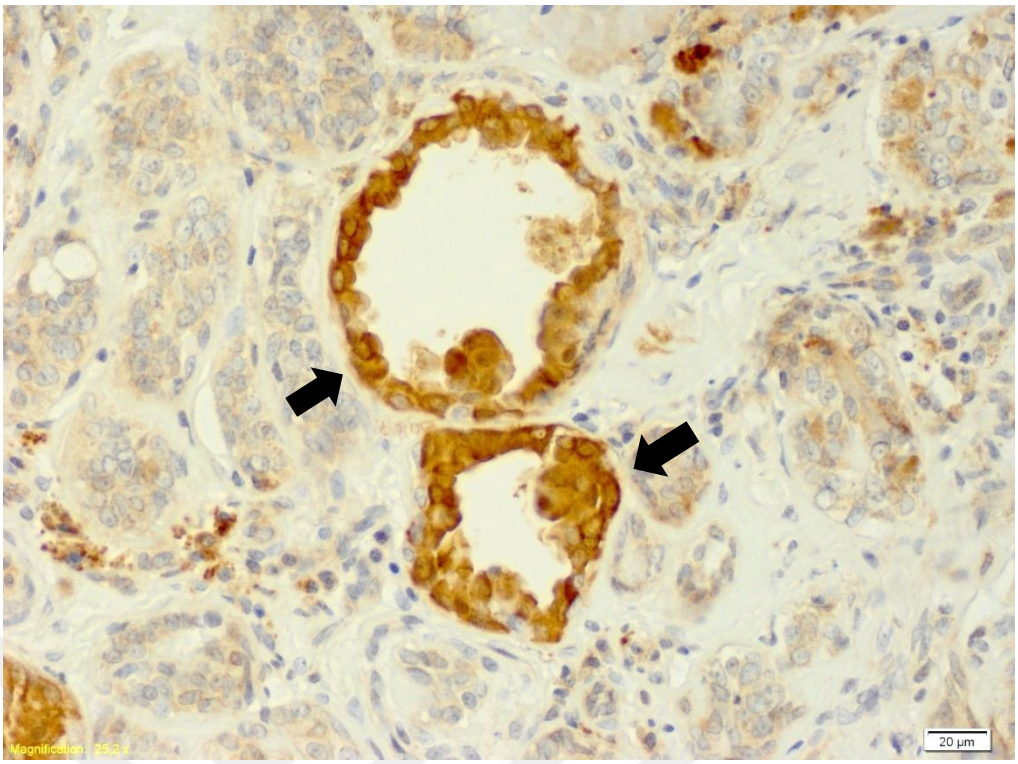
Köpeklerin benign tümörlerinde VEGF İHC boyanma skoru ortalaması (5,50±2,07)malign tümörlere (5,29±1,65) kıyasla yüksek olmakla birlikte fark istatistiksel açıdan önemsizdi (p>0,05). Köpeklerin malign tümörlerinde VEGF İHC boyanma skor ortalaması ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ, nekroz özellikleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. (p>0,05) (Tablo 3.7 ve Tablo 3.8).

Kedilerde de köpek tümörlerine benzer şekilde benign tümörlerinde VEGF İHC boyanma skoru ortalaması (5,67±0,58) malign tümörlere (5,22±1,56) kıyasla yüksekti ve arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p>0,05). Kedilerin malign tümörleri ile VEGF İHC boyanma skoru ile histolojik grade, tümör

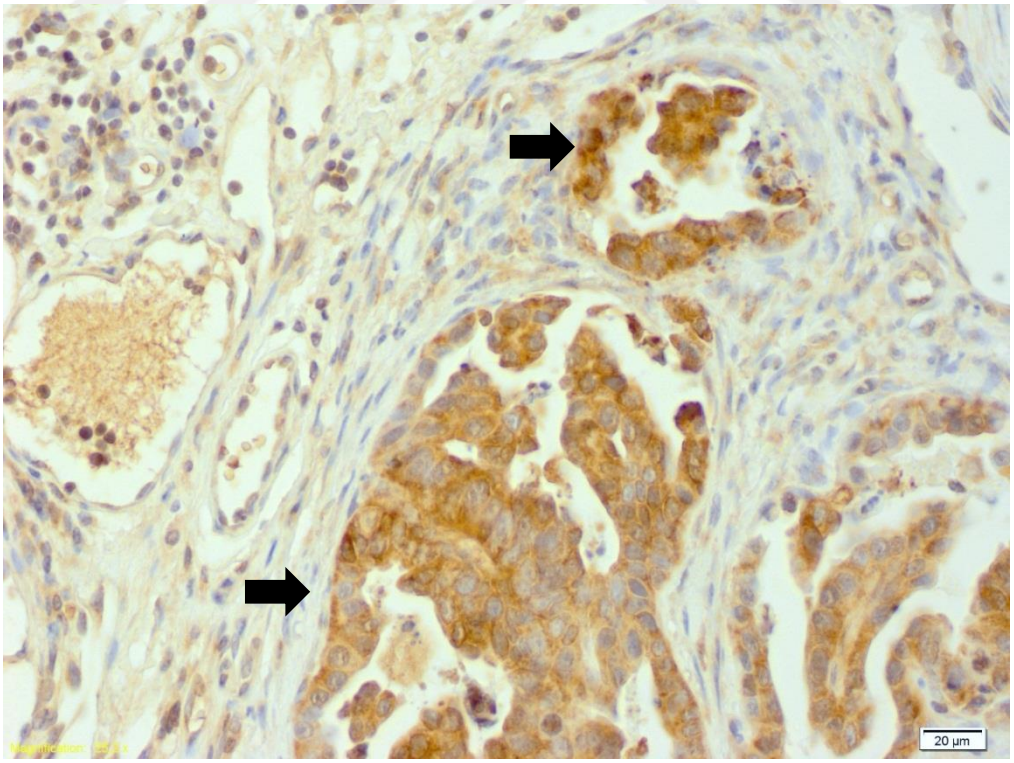
büyüklüğü, mitotik skor, LVİ, nekroz özellikleri arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. (p>0,05) (Tablo 3.7 ve Tablo 3.9)



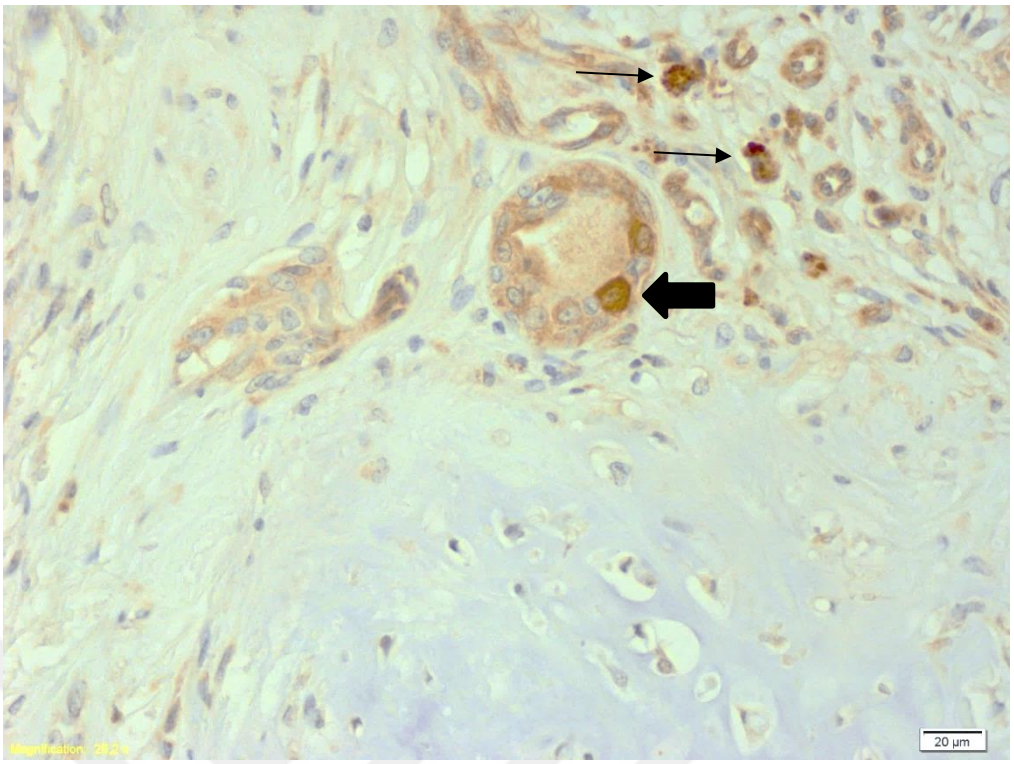
Şekil 3.13. Duktal adenom, kedi; tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu (oklar); olgu no:8, Bar=20 µm



Şekil 3.14. Miks karsinom, köpek; tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu (oklar); olgu no:19, Bar=20 µm



Şekil 3.15. Solid karsinom, kedi; tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu (oklar); olgu no:2, Bar=20 µm



Şekil 3.16. Miks karsinom, köpek; Tümör hücrelerinde (kalın ok) ve damar endotellerinde (ince oklar) VEGF ekspresyonu, olgu no:3, Bar=20 µm

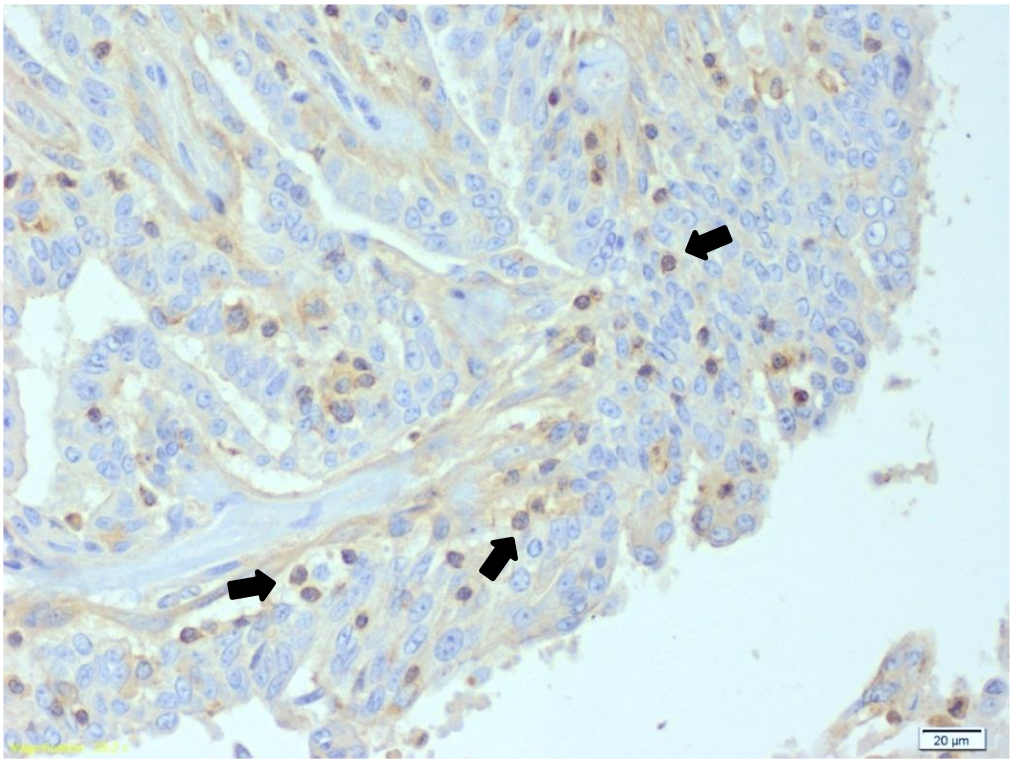
4.2.3. HİF-1A

HİF-1a ile işaretlenen tüm olgular kedi ve köpeklerde pozitif immunreaksiyon gösterdi. Pozitif kontrol için bir köpeğe ait pnömonili akciğer dokusu kullanıldı. HİF-1a bir transkripsiyon faktörü olması ve tümörogenezde rol alan aktif formunun nükleusta lokalize olması nedeniyle yalnızca nükleer boyanmalar önemsendi.

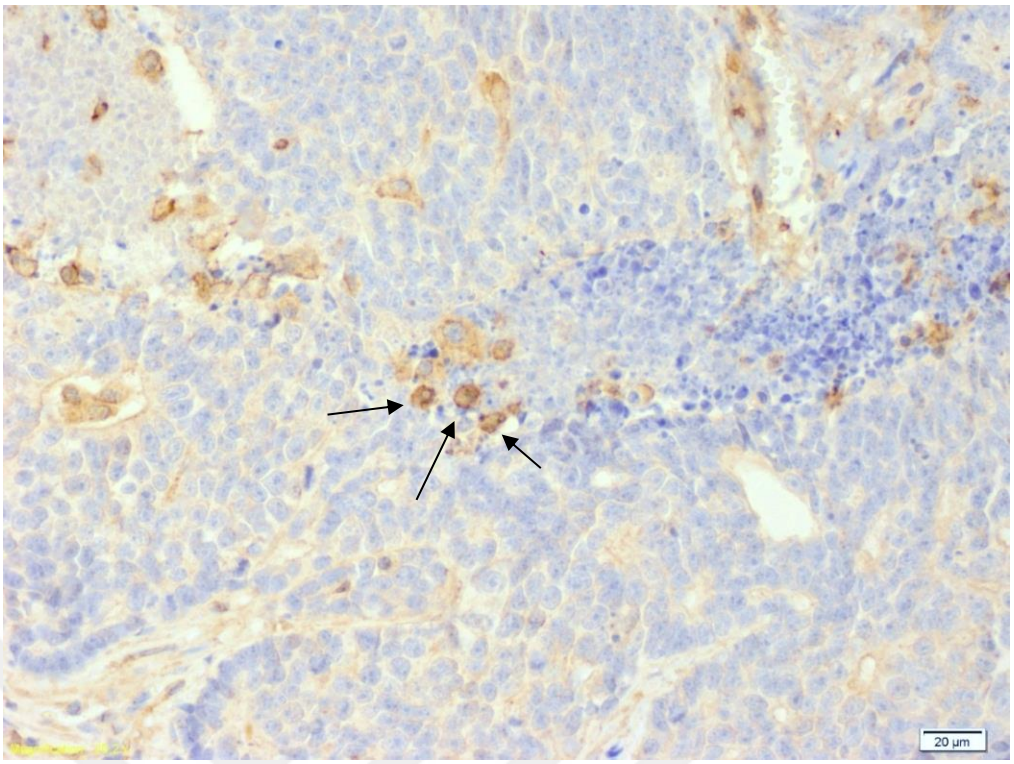
HIF-1a'nın çoğunlukla tümör hücrelerinde sitoplazmik ve nükleer olarak, boyanmanın daha çok tümörün merkezi kısımları, bez ve kanal lümenlerinin papillar uzantılarının uç kısımları ile perinekrotik alanlarda ve tümörün invaziv sınırlarında yoğunlaştığı dikkati çekti (Şekil 3.17-20).

