

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÖPEK MEME TÜMÖRLERİNDE VISTA İFADESİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Muhammed Ali YAMAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ve ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Volkan İPEK

Bu araştırma "Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü" tarafından 0959-YL-23 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR

TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında bana destek olan ve katkı sağlayan birçok kiői ve teőekkür etmek isterim. Öncelikle, tez danıőmanım Doç. Dr. Volkan İPEK'e, çalıőmam boyunca bana gösterdiği sabır, yol göstericiliği ve sağladığı değerli geri bildirimler için sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Ayrıca, çalıőmamın veri toplama aşamasında bana destek olan ve iő birliği yapan Öđretim Görevlisi Leyla Elif Özgü AYÖZGER'e teőekkür ederim. Bu çalışmanın gerçekleőmesinde katkı sağlayan tüm akademik ve idari personellere de minnettarım. Çalıőmam boyunca yanımda olan ve manevi desteğini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma özellikle Adem MİLLETSEVER'e da teőekkürü bir borç bilirim. Son olarak, bu çalışmanın tüm aőamalarında bana yol gösteren ve destek olan herkese içten teőekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	<i>ii</i>
ETİK BEYAN	<i>iv</i>
İÇİNDEKİLER	<i>v</i>
ŞEKİLLER	<i>vii</i>
TABLolar	<i>viii</i>
KISALTMALAR	<i>ix</i>
ÖZET	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
1. GİRİŞ	1
1.1. Köpek Meme Bezi Yapısı	1
1.2. Köpek Meme Tümörü	2
1.2.1. Köpek Meme Tümörü Risk Faktörleri	3
1.2.2. Köpek Meme Tümörü Genetik mekanizması	6
1.2.3. KLASİFİKASYON	9
1.3. İmmun kontrol noktaları Nedir?	16
1.3.1. CTLA-4	18
1.3.2. PD-1/PDL-1	20
1.3.3. Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3)	22
1.3.4. T-cell Immunoglobulin Mucin-3 (TIM-3)	23
1.3.5. B- and T- Lymphocyte Attenuator (BTLA)	23
1.3.6. T cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT)	23
1.4. VİSTA	24
1.4.1. Vista'nın Ligandları	31
1.4.1.1. P-selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1)	31
1.4.1.2. V-Set and Immunoglobulin Domain Containing 3 (VSIG-3)	31
1.4.1.3. FOXD3	32
1.4.1.4 Galectin-9	32
2. MATERYAL VE METOT	33
3. BULGULAR	36
3.1. Histopatolojik Bulgular	37
3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	41

3.2.1. Moleküler Alt Tiplendirme	41
3.2.2. VISTA İmmun Boyama Sonuçları	41
3.3. İstatistiksel Bulgular	51
3.3.1. Temel İstatistiksel Bulgular	51
3.3.2. Korelasyon Analiz Sonuçları	52
3.3.3. Gruplar Arası Karşılaştırma Analizleri	53
4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	77



ŞEKİLLER

- Şekil 3.1.** A. Adenoskuamöz karsinom olgusunda adenokarsinom alanı (ok) 36
skuamöz karsinom alanları (asterisk). B. Fibrosarkom olgusunda
mekik şekilli malignant fibroblast proliferasyonları. C. Karsinom
ile malignant myoepitelyoma olgusunda karsinom alanları (oklar)
ile malignant myoepitelyal proliferasyonlar (asterisk). D.
Karsinoma in situ olgusunda tubul lümeninde gözlenen nodüler
tümör alanı (asterisk). E. Kistik papiller karsinom olgusunda kist
sıvısı (asterisk) ile papiller proliferasyonlar gösteren karsinom
alanları. F. Komedo karsinom olgusunda, merkezi nekrotik
(asterisk) epitelyal proliferasyonlar. G. Kompleks karsinom
olgusunda malignant epitelyal proliferasyonlar (oklar). H. Lipid-
zengin karsinom olgusunda tümör hücre sitoplazmalarında belirgin
vakuoller (oklar). I. Malignant miks tümör olgusunda karsinom
alanları (ok) ve kıkırdak doku oluşumu (asterisk). J. Mikropapiller
karsinom olgusunda lümen proliferasyonlar sergileyen karsinom
alanları (ok). K. Solid karsinom olgusunda, yoğun şekilde
proliferasyon gösteren neoplastik epitel hücreleri. L.
Tubulopapiller olgusunda tubul lümenlerini dolduran papiller
- Şekil 3.2.** Adenoskuamöz karsinom, fibrosarkom ve karsinom ile malignant 40
myoepitelyom olgularında ER, PR, Her2 ve VISTA boyama
- Şekil 3.3.** Kistik papiller karsinom, komedo karsinom ve kompleks karsinom 41
olgularında ER, PR, Her2 ve VISTA boyama sonuçları.
- Şekil 3.4.** Kompleks karsinom, lipid-zengin karsinom ve malignant miks 42
tümör olgularında ER, PR, Her2 ve VISTA boyama sonuçları.
- Şekil 3.5.** Mikropapiller karsinom, solid karsinom ve tubulopapiller 43
karsinom olgularında ER, PR, Her2 ve VISTA boyama sonuçları.

TABLULAR

Tablo 1.1.	Köpek meme karsinomlarında malignitenin histolojik derecelendirilmesinde kullanılan kriterler	9
Tablo 1.2.	Maling tümörlerin histolojik sınıflandırması	10
Tablo 1.3.	İyi huylu ve kötü huylu meme tümörlerin ayrımı	11
Tablo 2.1.	Çalışmada kullanılan vakalara ait bilgiler	30
Tablo 3.1.	Olgulara ait tanımlar ve skorlar	44
Tablo 3.2.	VISTA boyanma yoğunluğu ve tümör derecesine ait tanımlayıcı istatistik verileri.	46
Tablo 3.3.	Moleküler tip dağılım verileri.	46
Tablo 3.4.	ER, PR ve HER2 Pozitiflik Durumları.	46
Tablo 3.5.	Moleküler tipler ile VISTA boyanma skorları ve tümör derecesi, ER, PR, HER2 durumu	53
Tablo 3.6.	Tümör derecelerine göre VISTA boyanmalarının istatistiksel tablosu.	54

SİMGELER ve KISALTMALAR

APC	Antijen sunan hücreler
CTLA-4	Sitoplazmik T lenfositleri ile ilişkili protein 4
DC	Dendritik hücre
EAE	Otoimmün ensefalomyelit
GvHD	Graft-versus-host hastalığı
HVEM	Herpes virüs giriş aracısı
MDSC	Miyeloid-Türevli Baskılayıcı Hücreler
NK	Doğal katil hücreler
PBMC	Periferal kan mononükleer hücreleri
PD-1	Programlanmış hücre ölümü-1
PD-L1	Programlanmış hücre ölümü ligandı-1
PSGL-1	P-selektin glikoprotein ligandı-1
TCR	T hücre reseptör kompleksini
TIL	Tümör İnfilte Lenfositler
TLR	Toll-like reseptör
TMC	Tümör Mikroçevre
VISTA	T hücre aktivasyonunun V-domain immunoglobulin baskılayıcısı

ÖZET

Köpek Meme Tümörlerinde VISTA İfadesinin İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması

VISTA, yeni bir bağışıklık kontrol noktası düzenleyicisi olarak ortaya çıkmaktadır. Buna göre, VISTA, T hücresi aktivasyonunu inhibe edebilir, toleransı koruyabilir ve immunopatolojiyi sınırlayabilir, antijen sunan hücrelerde bir ligand olarak ve T hücrelerinde bir reseptör olarak hareket eder. Paralel olarak, insan tümör örneklerinde, VISTA proteininin tümör infiltre lenfositler (TIL'ler) ve miyeloid hücreler üzerinde yüksek düzeyde eksprese edildiği belirtilmiştir ve bu durum prognoz ile ilişkilendirilmiştir Köpek meme tümörlerinde ise bilgimize göre VISTA'nın araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmadaki köpek meme tümörlerinin histopatolojik ve moleküler tiplendirmesi yapıldı. Moleküler tiplendirme için vakalara ER, PR HER2, VISTA ekspresyonlarının gösterilmesi için ise VISTA primer antikoru immunohistokimyasal olarak uygulandı. Vakalarda malign köpek meme tümörlerinde VISTA düzeyleri karşılaştırıldı. Ayrıca malign meme tümörlerinde farklı histolojik derece tümörlerde ve farklı moleküler tiplendirmelerde VISTA ekspresyonları arasındaki farklılıklar da ortaya konuldu. Çalışma sonunda VISTA immun boyanmalarına hem tümör hem de yangı hücrelerinde rastlanmıştır. Ayrıca tümör derecesi ile tümör dokusundaki VISTA boyanmaları arasında anlamlı korelasyonlar tespit edilmiştir. Sonuç olarak köpek meme tümörlerinde VISTA varlığı hem tümör hem de yangı hücrelerinde doğrulanmış olup, ileriye yönelik VISTA inhibisyonuna dayalı immunoterapi çalışmalarına yönelik bir temel oluşturmaktadır

Anahtar Kelimeler: İmmunoloji, Kanser, Köpek Meme Tümörü, Vista

ABSTRACT

Immunohistochemical Investigation of VISTA Expression in Canine Mammary Tumors

VISTA is emerging as a novel immune checkpoint regulator. Accordingly, VISTA can inhibit T cell activation, maintain tolerance, and limit immunopathology by acting as a ligand on antigen-presenting cells and as a receptor on T cells. Similarly, in human tumor samples, it has been reported that the VISTA protein is highly expressed on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and myeloid cells, and this expression is associated with prognosis. However, to our knowledge, there is no study investigating VISTA in canine mammary tumors. In this study, histopathological and molecular typing of canine mammary tumors were performed. For molecular typing, ER, PR, and HER2 were evaluated, and for demonstrating VISTA expression, VISTA primary antibody was applied immunohistochemically. The levels of VISTA in malignant canine mammary tumors were compared among cases. Additionally, differences in VISTA expression in tumors with different histological grades and different molecular types were investigated. At the end of the study, VISTA immunostaining was observed in both tumor and inflammatory cells. Significant correlations were also detected between tumor grade and VISTA staining in tumor tissues. In conclusion, the presence of VISTA in both tumor and inflammatory cells in canine mammary tumors has been confirmed, providing a basis for future studies on VISTA inhibition-based immunotherapies.

Keywords: Cancer ,Canine Mammary Tumor, Immunology, Vista

1. GİRİŞ

1.1. Köpek Meme Bezi Yapısı

Meme bezleri, karın duvarındaki orta hatta paralel olarak uzanan ve "süt çizgisi" olarak adlandırılan bölgede gelişir. Dişi köpekte meme bezleri, süt çizgisinin üzerinde bulunur. Dişi köpeklerde genellikle beş çift meme bezi bulunur. Ön iki çift "ön ve arka göğüs" meme bezleri olarak adlandırılırken, orta iki çift "ön ve arka karın" meme bezleri olarak adlandırılır ve arka çift ise "kasık" meme bezleri olarak adlandırılır (Barone, 1990; Frandson ve Spurgeon 1992; Miller ve ark. 1964).

Meme bezi, değişmiş bir ter bezi olarak kabul edilir. Bölünmüş interlobüler bağ doku tarafından lobüllere ayrılan bileşik bir tübüloalveoler bezdir. Meme bezi, parankim (alveoller), stroma (bağ doku), kanallar, damarlar ve sinirlerden oluşur (Bacha ve Bacha 2000; Dellmann ve Carithers 1996; Salomon ve ark., 2008; Silver 1966).

Meme alveolleri, sekretuar aktiviteye bağlı olarak basit kübik veya prizmatik salgı epitelinden oluşur. Ayrıca, sekretuar epitel miyoepitel hücreleri ile çevrilidir, bu hücreler de bir bazal lamina ile çevrelenmiştir. Miyoepitelyal hücreler kasılarak sütün akmasından sorumludur. İnterlobüler kanallar, laktifer kanallara dönüşür ve laktifer sinüse açılır. Laktifer sinüs, meme sinüsünde devam eder ve papillar kanal aracılığıyla meme başına açılır. Bu kanallar farklı Epitellerle döşelidir.

En küçük kanallar, basit küboidal epitel ile kaplıdır ve laktasyon yapan meme bezlerinde salgı epiteline dönüşürler. Daha büyük kanallar ve sinüsler iki katlı kübik ve prizmatik epitle kaplıdır, papillar kanal ise keratinize çok katlı yassı epitel ile kaplanmıştır.

Miyoepitel hücreleri kanallarda bol miktarda bulunur. İnteralveolar doku nispeten seyrek, iyi vaskülarize edilmiştir ve bol miktarda plazma hücresi barındırır. İnterlobüler septumlar yoğun düzensiz bağ doku ve bol miktarda elastik liflerden oluşur (Barone, 1990; Dellmann ve Carithers, 1996; Salomon ve ark.,

2008).

1.2. Köpek Meme Tümörü

İnsanlar ve köpeklerde yaşam beklentisinin artmasıyla kanser insidansı da artmıştır (Kaszak ve ark., 2018).

Meme bezi tümörleri, dişi köpeklerde en yaygın neoplazmalardan biridir (Shafiee ve ark., 2013). Bu spontan tümörler, insanlardaki tümörlere çok benzer olsa da, dişi köpeklerdeki insidans oranı kadınlara göre 3 kat daha fazladır (Egenvall ve ark., 2005). Köpek ve insan meme tümörleri arasında bazı moleküler ve biyolojik benzerlikler bulunmaktadır (DeSantis ve ark., 2011; Egenvall ve ark., 2005; Rivera, 2010; Shafiee ve ark., 2013). Köpek meme tümörlerinin (KMT) yaklaşık yarısı malign vakaları oluşturur (Shafiee ve ark., 2013), insanlardaki meme tümörleri ile karşılaştırıldığında insidans oranı 3 kat daha yüksektir. İnsanlardaki meme tümörüne benzer şekilde, bu tümörler neredeyse sadece dişilerde görülür ve nadiren erkek köpeklerde saptanır (Egenvall ve ark., 2005). Genel olarak, köpeklerde malign meme tümörlerinde (KMMT), metastatik yayılma lenfatik damarlar aracılığıyla bölgesel lenf düğümlerine veya hematojen olarak gerçekleşir ve akciğerler, uzak metastazların en sık görüldüğü organlardır (Sorenmo, 2003).

Meme tümörleri, kısırlaştırılmamış dişileri veya ileri yaşta kısırlaştırılan dişileri etkileyen en yaygın kanser türleridir (Lana ve ark., 2007; Sorenmo ve ark., 2013; Egenvall ve ark., 2005; Sleenckx ve ark., 2011; Varallo ve ark., 2019). Bu hastalık, dişileri etkileyen tüm neoplazmaların yaklaşık %52'sini oluşturur ve meme tümörlerinin %41-53'ü histopatolojik olarak malign olarak teşhis edilir (Varallo ve ark., 2019). 2010 ile 2012 yılları arasında Brezilya'da yapılan çalışmalar, malign meme tümörlerinin görülme sıklığının %60-82 arasında değiştiğini göstermiştir. Bu nedenle, meme tümörlerini incelemek, bu hayvan popülasyonunu etkileyen yüksek mortalite ve morbidite oranları nedeniyle büyük önem taşır (Varallo *et al.*, 2019)

Köpek meme tümörleri farklı büyüklüklerde nodüller olarak ortaya çıkarlar ve genellikle iyi tanımlanmışlardır. Hastanın tedavi protokolü ve prognozu, tümörün

fiziksel özellikleri, konumu, histolojik ve moleküler sınıflandırmasına göre belirlenebilir. Köpek meme tümörlerinin insidansı, yapılan çalışmanın coğrafi konumuna bağlı olarak değişir ve yaş, hormonal maruziyet, cins ve diğer faktörler arasında dişi köpeğin moleküler özellikleri de etkilenir (Vazquez ve ark., 2023) .

Malign köpek meme tümörleri arasında en yaygın olanı tübüler karsinom (adenokarsinom) olup, onu papiller karsinom, solid karsinom, kompleks karsinom ve karsinosarkom izler. İyi huylu meme tümörlerinin çoğu ise fibroadenomlar, duktal papillomalar, iyi huylu karışık tümörler ve basit adenomlardır (Kumar ve ark., 2009; Salas ve ark., 2015). Aynı hastanın farklı meme bezlerinde birden fazla tümör tipine rastlanması da yaygındır (Sorenmo, 2003).

Malignite derecesi, sadece tümör tipine değil, aynı zamanda belirgin nükleer ve hücrel pleomorfizmin varlığına, mitotik indekse, nekrotik bölgelerin varlığına, tümöral ve lenfatik invazyon ile bölgesel lenf nodu metastazının varlığına dayanır (Goldschmidt ve ark., 2011) .

1.2.1. Köpek Meme Tümörü Risk Faktörleri

Çoğu malign meme tümörü orta yaşlı (5-7 yaş) ve yaşlı (7-8 yaş) dişi köpeklerde gelişir. Ayrıca, kısırlaştırmanın gecikmesiyle meme tümörleri gelişme riski artar (Benavente ve ark., 2016; Salas ve ark., 2015; Schneider ve ark., 1969). Kısırlaştırılmamış dişi köpeklerde iki yaşından önce kısırlaştırılanlara kıyasla meme tümörü geliştirme riski dört kat daha fazladır (Schneider ve ark., 1969). Yapılan bir çalışmada, köpeklerde ilk kızgınlıktan önce kısırlaştırılanların meme tümörü insidansının %0,05 olduğunu, kızgınlık sayısı arttıkça arttığını, birinci ve ikinci kızgınlıktan sonra sırasıyla %8 ve %26 olduğunu bulmuştur. Üçüncü kızgınlıktan sonra kısırlaştırılan dişilerde, meme tümörü geliştirme riski kısırlaştırılmamış bir dişi köpek ile benzer bulunmuştur (Schmidt, 1970; Schneider ve ark., 1969).

İrk, köpeklerde meme tümörlerinin insidansını etkileyebilecek başka bir faktördür (Vascellari ve ark., 2016). Safkan köpeklerde, köpek meme tümörü vakaları arasında belirgin bir şekilde artış saptanmıştır (Sleeckx ve ark., 2011).

MacEwen ve Withrow (1996), Boxerlar, Chihuahualar ve melez ırklar için düşük bir risk bildirirken, diğerleri Boxerları yüksek riskli bir ırk olarak ve Collies, Shetland Sheepdogları ve Bernese Dağ Köpekleri'ni düşük riskli ırklar olarak bildirmektedir (Borge ve ark., 2011). Ayrıca, Bronden ve ark. (2003) Boxerlar ve Bernese Dağ Köpekleri için yüksek bir risk bulmuştur. (Bronden ve ark., 2003)

İspanya'da yapılan bir çalışma, Retrieverlar, av köpekleri ve su köpeklerini meme tümörlerinin daha yüksek bir insidansı olan ırklar olarak belirlemiştir (Pastor ve ark., 2018). İtalya'da, malign meme tümörlerinin en yüksek insidansına sahip olan ırklar Samoyedler, Dobermanlar, Schnauzerler ve Yorkshire terrierleri olarak belirlenmiştir (Vascellari ve ark., 2016). Arjantin'de, İngiliz Cocker Spanielleri, Pekingese ve Alman Çoban Köpeklerinin meme tümörleri tanısı konan ırklar olarak en sık rapor edildiği bilinmektedir (Benavente ve ark., 2016). İsveç'te, İngiliz Springer Spanielleri, Dobermanlar ve Boxerlar meme kanserini geliştirme riski daha yüksek olan ırklar olarak tanımlanmıştır (Egenvall ve ark., 2005).

Cinsiyet hormonlarının, özellikle östrojen ve progesteronun, köpek meme tümörlerinin gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Benavente ve ark., 2016). Dişi köpeklerde ve kadınlarda, over steroidleri fizyolojik koşullar altında meme dokusunun normal büyümesini uyarır. Ancak, epitelde proliferatif etki, neoplastik proliferasyon için mükemmel bir ortam oluşturabilir (Benavente ve ark., 2016; Kumaraguruparan ve ark., 2006). Bu, her östrus döngüsünde gerçekleşir ve köpeği kanser oluşumuna daha da hassas hale getirir (Chang ve ark., 2009; Rutteman, 1990; Stovring ve ark., 1997). Östrojenler duktal büyümeyi teşvik ederken, progestinler meme bezlerinde salgı ve miyoepitelyal hücrelerin hiperplazisi ile lobuloalveoler gelişimini indükleyebilir (Rutteman, 1990).

Luteal fazda, meme dokusu yüksek düzeyde progesterona maruz kalır, bu da büyüme hormonu (GH) up-regülasyonuna neden olabilir. Bu hormonun, karsinogenezin ilk adımı olarak meme kök hücrelerini uyarabileceğine inanılmaktadır (Queiroga ve ark., 2008). GH, insülin büyüme faktörü I (IGF-I) seviyelerini artırır, bu da sırasıyla meme hücrelerinin proliferasyonunu uyarır ve yerel bir büyüme faktörü olarak işlev görerek tümör gelişimini ve büyümesini uyarır

(Benavente ve ark., 2016; Queiroga ve ark., 2008). Yalancı gebelik, meme tümörlerinin gelişimiyle ilişkili değildir (Sleekx ve ark., 2011; Veronesi ve ark., 2003); ancak, kontraseptif olarak progesteron kullanımı köpeklerde iyi huylu meme tümörlerinin gelişimini indükleyebilir.