Köpeklerde benign tümörlerde HİF-1A İHC boyanma skor ortalaması 4,50±1,97 iken malign tümörlerde 5,11±1,50 idi ($p>0,05$). Köpeklerin malign tümörleri ile HİF-1a İHC boyanma skoru, histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ ve nekroz özellikleri arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. ($p>0,05$) (Tablo 3.7 ve Tablo 3.8).

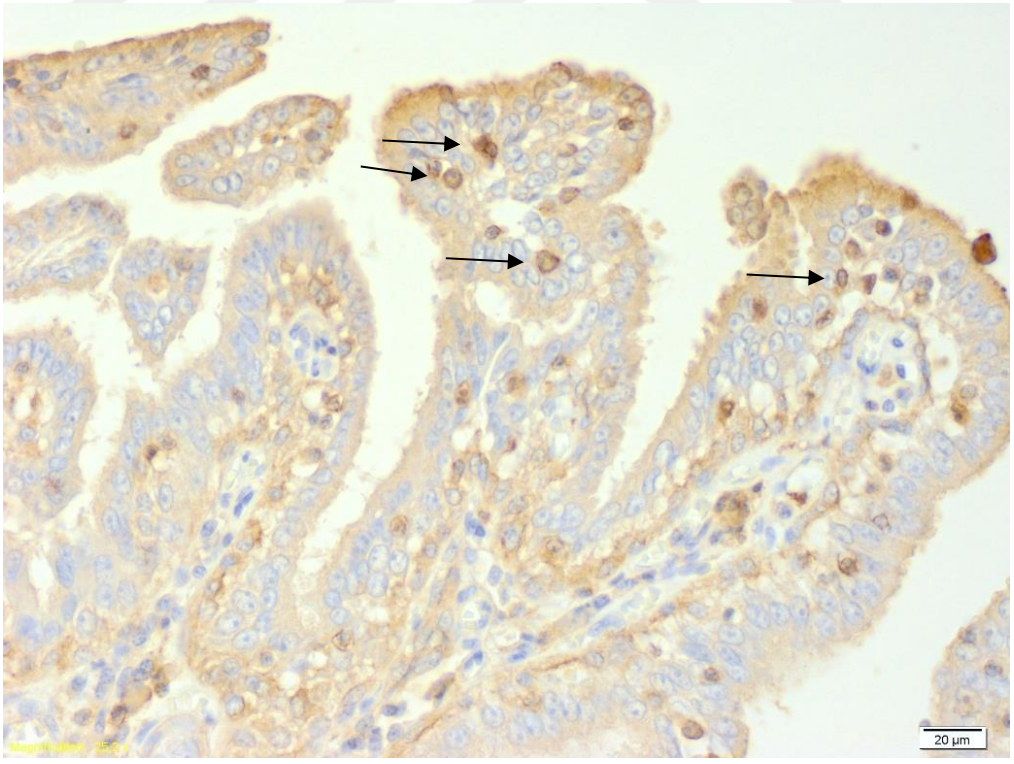
Kedilerde ise köpeklerin aksine benign tümörlerde İHC boyanma skor ortalaması (5,00±1,73) malign tümörlere (3,44±1,42) kıyasla daha yüksek olmakla birilikte fark istatistiksel açıdan önemsizdi ($p>0,05$). Kedilerin malign tümörlerinde HİF-1a İHC boyanma skor ortalaması ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ ve nekroz özellikleri arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$). (Tablo 3.7 ve Tablo 3.9).



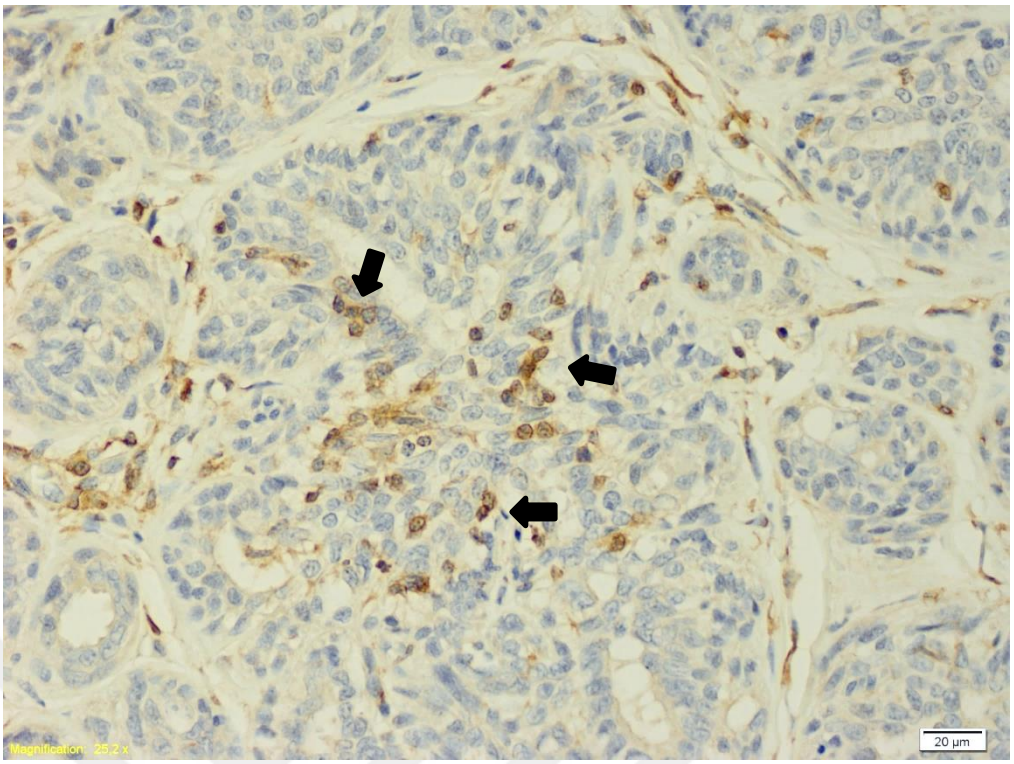
Şekil 3.17. Kompleks karsinom, köpek; Tümör hücrelerinde sitoplazmik ve nükleer HİF-1a ekspresyonu (oklar); olgu no:34, Bar=20 µm



Şekil 3.18. Komedokarsinom, kedi; Nekrotik bölge etrafındaki tümör hücrelerinde HİF-1a ekspresyonu (oklar); olgu no:10, Bar=20 µm



Şekil 3.19. Basit adenom, köpek; tümör hücrelerinde HİF-1a ekspresyonu (oklar); olgu no:25, Bar=20µm



Şekil 3.20. Tubulopapillar karsinom, köpek; Tümör hücrelerinde nükleer ve sitoplazmik HİF-1a ekspresyonu (oklar); olgu no:11, Bar=20 µm

4.2.4. CD68

CD68 ile işaretlenen olguların köpeklerde 33, kedilerde ise 5 adedinde pozitif immunreaksiyon gözlendi. Pozitif kontrol için bir köpeğe ait pnömonili akciğer dokusu kullanıldı. CD68 ile işaretlenen makrofajlar genellikle tümör stromasında, yer yer de bez ve kanal çevreleri ile lümenlerinde tek tek ya da kümeler halinde gözlendi. (Şekil 3.21-23).

Köpeklerin benign tümörlerinde CD68 ile işaretlenen makrofaj yoğunluğu (69,00±46,93) malign tümörlere (46,89±36,65) göre daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0,05$). (Tablo 3.7). Köpeklerin malign tümörlerinde histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ ve nekroz özellikleri bakımından değerlendirildiğinde anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). (Tablo 3.8).

Köpeklerde ayrıca benign ve malign tümörlerdeki toplam sayılan CD68 hücre sayısının ortalaması alınarak kesim noktası olarak belirlenen 50 değerinin alt ve üst değerleri arasında istatistik analiz yapıldı. Benign ve malign tümörler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0,05$). Ayrıca köpeklerin malign tümörlerinde CD68 hücre sayısı <50 ve >50 değerler ile histolojik grade, tümör büyüklüğü,

mitotik skor, LVİ ve nekroz özellikleri açısından fark yoktu (p>0,05). (Tablo 3.10 ve Tablo 3.11).

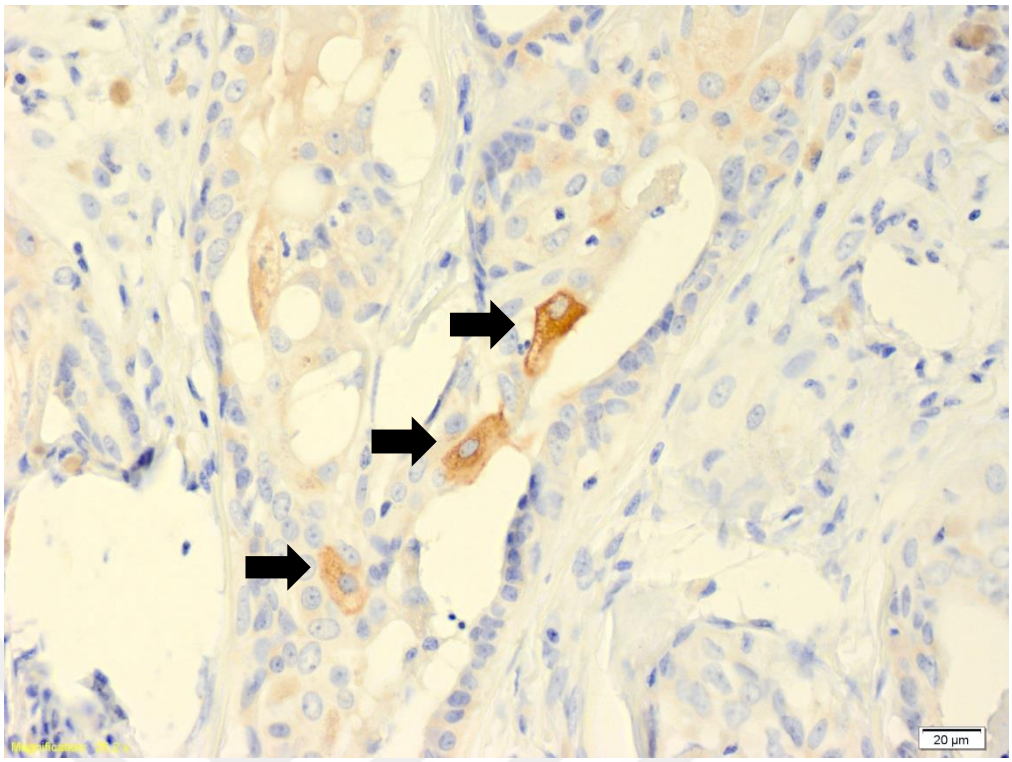
Kedilerde ise benign tümörlerdeki CD68 ile işaretlenen makrofaj yoğunluğu 5,00±5,00 iken malign tümörlerde 11,11±23,35 idi ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı (p>0,05). Ayrıca kedilerin malign tümörlerinde histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ ve nekroz özellikleri bakımından anlamlı bir fark yoktu (p>0,05). (Tablo 3.7 ve Tablo 3.9).

Tablo 3.10. Köpeklerde benign ve malign tümörlerin CD68+ hücre sayısına (**<50** ve **>50**) göre özellikleri.

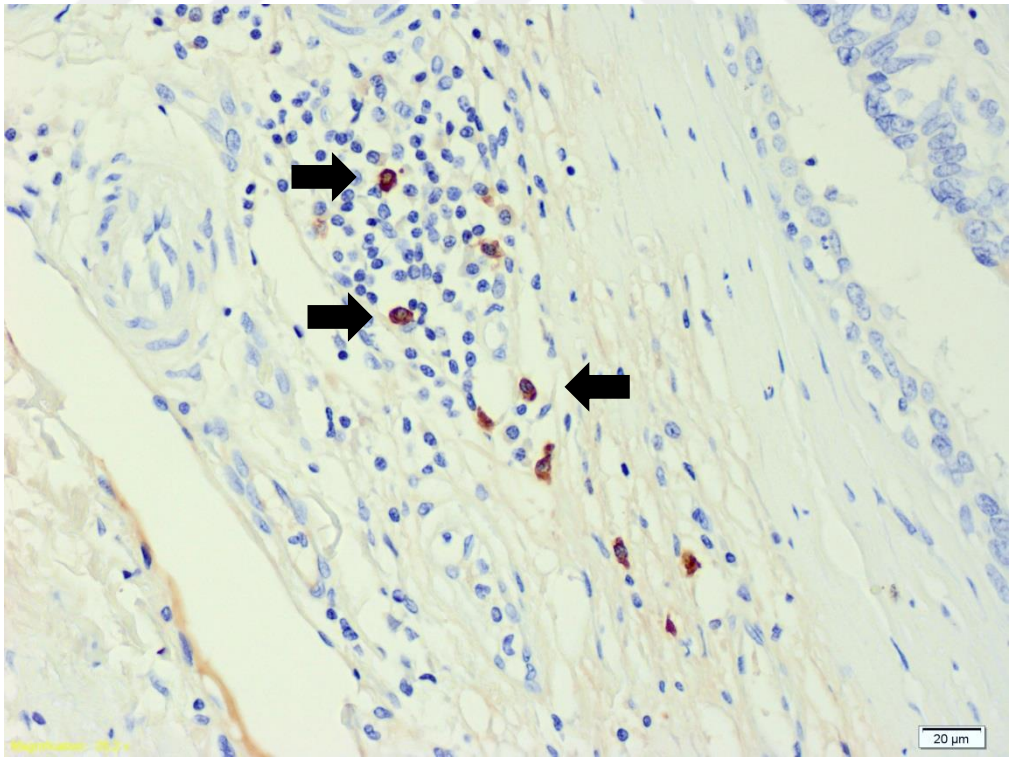
	CD68 hücre sayısı<50	**CD68 hücre sayısı>50**	**P**
Benign	2 (33,3%)	4 (66,7%)	0,370
Malign	17 (60,7%)	11 (39,3%)	