Köpeklerdeki yumurtalık steroidlerinin etkisi, esas olarak meme dokusunda ifade edilen reseptörler aracılığıyla olur. Progesteron ve östrojen reseptörleri (PR ve ER, sırasıyla), hem normal hem de neoplastik dokularda bulunur (Chang ve ark., 2009; de Las Mulas ve ark., 2005; Gama ve ark., 2008; Geraldès ve ark., 2000; MacEwen ve ark., 1982; Millanta ve ark., 2005; Nieto ve ark., 2000; Rutteman ve ark., 1988; Yang ve ark., 2006). Ancak, ER varlığı, malign olanlara kıyasla benign tümörlerde önemli ölçüde daha yüksektir (Chang ve ark., 2009; de Las Mulas ve ark., 2005; Donnay ve ark., 1995; Geraldès ve ark., 2000; Illera ve ark., 2006; MacEwen ve ark., 1982; Rutteman ve ark., 1988; Yang ve ark., 2006). Benzer şekilde, PR ifadesi, hiperplastik/displastikten başlayarak benign olanlara ve sonunda malign olan köpek meme lezyonlarına kadar aşamalı olarak azalmaya başlar (Geraldès ve ark., 2000; Millanta ve ark., 2005; Chang ve ark., 2009). ER ve PR'nin azalan ekspresyonunun, kötü bir prognozla ters orantılı olduğu görünmektedir (Sleekx ve ark., 2011).

Ancak son zamanlarda, serum ve doku homojenatlarında steroid hormonlarının düzeylerinin malign meme tümörleri (MMT) olan dişilerde benign meme tümörleri (BMT) olanlara göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir, bu da steroid hormonlarının malign tiplerde lokal büyüme faktörleri olarak işlev görebileceğini ve onların proliferasyonunu uyarabileceğini göstermektedir (Queiroga ve ark., 2005).

Farklı çalışmalar arasındaki gözlemlenen tutarsızlıklar muhtemelen örnek seçimi, antikorlardaki farklılıklar, boyama prosedürü ve değerlendirme veya tespit sisteminin hassasiyetiyle veya semikantitatif olarak değerlendirilmesiyle de ilgilidir. İnsan meme kanserinde benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Bardou ve ark., 2003; Pichon ve ark., 1996).

Yağ dokusunun bazı steroid hormonları sentezleme yeteneğinden dolayı beslenme faktörleri özel ilgi görmektedir. Yağ dokusu, androjenleri östrojenlere dönüştüren aromataz aktivitesi nedeniyle önemli bir östrojen kaynağıdır. Artan meme yağ dokusu, bezinin, meme tümörü oluşumunu teşvik ettiği bilinen östrojenlere maruz kalmasına katkıda bulunur (Simpson ve Zhao, 1996).

Hücresel düzeyde ise, obezite, makrofajların aktive olduğu ve tümör nekroz faktörü α ve interleukin 6 gibi yangısal mediatörler ile leptin, adiponektin, rezistin ve aromataz gibi diğer maddelerin üretildiği yağ dokusunun yangılanmasına neden olur. Bu, hücre proliferasyonunun artmasına, apoptozun inhibe edilmesine ve anjiyogenezin indüklenmesine yol açabilir (Veronesi ve ark., 2003).

1.2.2. Köpek Meme Tümörü Genetik mekanizması

Hormon reseptörü pozitif meme kanserleri büyük ölçüde östrojen/ER yolu tarafından yönlendirilir. HER2 pozitif meme tümörlerinde HER2, PI3K/AKT ve RAS/RAF/MAPK yollarını aktive eder ve hücre büyümesini, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını uyarır. Üçlü negatif meme kanserinden (TNBC) muzdarip hastalarda, çeşitli sinyal yollarında (Notch ve Wnt/beta-katenin) EGFR proteininin düzensizliği doğrulanmıştır. Meme kanseri durumunda, tüm kanserlerin yalnızca %8'i kalıtsaldır; bu, BRCA1 veya BRCA2'deki (Meme kanseri genleri 1 ve 2) genetik değişikliklerle bağlantılı bir olgudur. Yalnızca üç gendeki (TP53, PIK3CA ve GATA3) somatik mutasyonlar, tüm meme kanserlerinde >%10 oranında meydana geldiği görülmüştür (KEGG Breast Cancer).

Genetik değişiklikler, meme tümörü gelişiminin bir parçasıdır. Proto-onkogen epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), insan meme kanserinde önemli bir rol oynar çünkü fosforile formunun ekspresyonu artmış anjiyogenez ve metastaz ile ilişkilidir (Magkou ve ark., 2008). Malign köpek meme karsinomlarında, EGFR'nin aşırı ekspresyonu tümör boyutu, nekroz, mitotik derece, histolojik malignite derecesi, tümör nüksü, uzak metastaz ve klinik evre ile ilişkilidir. Ayrıca, artmış anjiyogenez ve malign meme tümörlerinin agresifliğine katkıda bulunabilir, bu da EGFR inhibitörlerinin metastatik hastalığın tedavisinde kullanılabileceğini

düşündürmektedir (Carvalho ve ark., 2013; Guimarães ve ark., 2014; Queiroga ve ark., 2017) .

Diğer yaygın genetik değişiklikler, köpek meme kanserinde PI3K/Akt/mTOR yolunun proteinlerini kodlayan genlerde bulunan mutasyonlardır. PI3K/Akt/mTOR yolu, proliferasyon, protein sentezi, apoptoz, hücre hareketliliği ve anjiyogenezin düzenlenmesi için gereklidir ve birkaç köpek meme tümöründe düzensiz hale gelmiştir (Asproni ve ark., 2021; Kim ve ark., 2020). PIK3CA (fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birimi alfa), PTEN (fosfataz ve tensin homologu), PIK3R1 (fosfoinozidit-3-kinaz düzenleyici alt birimi 1) ve AKT1 (serin/treonin kinaz 1) genlerinde bulunan mutasyonlar, köpek meme kanserlerinde insan meme kanserlerine benzer sıklıklarda tanımlanmış olup, bu değişikliklerin türler arasında korunmuş olabileceğini göstermektedir (Kim ve ark., 2020). Köpek PIK3CA geni, sırasıyla benign ve malign meme tümörlerinin %55 ve %38'inde mutasyona uğramıştır ve insan karşılığıyla %99 benzerlik gösteren 1068 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. Bu nedenle, PIK3CA'nın yakınlık oluşturan fonksiyonel bir mutasyonunun insanlar ve köpekler arasında benzer olduğu oldukça muhtemeldir (Kim, 2020). PIK3CA'daki mutasyonlar bu sinyal yolunu aşırı aktive edebilir ve tümör oluşumunu teşvik edebilir (Miller, 2012).

Farklı histolojik tiplerde (hem benign hem de malign) köpek meme tümörlerinde PTEN ve PIK3R1 mutasyonları tanımlanmıştır, AKT1 mutasyonları ise yalnızca kompleks karsinomlarda gözlemlenmiş olup, bunların dokuya özgü olduğunu önermektedir (Kim ve ark., 2020). Köpek meme tümörlerinde fosforile AKT ekspresyonu daha agresif alt tipler, lenfatik invazyon ve daha kötü hayatta kalma ile korelasyon göstermektedir (Asproni ve ark., 2021). PTEN ekspresyonu köpeklerde daha az agresif tümörlerle ilişkilidir (Asproni ve ark., 2021), ancak köpeklerdeki malign meme tümörlerinde PTEN kaybı daha kısa hayatta kalma süresi ile ilişkilidir (Ressel ve ark., 2009). Köpek meme tümörü hücrelerinde PTEN'in aşırı ekspresyonu hücre proliferasyonunu inhibe eder, kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bax'ın yukarı regülasyonu yoluyla apoptozu indükler ve fosforile AKT'yi aşağı regüle eder (Tong ve ark., 2016).

BRCA1 ve BRCA2, hem insanlar hem de köpeklerde meme tümörü gelişiminde önemli oyunculardır. Bunlar, hücre döngüsü düzenlemesi ve DNA hasarına yanıt vermede rol oynayan nükleer bir fosfoproteini kodlayan tümör baskılayıcı genlerdir (Welch ve King, 2001). BRCA1 ekspresyonunun kaybı, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu gibi diğer değişikliklere yol açan genetik kararsızlığa neden olur ve tümör oluşumunu teşvik eder (Deng ve Scott, 2000; Montalban ve ark., 2021). BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları kalıtsaldır ve erken yetişkinlikten itibaren meme tümörü geliştirme olasılığını artırır. 80 yaşına kadar, BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarına sahip kadınların meme kanseri geliştirme kümülatif riski sırasıyla %72 ve %69'dur (Kuchenbaecker ve ark., 2017). Köpeklerde, bu genlerdeki mutasyonlar da belirli ırkların meme tümörü geliştirme eğilimini artırabilir ve BRCA1 köpeklerde malign vakalarla daha güçlü bir şekilde ilişkilidir (Rivera ve ark., 2009). Ayrıca, BRCA1 protein ekspresyonunun sadece nükleer olmaktan çıkarak hem nükleer hem de sitoplazmik hale gelmesi, özellikle malign türlerde, köpek meme tümörlerinin karakteristik bir özelliğidir (Nieto ve ark., 2003). BRCA2 ekspresyonu, köpek meme tümörlerinde etkilenmemiş meme dokularına göre daha düşüktür ve bu nedenle tümör oluşumuna yol açabilecek başka bir olası mekanizma olabilir.

1.2.3. KLASİFİKASYON

1.2.3.1. Histolojik Klasifikasyon

Meme tümörleri kısırlaştırılmamış dişi köpeklerde en sık teşhis edilen neoplazidir ve yaklaşık %50'si maligndir (Vazquez ve ark., 2023). Kötü huylu meme tümörleri bölgesel lenf düğümlerine ve akciğer gibi uzak organlara metastaz yapma kapasitesine sahiptir; bazı durumlarda kan damarları yoluyla karaciğer, dalak ve böbrek gibi karın organlarına metastaz yapabilirler (Karayannopoulou ve Lafioniatas, 2016). Yıllar geçtikçe köpek meme tümörlerinin histolojik sınıflandırmasına yönelik çeşitli sistemler kurulmuştur. İlk sınıflandırma 1974'te (Hampe ve ark., 1974), ikincisi 1999'da yayınlanmış ve daha sonra 2011'de şu anda kullanılanı göre bir değişiklik yapılmıştır (Goldschmidt ve ark., 2011).