Tablo 3.11. Köpeklerde malign tümörlerin CD68+ hücre sayısına (**<50** ve **>50**) göre özellikleri

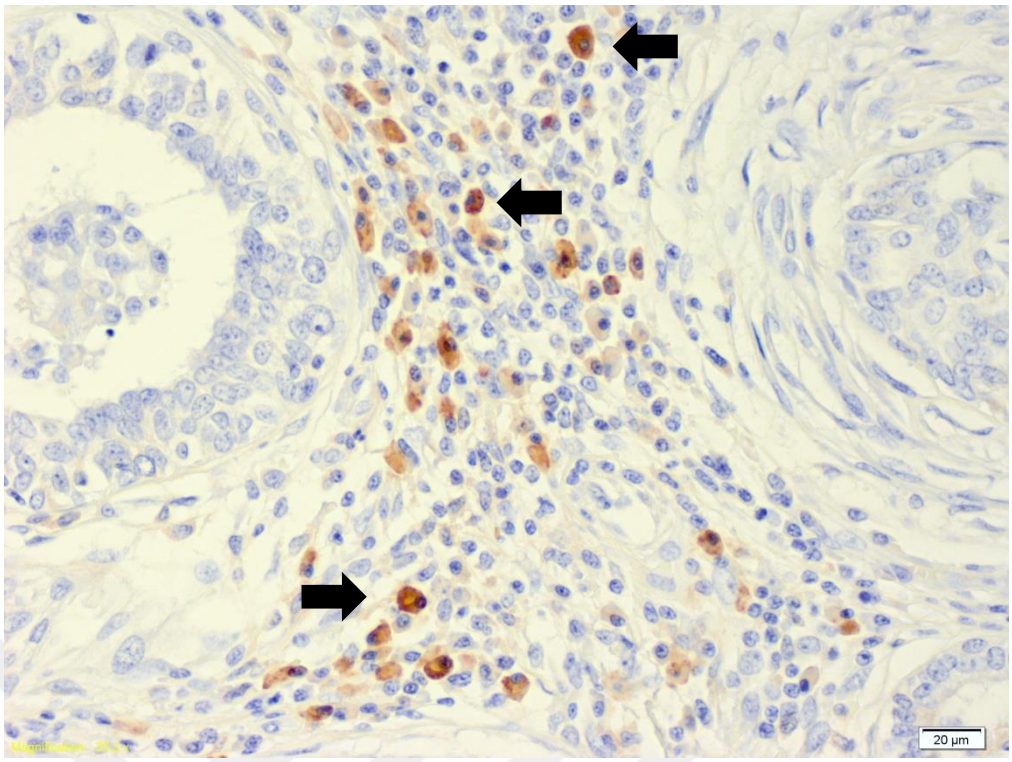
		CD68 hücre sayısı<50	**CD68 hücre sayısı>50**	**P**
Histolojik Grade	1	3 (10,7%)	3 (10,7%)	0,832
	2	7 (25,0%)	4 (14,3%)	
	3	7 (25,0%)	4 (14,3%)	
Tümör Büyüklüğü	0-3cm	6 (21,4%)	3 (10,7%)	0,592
	3-5cm	5 (17,9%)	2 (7,1%)	
	>5cm	6 (21,4%)	6 (21,4%)	
Mitotik Skor	0-9	3 (10,7%)	2 (7,1%)	0,900
	10-19	6 (21,4%)	3 (10,7%)	
	≥20	8 (28,6%)	6 (21,4%)	
LVİ	Var	1 (3,6%)	1 (3,6%)	0,747
	Yok	16 (57,1%)	10 (35,7%)	
Nekroz	Var	10 (35,7%)	3 (10,7%)	0,102
	Yok	7 (25,0%)	8 (28,6%)	



Şekil 3.21. Miks karsinom, köpek; makrofaj sitoplazmalarında CD68 ekspresyonu (oklar), olgu no:16, Bar=20 µm



Şekil 3.22. Miks karsinom, köpek; makrofaj sitoplazmalarında CD68 ekspresyonu (oklar), olgu no:13, Bar=20 µm



Şekil 3.23. Miks karsinom, köpek; makrofaj sitoplazmalarında CD68 Ekspresyonu (oklar), olgu no:15, Bar=20 µm

4.2.5. CD163

CD163 ile işaretlenen olguların köpeklerde 33, kedilerde ise 7 adedinde pozitif immunreaksiyon gözlendi. Pozitif kontrol için bir köpeğe ait pnömonili akciğer dokusu kullanıldı.

CD163 ile işaretlenen makrofajlar CD68'e benzer şekilde tümör stroması ile bez ve kanal çevreleri ile lümenlerinde tek tek ya da kümeler halinde gözlendi (Şekil 3.24-26).

Köpeklerin benign tümörlerinde CD163 ile işaretlenen makrofaj yoğunluğu (74,00±51,95) malign tümörlere göre (58,75±40,43) daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0,05$). Ayrıca malign tümörlerde ortalama CD163 hücre sayısı ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ ve nekroz özellikleri bakımından anlamlı fark yoktu ($p>0,05$), (Tablo 3.7 ve Tablo 3.8).

Köpeklerde ayrıca benign ve malign tümörlerdeki toplam sayılan CD163 hücre sayısının ortalaması alınarak kesim noktası olarak belirlenen 61 değerinin alt ve üst değerleri arasında istatistik analiz yapıldı. Benign ve malign tümörler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0,05$). Ayrıca köpeklerin malign

tümörlerinde CD163 hücre sayısı <61 ve >61 değerler ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor ve nekroz özellikleri açısından fark yoktu (p>0,05). (Tablo 3.12 ve Tablo 3.12).

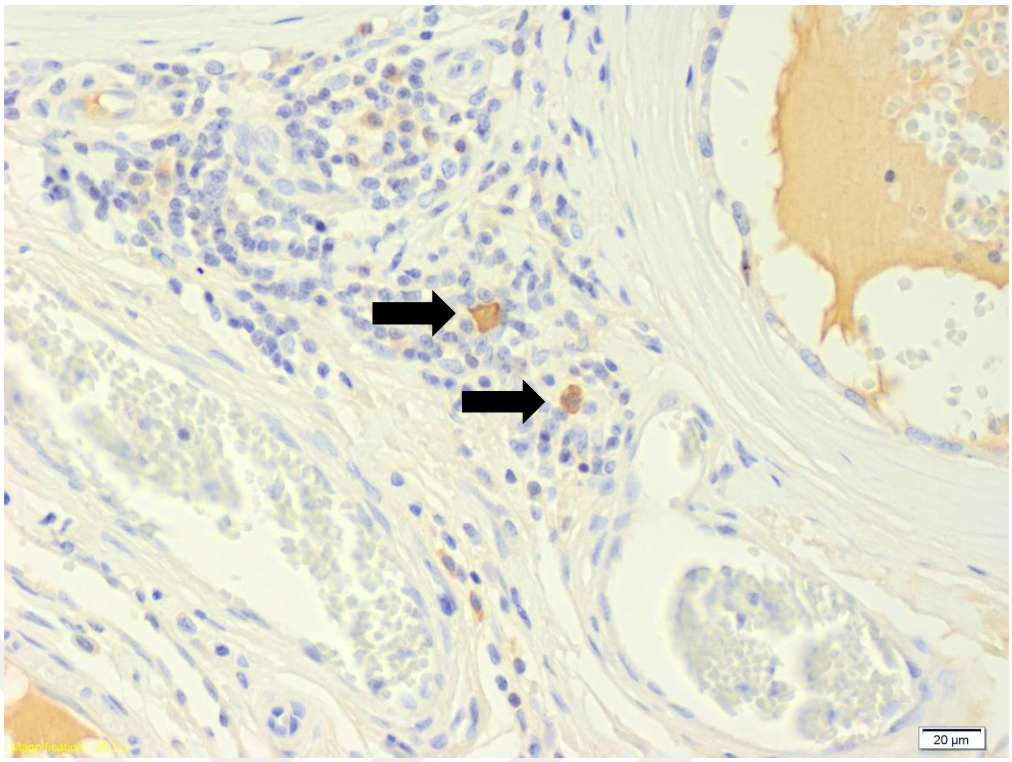
Kedilerde ise köpeklerin aksine benign tümörlerde CD163 ile işaretlenen makrofaj yoğunluğu (3,00±2,65) malign tümörlere göre daha düşük (26,22±31,02) olmasına rağmen istatistiksel fark önemsizdi (p>0,05). Ayrıca malign tümörlerde ortalama CD163 hücre sayısı ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ ve nekroz özellikleri bakımından anlamlı fark yoktu (p>0,05). (Tablo 3.7 ve Tablo 3.9).

Tablo 3.12. Köpeklerde benign ve malign tümörlerin CD163 hücre sayısına (<61 ve >61) göre özellikleri.

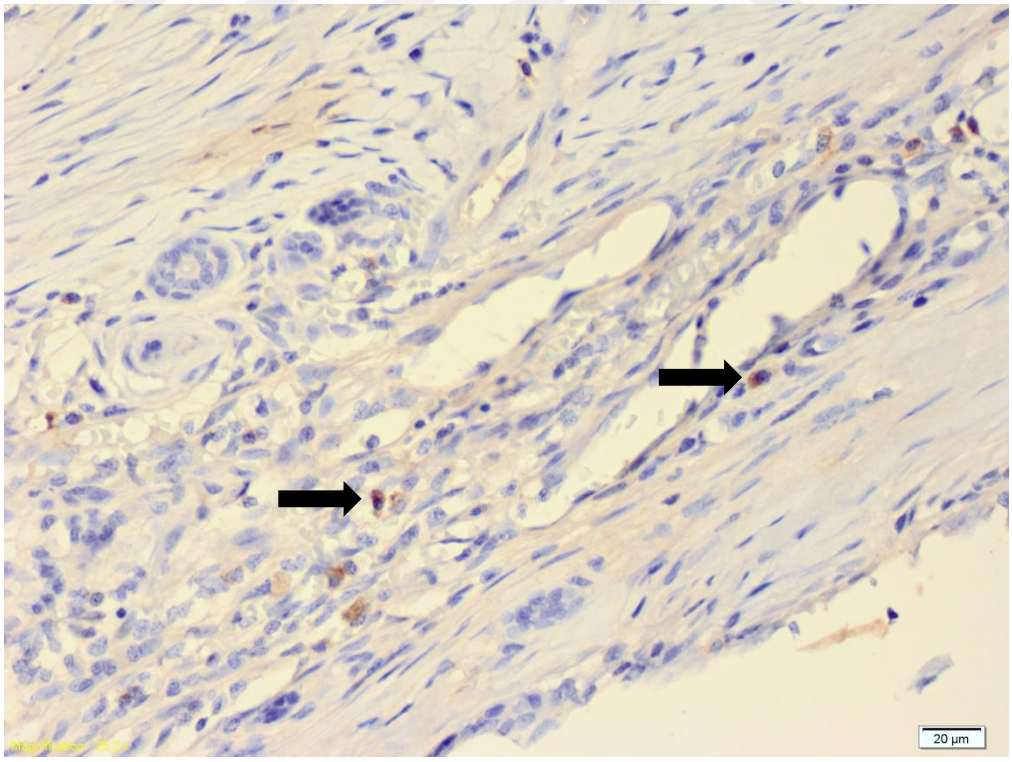
	CD163 hücre sayısı<61	**CD163 hücre sayısı>61**	P
Benign	2 (33,3%)	4 (66,7%)	0,660
Malign	14 (50,0%)	14 (50,0%)	

Tablo 3.13. Köpeklerde malign tümörlerin CD163 hücre sayısına (<61 ve >61)göre özellikleri.

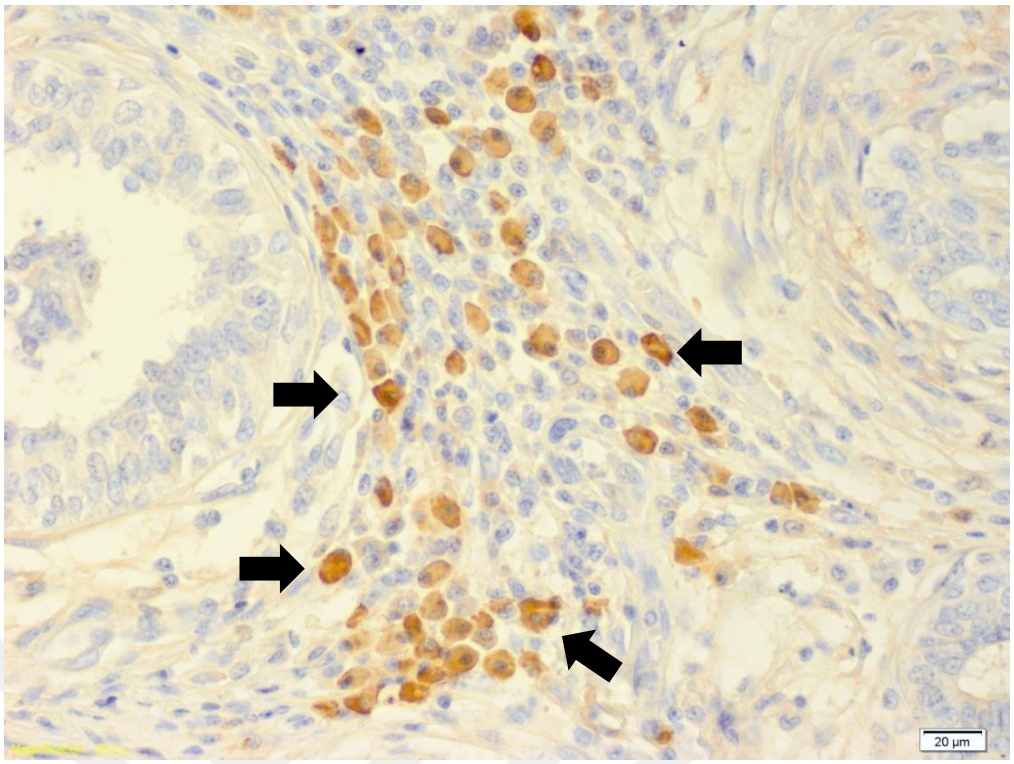
		CD163 hücre sayısı<61	**CD163 hücre sayısı>61**	**P**
Histolojik Grade	1	3 (10,7%)	3 (10,7%)	0,441
	2	7 (25,0%)	4 (14,3%)	
	3	4 (14,3%)	7 (25,0%)	
Tümör Büyüklüğü	0-3cm	7 (25,0%)	2 (7,1%)	0,111
	3-5cm	2 (7,1%)	5 (17,9%)	
	>5cm	5 (17,9%)	7 (25,0%)	
Mitotik Skor	0-9	3 (10,7%)	2 (7,1%)	0,742
	10-19	5 (17,9%)	4 (14,3%)	
	≥20	6 (21,4%)	8 (28,6%)	
LVİ	Var	0 (0,0%)	2 (7,1%)	0,142
	Yok	14 (50,0%)	12 (42,9%)	
Nekroz	Var	6 (21,4%)	7 (25,0%)	0,705
	Yok	8 (28,6%)	7 (25,0%)	



Şekil 3.24. İntraduktal papillar karsinom, köpek; makrofaj sitoplazmalarında CD163 ekspresyonu (oklar), olgu no:9, Bar=20 µm



Şekil 3.25. Tubulopapillar karsinom, köpek; makrofaj sitoplazmalarında CD163 ekspresyonu (oklar), olgu no:11, Bar=20 µm



Şekil 3.26. Miks karsinom, köpek; makrofaj sitoplazmalarında CD163 ekspresyonu (oklar), olgu no:15, Bar=20 µm

4.2.6. MDD, VEGF, HİF-1A, CD68 ve CD163 seviyeleri arasındaki korelasyon

Köpeklerin malign tümörleri içerisinde CD68 ve CD163 arasında pozitif korelasyon saptanırken ($p<0.01$), diğer veriler arasında korelasyon belirlenmedi. Bening tümörler içerisinde ise korelasyonlar istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 3.13). Kedilerde ise materyal sayısının düşük olmasından dolayı istatistiksel analiz yapılamadı.