Köpek meme tümörleri morfolojileri açısından oldukça değişkendir ve genellikle kombinasyon halinde veya tek başına lümen epitel hücreleri, miyoepitelyal hücreler ve mezenkimal hücreler dahil olmak üzere birden fazla hücre tipinden oluşur (Vazquez ve ark., 2023). Epitelyal kökenli (basit adenom veya basit karsinom) veya mezenkimal (fibroadenom, fibrosarkom, osteosarkom ve diğer sarkomlar) olabilirler; ancak bazıları epitel ve miyoepitelyal dokunun bir kombinasyonunu şekillendirir (iyi huylu karışık tümörler veya karsinosarkom). Kadınlarda neredeyse hiç teşhis edilmeyen mezenkimal tümörler ile miyoepitel hücre proliferasyonu olan tümörler köpeklerde sık görülür (Gray ve ark., 2020; Kim ve ark., 2020; Peña ve ark., 2014). Tümör tipi, nükleer ve hücresel pleomorfizm, mitotik indeks, nekrotik alanların varlığı, lenfatik ve peritümöral invazyon ve bölgesel lenf düğümü metastazı, malign meme tümörlerinin tanısında kullanılan bazı kriterlerdir (Goldschmidt ve ark., 2011).

Tablo 1.1. Köpek meme karsinomlarında malignitenin histolojik derecelendirilmesinde kullanılan kriterler (Vazquez ve ark., 2023)

Tübül Oluşumu	Nükleer Pleomorfizm	Mitoz
Tübül oluşumu >%75: 1 puan	Tekdüze veya düzenli küçük çekirdek ve ara sıra çekirdekçikler: 1 puan	0–9: 1 puan
Katı tümör alanlarıyla karışmış orta derecede tübüler düzenleme (%10-75) oluşumu: 2 puan	Nükleer boyut ve şekilde orta dereceli değişiklik, hiperkromatik çekirdek (bazıları belirgin olabilir): 2 puan	10–19: 2 puan
Minimal veya hiç tübül oluşumu yok (<%10): 3 puan	Çoğunlukla bir veya daha fazla belirgin çekirdekçik ile çekirdek boyutunda ve hiperkromazide belirgin varyasyon: 3 puan	>20: 3 puan
Toplam Skor	Malignite Derecesi	
3-5	I (düşük) iyi farklılaşmış	
6-7	II (orta) orta derecede farklılaşmış	
8-9	III (yüksek) az farklılaşmış	

2011 yılında Goldschmidt ve arkadaşları, KMTKMT'lerin 23 malign ve 7 benign alt tipe ayrıldığı yeni bir tam sınıflandırma şeması oluşturdular (Goldschmidt ve ark., 2011). Bu sınıflandırma sistemi daha sonra 2019 yılında DSÖ ve Davis-Thompson DVM Vakfi tarafından güncellenmiştir (Nosalova ve ark., 2024; Papparella ve ark., 2022). Malign KMT'ler çoğunlukla adenokarsinom, karsinosarkom, solid karsinom, papiller karsinom veya kompleks karsinomdur. KMT'lerin en sık görülen benign formları duktal papillomlar, fibroadenomlar, basit adenomlar ve benign mikst tümörlerdir (Kumar ve ark., 2009; Salas ve ark., 2015). KMT'lerin yaklaşık %50'sinden fazlası histolojik olarak maligndir (Kaszak ve ark., 2018).

Tablo 1.2. Malign tümörlerin histolojik sınıflandırması (Goldschmidt ve ark., 2011).

Histolojik sınıflandırma
A. Malign Epitelial Neoplaziler
1. İn situ karsinom
2. Basit karsinom
a. Tubuler
b. Tubulopapiller
c. Kistik-papiller
d. Kribriiform
3. İnvaziv mikropapiller karsinom
4. Solid karsinom
5. Komedokarsinom
6. Anaplastik karsinom
7. Kompleks karsinom
+Epitel bileşeni kötü huyludur ve miyoepitel iyi huyludur.
8. Malign miyoepitelial karsinom
+Epitel ve miyoepitelial bileşenler maligndir.
9. Miks karsinom
+Epitel bileşeni kötü huyludur; miyoepitelial mezenkimal bileşen iyi huyludur ve mezenkimal bileşen kıkırdak veya kemiktir.
10. Duktal karsinom
11. İntraduktal papiller karsinom
B. Malign Epitelial Neoplaziler- Özel tipler
1. Yassı hücreli karsinom
2. Adenoskuamöz karsinom
3. Müsinöz karsinom
4. Lipit-zengin karsinom
5. İğ hücreli karsinom
a. Malign myoepitelioma
b. Yassı hücreli karsinom–mekik hücreli varyant
c. Karsinoma–mekik hücreli varyant
C. Yangısal karsinom
D. Malign Mezenkimal Neoplaziler-Sarkomlar
1. Osteosarkom
2. Kondrosarkom
3. Fibrosarkom
4. Hemangiosarkom
5. Diğer sarkomlar
E. Karsinosarkom- Malign Miks Meme Tümörü

Her ne kadar bazı klinik belirtiler (hızlı büyüme, tümör boyutu, ülserasyon ile deriye ve altta yatan dokulara fiksasyon) malignitenin göstergesi olabilse de, köpeklerde klinik olarak iyi huylu ve kötü huylu meme tümörlerini birbirinden ayırmak çoğu zaman imkansızdır. Benign ve malign köpek meme tümörleri

arasındaki sitolojik ayırım zordur; sitolojik farklılaşmanın doğruluğu yaklaşık %20'dir. Bu nedenle histopatoloji, tümör tipi, iyi huylu ve kötü huylu, derece ve prognoz dahil olmak üzere tanıyı belirlemek için en iyi yöntemdir. H&E ile boyanmış bölümlere dayanarak iyi huylu meme tümörlerini kötü huylu meme tümörlerinden ayırmaya yönelik en önemli kriterler aşağıda açıklanmaktadır (Goldschmidt ve ark., 2016).

Tablo 1.3. İyi huylu ve kötü huylu meme tümörlerin ayrımı (Goldscmidt ve ark., 2016).

BENİGN	MALİGN
İyi sınırlı	Kötü sınırlı
Periferde düzgün kenarlar	Periferde düzensiz kenarlar
Periferde kompakt fibröz bağ dokusu	Periferde olgunlaşmamış fibröz bağ dokusu
Nekroz merkezidir ve vasküler beslenme kaybıyla ilişkilidir	Nekroz multifokaldır ve hızlı neoplastik hücre çoğalması ile ilişkilidir
Çekirdekler monomorfiktir	Çekirdekler pleomorfiktir
Lenfatik veya vasküler invazyon yok	Olası lenfatik veya vasküler invazyon
Lenf nodu metastazı yok	Olası lenf nodu metastazı

1.2.3.2. Moleküler Klasifikasyon

Histopatolojik ve morfolojik veriler insandaki meme kanserlerinin sınıflandırılmasına yardımcı olsa da immunohistokimya yoluyla elde edilen moleküler bilgilerin eklenmesi daha doğru teşhis ve prognostik bilgiler sağlar (Kwon ve ark., 2023).

Moleküler alt tiplerin kadın meme kanseri için ilk olarak Perou ve ekibinin, meme kanserinin fenotipik çeşitliliğini belirli bir gen ifadesine haritalayarak tanımladıkları belirtilmiştir (Perou ve ark., 2000). Diğer çalışmalar, farklı alt tipler arasında prognoz ve kemoterapi yanıtı farklılıklarını bildirmiştir (Sørli ve ark., 2001).

Meme kanserleri östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü 2 reseptörü (HER-2 veya EGFR-2) dahil olmak üzere immunohistokimyasal belirteçlerin ekspresyonuna göre dört alt tipte sınıflandırılır: I. Luminal A (ER+ ve/veya PR+ ve HER-2-), II. Luminal B (ER+ ve/veya PR+ ve HER 2+), III. HER-2 pozitif (ER-, PR- ve HER-2+) ve IV. Üçlü negatif (ER-, PR- ve HER-2-) (Provenzano ve ark., 2018; Varallo ve ark., 2019) . Luminal A, luminal B ve HER-2'nin aşırı eksprese edildiği tiplere sahip hastalar olumlu sonuçlar gösterirken, üçlü negatif tiplere sahip olanların prognozu kötüdür (Hennigs ve ark., 2016; Inwald ve ark., 2015).

İnsanlarda HER-2, floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemiyle gen amplifikasyonuna ve immun histokimya kullanılarak protein ekspresyonuna dayanarak tespit edilir. İnsan meme kanserinde HER-2 durumunun değerlendirilmesi, Amerikan Klinik Onkoloji Derneği ve Amerikan Patologlar Koleji (ASCO/CAP) uzmanları tarafından revize edilmiştir (Wolff ve ark., 2018). Veteriner hekimlikte KMT'lerde HER-2 aşırı ekspresyonunun biyolojik anlamı açık değildir. HER-2'nin amplifikasyon durumu daha önce KMT'de kromojenik in situ hibridizasyon yoluyla araştırılmış ancak HER-2 amplifikasyonu tespit edilmemiştir (Martín De Las Mulas ve ark., 2003). Muscatello ve ark., tek ve çift problu floresan yerinde hibridizasyon gerçekleştirerek kromozomal anormallikleri, translokasyonları, ortak amplifikasyonu veya polisomiye değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında HER-2 aşırı ekspresyonu ile HER2 gen kopyalarının artan sayısı arasında anlamlı bir korelasyon olduğu gösterilmiş ancak ASCO/CAP değerlendirme sistemi tarafından belirlenen amplifikasyon durumu ile herhangi bir korelasyon bulunamamıştır (Muscatello ve ark., 2022). Bu, insan meme kanserine yönelik değerlendirme sisteminin KMT'ye uyarlanamayacağını ve HER-2'nin köpeklerdeki klinik rolünü açıklığa kavuşturmak için gelecekteki çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermiştir (Nosalova ve ark., 2024).

İnsandaki meme kanserlerinin aksine, KMT'lerin moleküler alt tipleri henüz tam olarak belirlenmemiştir. Bununla birlikte, KMT'lerin sınıflandırılmasında insan meme kanserinin mevcut moleküler sınıflandırmasının uygulanması için çaba sarf

edilmiştir. Örneğin Gama ve ark. (Gama ve ark., 2008), KMT'lerini insan meme kanseri moleküler sınıflandırma yöntemine göre sınıflandırılmıştır; Luminal A tipi tümörlü köpeklerde (%44,8) düşük histolojik derece ve düşük proliferasyon oranları bulunurken, bazal tip tümörlü köpeklerde (%29,2, üçlü negatif tümörlerin bir alt tipi) çoğunlukla yüksek histolojik derece ve yüksek proliferasyon oranları bildirilmiştir. Ayrıca, bazal alt tip, insanlarda gözlemlenene benzer şekilde, luminal A tipiyle karşılaştırıldığında daha kısa hastaliksız aralıklar ve genel hayatta kalma oranlarıyla ilişkilendirilmiştir.

Abadie ve ark. (Abadie ve ark., 2018), insan moleküler sınıflandırma yöntemini kullanarak 350 KMT'yi sınıflandırmış ve KMT'lerin %14,3'ünün luminal A tipi, %9,4'ünün luminal B tipi, %0'ının HER-2 aşırı eksprese eden tip ve %76,3'ünün üçlü negatif tip olduğunu bulmuşlardır. Luminal A tümörlü köpekler, luminal B veya üçlü negatif tümörlü köpeklerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha uzun hayatta kalma süreleri göstermiştir.