Tablo 3.13. Köpeklerin benign ve malign tümörlerinde MDD, VEGF, HİF-1A, CD68 ve CD163 seviyeleri arasındaki korelasyon kat sayısı değerleri.

		BENING (n=6)				
		MDD	VEGF	HIF_1A	CD68	CD163
MALIGN (n=28)	MDD	---	0.059	-0.568	-0.543	-0.600
	VEGF	-0.011	---	0.127	-0.353	-0.559
	HIF_1A	-0.091	0.321	---	0.031	0.494
	CD68	0.105	0.171	0.271	---	0.714
	CD163	-0.079	-0.123	0.127	**0.497****	---

(**)<0.01, pozitif korelasyonu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri dünya çapında kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanser türüdür ve kanserle ilişkili mortalitenin en önde gelen nedenleri arasında yer alır (Ghoncheh ve ark 2016). Global Cancer Observatory (GLOBOCAN)'ın 2018 verilerine göre en sık görülen kanser türleri arasında 2.09 milyon kişi ile ikinci sırada, kansere bağlı ölümlerde ise 627 bin kişi ile beşinci sırda yer almaktadır (Bray ve ark 2018). Bundan dolayı meme kanserinin önlenmesi ve tedavisi araştırmacılar için birincil hedeflerdir. Bunun için, hastalığın gelişimi ve ilerlemesi sırasında biyolojisinin anlaşılması önemlidir (Abdelmegeed ve Mohammed 2018).

Meme tümörleri insanlarda olduğu kadar köpek ve kedilerde de en önemli tümörler arasında yer alır. Köpek ve kedi meme tümörlerinin insan meme tümörleri ile arasındaki benzerlikler ve insanlar için model oluşturabileceği yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir. Bu yüzden tümör gelişiminin daha iyi anlaşılması için yapılan çalışmaların veteriner hekimlik yönünden olduğu kadar insan hekimliğine de ışık tutması umulmaktadır (Owen 1979, De Maria ve ark 2005, Queiroga 2011, Madej ve ark 2013, Wiese ve ark 2013). Bu çalışmada köpek ve kedilere ait meme tümörü örneklerinde tümör mikroçevresi, hipoksi, anjiyogenez ile kullanılan antikorların histopatolojik bulgular ile ilişkisi immunohistokimyasal yöntemle araştırılması amaçlanmıştır.

Meme tümörleri dişi köpeklerde görülen en sık tümör iken kedilerde hematopoietik sistem ve deri tümörlerinden sonra üçüncü en sık teşhis edilen tümör olarak bildirilmiştir (Dorn ve ark 1968, Hayes ve Mooney 1985, Andrade ve ark 2017, Pastor ve ark 2018). Köpeklerde benign ve malign özellik gösteren tümörlerin oranları değişkenlik göstermekle beraber yapılan çalışmalarda %41-96 gibi geniş bir aralıkta değişen oranlarda malign meme tümörü yüzdeleri bildirilmiştir (Brodey ve ark 1983, Karayannopoulou ve ark 1989, Vural ve Aydın 2001, Nunes ve ark 2018, Kuruca ve ark 2019). Sunulan çalışmada da bu oranın yapılan çalışmalarda belirtilen aralıkta olduğu görülmüş, dişi köpeklerde tanısı konan 34 meme bezi tümörünün 28 (%82,35) adedinin malign, 6 (%17,65) adedinin benign yapıda olduğu belirlenmiştir. Kedilerde ise meme tümörlerinin yaklaşık %85'inden fazlasının malign olduğu bildirilmiştir (Murphy 2008, Karabolovski ve ark 2020). Bu çalışmada ise dişi kedilerde tanısı konan 12 adet meme bezi tümörünün 9 (%75) adedini malign ve 3

adedini de (%25) benign tümörler oluşturmuştur. Köpek ve kedilerdeki benign ve malign özellik gösteren tümörlerin oranlarını etkileyen faktörlerin, benign tümör olgularının hayvan sahipleri tarafından fark edilmemesine, kliniklere getirilmemesine ya da tümörün malign karakter kazandığı geç dönemlerde getirilmesine, geç müdahale edilmesine, histolojik değerlendirme kriterlerine ve teşhisi koyan patoloğun deneyimine bağlı olduğu bildirilmiştir (Perez-Alenza ve ark 2000, Sorenmo ve ark 2009, Aydoğan 2010, Andrade ve ark 2017, Meuten 2017, Nunes ve ark 2018).

Köpeklerde meme tümörlerinin 2 yaşından önce nadiren görüldüğü, insidensin 6 yaşından itibaren 10 yaşına kadar belirgin bir artış gösterdiği, 10-11 yaşından sonra azaldığı bildirilmiştir (Moulton ve ark 1970). Sunulan çalışmada köpeklerin yaş ortalaması 9.24 olarak belirlenmiş, en küçüğünün 4, en büyüğünün ise 15 yaşlı olduğu görülmüştür. Yaş aralığı olarak ise en çok 5-8 yaş aralığında (n:12) olduğu belirlenmiştir. Kedilerde ise meme tümörü görülme oranı 9 yaşından sonra belirgin bir artış eğilimi göstermekle birlikte en çok teşhis 10-12 yaşlarında konulduğu bildirilmiştir (Hayes ve Mooney 1985, Meuten 2017). Çalışmada meme tümörlü kedilerin yaşları 1-14 yaş arasında değişmiş ve yaş ortalaması 9.6 yaş olarak belirlenmiştir. Yaş aralığı olarak ise literatür verileri ile uyumlu olarak en çok 9-12 yaş aralığında (n:7) gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda ırk predispozisyonu olarak köpek meme tümörlerinin daha çok av ve spor amacıyla yetiştirilen Puanter, İngiliz Setter, Retriever, Spaniel gibi ırklarla Poodle, Boston Terrier, Dachshund ırklarının meme bezi tümörlerine daha duyarlı oldukları, bununla birlikte saf köpek ırklarında melez ırklara kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Karayannopoulou ve ark 1989, Moulton 1990, Zatloukal ve ark 2005, Salas ve ark 2015, Pastor ve ark 2018). Kedilerde ise Siyam İran ve evcil shorthair ırkı kedilerde daha çok meme tümörüne rastlandığı rapor edilmiştir (Hayes ve ark 1981, Amorim ve ark 2006, Shida ve ark 2010, Meuten 2017). Çalışmada en yüksek meme tümörü insidensi köpeklerde Terrier (n:14) ırkında, kedilerde ise Melez (n:7) ırkta gözlenmiştir. Bu bulgu, belki de İzmir ile Konya illeri ve çevrelerinde bu ırkların daha çok tercih edilmesiyle ilgili ya da bu illerde hakim olan pet popülasyonunun bu ırklar olmasıyla açıklanabilir.

Anjiyogenezin tümör büyümesinde ve metastazında anahtar rol oynadığına inanılmaktadır (Graham ve Myers 1999). Tümörler büyümeden önce hücrelere besin maddelerini ve oksijeni ulaştırmak, metabolizma ürünlerini uzaklaştırmak için mikrodamarlanmayı arttırmak zorundadır. Yeni kan damarları olmadan, tümörler 1–2 mm çapındadan fazla büyüyemezler ve metastaz yapamazlar. Bu yüzden anjiyogenez tüm neoplastik sürecin ayrılmaz bir parçası olarak kabul edilir (Zetter 1998). Tümör örneklerinde neovaskülarizasyon görünümü ve mikrodamar yoğunluğu tümör hücreleri tarafından üretilen anjiyogenik aktiviteyi yansıtmaktadır (Graham ve Myers 1999). Bununla beraber mikrodamar dansitesi (MDD) ölçümünde damar sayımı sırasında tümör içerisindeki vasküler hot spot (sıcak nokta) alan seçiminin gözlemciye bağlı olduğu, sayımda farklı panendotelyal antikorlar (CD31, CD34, von-Willebrand faktör, CD105) kullanıldığı ve tümör basısı, kıvrımlanmaların sayım sonuçlarını etkileyebileceği belirtilmektedir (Ekici ve ark 2016).

Geriye dönük otuz yıllık dönem incelendiğinde insan meme kanserlerinde (Weidner ve ark 1991, Uzzan ve ark 2004, Van der Auwera ve ark 2004) olduğu gibi veteriner onkolojide de köpek ve kedilerin meme tümörlerini de içeren farklı tümör tiplerinde anjiyogenezin malignite ve prognozla ilişkisini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır (Griffey ve ark 1998, Graham ve Myers 1999, Restucci ve ark 2000, Maiolino ve ark 2001, Millanta ve ark 2002, Restucci ve ark 2003, Martano ve ark 2004, Preziosi ve ark 2004, Luong ve ark 2006, Lavalle ve ark 2009, İslam ve ark 2012). Ayrıca yapılan birçok çalışmada da lenf nodu metastazı, histolojik grade ve nekroz ile MDD arasında korelasyon olduğunu bildirilmiştir (Weidner ve ark 1991, Harris ve ark 1992, Valkovic ve ark 2002, Jakab ve ark 2008, Raposo ve ark 2015). Benign ve malign meme tümörlerinde yapılan çalışmalarda MDD'lerinin benign tümörlere kıyasla malign tümörlerde yüksek olduğu yönünde görüş birliği hakimdir (Restucci ve ark 2000, Jakab ve ark 2008, Raposo ve ark 2013, Sleeckx ve ark 2014). Çalışmamızda literatür verilerine uygun olarak hem köpeklerde hem de kedilerde malign tümörlerdeki MDD benign tümörlere kıyasla fazla olmasına rağmen ve fark istatistiksel olarak her iki grupta da önemsizdi ($p>0,05$) (Tablo 3.7). Ayrıca köpeklerin malign tümörlerinde histolojik grade'ler arasındaki istatistiksel fark da anlamsızdı ($p>0,05$) (Tablo 3.8). Ancak Grade'ler ayrı ayrı değerlendirildiğinde Grade 2 ile Grade3 arasındaki ilişki anlamlıyken ($p<0,05$), Garde1 ile Grade2 ve Grade3 arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). Bu durumun anjiyogenezin

karsinogenezin başlangıç evrelerinde artış göstermesi ve sonraki evrelerde birtakım kompleks moleküllerin süreci etkilemiş olabilmesinden ileri gelebileceği düşünüldü. Kedilerin malign tümörlerinde ise literatür verilerine benzer şekilde malignite arttıkça damar dansitesi de artma eğilimindeydi. Ancak benign-malign arasındaki istatistiksel fark önemsizdi ($p>0,05$), (Tablo 3.8). Yine Grade'ler ayrı ayrı değerlendirildiğinde de istatistiksel fark anlamsızdı ($p>0,05$). Köpeklerde MDD ile tümör büyüklüğü arasındaki istatistiksel fark önemliyken ($p<0,05$), kedilerde önemsizdi ($p>0,05$), (Tablo 3.8, Tablo 3.9). Bununla beraber hem köpeklerde hem kedilerde LVİ ve mitotik skor ile MDD arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p>0,05$). Köpeklerin malign tümörlerinde tümör içerisinde nekroz bulunan olguların MDD'si belirgin şekilde yüksekti ve istatistiksel fark önemliydi ($p<0,05$). Bu durumun, köpeklerin malign tümörlerinde nekrotik bölgelerdeki hücresel atıkları uzaklaştırmak ya da nekrotik bölgelere besin ulaştırabilmek amacıyla vücudun nekroza verdiği yangısal bir tepkiyle ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Anjiyogenezi stimüle eden birçok hormon ve/veya büyüme faktörleri mevcuttur. Büyüme faktörlerinden vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) endotel hücreleri üzerinde güçlü bir mitojenik etkisi olan ve anjiyogenezi stimüle eden faktörlerin en başında yer almaktadır (Ferrara ve Davis-Smyth 1997).

Çalışmamızda VEGF İHC skor ortalamaları arasındaki istatistiksel fark önemsiz olmasına rağmen ($p>0,05$) hem köpeklerde hem kedilerde bu skorun benign tümörlerde malign tümörlere kıyasla daha yüksek olduğunu saptadık (Tablo 3.7). Bizim çalışmamızın aksine Qui ve ark (2008), istatistiksel olarak desteklemeseler de köpek meme tümörlerinde normal meme dokusu örnekleri ve benign meme tümörlerinden, malign tümörlerinin VEGF ekspresyonunun daha yüksek olduğunu, tümör büyüklüğü ve yaş ile bağlantılı olmamasına rağmen lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Restucci ve ark (2002) VEGF seviyelerinin Qui ve ark (2008)'nın çalışmasına benzer şekilde malign tümörlerde benign tümörlere kıyasla yüksek olduğunu ve grade ile beraber arttığını ve bu farkın da anlamlı olduğunu raporlamışlardır. Bu çelişkinin çalışmamızda kullanılan benign tümör sayısının hem köpeklerde hem kedilerde düşük olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca VEGF ile hem köpeklerin hem kedilerin malign meme tümörlerinde histolojik derece, LVİ, tümör büyüklüğü, mitotik skor ve nekroz arasındaki istatistiksel fark önemsizdi ($p>0,05$). Bu tutarsızlıkların sebebi

gözlemciler arası skorlama farklılıkları, araştırma metodlarındaki farklılıklar ya da kullanılan antikorların farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir.