110 KMT'yi kapsayan başka bir çalışma, tümör histolojisini luminal A tipi (%38,1), luminal B tipi (%15,4), HER-2 aşırı eksprese eden tip (%9) ve üçlü negatif tip (%15,4) olarak sınıflandırmıştır (Varallo ve ark., 2019).

Luminal A ve B fenotipleri daha iyi prognoz ile ilişkilendirilirken, HER-2'yi aşırı eksprese eden ve üçlü negatif tümörler daha agresif ve metastaz oluşumu ile önemli ölçüde daha kısa hayatta kalma süresi açısından anlamlı bir ilişki sergilemiştir. Bireysel çalışmaların sonuçları bir miktar değişkenlik gösterse de meme tümörlü köpeklerde bildirilen bu bulgular, insan meme kanserlerinde gözlemlenenlerle karşılaştırılabilir. Bu sonuçlar, insan meme tümörleri için Elston ve Ellis kriterlerine göre sınıflandırılan KMT'lerin moleküler alt tiplerinin, insanlarda gözlemlenene benzer şekilde köpeklerde de prognostik bir ilişkiye sahip olduğunu göstermektedir (Kwon ve ark., 2023).

Özetle, KMT'ler ile insan meme kanserleri arasındaki önemli derecede histolojik ve moleküler benzerlik, KMT'lerin insan meme kanseri araştırmaları için karşılaştırmalı modeller olarak kullanılabilirliğini daha da kanıtlamaktadır (Kwon ve

ark., 2023).

Östrojen ve progesteron, büyüme ve normal meme dokusu gelişimi için gereklidir; ancak aynı zamanda tümör büyümesini de etkilerler. Bazı çalışmalar östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) veya her ikisinin ekspresyonunun benign tümörlerde daha sık olduğunu ve genellikle olumlu prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Nieto ve ark., 2000; Millanta ve ark., 2005; Mainenti ve ark., 2014). Başka bir çalışma, östrojen reseptörü negatif (ER-) ve progesteron reseptörü pozitif (PR+) tümörlerin, östrojen ve progesteron pozitif (ER+ ve PR+) ile karşılaştırıldığında kötü bir sonuçla ilişkili olduğunu, ER- ve PR- tümörlerinin ise en kötü prognoza sahip olduğunu göstermiştir (Kim ve ark., 2014).

Yapılan bir çalışmada Luminal A ve B olan her iki kanser türünde de, Ki67 ekspresyonu, sonuç tahmini için güçlü bir prognostik faktör olduğunu bildirmiştir (Abadie ve ark., 2018). Ki67 nükleer bir proteindir; bu nedenle yalnızca hücre döngüsünün geç G1, S ve G2 evreleri sırasında hücre çekirdeğinde ve mitoz sırasında kromozomların yüzeyinde tespit edilebilir. Köpeklerde en çok çalışılan proliferasyon ve apoptoz biyobelirteçleri arasındadır ve çeşitli tümör tiplerinde mevcuttur. Ki67 düzeyleri iyi huylu tümörlerde kötü huylu tümörlere göre önemli ölçüde daha düşüktür ve artan düzeyler metastaz, kötü prognoz ve daha kısa sağkalım ile pozitif olarak ilişkilidir (Kaszak ve ark., 2018; Peña ve ark., 1998). Normalde epitel hücrelerinde eksprese edilen bir adezyon membran proteini ve tümör baskılayıcı gen olan E-kaderin de önemli bir immunohistokimyasal prognostik faktördür. Kadınlarda ve dişi köpeklerde meme kanserinde E-kaderin kaybı meydana gelebilir ve tümör boyutunun artması, histolojik derece, hastalığın evresi ve genel olarak daha kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Li ve ark., 2017). Köpeklerde E-kaderinin düşük ekspresyonu veya yokluğu, üçlü negatif ve HER-2 pozitif tümörler dahil olmak üzere daha agresif ve metastatik kanserlerle ilişkilidir (Varallo ve ark., 2019). Bu proteinin düşük ekspresyonu aynı zamanda tümör epitel hücrelerinde mezenkimal özelliklerin edinilmesini, invazyonu ve hücre yayılımını teşvik eden epitelyal mezenkimal geçişte de rol oynar (Gray ve ark., 2020; Varallo ve ark., 2019).

Aktin mikrofilamentleri, ara filamentler ve mikrotübüller, memeli

hücrelerinde hücre iskeletinin oluşumunda rol oynar. Sitokeratinler (CK'ler), hücre farklılaşması, doku büyümesi ve epitel hücre tipini yansıtan intermediate filamentlere aittir (Abd El-Rehim ve ark., 2004). Normal insan ve köpek meme bezlerinde lümen epitel hücreleri CK7, CK8, CK18 ve CK19 ekspresyonu sergiler. Öte yandan CK5, CK14, CK15 ve CK17 bazal/miyoepitelyal hücrelerde eksprese edilir (Böcker ve ark., 2002; Rasotto ve ark., 2014). Malign KMT'de luminal CK19'un aşağı regülasyonu, agresif bir fenotip ve daha yüksek tümör ilerlemesi riski ile ilişkilendirilmiştir (Gama ve ark., 2010). Fhaikrue ve ark. (2020), kompleks karsinom ve iyi huylu karışık tümör hücrelerinde CK5 ekspresyonunu göstermişlerdir. Ayrıca basit karsinom hücrelerinde CK18 bulunmuştur (Fhaikrue ve ark., 2020). Solid karsinomda da yüksek düzeyde CK18 ekspresyonu tespit edilmiştir (Borghesi ve ark., 2021). CK'lerin immunohistokimyasal ekspresyonu, meme kanserinin histolojik incelemesinde umut verici bir yaklaşımı temsil edebilir (Taneja ve ark., 2010).

1.3. İmmun kontrol noktaları Nedir?

İmmun kontrol noktaları, immun yanıtları hassas şekilde ayarlamak için ortak uyarıcı yolları fizyolojik olarak dengeleyen inhibitör yollarıdır. Başka bir deyişle, bir immun yanıtı durdurabilen normal immun sinyalleridir (Türkoğlu ve Kahveci, 2019; Gibney ve ark., 2016). Bir immun kontrol noktasının iki bileşeni ile ilgili olarak, immun hücreler üzerinde eksprese edilen moleküller genellikle immun kontrol noktası reseptörleri olarak adlandırılırken, antijen sunan hücrelerde, tümör hücrelerinde veya diğer hücre tiplerinde immun kontrol noktası ligandları olarak isimlendirilir (Foy ve ark. 2016).

İmmun kontrol noktaları, fizyolojik koşullarda bağışıklık homeostazını koruyan düzenleyici moleküllerdir. Alıcılar aracılığıyla T hücrelerine ko-stimülatör veya ko-inhibitör sinyaller göndererek, immun kontrol noktaları hem sağlıklı dokuları adaptif immun yanıtlardan korur hem de lenfositleri patojenleri etkili bir şekilde uzaklaştırmak için aktive eder. Ancak, baskılayıcı immun kontrol noktaları işlevlerinden dolayı kanser hücreleri için istenmeyen bir koruma sağlayabilir. İmmun sistemin işlevini yeniden kazandırmak ve hastanın bağışıklık hücrelerinin tümörleri

tanıyıp yok etmesini sağlamak ve baskılayıcı immün kontrol noktalarını engellemek veya pozitif immün kontrol noktalarını uyarmak için kanser immunoterapisinde monoklonal antikolar geniş çapta kullanılır (Marhelava ve ark. 2019).

İnhibitör veya uyarıcı immün kontrol noktası molekülleri, farklı tümör tiplerinde tümör hücrelerinin oldukça büyük bir kısmı üzerinde eksprese edilir. Son yıllarda, tümör hücrelerinde immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonunun, tümör hücrelerinin biyolojisi üzerinde önemli sonuçları olduğu ortaya konulmuştur (Foy ve ark. 2016). Kanser gelişiminde kritik olan bu immün kontrol noktası inhibitörlerinin keşfi yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için yeni fırsatlar sunmuştur. Bu tedavi stratejileri, İnhibitör İmmün Kontrol Noktası Blokajı (İKB) olarak adlandırılmaktadır (Walker ve Sansom 2015; Lo ve Abdel-Motal 2017; Nallasamy ve ark. 2018). İmmün kontrol noktası moleküllerinin tümör hücreleri tarafından aşırı ekspresyonu, kanser mikroçevresinde tümöre özgü T-hücresi bağışıklığını etkiler. Bu kontrol noktalarını kullanan tümör immün kaçış mekanizmalarının çoğu efektör hücre fonksiyonlarını bloke ettiğinden, anti-tümör immunitesi, inhibitör reseptör-ligand etkileşimini bloke eden ve böylece immün kontrol noktalarını inaktive eden antikolar ile onarılabilir (Carosella ve ark. 2015).

Bahsedilen denetim noktaları için en önemli hedef hücre grubu T lenfositlerdir. T lenfositler temel olarak CD4+ ve CD8+ T lenfositler olarak iki gruba ayrılırlar. Naive CD8+ T hücresinin aktive olabilmesi için T hücre reseptör kompleksinin (TCR) majör doku-uygunluk kompleksi (MHC) üzerinden sunulan bir peptit ile birleşmesi ve sonrasında ko-stimülatör uyarının oluşması gereklidir. Kendimize ait olan veya olmayan antijenler dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreler (APC) ile T hücrelerine sunulurlar. TCR, MHC üzerinden kendisine sunulan antijeni tanır ve böylece ilk sinyal oluşmuş olur. Ancak T hücresinin aktivasyonunu tamamlayabilmesi için ko-stimülatör sinyale ihtiyacı vardır. Naive CD8+ T hücrelerinin en önemli ko-stimülatör uyarı sinyali T lenfosit yüzeyindeki CD28'in, APC üzerindeki CD80/CD86 ile etkileşimidir. T hücre yüzeyinde yer alan CD28 ile APC üzerinde yer alan CD 80/86'nın etkileşmesi ile ko-stimülatör sinyal oluşur. Böylece T hücresi naive formdan aktive forma geçiş gösterir. Ko-stimülatör uyarının olmaması halinde, T hücresi yanıt veremez ve antijene periferik tolerans durumu yani

aneri gelişir (Baş Aksu ve Şengül 2020; Pardoll, 2012). Bununla birlikte aktive edici sinyallerin yanında uygunsuz T hücre aktivasyonunu önlemek için PD-1, CTLA-4, LAG-3 ve VISTA gibi T hücre bağışıklığının negatif düzenleyicilerine ihtiyaç vardır. Bu proteinler sayesinde immun sistem, normal hücelere karşı atak göstermez ve normal hücreler neoplastik büyüme geçirmeye başladığında T hücreleri bunları algılayarak karşı atak yaparlar. Ancak tümör hücreleri de bu immun kontrol noktası moleküllerini membranlarında eksprese ederek immun sistem hücrelerinin saldırısından korunmayı başarırlar. Pankreas kanserinin ileri evrelerinde CTLA-4, LAG-3, PD-1, VISTA gibi immun kontrol noktası genlerinin yüksek seviyede ekspresyon gösterdiği ve bunun da sağkalım ile ters orantılı olduğu bilinmektedir. Negatif düzenleyici inhibitörlerin blokesi veya aktivatörlerin arttırılması ile tümöre karşı yanıt güçlendirilebilir (Brunet ve ark. 1988; Erbakan ve ark., 2021; Gelao ve ark. 2014; Blando ve ark. 2019).