Anjiyogenez ile VEGF arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sayısı köpek ve kedilerde oldukça kısıtlıdır. Restucci ve ark (2002)'nın 10 adet benign 40 adet malign köpek meme tümöründe immunohistokimyasal olarak VEGF ve MDD'sini değerlendirdiği bir çalışmada, VEGF ile MDD arasında istatistiksel olarak korelasyon bulunduğunu, anjiyogenez ile malignitenin beraber arttığı ve VEGF'nin köpeklerin meme tümörlerinde güçlü bir anjiyogenik faktör olabileceği bildirilmiştir. Queiroga ve ark (2011) 70 adet köpek meme tümöründe (28 benign ve 42 malign) yaptıkları bir çalışmada VEGF pozitif malign tümörlerde yeniden damarlanmanın daha baskın olduğunu ve artan damar ağının metastatik kapasiteyi yansıttığını belirtmişlerdir. İslam ve ark (2012)'nın 23 adet kedi meme tümöründe farklı antikorlar ile yaptıkları bir çalışmada VEGF ekspresyonu ile MDD arasında pozitif korelasyon olduğu belirtilmiştir. Millanta ve ark (2002)'nın 48 adet kedi meme tümöründe yaptıkları farklı bir çalışmada VEGF'nin lenfatik damarlardaki invazyon ile korelasyon göstermemesine rağmen klinik gidişat ile önemli ölçüde korelasyonu olduğu; ayrıca MDD'sinin ortalama yaşam süresiyle korelasyon göstermediği ve diğer araştırmacıların aksine VEGF ile anjiyogenez arasında anlamlı bir ilişki saptamadıklarını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada Restucci ve ark (2002), İslam ve ark (2012), Queiroga ve ark (2011)'nın bulgularının aksine köpek tümörlerinde VEGF ile anjiyogenez arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Kedilerde ise materyal sayısının düşük olmasından dolayı istatistiksel analizler gerçekleştirilemedi.

Tümör biyolojisi 1950'li yıllardan sonra daha fazla ilgi duyulan bir arastırma konusu olmuş ve hipoksi-tümörogenez ilişkisi ortaya atılmıştır. Hipoksinin tümör anjiyogenezinde güçlü ve önemli bir uyarıcı olduğuna inanılmaktadır. Hipoksinin immünhistokimyasal olarak tesbitine yönelik çalısmalar ise son yıllarda hız kazanmıştır. Böylece tümörlerdeki hipoksinin göstergesi olabileceği düşünülen immünhistokimyasal belirteçler malignitelerdeki önemi tartışılan parametreler arasında yerini almıştır. Bunlardan en önemlisi HIF-1a'dır (Graff ve ark 1960, Jakab ve ark 2008).

Yapılan çalışmalarda HIF-1a'nın agresif tümör gelişiminde etkili olduğuna yönelik birçok kanıt sunulmuştur. Madej ve ark (2013) köpek meme tümörlerinde yaptıkları bir çalışmada malign tümörlerde HIF-1a seviyelerinin benign tümörlere

kıyasla anlamlı ölçüde yüksek olduğunu ve tümör evresi ile önemli ölçüde pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Yine bu çalışmaya benzer olarak Shin ve ark (2015) köpeklerin malign tümörlerinde yaptıkları farklı bir çalışmada insan meme kanserlerine benzer şekilde HIF-1a'nın malignitede potansiyel rol oynayabileceğini bildirmişler, histolojik grade ile aralarındaki istatistiksel ilişkinin anlamlı olduğunu, lenfatik invazyonla bir ilişki tespit edemediklerini raporlamışlardır. Sunulan çalışmada köpeklerin malign tümörlerinde HIF-1a İHC skor ortalaması benign tümörlere göre daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel fark önemsizdi ($p>0,05$). Bunun yanı sıra histolojik grade ile HIF-1a arasında da anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). Ayrıca hem köpeklerin hem kedilerin malign tümörlerinde diğer çalışmalara benzer şekilde HIF-1a İHC skor ortalaması ile lenfatik invazyon arasında ilişki tespit edilemedi ($p>0,05$). Kedilerde ise benign tümörlerde HIF-1a İHC skor ortalaması malign tümörlere göre daha yüksekti ve aradaki fark istatistiksel açıdan anlamsızdı ($p>0,05$) (Tablo 3.7). Bunun sebebinin kedilerde incelenen materyal sayısının düşük olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünüldü. Yapılan çalışmalar histolojik grade ile HIF-1a arasında korelasyon olduğu yönünde raporlansa da sonucumuz bu konunun geniş serilerde çalışılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca yukarıda sunulan çalışmalarda HIF-1a ile VEGF arasında pozitif korelasyon olduğu raporlanmıştır. Çalışmamızda köpeklerin benign ve malign tümörlerinde HIF-1a ile VEGF arasındaki korelasyonlar anlamsızdı (Tablo 3.13).

İnsanlarda meme (Leek ve ark 1996, Valkovic ve ark 2002, Tsutsui ve ark 2005), prostat (Lissbrant ve ark 2000) , mesane (Hanada ve ark 2000), ovaryum benign tümörleri (Orre and Rogers 1999), glioma (Nishie ve ark 1999), akciğer (Chen ve ark 2005) ve malignant uveal melanom (Makitie ve ark 2001) vb. pek çok kanser türünde MDD ile makrofaj infiltrasyonu arasında korelasyon olduğunu belirten çalışmalar varken, endometrial (Salvesen ve Aksleen 1999) ve akciğer (Koukourakis ve ark 1998) kanserlerinde MDD ile makrofaj infiltrasyonu arsında korelasyon olmadığını belirten çalışmalar da mevcuttur. Çalışmamızda köpeklerin benign ve malign tümörlerinde CD68, CD163 makrofajlar ile MDD arasında anlamlı bir korelasyon tespit edemedik. Bunun nedenini olgu sayımızın az olmasına bağlamaktayız (Tablo 3.13). Kedilerde ise materyal sayısı düşük olduğu için istatistiksel korelasyon değerlendirmesi yapılamamıştır.

VEGF ile TAM infiltrasyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda genel olarak makrofajlar ile VEGF arasındaki ilişkinin anlamlı olduğu görüşü hakimdir. Raposo ve ark (2013) yaptıkları bir çalışmada TAM'lar ile VEGF pozitif tümörler ve malign tümörler arasında anlamlı bir ilişki olduğunu raporlamışlardır. Raposo ve ark (2015)'nın köpek meme tümörlerinde TAM'ların anjiyogenezdeki rolünü araştırdıkları farklı bir çalışmada malign tümör grubu içerisinde TAM'larin VEGF ile önemli derecede ilgileşim gösterdiğini ancak TAM'lar ile MDD arasında benzer bir ilişki saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda köpeklerin hem benign tümörlerinde hem malign tümörlerinde CD68 ve CD163 antikorları ile VEGF İHC skorları arasında anlamı korelasyon tespit edilmedi. (Çizelge 4.13). VEGF ve TAM infiltrasyonu arasında bulunan ilişki sadece karmaşık bir sürecin yansıması olmamakla beraber sadece VEGF'ün tümöral anjiyogenezi tek başına koordine etmediğini ve diğer bazı faktörlerin de makrofajların tümör mikroçevresine toplanmasını ve anjiogenez sürecine katıldığının göstergesi olarak düşünülebilir.

Makrofajlar kemik iliği kökenli kan hücreleri olan ve monosit olarak adlandırılan hücrelerden farklılaşırlar. İnflamasyon durumunlarında dokuya geçerek makrofaj adını almaktadır (Zhang ve ark 2012). Genelde makrofajlar M1 ve M2 makrofajlar olarak 2 alt gruba sınıflandırılır (Chanmee ve ark 2014). Tümör ilişkili makrofajlar (TAM) ise tümör dokusuna göç eden M2 yapısındaki makrofajlara verilen genel isimdir. Çalışmamızda kullanılan CD68 antikoru pan-makrofaj bir molekül olup M1, M2 ayrımı yapmadan tüm makrofajlarda ifadelenmekte, CD163 ise sadece M2 makrofajlarda ifadelenmektedir (Suyanı 2012).

Raposo ve ark (2015)'in köpek meme tümörlerinde yaptıkları bir çalışmada malign tümörlerdeki makrofaj sayısının benign tümörlere kıyasla anlamlı derecede ($P<0.001$) yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada hücre sayısı kesim noktası olan 55 değeri esas alınarak analiz yapılmış ve tümör büyüklüğü, histolojik grade, nekroz gibi özellikler ile aralarında anlamlı bir ilişki saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Yine Raposo ve ark (2012) köpek meme tümörlerinde yaptıkları farklı bir çalışmada tümör ilişkili makrofaj sayısının malign tümörlerde benign tümörlere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişler ve tümör büyüklüğü, histolojik grade, nekroz ve lenf nodu metastazı gibi özellikler ile aralarında anlamlı bir ilişki saptayamamışlardır. Çalışmamızda bahsi geçen çalışamaların aksine köpeklerin benign tümörlerinde sayılan CD68 ve CD163 sayıları istatistiksel olarak

anlamsız olmasına rağmen malign tümörlerden yüksekti (p>0,05) (Tablo 3.7). Ancak kedi tümörlerindeki CD68 ve CD163 sayıları anılan çalışmalara benzer şekilde istatistiksel olarak anlamsız olmasına rağmen malign tümörlerde daha yüksekti ve bu çalışmalara benzer şekilde tümör büyüklüğü, histolojik grade, nekroz ve lenf nodu metastazı gibi özellikler ile hem kedi hem de köpek tümörlerinde aralarında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p>0,05). Bu çelişkili sonuç çalışmaların sadece köpek tümörlerinde yapılmış olmasından ya da çalışmada TAM'lar için sadece tek bir belirteç ile boyama yapılmasından kaynaklanmış olabilir. Şöyle ki sunulan çalışmalarda sadece MAC387 antikoru kullanılmış, bizim çalışmamızda bu tip bir karışıklığa sebep olmamak için hem anti-CD68 monoklonal antikoru, hem de anti-CD163 monoklonal antikoru kullanılarak TAM değerlendirmesi yapılmıştır. Belirtilen çalışmalarda kullanılan antikor pro-tümoral etkiden ziyade anti-tümoral etkiye sahip olan M1 makrofajlarından ibaret olabilir. Monteiro ve ark (2018) köpek meme tümörlerinde yaptıkları farklı bir çalışmada MAC387 ve CD206 antikorları kullanmış benign tümörlerde M1 makrofajların, malign tümörlerde ise M2 makrofajların daha fazla olduğunu tespit etmişler ve yüksek TAM miktarının tümör büyüklüğü, LVİ, MDD ile ilişkili olduğunu bildirerek ve 2 yıllık prognozla olan ilişkisini ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda prognozla ilgili değerlendirme yapılamamıştır. Bununla birlikte çalışmamızda köpeklerin malign tümörlerinde CD68 ve CD163 ile işaretlenen makrofaj sayıları arasında pozitif korelasyon olduğunu saptadık (p<0.01) (Tablo 3.13). Çelişkili sonuçların yanı sıra köpek ve kedilerde M1-M2 ayrımını yapan çalışmaların kısıtlı olmasından dolayı çalışmamız köpek ve kedilerdeki CD68 ve CD163 monoklonal antikorlar ile boyamanın TAM infiltrasyonunu göstermedeki etkisinin başka çalışmalarla doğrulanması gerektiğini göstermektedir.

TAM, tümör dokusunun nekrotik ve hipoksik bölgelerine toplanmaktadır (Murdoch ve ark 2004, Chanmee ve ark 2014). Çalışmamızda köpeklerin malign tümörlerinde nekroz bulunan tümörlerde, olmayanlara göre hem CD68 hemde CD163 hücre sayıları daha düşüktü ve istatistiksel olarak anlamsızdı (p>0,05) (Tablo 3.8). Literatürde yapılan tüm bu çalışma sonuçları bizim çalışmamızla birlikte değerlendirildiğinde tümörde TAM infiltrasyonu ve onun histopatolojik faktörler üzerine etkisi arasında kesin bir sonuç çıkarılamamaktadır. Bunun nedeninin TAM'ların pro-tümörojenik ve anti-tümörojenik çift taraflı etkisinden dolayı olduğunu düşünebiliriz. TAM'ların tümorojenik ve anti-tümörjenik mekanizmalar

arasındaki etkilerinin tam olarak aydınlatılamamış olmasından dolayı bu çelişkili sonuçları açıklamaya yönelik daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamız genel olarak değerlendirildiğinde köpek ve kedilerin meme tümörlerindeki mikroçevre, hipoksi ve anjiyogenez üzerine insan hekimliğindeki kadar araştırma yapılmamış olması, kullanılan antikorların insan tümörlerinde kullanılan antikorlar olması, kedilerdeki bu çalışmaların köpeklere kıyasla daha kısıtlı olması ve sonuçların çelişkili olması bu antikorların köpek ve kedilerdeki mevcut süreci insanlardaki gibi temsil edip edemediği konusunda soru işaretlerini beraberinde getirmiştir. Ancak gözlemciler arası skorlama farklılıkları, araştırma metodlarındaki farklılıklar ve yetersiz örneklem büyüklüğü gibi sorunlar nedeniyle immünhistokimya sonuçlarında çelişkili sonuçlara ulaşılmış olabileceği de unutulmamalıdır.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Köpek ve kedilerin meme tümörlerinde tümör mikroçevresi, bu mikroçevredeki anjiyogenez, hipoksi ve tümör ilişkili makrofajların klinikopatolojik ve histopatolojik verilerle ilişkisi ülkemizde ilk kez bu çalışmada birlikte değerlendirilmiş ve aşağıda sıralanan sonuçlar elde edilmiştir.

Köpeklerde incelenen olguların 28'i malign, 6'sı benign olarak sınıflandırıldı. Kedilerdeki olguların ise 9'u malign, 3'ünü benign idi.

Köpeklerin yaşları 4-15 yaş (ort. 9.24) ve kedilerin yaşları 1-14 yaş (ort. 9.6) arasında değişti. Köpeklerde en yüksek meme tümörü insidensi 5-8, kedilerde ise 9-12 yaş aralığında görüldü.

Köpeklerde en fazla tümör saptanan köpek ırkının (n:14) Terrier olduğu ve bunların çoğunluğu malign özellik (n:13) gösterirken; tümör tipi olarak da miks karsinomların (n:9) çok sayıda olduğu görüldü. Kedilerde ise en fazla Melez (n:7) ırkta tümör tespit edildi.

Köpeklerde ve kedilerde incelenen benign tümörlerin MDD'si malign tümörlere kıyasla düşük olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0,05$).

Köpeklerde Grade'ler ayrı ayrı değerlendirildiğinde Grade 2 ile Grade 3 arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıyken ($p<0,05$); Grade 1 ile Garde 2 ve Garde 1 ile Grade 3 arasındaki ilişki anlamsızdı ($p>0,05$). Kedilerin malign tümörlerinde Garde'ler ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise Grade'ler arasındaki ilişki anlamsızdı ($p>0,05$).

Köpeklerin malign tümörlerinde tümör büyüklüğü ve tümör nekrozu ile MDD arasındaki ilişki anlamlıyken ($p<0,05$), histolojik grade, mitotik skor, LVİ bakımından anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Kedilerin malign tümörlerinde tümör derecesi, mitotik skor, LVİ, nekroz özellikleri ile MDD arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$)

Köpeklerde tümör büyüklükleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde tümör büyüklüğü 0-3cm olan tümörlerle 3-5cm olan tümörler arasında MDD derecesi

anlamsızken (p>0,05), 0,3cm ve >5cm ile 3-5cm ve >5cm arasında olan tümörlerde MDD dereceleri arasındaki istatistiksel fark önemliydi (p<0,05).

Köpeklerin ve kedilerin benign tümörlerinde VEGF İHC boyanma skoru ortalaması malign tümörlere kıyasla yüksek olmakla birlikte aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p>0,05).

Köpeklerde ve kedilerde malign tümörlerde VEGF İHC boyanma skoru ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ, nekroz özellikleri arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. (p>0,05).

Köpeklerde benign tümörlerde HİF-1A İHC boyanma skor ortalaması malign tümörlere kıyasla düşüktü (p>0,05). Kedilerde ise köpeklerin aksine benign tümörlerde ortalama daha yüksekti (p>0,05).

Hem köpeklerde hem kedilerde malign tümörlerde HİF-1a İHC boyanma skoru ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ, nekroz özellikleri arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. (p>0,05).

Köpeklerin benign tümörlerinde CD68 ile işaretlenen makrofaj yoğunluğu malign tümörlere göre daha yüksek olmakla birlikte aradaki istatistiksel fark anlamsızdı (p>0,05). Kedilerde ise köpeklerin aksine benign tümörlerdeki CD68 ile işaretlenen makrofaj yoğunluğu malign tümörlere kıyasla düşüktü (p>0,05).

Hem köpeklerde hem kedilerde malign tümörlerde CD68 hücre sayısı ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ, nekroz özellikleri arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. (p>0,05).

Köpeklerde ortalama CD68 hücre sayısı kesim noktası olan 50 değeri esas alınarak yapılan analizde benign ve malign tümörler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı (p>0,05). Ayrıca köpeklerin malign tümörlerinde CD68 hücre sayısı <50 ve >50 değerler ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ ve nekroz özellikleri açısından fark yoktu (p>0,05).

Köpeklerin benign tümörlerinde CD163 ile işaretlenen makrofaj yoğunluğu malign tümörlere göre daha yüksekti ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı (p>0,05). Kedilerde ise köpeklerin aksine benign tümörlerde CD163 ile işaretlenen makrofaj yoğunluğu malign tümörlere göre daha yüksekti (p>0,05).

Hem köpeklerde hem kedilerde malign tümörlerde CD163 hücre sayısı ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor, LVİ, nekroz özellikleri arasında istatiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Köpeklerde ortalama CD163 hücre sayısı kesim noktası olan 61 değeri esas alınarak yapılan değerlendirmede benign ve malign tümörler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0,05$). Ayrıca köpeklerin malign tümörlerinde CD163 hücre sayısı <61 ve >61 değerler ile histolojik grade, tümör büyüklüğü, mitotik skor ve nekroz özellikleri açısından fark yoktu ($p>0,05$).

Köpeklerin malign tümörleri içerisinde CD68 ve CD163 arasında pozitif korelasyon saptanırken ($p<0,01$), diğer veriler arasında korelasyon belirlenmedi. Kedilerde ise materyal sayısının düşük olmasından dolayı istatistiksel analiz yapılamadı.

Sonuç olarak, çalışmamızda ele alınan moleküller, malignitelerdeki değeri çelişkili olan, henüz tedavi planındaki rolü bilinmeyen moleküllerdir. Tümör mikroçevresindeki toplanan immun hücrelerin tipleri, anjiyogenez ve hipoksi malignitelerin önemli bir bileşeni ve bazı çalışmalarda kötü prognozun bir göstergesi olarak değerlendirilmesine rağmen CD31, HIF-1a, VEGF, CD68 ve CD163'ün immünhistokimyasal olarak tesbitinin tümördeki dinamik süreci doğru temsil edip edemediği de önemli bir tartışma konusudur. Bizim çalışmamız, köpek ve kedilerin meme tümörlerinde tümör mikroçevresindeki hücresel yanıt, anjiyogenez, hipoksi mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasında bir ipucu niteliğinde olabilir. Fakat bu moleküllerin karsinogenez ve tümör progresyonundaki gerçek rollerini anlamak, bu süreçlerde yer alan kompleks moleküller ağının ve genetik değişikliklerin birbirleri ile ilişkili çok faktörlü dinamik bir etkileşimin sonucu olması nedeniyle zorlaşmaktadır. Bununla beraber materyal sayısının az olması, benign ve malign tümör dağılımının dengesiz olması, çalışmanın retrospektif yapılması, makroskopi sırasında fiksasyonun yeteri kadar yapılıp yapılmadığının bilinmemesi bu çalışmanın kısıtlayıcı yönleri olmuştur. Bu nedenle daha fazla materyalle, ayrıntılı olarak klinik, histopatolojik ve klinikopatolojik özelliklerinin yanı sıra prognozun da incelendiği çok merkezli çalışmaların yapılmasının uygun olacağı görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

Abdelmegeed S, Mohammed S, 2018. Canine Mammary Tumors as a Model for Human Disease (Review). Oncology Letters, 15, 8195-8205 Nisan. https://doi.org/10.3892/ol.2018.8411.

Algire GH, Chalkey HW, Legallais FY, Park H, 1945.Vascular reactions of normal and malignant tumours in vivo. JNCI, 6, 73–85.

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A, 2008. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. Crit Rev Oncol Hematol, 66, 1-9.

Amorim, FV, Souza, HJM, Ferreira, AMR, Fonseca, ABM, 2006. Clinical, cytological and histopathological evaluation of mammary masses in cats from Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Feline Medicine and Surgery, 8, 379-388. doi:10.1016/j.jfms.2006.04.004

Andrade MB, Guimaraes EC, Coleto AF, Soares NP, Medeiros-Ronchi AA, 2017. Estudo retrospectivo de lesões mamárias em cadelas-Uberlândia, MG, Brasil. Retrospective study of mammary lesions in bitches-Uberlandia, MG, Brazil. Acta Scientiae Veterinariae, 45, 1509.

Antunes SCS, 2014. Felıne Mammary Tumours: A Lıterature Revıew. Doktora Tezi, Escola Unıversıtárıa Vasco Da Gama, Coimbra.

Argyle DJ, 2006. The mammary gland. In: Simpson GM, England GCW, Harvey M, eds. BSAVA Manual of small animal reproduction and neonaology. 3rd ed. India: Replika Press, p.53-9.

Argyle DJ, Turek MM, Mac Donald V, 2008. Canine and Feline Mammary Tumors, Argyle DJ, Brearley MJ, Turek MM (eds), Decision Making in Small Animal Oncology, 1st Ed., Wiley-Blackwell, p. 327, Iowa

Artan ME, 1988. Histoloji. T.C. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, İstanbul

Aughey E, Frye FL, 2001. Comparative Veterinary Histology With Clinical Correlates, Manson Publishing, London, UK.

Ausprunk DH and Folkman J, 1977. Migration and proiferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc Res, 14, 53–65.

Avni R, Cohen B, Neeman M, 2011. Hypoxic stres and cancer: Imaging the axis of evilin tumor metastasis. NMR Biomed, 24, 569-581.

Aydoğan A, 2010. Köpek meme tümörlerinin tanısında histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Babacan NA, 2015. Tümör Mikroçevresi. Erişim adresi, www.immuno-onkoloji.org. Erişim tarihi, 28.11.2016.

Bahadori B, Uitz E, Mayer A, Harauer J, Dam K, Truschnig-Wilders M, Pilger E, Renner W. 2010. Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene peripheral artery disease. Vascular Medicine ,15, 5, 371-374.

Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T, 2012. The tumor microenvironment at a glance. J Cell Sci, 125, 5591-6.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D, 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. Blood, 87,3336-3343.

Bates, GJ et al, 2006. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. J. Clin. Oncol, 24, 5373–5380

Battegay EJ, 1995.Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. J Mol Med, 73, 7,333-46.

Benavente MA, Bianchi CP and Aba M A, 2016. Canine Mammary Tumors: Risk Factors, Prognosis and Treatments. J. Vet Adv, 6, 8, 1291-1300. DOI: 10.5455/jva.20160916045115

Bergers G, Benjamin LE, 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nature Reviews Cancer, 3, 401–410.

Betof AS ve Dewhirst MV, 2011. Establishing the Tumor Microenvironment , In: Tumor Microenvironment, ed: Sieman Dietmar W. Hoboken: Wiley, P.7-24

Bingle L, Lewis CE, Corke KP, Reed MW, Brown NJ, 2006. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. Br. J. Cancer 94, 101–107.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL. Torre LA, Jemal A, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, CA A Cancer J. Clin, 68, 6, 394–424

Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR, 1983. Canine mammary gland neoplasms. J Am Anim Hosp Assoc, 19, 61-90.

Brown JM, Wilson WR, 2004. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. Nature Reviews Cancer, 4, 6, 437–447.

Cardazzo B, Zappulli V, Frassineti F, Patarnello T, Castagnaro M, Bargelloni L, 2005 Fulllenght sequence and expression analysis of estrogen receptor alpha mRNA in feline mammary tumours. J Steroid Biochem Mol Biol, 96, 109-18.

Carmeliet P, 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nature Medicine, 6, 389–395.

Carmeliet P, 2003. Angiogenesis in health and disease. Nat Med, 9, 653- 660.

Carmeliet P, Jain RK, 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature, 407,6801 ,249-57.

Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N, 2014. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. Cancers, 6, 1670-1690, doi:10.3390/cancers6031670.

Chen JJ, Lin YC, Yao PL, Yuan A, Chen HY, Shun CT, et al. 2005. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. J Clin Oncol, 23, 953-64.

Chodak GW, Haudenschild C, Gittes FF, Folkman J. 1980. Angiogenic activity as a marker of neoplastic and preneoplastic lesions of the human bladder. Ann Surg,192, 762-771.

Choudhury KR, Yagle KJ, Swanson PE, Krohn KA, Rajendran JG, 2010. A robust automated measure of average antibody staining in immunohistochemistry images. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, 58, 2, 95-107.

Clemente M, Sanchez-Archidona A R, Sardon D, Diez L, Martin-Ruiz A, Caceres S, Sassi F, Dolores Perez-Alenza M, Illera JC, Dunner S and Pena L, 2013. Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. Vet J, 197, 427-432.

Comito G, Giannoni E, Segura CP, Barcellos-de-Souza P, Raspollini MR, Baroni G, 2014. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. Oncogene, 33, 2423–31.

Coronella JA, Telleman P, Kingsbury G A, Truong TD, Hays S and Junghans RP, 2001. Evidence for an antigen-driven humoral immune response in medullary ductal breast cancer. Cancer Res, 61, 7889-7899.

Curiel TJ, 2004.Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nature Med, 10, 942–949

Davies LC ,Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR, 2013. Tissue-resident macrophages. Nat. Immunol, 14, 986–995.

De Maria R, Olivero M, Iussich S, Nakaichi M, Murata T, Biolatti B and Di Renzo MF, 2005. Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. Cancer Res, 65, 907-912.

Distler O , Neidhart M, Gay RE, Gay S, 2002. The molecular control of angiogenesis. Intern. Rev. İmmunol, 21, 33-49.

Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR, 1968. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda county. J Nath Cancer Inst, 40, 2, 307-318.

Ekici Ö, Tokyol Ç, Dilek FH, Aktepe F, Şahin Ö, Şahin DA, 2016. "Cyclooxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Their Correlation with Angiogenesis in Gastric Carcinomas". Içinde . https://doi.org/10.4274/meandros.1038.

Eskiizmir G, 2015. Baş boyun yassı hücreli karsinomlarında tümör mikroçevresi. Turk Arch Otorhinolaryngol, 53, 120-7.

Eubank TD, Roda JM, Liu H, O'Neil T, Marsh CB, 2011. Opposing roles for HIF-1alpha and HIF-2alpha in the regulation of angiogenesis by mononuclear phagocytes. Blood, 117, 323–332.

Evans HE ,1993 Miller's Anatomy of the Dog, 3rd Ed, Saunders, p.549-553, Philadelphia.

Fernandez PM, Rickles FR, 2002. Tissue factor and angiogenesis in cancer. Curr Opin Hematol, 9, 401-406.

Ferrara N, 2000. VEGF: An update on biological and therapeutic aspects, Curr Opin Biotechnol, 11, 517-24

Ferrara N, Davis-Smyth T, 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev, 18, 4-25.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J, 2003. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med, 9, 669-676.

Finger EC, Giaccia AJ, 2010. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. Cancer Metastasis Rev 29:285–293. DOI 10.1007/s10555-010-9224-5

Folkman J, 1971.Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. N Engl J Med, 285, 1182-1186

Folkman J, 1984. Angiogenesis. In: Biology of endothelial cells. Ed. EA Jaffe. Boston: Nijhoff, pp 412-428.