1.3.1. CTLA-4

En erken tanımlanan immun kontrol noktası CTLA-4'tür. Fare CTLA-4 geni 1987'de keşfedilmiş ve insan geni takip eden yıl klonlanmıştır (G. Wang ve ark., 2020; Brunet ve ark., 1987; Dariavach ve ark., 1988; X. B. Wang ve ark., 2011; R. Li ve ark., 2007). Ancak CTLA-4'ün T hücresi aktivasyonunu negatif olarak düzenlediği 1990'ların ortalarına kadar gösterilememiştir (Waterhouse ve ark., 1995; Krummel ve Allison, 1995; Leach ve ark., 1996).

İmmunoglobulin süper ailesine ait olan CTLA-4 (sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4) 223 amino asitlik protein kodlayan bir dizidir. Esas olarak efektör T lenfositlerinde, naif T hücrelerinde ve Treg yüzeyinde az miktarda eksprese edilir (Erbakan ve ark., 2021; Brunet ve ark., 1987; Goodall ve ark. 2014; Gelao ve ark., 2014). Normal şartlar altında B7 molekülü ile CD28 reseptörü bağlanırken, CTLA-4 B7'ye bağlanmak için CD28 ile rekabet haline girer ve 20 kat fazla afiniteyle B7'ye bağlanır. Bunun sonucunda ikinci sinyalleşme olan B7/CD28 gerçekleşmediği için T hücrelerinde aneriye sebep olunur. B7 eş uyarınlar ile bağlantı sonrasında TCR sinyallerinin doğrudan inhibisyonu meydana gelir ve azalan IL-2 ekspresyonu ile T

hücreleri için immunsuppressive etki yaratır (Gelao ve ark., 2014; Linsley ve Ledbetter, 1993).

İmmun sistemin hassas dengesinde baskılayıcı tarafta yer alan T-reg hücreleri tümör mikro-çevresinde de yoğun olarak bulunur ve tümöre karşı gelişen immun yanıtı inhibe ederler. Böylece tümörün immun sistemden korunmasına yardımcı olurlar. T-reg'lerin yüzeyinde CTLA-4 gibi immun kontrol noktaları yer almaktadır. CTLA-4 inhibitörleri T-reg'lerin fonksiyonunu inhibe ederek, tümör mikro-çevresindeki immun süpresif etkiyi ortadan kaldırır. Bu nedenle, CTLA-4 blokajının anti-tümoral etkinliği hem efektör CD4/CD8+ T hücre aktivitesinin artırılması hem de T-Reg hücrelere bağlı immunosüpresyonun inhibisyonu üzerinden ortaya çıkmaktadır (Baş Aksu ve Şengül, 2020; Peggs ve ark., 2009).

NCR ifadesi, anti-tümör konak yanıtının gelişiminin birçok aşamasında düzenlenir. Bu yanıtın gelişiminde hem konstitütif onkogenik sinyalleşme hem de adaptif bağışıklık direnci tarafından yönlendirilir. CTLA-4 için bağlayıcı ortaklar CD80 ve CD86'dır. APC'lerde ifade edilirler ve sonuç olarak CTLA-4, T hücre aktivasyonunun gerçekleştiği ikincil lenfoid organlarda işlev görmesi nedeniyle öncelikle bu organlarda işlev görür (Nowak ve ark., 2017; Topalian ve ark., 2015). Naive veya bellek hücrelerinde ifade edilmez, bu nedenle CD28'in CD80/86 ile etkileşime girmesi ve ko-stimülasyonun baskın olmasına olanak sağlar. Ancak, TCR sinyalizasyonu sonrasında CTLA-4 mRNA'sı stabilize edilir, protein mobilize edilir ve ardından yüzeyde ifade edilir. CD28'i geride bırakarak CD80/CD86 ile bağlanan CTLA-4, T hücre yanıtlarını hem hücre-otonom hem de hücre-dışı yollarla inhibe edebilir (Wolchok ve Saenger, 2008).

TMÇ'deki diğer bağışıklık düzenleyici mekanizmalarla birlikte sürekli antijene maruz kalmanın, yüksek seviyelerde ko-inhibitör reseptörleri (CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3, BTLA vb.) ifade edilmesine ve sitotoksikite ve efektör sitokinlerin üretimi (IFN- γ , IL-2, TNF- α) gibi proliferasyon ve efektör fonksiyon kaybı ile tükenmiş-T hücrelerine yol açtığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, T hücresi tükenmesi, geri döndürülemez değildir ve tükenmiş T hücreleri tarafından ifade edilen ortak inhibitör yollar modüle edilerek, mevcut immun kontrol noktası inhibe

edici tedavilerin temelini oluşturan T hücrelerinin işlevsel olmayan hali tersine çevrilebilir (Agrawal, 2019).

CTLA-4'e özgü bir insan monoklonal antikoru olan Ipilimumab (Yervoy), bu yeni kanser immunoterapisi sınıfından ilk FDA onaylı ilaçtır. Metastatik melanomali hastalarda, ipilimumab tedavisi genel sağkalımı 3.6 ay arttırarak, hastaların % 10-20'sinde kalıcı tümör regresyonu ile tam bir yanıt oluşturmuştur (Foy ve ark., 2016). Ipilimumab ve tremelimumab, CTLA-4'ü hedef alırlar (Ott ve ark., 2013).

Tümör yanıtlarını kontrol noktası blokajına engelleyebilecek mekanizmaların çokluğu göz önüne alındığında, monoterapi olarak CTLA-4 blokajının uzun yıllar sürebilen kısmi ve tam tümör yanıtları oluşturması oldukça dikkat çekicidir (Ott ve ark., 2013). Ipilimumab'a cevabın dayanıklılığı, tedavinin başlamasından 3 yıl sonra %20 hayatta kalma platosuna işaret eden 1861 hastanın faz II ve faz III klinik çalışmalarının uzun süreli analizleri ile gösterilmesi çok önemlidir (van Hooren ve ark., 2017).

1.3.2. PD-1/PDL-1

Efektör T hücresi, B hücresi ve miyeloid hücrelerinde eksprese edilen programlanmış ölüm reseptörü-1 (PD-1), neredeyse tüm insan hücrelerinin yüzey membranında bulunan B7 gen ailesinin bir üyesi olan PD-L1 (programlanmış ölüm ligandı-1) ile etkileşim gösterir. T hücrelerinin aktive edilmesi ve inhibe edilmesi için oldukça önemli olan PD-1/PD-L1 yolu periferik T-lenfosit toleransının korunmasında ve inflamasyonun düzenlenmesinde görev alır. PD-1/PD-L1 etkileşimi sonucunda TCR aracılı T hücre proliferasyonu zayıflar, IL-2 ekspresyonu azalır, T hücrelerinde sitokin salınımı inhibe olur. Bu sinyal yolağı PD-1 hücre ölümünü doğrudan indüklemeyi, ancak hücre büyüme faktörlerini ve sağkalım sinyallerini azaltır. Yapılan çalışmalarda PD-1 eksik farelerde graft-versus-host hastalığı (GvHD) adı verilen otoimmün reaksiyonlar gerçekleşmiştir (Freeman ve ark., 2000; Latchman ve ark., 2001; Schütz ve ark., 2017). Kanser hücreleri ise hücre yüzeylerinde PD-L1 ekspresyonunu arttırarak bağışıklık sistemini inhibe etmeyi başarır. İn-vivo olarak

PD-L1 tümör oluşumunu ve invazivliği arttırarak tümör hücrelerini spesifik CD8 + T hücrelerine daha duyarsız hale getirdiği gösterilmiştir (Schütz ve ark., 2017).

CTLA-4'ün aksine PD-1 naive T hücrelerinde eksprese edilmez. PD-1, T hücre aktivasyonundan sonraki 24 saat içerisinde eksprese edilmeye başlanır. T hücre ve APC arasındaki etkileşimin süresi de çok değişkendir. T hücresinin aktive olup sitokin salınımı yapabilmesi için öncelikle APC ile stabil bağlantılar oluşturması gerekir. Stabil bağlantı oluşturamayan T hücreleri anerjik hale gelirler. Yapılan çalışmalarda PD1/PD-L1 blokajının T hücre-dendritik hücre arasında stabil bağlantının oluşmasını sağladığı ve anerji gelişmesini önlediği gösterilmiştir (Baş Aksu ve Şengül, 2020; Garris ve ark., 2018).

PD-1, CTLA-4'e göre daha geniş alanlarda eksprese edilir. Çalışmalar özellikle T lenfositler üzerine yoğunlaşmış olsa da NK hücreler ve B lenfositlerde de PD-1 ekspresyonu olduğu, bu hücrelerin litik aktivitelerini kısıtladığı ile ilgili veriler vardır. Dolayısıyla PD-1 blokajı doku ve tümör mikroçevresinde efektör T lenfositlerin ve NK hücrelerinin aktivitesini artırır ve B lenfositlerden antikor salınımında artışa neden olur (Pardoll, 2012).

PD-1'in PD-L1 ve PD-L2 olmak üzere iki adet ligandı vardır. PD-1'in T lenfosit fonksiyonlarını inhibe etmesi için mutlaka PD-L1 ve PD-L2 ligandlarıyla birleşmesi gerekmektedir. Tümör hücrelerinde çoğunlukla bulunan ligand PD-L1'dir. Tümörün mikro-çevresinde eksprese edilen PD-L1, tümöre karşı gelişen immun yanıtı baskılar. Fare modellerinde tümör hücresi yüzeyinde PD-L1'in artmış ekspresyonun, tümör mikro-çevresinde tümöre karşı gelişen immun yanıtı inhibe ettiği ve böylece tümör hücrelerinin immun sistemden kaçarak çoğalabildiği gösterilmiştir (Dong ve ark., 2002).

PD-L1 melanom, over kanseri, ve akciğer kanseri tümör hücrelerinde yüksek seviyede ifade edilirken, PD-L2 B hücreli lenfomalarda (primer mediastinal B hücreli lenfoma, foliküler lenfoma, Hodgkin hastalığı gibi) ifade edilir (G. Wang ve ark., 2020; Pardoll, 2012; Baumeister ve ark., 2016) .

İmmun denetim noktaları, ko-stimülatör uyarıyı engelleyerek T hücrelerinin tümör hücrelerine karşı verdiği yanıtı baskılar ve tümör hücreleri için immün sistemden kaçış mekanizması olarak görev alırlar. Bu immün baskılamayı ortadan kaldırmak için primer hedefleri PD-1, PD-L1 ve CTLA-4 olan antikolar bugün klinikte kullanılan tedavi seçenekleri haline gelmiştir. Bu yolla immün sistemi güçlendirerek tümör hücrelerine karşı yanıtı artıran, immün düzenleyici monoklonal antikoların klinik kullanımları ile ilerlemiş malignitesi olan hastalarda prognoz önemli ölçüde iyileştirilmiştir (Garon ve ark., 2015; Ansell ve ark., 2015; Bellmunt ve ark., 2017) .

CTLA-4 blokajı yapan ipilimumab malign melanomda kullanılırken PD-1 blokajı yapan cemiplimab kutanöz yassı hücreli karsinomada, pembrolizumab ve nivolumab küçük hücre dışı akciğer kanseri, malign melanom, renal hücreli kanser, Hodgkin lenfoma, baş boyun yassı hücreli kanserleri, kolorektal kanser ve üretelyal karsinom gibi birçok malignitede kullanılmaktadır. Atezolizumab, durvalumab ve avelumabın ise PD-L1 üzerinden etki göstererek üretelyal karsinomda kullanımları onaylanmıştır (Markham ve Duggan, 2018; Hargadon ve ark., 2018; Emens ve ark., 2017).

1.3.3. Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3)

LAG-3, 1990 yılında keşfedilmiş ve aktive T hücrelerinde, Tregs, DC'ler, NK hücrelerinde ifade edildiği saptanmıştır (Triebel ve ark., 1990) . LAG-3, CD4 ile yüksek homolojiye sahip olup MHC-II molekülleri için daha yüksek bir afinitesi bulunmakla birlikte, T hücre fonksiyonunu negatif olarak düzenler (Huard ve ark. 1995). LSECTin ve fibrinojen-benzeri protein 1 (FGL1) ligandlarına bağlanması yoluyla tümör immunoterapisinde bir hedef olarak umut vaat etmektedir (Jun Wang ve ark., 2019; F. Xu ve ark., 2014).

Tümör mikroçevresinde bulunan T hücrelerinde özellikle CD8+ T hücrelerinde yüksek seviyede LAG-3 ekspresyonuyla immunosupresif etki gözlenmektedir. PD-L1'i yüksek seviyede eksprese eden tümörlü dokularda LAG-

3'ün ekspresyonu ile beraber tümörün daha agresif olduğu tespit edilmiştir (Keane ve ark., 2020)

1.3.4. T-cell Immunoglobulin Mucin-3 (TIM-3)

TIM-3, 2002 yılında keşfedilmiş ve CD4+ T yardımcı hücrelerinde, CD8+ sitotoksik T hücrelerinde, Treg'lerde ve belirli doğal bağışıklık hücrelerinde (DC'ler, NK hücreleri, monosit/makrofajlar) ifade edildiği bulunmuştur (Anderson ve ark., 2016). Hayvan modelleri ve hastalarda yapılan çalışmalar, TIM-3'ün anti-PD-1 antikorlarına dirençli bireylerin T hücrelerinde yukarı regüle edildiğini göstermiştir. Anti-TIM-3 antikorunun anti-PD-1 antikoru ile birleştirilmesi, bu anti-PD-1 direncinin üstesinden gelerek TIM-3'ün de antitümör yolda oynadığını gösterir (Koyama ve ark., 2016).

1.3.5. B- and T- Lymphocyte Attenuator (BTLA)

BTLA, 2003 yılında genetik tarama yoluyla keşfedilmiştir. T hücreleri, B hücreleri, DC'ler ve miyeloid hücrelerde (Gavrieli ve ark., 2003; Murphy ve ark., 2006) ve herpes virüs giriş aracı (HVEM) için 2005 yılında BTLA'nın ligandı olarak kabul edilmiştir (Sedy ve ark., 2005). BTLA, SHP1'i etkinleştirerek TCR sinyalini inhibe edebilir, böylece B hücrelerine bağlı CD40 L'nin mobilizasyonunu ve T hücrelerinin B hücreleri üzerindeki yardımcı etkisini sınırlayabilir (Sedy ve ark., 2005). Bu nedenle, BTLA-HVEM eksenini bloke eden antikorlar, TCR aracılığıyla T hücre sinyalleşmesinin doğrudan artmasına ve dolaylı olarak B hücre aracılığıyla bağışıklık yanıtının artmasına neden olabilir.

1.3.6. T cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT)

TIGIT, 2009 yılında keşfedilmiş bir immunoglobulin ailesi üyesidir. Aktive olan T hücreleri, NK hücreleri, bellek T hücreleri, Tregs ve Tfh hücrelerinde ifade edilir (Yu ve ark., 2009). Ligandları arasında, APC'lerde, T hücrelerinde, non-hematopoetik hücrelerde ve tümör hücrelerinde ifade edilen CD155, CD112 ve CD113 yer alır. CTLA-4 ve CD28'in B7 bağlanması için rekabet ettiği gibi, TIGIT de

kostimülatör reseptör CD226 ile rekabet eder (Manieri ve ark., 2017). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, tümöre infiltrasyon yapan NK hücrelerinin TIGIT'i aşırı ifade ettiğini ve buna bağlı olarak NK fonksiyonunun azaldığını göstermiştir. TIGIT'i hedefleyen monoklonal antikor tedavisi, NK hücrelerinin fonksiyonel tükenmesini tersine çevirerek farelerde tümör büyümesini etkili bir şekilde inhibe edebileceği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2018).

1.4. VISTA

Sitoplazmik T lenfositleri ile ilişkili protein 4 (CTLA4), programlanmış hücre ölümü-1 (PD-1) ve/veya ligandı PD-L1 hedefleyen bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin, melanom ve akciğer kanseri gibi immunogenik kanserlerin yanı sıra çeşitli solid tümörlü hastalara fayda sağladığı gösterilmiştir (Zong, Mo, ve ark., 2020; Z. Li ve ark., 2018). Ancak, potansiyel olarak immunogenik kansere sahip hastalar arasında bile, sadece nispeten küçük bir oran bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinden fayda sağlar. Bu tedavilere direnç gösteren hastaların açıklaması, T hücre yanıtlarını baskılayan ve ciddi T hücresi tükenmesine katkıda bulunan alternatif bağışıklık kontrol noktalarının aktivasyonudur. V-domain Ig supresörü (VISTA) gibi ek bağışıklık kontrol noktalarının modülasyonu, daha iyi klinik sonuçlar elde etmek için kullanılabilir; bu nedenle, bu moleküller şu anda aktif olarak araştırılmaktadır (Deng ve ark., 2016).

VISTA (gen *Vsir*, RIKEN cDNA 4632428N05, takma adları Gi24, Dies-1, PD-1H ve DD1 α), T hücre aktivasyonunu baskılayan V alanı immunoglobulin proteindir (W. Xu ve ark., 2018; Yoon ve ark., 2015; Flies ve ark., 2011; Aloia ve ark., 2010). Fare *Vsir* geni transkripti 930 baz çiftinden oluşur ve 309 amino asit (aa) içeren tip I transmembran proteinine çevrilir. Fare VISTA'nın ekstraselüler bölgesi, tek bir Ig-V domaini içerir ve bu domain 136 aa uzunluğundadır. Bu domain, 23 aa'lık bir sap bölgesi, 21 amino asitlik bir transmembran segmenti ve ITAM, ITIM veya ITSM motifleri içermeyen 97 aa'lık bir sitoplazmik bölüme bağlanır. Potansiyel protein kinaz C bağlanma bölgeleri ve sitoplazmik kuyrukta prolin açısından zengin bölgeler tanımlanmıştır, ancak bunların işlevsel rolü henüz karakterize edilmemiştir (Flies ve ark., 2011).

Hematopoietik hücre serileri içinde, VISTA proteini granülositler, monositler, makrofajlar ve miyeloid dendritik hücreler (DC'ler) dahil olmak üzere CD11bHi miyeloid hücrelerde yüksek düzeyde ifade edilir (Li Wang ve ark. 2011). CD11bInt miyeloid DC'lerde orta düzeyde ifade edilir. VISTA ayrıca NK hücrelerinde, TCR $\gamma\delta$ T hücrelerinde, naif CD4+ ve CD8+ TCR $\alpha\beta$ T hücrelerinde ve Foxp3+ CD4+ düzenleyici T hücrelerinde (Tregs) ifade edilir. Durağan durumda dalak B hücrelerinde yüzey ifadesi tespit edilmez. T hücrelerinde, VISTA ifadesi CD8+ T hücrelerindeki naif CD4+ T hücrelerine göre daha yüksektir. Aktivasyonun ardından, T hücrelerinde VISTA ifadesi geçici olarak yükseltilir, ancak in vitro 24 saat veya in vivo birkaç gün sonra düşürülür (Li Wang ve ark., 2011; Flies ve ark., 2011).

Diğer immun-kontrol noktası düzenleyicileri CTLA4 ve PD-L1 / PD-1 T hücresi aktivasyonunu SHP1 / 2'yi seferber ederek kontrol ederken (W. Xu ve ark., 2019; Hui ve ark., 2017; Teft ve ark., 2006), VISTA, hem miyeloid hücre aracılı hem de T hücre aracılı immun yanıtları düzenlemede daha geniş bir rol oynar (W. Xu ve ark., 2018). Önceki çalışmalarda, bir fare psoriasiform enflamasyon modelinde, VISTA'nın miyeloid DC'lerde TLR7 tarafından indüklenen IL-23 üretimini inhibe ettiği ve TCR $\gamma\delta$ T hücrelerinde IL-17 üretimini azalttığı gösterilmiştir (N. Li ve ark., 2017). Mieloid antijen sunan hücrelerde ifade edilen VISTA, CD4 + ve CD8 + T hücrelerinde tanımlanmamış bir inhibisyon reseptörüne bağlanarak, T hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin üretimlerini baskılar (Li Wang ve ark., 2011). CD4 + T hücrelerinde ifade edilen VISTA, T hücresi-özgül bir şekilde T hücre aktivasyonunu sınırlar (Flies ve ark., 2014).

APC'lerde eksprese olan VISTA, CD4+ ve CD8+ T hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini doğrudan baskılayarak immunsupresör görevi görmektedir. T hücrelerinin hayatta kalması, büyümesi için son derece önemli olan IL-2 sitokininin ekspresyonunu azalttığı da tespit edilmiştir. VISTA ekspresyonunu korumak veya düzenlemek için lenfoid dokularda mikroçevrenin rolü büyüktür. Yapılan bir çalışmayla birlikte VISTA'nın tümör hücreleri üzerindeki ekspresyonunun MMP yolunu tetikleyerek tümör büyümesine katkı sağladığı görülmüştür (G. Wang ve ark., 2020; Nowak ve ark., 2017; Gabrilovich, 2017; Ceeraz ve ark., 2013).