Folkman J, 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, J Natl Cancer Inst, 82, 4-6

Folkman J, 1995.Clinical applications of research on angiogenesis. N Eng J Med, 333, 1757-1763

Folkman J, Klagsbrun M, 1987. Angiogenic factors. Science, 235, 442-447.

Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1"versus "N2" TAN. Cancer Cell, 16 ,3, 183-194.

Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J, 2012. The immune contexture in human tumors: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer, 12, 298-306.

Gao Q, 2007. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. J. Clin. Oncol, 25, 2586–2593

García-Zepeda EA, Valdivia-Silva J, Franco-Barraza J, Cukierman E, 2011. Novel Insights Into the Role of Inflammation in Promoting Breast Cancer Development. In: Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem Cells and Metastasis. Ed:Gunduz M ve Gunduz E. InTech, p. 129-165. https://doi.org/10.5772/1747.

Geraldes M, Gartner F, and Schmitt F, 2000. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. Vet Rec, 146, 403–406.

Ghoncheh M, Pournamdar Z and Salehiniya H, 2016. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. Asian Pac J Cancer Prev, 17,43-46.

Gocheva V, Wang HW, Gadea, BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, Berman T, Joyce JA, 2010. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promotecancer growth and invasion. Genes Dev, 24, 241–255

Goldschmidt M, Pen˜a L, Rasotto R, Zappulli V, 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. Veterinary Pathology, 48, 117-131.

Goldschmidt M, Pen˜a L, Rasotto R, Zappulli V, 2017. Tumors of the Mammary Gland. In:Tumors in Domestic Animals, Edited by Donald J. Meuten, Fifth Edition. Ames, Iowa: Wiley/Blackwell. p:723-65

Goliasova T and Denko NC, 2011. Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF1) Mediated Adaptive Responses in the Solid Tumor. In: Tumor Microenvironment. Edited by Dietmar W. Siemann. p.271-291. ISBN: 978-0-470-74996-8

Gordon, S, Martinez FO, 2010. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. Immunity, 32, 593–604.

Graff S, Barach A, Bickerman HA, Beck GJ, Eisenberg M, Freedman AD, 1960. Hypoxia in cancer. Acta Unio Int Contra Cancrum, 16, 651-5.

Graham JC, Myers RK ,1999. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. Journal ofmVeterinary Internal Medicine, 13, 416-418.

Griffey SM, Verstraete FJ, Kraegel SA, Lucroy MD, Madewell BR, 1998. Computer-assisted image analysis of intratumoral vessel density in mammary tumors from dogs. American Journal of Veterinary Research, 59, 1238-1242.

Guruvayoorappan C, 2008. Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? Integrative Cancer Therapies, Volume 7, Number 2, 90-95.

Gültiken N, 2016. Meme Hastalıkları. Turkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics, 2, 2, 102-8

Hameed KAS, Banumathi A, Ulaganathan G, 2015. Performance evaluation of maximal separation techniques in immunohistochemical scoring of tissue images. Micron, 79, 29-35.

Hanada T, Nakagawa M, Emoto A, Nomura T, Nasu N and Nomura Y, 2000. Prognostic value of tumour-associated macrophage count in human bladder cancer. Int J Urol 7, 263-269.

Hanahan D, Coussens LM, 2012. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. Cancer Cell, 21, 309-22.

Hao NB, Lu MH, Fan YH, Cao YL, Zhang Z.R, Yang SM, 2012.Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. Clin. Dev. Immunol, 948098.

Haroon ZA, Peters KG, Greenberg CS, Dewhirst MW, 1999. Angiogenesis and Oxygen Transport in Solid Tumors. In: Totowa, New Jersey, Teicher BA (eds). Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy, 3, 21, Humana Press.

Harris AL, Horak E, Leek R, 1992. Quantative angiogenesis in human breast cancer- correlation with lymph node metastasis and assesment of vascular growth factors. Proc. AACR, 33, 75

Hayes AA, Mooney S, 1985. Feline Mammary Tumors. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 15, 3, 513-520.

Hayes HM, Milne KL, Mandell CP, 1981. Epidemiological features of feline mammary carcinoma. Vet Rec, 108, 22, 476-479.

Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK,Kelley DG, Marconcini LA, Mecham R.P, Senior RM, Shapiro SD, 2006. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. J. Clin. Invest, 116, 753–759.

Ide AG, Bake NH, Warren SL, 1939. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. Am J Roentgenol, 42, 891–899

Islam MS, Matsumoto M, Hidaka R, Miyoshi N, Yasuda N, 2012. Expression of NOS and VEGF in Feline Mammary Tumours and Their Correlation with Angiogenesis. The Veterinary Journal 192, 3, 338-44. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.08.032.

Jakab C, Halász J, Kiss A, Schaff Z, Szász AM, Rusvai M, Tóth ZA, Kulka J, 2008. Evaluation of Microvessel Density (MVD) in Canine Mammary Tumours by Quantitative Immunohistochemistry of the Claudin-5 Molecule. Acta Veterinaria Hungarica 56, 4, 495-510. https://doi.org/10.1556/AVet.56.2008.4.7.

Kao J, Houck K, Fan Y, Haehnel I, Libutti SK, Kayton ML, Grikscheit T, Chabot J, Nowygrod R, Greenberg S, 1994. Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II. J. Biol. Chem, 269, 25106–25119.

Karabolovski, Dvm Nikola, Dvm Natasha Pejcinovska, Dvm Pance Dameski, Dvm Petar Dodovski, Dvm Igor Zdraveski, ve Dr Saso Stojanovski. t.y. 2020. Felıne Mammary Tumors, Prevalence And Pathohıstologıcal Classıfıcatıon, 8. doı: 10.20544/horızons.b.03.1.16.p07

Karayannopoulou M, Kaldrimidou E, Dessiris A, 1989. Some Epidemiological Aspects of Canine Mammary Tumors Treatment and Prognosis. Bull. Helenic Vet. Med. Soc, 40, 111-121.

Keskin A, Yılmazbaş G, Yilmaz R, Ozyigit MO, Gumen A, 2009.Pathological abnormalities after long-term administration of medroxyprogesterone acetate in a queen. Journal of Feline Medicine and Surgery, 11, 518-21

Kierszenbaum AL, 2006. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Demir R (Çev. Ed.), 1. Basım, Palme Yayınları, Ankara.

Kliche S, Waltenberger J, 2001. VEGF receptor signaling and endothelial function. IUBMB Life, 52, 61-66.

Klopfleisch R, 2016. Mammary Tumors. Veterinary Oncology. R. Klopfleisch (ed.),Springer International Publishing Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-41124-8_5

Knies UE, Kroger S, Clauss M. Expression of EMAP II in the developing and adult mouse. Apoptosis. 2000;5:141-151.

Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T, Koyama H, Kitazawa M, Takeoka M, Sano K, Amano J, Isogai Z, Niida S, 2010. Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. Cancer Res, 70, 7073–7083.

Koh MY, Powis G, 2012. Passing the button: the HIF swich. Trends in Biochemical Sciences, 37, 9, 364-72.

Koontongkaew S, 2013. The Tumor Microenvironment Contribution to Development, Growth, Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. J Cancer , 4, 1, 66-83. doi:10.7150/jca.5112.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Kakolyris S, 1998. Different patterns of stromal and cancer cell thymidine Phosphorylase reactivity in non-small-cell lung cancer: impact on tumour neoangiogenesis and survival. Br J Cancer, 77, 1696-1703.

Król M, Pawlowski K, Majchrzak K, Dolka I, Abramowicz A , Szyszko K, Motyl T, 2011. Density of Tumor-Associated Macrophages (TAMs) and Expression of Their Growth Factor Receptor MCSF-R and CD14 in Canine Mammary Adenocarcinomas of Various Grade of Malignancy and Metastasis. Polish Journal of Veterinary Sciences ,14,1. https://doi.org/10.2478/v10181-011-0001-3.

Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, Brumlik M, Cheng P, Curiel T, Myers L et al, 2006. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. J. Exp. Med, 203, 871–881

Kuang DM, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu C, Zheng L, 2009. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. J. Exp. Med, 206, 1327–1337.

Kuruca N, Gülbahar MY, Sözmen M, Yarım M, Kabak YB, Karaca E, İnal S, Güvenç T, 2019. Samsun'da 2004-2019 yılları arasında incelenen köpek meme tümörleri. Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 30, 2,132-136.

Lavalle GE, Bertagnolli AC, Tavares WL, Cassali GD, 2009. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. Veterinary Pathology, 46, 1275-1280.

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J and Harris AL.1996 .Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. Cancer Res, 56, 4625-4629.

Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Harris AL, 2000. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. J Pathol, 190, 430-436.

Lewis CE, Pollard JW, 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. Cancer Res, 66, 2, 605-612.

Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE, 2000. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. J Pathol, 192, 150-158.

Li H, Fan X, Houghton JM, 2007. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. Journal of Cellular Biochemistry, 101,805–815.

Li H, Ko HP, Whitlock JP, 1996. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of ARNT and HIF1alpha. J Biol Chem, 271, 21262-7.

Liao D, Johnson RS, 2007. Hypoxia: A Key Regulator of Angiogenesis in Cancer. Cancer and Metastasis Reviews, 26, 2, 281-90. https://doi.org/10.1007/s10555-007-9066-y.

Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW, 2001.Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. J Exp Med, 193, 727-740.

Lissbrant IF, Stattin P, Wikström P, Damber JE, Egevad L and Bergh A, 2000. Tumour associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. Int J Oncol, 17, 445-451.

Lok CN, Ponka P, 1999. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. J Biol Chem, 274, 24147-52.

Lu P, Weaver VM, Werb Z, 2012. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. J Cell Biol, 196, 395-406. https://doi.org/10.1083/jcb.201102147.

Luong RH, Baer KE, Craft DM, Ettinger SN, Scase TJ, 2006. Prognostic significance of intratumoral microvessel density in canine soft-tissue sarcomas. Veterinary Pathology, 43, 622-631.

MacEwen EG, Withrow S, 1996 Tumors of the mammary gland. Small animal oncology. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders, p.356-72.

Madej JA, Madej JP, Dziegiel P, Pula B, Nowak M, 2013. Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1α and Vascular Density in Mammary Adenomas and Adenocarcinomas in Bitches. Acta Veterinaria Scandinavica, 55, 1, 73. https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-73.

Maiolino P, Papparella S, Restucci B, De Vico G ,2001. Angiogenesis in squamous cell carcinomas of canine skin: an immunohistochemical and quantitative analysis. Journal of Comparative Pathology, 125, 117-121.

Makitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivela T, 2001. Tumorinfiltrating macrophages (CD68+ cells) and prognosis in malignant uveal melanoma. Invest Ophthalmol Vis Sei, 42, 1414-1421.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A, 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol, 23, 549-55.

Mantovani A, Locati M, 2013. Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm of Macrophage Plasticity, Diversity, and Polarization: Lessons and Open Questions. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 33, 7, 1478-83. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.300168.

Martano M, Maiolino P, Cataldi M, Restucci B, 2004. Evaluation of angiogenesis by morphometric analysis of blood vessels in dysplastic and neoplastic lesions of canine gingiva. Veterinary Research Communications, 28(Suppl. 1), 299-301.

McNamara DA, Harmey JH, Walsh TN, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ, 1998. Significance of angiogenesis in cancer therapy. Br J Surg, 85, 1044-1055.

McNeil B, Papandreou I and Denko NC, 2016. Hypoxic Reprograming of Tumor Metabolism, Matching Environmental Supply with Biosynthetic Demand, In: Tumor Hypoxia, Ed: Yun Z, New Jersey, World Scientific, p.147-48

Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L. 1995.A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. J Exp Med;182:1683-93.

Meuten, Donald J., ed. 2017. Tumors in Domestic Animals. Fifth edition. Ames, Iowa: Wiley/Blackwell, p.723-765

Mignatti P, Rifkin DB, 1996. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. Enzyme Protein, 49, 117- 137.

Millanta F , Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D, Poli A, 2006. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor Flk-1/KDR in Promoting Tumour Angiogenesis in Feline and Canine Mammary Carcinomas: A Preliminary Study of Autocrine and Paracrine Loops. Research in Veterinary Science, 81, 3, 350-57. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.01.007.

Millanta F, Andreani G, Rocchigiani G, Lorenzi D, Poli A, 2016. Correlation Between Cyclo-Oxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Canine and Feline Squamous Cell Carcinomas. Journal of Comparative Pathology, 154, 4, 297-303. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.02.005.

Millanta F, Lazzeri G, Vannozzi I, Viacava P, Poli A, 2002. Correlation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression to Overall Survival in Feline Invasive Mammary Carcinomas. Veterinary Pathology, 39, 6, 690-96. https://doi.org/10.1354/vp.39-6-690.

Mills SW, Musil KM, Davies JL, 2015. Prognostic value of histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis. Vet Pathol, 52, 238–249.

Milne K, Ko¨bel M, Kalloger SE, Barnes RO, Gao D, Gilks CB, Watson PH and Nelson BH, 2009. Systematic analysis of immune infiltrates in highgrade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. PLoS ONE 4, e6412.

Milosevic MF, 2011. Hypoxia, Anerobic Metabolism and Interstitial Hypertension. In: Tumor Microenvironment. Edited by Dietmar W. Siemann. p.183-201. ISBN: 978-0-470-74996-8

Misdorp W, 1991. Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. Acta Endocrinol (Copenhagen) 125, 27–31.

Misdorp W, 2002 Tumors of the Mammary Gland, Meuten DJ (ed), Tumors in Domestic Animals, 4th Ed., Iowa State Press, p. 575-599, Iowa.

Monteiro LN, Rodrigues M.A, Gomes DA, Salgado BS, Cassali GD, 2018. Tumour-Associated Macrophages: Relation with Progression and Invasiveness, and Assessment of M1/M2 Macrophages in Canine Mammary Tumours. The Veterinary Journal, 234 (Nisan), 119-25. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.02.016.

Morris J, 2013. Mammary tumours in the cat. J Feline Med Surg. P. 15, 391-400.

Moulton JE, Taylor DON, Dorn CR, Andersen AC, 1970. Canine mammary tumors. Pat.Vet. 7, 289-320.

Moulton JE,1990. Tumors of the Mammary Gland. In: Tumors in Domestic Animals, Shirley Warren, Kathy Walker and Ellen Herman (Ed), University Press, California. p. 518-552.

Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE, 2004. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. Blood, 104, 2224-34.

Murphy S, 2008. Mammary tumours in dogs and cats. In Practice,30, 334-339. doi: 10.1136/inpract.30.6.334

Murray PJ,Wynn TA, 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat. Rev. Immunol, 11, 723–737.

Nicolson GL, 1988. Organ specificity of tumor metastasis: Role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. Cancer Metastasis Rev, 7, 143 -188.

Nishie A, Ono M, Shono T, 1999. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. Clin Cancer Res, 5, 1107-1113,

Nunes FC, Campos CB, Teixeira SV, Bertagnolli AC, Lavalle GE, Cassali GD, 2018. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. Arq Bras Med Vet Zootec, 70, 6, 1714-1722.

Orre M and Rogers PAW, 1999. Macrophages and microvessel density in tumors of the ovary. Gynecol Oncol 73, 47-50.

Overley B, Schofer FS, Goldschmidt MH, Sherer D, Sorenmo KU, 2005. Association between ovariohysterectomy and feline mammary carcinoma. J Vet Intern Med, 19, 560-63.

Owen LN, 1979. A comparative study of canine and human breast cancer. Invest Cell Pathol 2, 257-275.

Paget S, 1889. The Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. Cancer Metastasis Reviews, 8, 2, 98-101.

Pastor N, Caballe NC, Santella M, Ezquerra LJ, Tarazona R, Duran E, 2018. Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. Austral J Vet Sci ,50, 143-147.

Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidoy E, Papazoglou, LG, Tzegas SI, Tziris NE, Kaitzis DG, Dimitriadis AS, Dessiris A (2006) The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: A lymphographic study, Anatomia Histologia Embryologia, 1-7.

Pena L, De Andres PJ, Clemente M, 2013. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: Relationship with clinical and histological characteristics. Vet Pathol 50, 94–105.

Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD, 1996.Angiogenesis: A paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. Enzyme Protein, 49, 138–162.

Pereira CT, Rahal SC, de Carvalho Balieiro JC, Ribeiro AA, 2003.Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can ıt really be altered? Anat Histol Embryol, 32, 282-90.

Perez-Alenza MD, Pena L, Del Castillo N, Nieto AI, 2000. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. J Small Anim Pract, 41, 287-291.

Podar K, Anderson KC, 2005. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. Blood, 105, 1383-1395

Pollard JW, 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. Nat Rev Cancer, 4,71-78.

Preziosi R, Sarli G, Paltrinieri M, 2004. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumors of the dog. Journal of Comparative Pathology, 130, 143-151.

Qiu CW, Lin DG, Li CY, Deng GZ, 2008. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. Veterinary Research Communications, 32, 463-472.

Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, Prada J and Pires I, 2011. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: Most recent findings. In vivo 25, 455-465.

Rapisarda A ve Giovanni M, 2009. Role of the Hypoxic Tumor Microenvironment in the Resistance to Anti-Angiogenic Therapies. Drug Resistance Updates, 12, 3, 74-80. https://doi.org/10.1016/j.drup.2009.03.002.

Raposo T, Gregorio H, Pires I, Prada J and Queiroga FL, 2012. Prognostic value of tumour-associated macrophages in canine mammary tumours. Veterinary and Comparative Oncology. doi:10.1111/j.1476-5829.2012.00326.x.

Raposo T, Pires I, Carvalho MI et al, 2013. Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. Vet Comp Oncol, 4, 1-11.

Raposo, T. P., I. Pires, M. I. Carvalho, J. Prada, D. J. Argyle, ve F. L. Queiroga, 2015. "Tumour-Associated Macrophages Are Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Canine Mammary Tumours". Veterinary and Comparative Oncology 13, 4, 464-74. https://doi.org/10.1111/vco.12067.

Razorenova OV, Giaccia AJ, 2010. Hypoxia, Gene Expression, and Metastasis. In: The Tumor Microenvironment, Cancer Drug Discovery and Development. Eds: R.G. Bagley, Humana press, p.43-58.

Restucci B, De Vico G, Maiolino P, 2000. Evaluation ofangiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. Veterinary Pathology, 37, 297-301.

Restucci B, Maiolino P, Paciello O, Martano M, De VicoG, 2003. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. Journal of Comparative Pathology, 128, 252-259.

Restucci B, Papparella S, Maiolino P and De Vico G, 2002. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. Vet Pathol, 39, 488-493.

Rosenthal EL, McCrory A, Talbert M, Carroll W, Magnuson JS, Peters GE, 2004. Expression of proteolytic enzymes in head and neck cancer–associated fibroblasts. Arch Otolaryngol Head Neck Surg; 130: 943-7.

Salas Y, Márquez A, Diaz D, Romero L, 2015 Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. PLOS ONE, 105, e0127381. doi:10.1371/journal.pone.0127381

Salvesen HB and Aksleen LA, 1999. Significance of tumourassociated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospodin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. Int J Cancer, 84, 539-543,

Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, 2001. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocytemacrophages in humans. Blood, 97,785- 791.

Schioppa, T, Uranchimeg B, Saccani A, Biswas SK, Doni A, Rapisarda A, Bernasconi S, Saccani S, Nebuloni M, Vago L, 2003. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. J. Exp. Med, 198, 1391–1402.

Schneider R, 1970. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. Cancer, p. 419-26

Semenza GL, 2000. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. Genes Dev, 14, 16, 1983-91.

Semenza GL, 2001. HIF-1, O2, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. Cell, 107, 1-3.

Semenza GL, 2010. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. Current Opinion in Genetics and Development, 20, 51-6.

Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, Adjemian S, Eggermont A, Fridman WH, 2012. Trial watch: prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. Oncoimmunology, 1, 1323-43.

Shida T, Yamada T, Maruo T, Ishida T, Kawamura H, Takeda H, Sugiyama H, Ishikawa T, Ito T, Madarame H, Kayanuma H, Suganuma T,2010. Retrospective study in 1,070 feline tumor cases of Japan. Jpn Vet Cancer Soc, 1,1, 1-7.

Shin JI, Lim HY, Kim HW, Seung BJ, Sur JH, 2015. Analysis of Hypoxia-Inducible Factor-1α Expression Relative to Other Key Factors in Malignant Canine Mammary Tumours. Journal of Comparative Pathology, 153, 2-3, 101-10. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.05.004.

Sica A, Mantovani A, 2012. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. J. Clin. Invest, 122, 787–795.

Siemann Dietmar W, ed, 2011. Establishing the Tumor Microenvironment, in:Tumor Microenvironment. Hoboken, Wiley.

Silver IA, 1966. Symposium on Mammary Neoplasia in the Dog and Cat—I The Anatomy of the Mammary Gland of the Dog and Cat. Journal of Small Animal Practice, 7, 11, 689-96. https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1966.tb04394.x.

Singh, Yuvraj, Vivek Kumar Pawar, Jaya Gopal Meher, Kavit Raval, Animesh Kumar, Richa Shrivastava, Smrati Bhadauria, ve Manish K. Chourasia, 2017. "Targeting Tumor Associated Macrophages (TAMs) via Nanocarriers". Journal of Controlled Release 254 (Mayıs), 92-106. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.395.

Sleeckx N, de Rooster H, Veldhuis Kroeze EJB, Van Ginneken C, Van Brantegem L, 2011. Canine mammary tumours, an overview. Reprod Dom Anim, 46, 1112-31.https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x

Sleeckx, N., L. Van Brantegem, G. Van den Eynden, E. Fransen, C. Casteleyn, S. Van Cruchten, E.Veldhuis Kroeze, ve C. Van Ginneken, 2014. Angiogenesis in Canine Mammary Tumours: A Morphometric and Prognostic Study. Journal of Comparative Pathology, 150, 2-3, 175-83. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.09.005.

Solinas G, Schiarea S, Liguori M, Fabbri M, Pesce S, Zammataro L, Pasqualini F, Nebuloni M, Chiabrando C, Mantovani A, 2010. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: A new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. J. Immunol, 185, 642–652.

Sorenmo K, 2003. Canine mammary gland tumors. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 33, 573-96.

Sorenmo K, Worley D, Goldschmidt M, 2013. Tumors of the mammary gland. In Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th ed. Withrow S, Vail D, Page R, Eds. Saunders Elsevier: St. Louis, Missouri, pp 548-556.

Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Langeland M, Mongil CM, Grondahl AM, Teige J, Goldschmidt MH, 2009. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. Vet Comp Onkol, 7, 162-72.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME et al, 2001. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. Nat Med, 7,186-191.

Sun Z, Wang S, Zhao R C, 2014. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. J Hematol Oncol, 7, 1, 14.

Suyanı E, 2012. Multipl myelomlu hastalarda tanı anındaki kemik iliği biyopsisinde cd68 ve cd163 ile immunohistokimyasal olarak tayin edilen doku makrofajının prognostik önemi. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi. İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı, Ankara.

Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G, 1999. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell specific post-transcriptional regulation. J Biol Chem, 274, 24142-6.

Tang RP, Kacinski B, Validire P, et al, 1990.Oncogene amplification correlates with dense lymphocyte infiltration in human breast cancers: a role for hematopoietic growth factor release by tumor cells? J Cell Biochem, 44, 189-198.

Tanyolaç A , 1999. Özel Histoloji, 3. Basım, Yorum Basın Yayın, Ankara

Tao H , 2011. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. Lung Cancer, 75, 95–101

Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Zhang B, 2010. Mast cells and tumor microenvironment, In: The Tumor Microenvironment(Cancer Drug Discovery and Development), Ed: Bagley RG, Framingham MA, USA: Humana Press, 353-359.

Tonini T, Rossi F, Claudio PP, 2003. Molecular basis of angiogenesis and cancer. Oncogene, 22, 6549-6556.

Tsutsui S, Kazuhiro Y, Kosuke S, Kouichirou T, Hidefumi H ve Shoichi E, 2005. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: The relationship with VEGF expression and microvessel density. Oncol. Rep, 14, 425–431. https://doi.org/10.3892/or.14.2.425.

Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY, 2004. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. Cancer Research, 64, 2941-2955.

Valkovic T, Dobrila F, Melato M, Sasso F, Rizzaardi C and Jojic N, 2002. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. Virchows Arch, 440, 583-588.

Van der Auwera I, Van Laere SJ, Van den Eynden GG, Benoy I, van Dam P et al, 2004. Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. Clinical Cancer Research, 10, 7965-7971.

Vaupel P, 2004. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. Semin Radiation Oncol, 14,198-206.

Vaupel P, Mayer A, 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. Cancer Metastasis Rev, 26, 225–239. DOI 10.1007/s10555-007-9055-1

Vural SA, Aydın Y, 2001 Ankara'da 1973-1998 yılları arasında incelenen köpek meme tümörleri. Turk J Vet Anim Sci, 25, 233-239.

Wang GL, Semenza GL, 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. The Journal of biological chemistry, 270, 3, 1230-1237.

Wang JM, Griffin JD, Rambaldi A, Chen ZG, MantovaniA, 1988. Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. J Immunol, 141, 575-579.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J, 1991 Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med, 324, 1-8.

Wiese DA, Thaiwong T, Yuzbasiyan-Gurkan V and Kiupel M, 2013. Feline mammary basal-like adenocarcinomas: A potential model for human triple-negative breast cancer (TNBC) with basal-like subtype. BMC Cancer, 13, 403

Wolfesberger B, Guija de Arespacohaga A, Willmann M, Gerner W, Miller I, Schwendenwein, I, Kleiter M, Egerbacher M, Thalhammer JG, Muellauer L, Skalicky M and Walter I, 2007. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in canine lymphoma. J Comp Pathol, 137, 30-40

Yang WY, Liu CH, Chang CJ, Lee CC, Chang KJ, Lin CT, 2006. Proliferative activity, apoptosis and expressions of oestrogen receptor and bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. J Comp Pathol, 134, 70-9.

Zaninovic P, Simeic V, 1991. Epidemiyology of mammary tumors in dog. Z B Vet Fak Univ Ljubljana, 1, 57-72.

Zappulli V, De Zan G, Cardazzo B, Bargelloni L, Castagnaro M, 2005.Feline mammary tumours in comparative oncology. Journal of Dairy Research, 72 , S1, 98.

Zatloukal J, Lorenzova J, Tichy F, Necas A, Kecova H, Kohout P, 2005. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours, Acta Veterinaria Brno, 74, 103-109.

Zetter BR, 1998. Angiogenesis and tumor metastasis. Annual Review of Medicine 49, 407–424

Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, Zhao YW et al, 2012. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. PLoS One, 7, e50946.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050946.

Zijlmans HJ, Fleuren GJ, Baelde HJ, Eilers PH, Kenter GG, Gorter A, 2006. The absence ofCCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2. J. Pathol, 208, 507–517.

7. EKLER

EK-A: Etik Kurul Onayı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI
ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ETİK KURULU (SÜVDAMEK) KARARLARI

Toplantı Tarihi	31.01.2019	Toplantı Sayısı	2019/01	Karar Sayısı	2019/04

S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU tarafından sunulan "**Kedi ve Köpek Meme Tümörlerinde Tümör Mikroçevresi, Hipoksi ve Anjiyogenezin İmmunohistokimyasal ve Histopatolojik Yöntemlerle Araştırılması**" başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.

Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin **8 inci maddesinin 8 inci fıkrasının (k) bendinde belirtilen maddeler gereğince; "1)Teşhis ve tedavi amaçlı klinik uygulamalar, 2) Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetuslar ile yapılan prosedürler, 3) Süt sağma, 4) Dışkı veya altlık örneği toplama, 5) Sürüntü ile örnek alma. şeklindeki müdahaleler HADMEK iznine tabi değildir.**

Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından "**Uygun olduğuna**" oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Oya BULUT Başkan	Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. İbrahim AYDIN Üye	Prof. Dr. Özlem DERİNBAY EKİCİ Üye	Doç. Dr. Ayşe ER Raportör Üye
Doç. Dr. Mustafa Selçuk ALATAŞ Hayvan Refahı Birimi Üyesi	Muhlis ÜLGEN Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi	Sabri YALICI Sivil Üye

8. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İstanbul'da doğdu. İlkokul öğrenimini Uşak Banaz Cumhuriyet İlkokulunda tamamladı. Ortaöğrenim ve liseyi İzmir Karşıyaka Anadolu Lisesinde tamamladı. 2006 yılında kazandığı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Konya Elit Zengen Tarım Hayvancılık Gıda San. Tic. A.Ş. de göreve başladı. 2013 yılında T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı Hadim İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'ne atanarak göreve başladı. 2016 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2017 yılında dönem tayininde geçiş yaptığı İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Patoloji Laboratuvarında görevini sürdürmektedir. Evli ve 1 erkek çocuğu babasıdır.