VISTA asidik tümörlü ve inflamasyonlu bölgelerde immunsupresif etkisini gösterebilmek için pH seçiciliğini kullanarak PSGL-1 ile etkileşim kurmaktadır ve T hücrelerinin sitokin salınımını engelleyerek T hücre aktivasyonunu baskılamaktadır. Yapılan çalışmalarda PSGL-1 geninin silinmesi T hücrelerine VISTA bağlanmasını önemli ölçüde azaltmıştır (Johnston ve ark., 2019)

VISTA, bağışıklık yanıtlarını düzenlerken hem bir ligand (asitik koşullarda ko-engelleyici reseptör P-selektin glikoprotein ligand-1'e bağlanarak) hem de bir reseptör (ligand V-set ve immunglobulin alanı içeren protein 3'e bağlanarak) olarak hareket edebileceği için PD-1 ve CTLA4'ten farklıdır (Johnston ve ark., 2019; Jinghua Wang ve ark., 2019).

VISTA, CD4+ hücrelerinde ko-inhibitör reseptörü olarak işlev görürken, T hücreleri için ko-inhibitör ligandı olarak işlev görür. Bu, in vitro deneylerde VISTA-immunoglobulin füzyon proteininin anti-CD3 aktivasyonu sırasında T hücrelerinin aktivasyonunu, proliferasyonunu ve sitokin üretimini inhibe ettiği şeklinde gösterilmiştir (Le Mercier ve ark., 2014). Bu gözlem, VISTA^{-/-} CD4+ T hücrelerinin, vahşi tip olanlara kıyasla daha güçlü antijen-spesifik proliferasyon ve sitokin üretimi sergilediği kanıtıyla güçlendirilmiştir. Bu nedenle, bir paradigma olarak, APC'lerde (miyeloid hücreler) ifade edildiğinde de ligand olarak işlev görür ve dışsal olarak T hücrelerine inhibitör sinyaller taşır (W. Xu ve ark., 2018).

VISTA'nın otoimmün hastalıkların çeşitli türlerinde immün fonksiyonu olumsuz yönde düzenlediği ve T hücreleri, DC'ler, makrofajlar ve TCR $\gamma\delta$ T hücreleri üzerinde inhibisyon etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca VISTA'nın inflamasyonun ve otoimmün hastalıkların çeşitli modellerindeki işlevi hakkında etkileri olduğu bildirilmektedir. Multiple sklerozun fare modelinde, VISTA bloke edici bir antikoron (13F3) uygulanması hastalık ilerlemesini önemli ölçüde hızlandırmış ve hastalık şiddetini kötüleştirilmiştir (Li Wang ve ark., 2011) VISTA'nın CD4 + T hücrelerinin aktivasyonuna bağlı inflamasyonu bastırılması yoluyla, hepatit modelinde inflamasyonu azalttığı bildirilmiştir (Flies ve ark. 2014b). Kulak iltihabı modelinde de VISTA'nın, immunsupresif etkilerini CD4 + T hücreleri aracılığıyla gösterdiği bildirilmiştir (Ohno ve ark., 2017) .

VISTA-eksik farelerin deneysel otoimmün ensefalomyelitise (EAE) karşı daha duyarlı oldukları gösterilmiştir. Bu farelerde merkezi sinir sisteminde daha fazla IFN- γ + ve IL-17A+ üreten CD4+ T hücreleri tespit edilmiştir. Bu sistem kullanılarak yapılan diğer deneyler, otoimmunitiyi kontrol etmede T hücreleri veya miyeloid hücrelerde VISTA'nın rolünü göstermiştir (Li Wang ve ark., 2014).

P-selektin glikoprotein ligandı-1 (PSGL-1) T hücreleri ve daha birçok hematopoietik hücre tarafından eksprese olan adezyon molekülüdür. Naive T hücreleri, bellek T hücreleri ve efektör T hücrelerinin inflamasyonlu dokuya göçünde, endotel hücrelere ve trombositlere tutunmasında P-selektin gibi moleküller oldukça önemlidir (Tinoco ve ark., 2017; Johnston ve ark., 2019).

Antijen stimülasyonu sırasında PSGL-1 ekspresyonu sonucu hücrelere bağlanmasıyla, T hücresi reseptör sinyallerini azaltarak hücre sağlığı ve fonksiyonunu bozmaktadır. Ayrıca hücre yüzeyinde VISTA gibi inhibitör reseptör ekspresyonunu da arttırmaktadır. Güncel çalışmalarla beraber PSGL-1 eksikliğinde aktif T hücrelerinde efektör sitokin üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Viral enfeksiyon ve melanoma tümör modellerinde de PSGL-1 molekülünün T hücrelerinin tükenmesini desteklediği gözlemlenmiştir (Tinoco ve ark., 2017).

VISTA'nın histidin kalıntıları, asidik pH koşullarında PSGL-1'e bağlanma yeteneğine sahiptir. PSGL-1, immün hücrelerin yüzeyinde bulunan bir glikoproteindir ve immün yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, VISTA'nın PSGL-1'e bağlanma yeteneği, immün hücrelerin davranışını etkileyebilir (Johnston ve ark., 2019).

Hem VISTA hem de PSGL-1, granüositler, makrofajlar ve endotel hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilir ve biyolojilerinde önemli fonksiyonlar yerine getirirler (Mohamed A. ElTanbouly ve ark. 2019; Carlow ve ark. 2009). Bağışıklık hücresi fonksiyonu açısından, VISTA ve PSGL-1 arasında bağışıklık tepkilerinin sonucu açısından ilginç paralellikler bulunmaktadır. Örneğin, VISTA eksikliği veya hedeflenmesi ve PSGL-1-Ig fare artritis modelini iyileştirebilir (Ceeraz ve ark. 2017; Sumariwalla, Malfait, ve Feldmann 2004). VISTA veya PSG-

L1 hedeflenen antikolarlar ayrıca T hücre ölümüne neden olarak GVHD indüksiyonunu da inhibe edebilir (Flies ve ark., 2011; Mohamed A. ElTanbouly ve ark., 2020; C. C. Huang ve ark., 2005).

VSIG3, VISTA'nın bağlayıcı ortağı olarak tanımlanmıştır. VSIG3, hücre adezyonunda yer alan bir ligand olarak görev yapar. VSIG3-VISTA etkileşiminin immun yanıtı nasıl düzenlediği hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, VSIG3-VISTA etkileşimi, immunoterapide kullanılabilecek bir hedef olarak görülmektedir (M. A. ElTanbouly ve ark., 2020).

Son zamanlarda VISTA'nın ligandı olduğu düşünülen B7 ailesinden VSIG-3 molekülü kolorektal kanser, hepatoselüler karsinom ve mide kanserinde yüksek seviyede eksprese olmaktadır. VISTA/VSIG-3 etkileşimi aktive olmuş T hücrelerinde ko-inhibitör fonksiyon gösterir. VSIG-3 T hücrelerinde ve periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) sitokin ve kemokin salınımını baskılayarak, proliferasyonu engeller. VISTA/VSIG-3 blokasyonu ile yeni bir kanser immunoterapi stratejisi geliştirilmiştir. Ancak yine de VSIG-3'ün tam olarak biyolojik fonksiyonu bilinmemektedir (Jinghua Wang ve ark., 2019).

Çoklu fare modellerinde, TME'de VISTA ifadesi artmakta ve anti-tümör bağışıklığı şekillendirmede kritik bir rol oynamaktadır (Deng ve ark., 2016; Le Mercier ve ark., 2014). PD-L1'den farklı olarak, VISTA ifadesi tümör infiltrasyonu yapan lökositlere özgüdür ve tümör hücrelerinde tespit edilmemiştir. Özellikle, VISTA ifadesi tümör infiltrasyonu yapan miyeloid hücrelerde, miyeloid DC'lerde ve MDSC'lerde ve periferdeki Tregs'lerle karşılaştırıldığında tümör infiltrasyonlu Tregs'lerde özellikle artmaktadır (Le Mercier ve ark., 2014).

MDSC'lerde, VISTA, periferik lenf nodunda bulunanlara kıyasla tümör infiltrasyonlu lökositlerde neredeyse 10 kat artmıştır (Le Mercier ve ark., 2014). Bu önemlidir çünkü infiltrasyonlu immun hücreleri ve özellikle MDSC'leri olan tümörlerin, tedaviye yönelik olarak kullanılabilecek bol miktarda VISTA'ya sahip olabileceğini göstermektedir.

Çoklu hücreler ve moleküller, immunoterapinin tam potansiyelini bozan birçok faktör olmasına rağmen, MDSC'lerin hedeflenmesi, antitümör T hücre fonksiyonunun genel olarak artmasına yol açacak bir kombinasyon tedavisinde benzersiz avantaj sunabilir. Kanser ortamında dislejik miyelopoiezin ve olgunlaşmamış öncüllerin genişlemesi ilk kez 1980'lerde gözlemlenmiştir (Talmadge ve Gabrilovich, 2013). Şimdi, MDSC'ler birçok fare modelinde (Youn ve ark., 2012, 2008) ve kolon, meme, melanom ve pankreas gibi insan kanserlerinde büyük ölçüde genişlemiş olarak belgelenmiştir (Haymaker ve ark., 2012; Derré ve ark., 2010). Bu hücreler, besin tükenmesi, TCR sinyal iletiminin bozulması, T hücre göçünün engellenmesi ve T hücrelerin baskılanmasına bir mekanizma olarak PD-L1-PD-1 yolunu kullanarak T hücre aktivitesini birden fazla farklı mekanizma aracılığıyla inhibe ederler (Talmadge ve Gabrilovich, 2013; Gabrilovich ve ark., 2012; Srivastava ve ark., 2010; Nagaraj ve ark., 2007; Hanson ve ark., 2009; Molon ve ark., 2011; Noman ve ark., 2014)

VISTA özgül blokaj antikoru (13F3), TME'deki inhibisyon dengesini değiştirerek birkaç tür tümörü (B16/BL6 melanom, B16/OVA melanom, PTEN/BRAF oluşturulan melanom ve MB49 mesane kanseri dahil) hafifletebilir. CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin sayısını artırarak, IFN- γ , TNF- α ve IL-12p40 gibi inflamatuvar faktörlerin salgısını artırarak ve MDSC ve Foxp3+CD4+ Treg'lerin sayısını azaltarak bunu yapar. Ayrıca, TIL'lerdeki MDSC'ler ve miyeloid DC'lerdeki yüksek VISTA ifadesi ve VISTA blokajı yoluyla TIL'lerin artan proliferasyonu, VISTA'nın monoklonal blokaj antikor terapisinin temelidir (Le Mercier ve ark., 2014).

13F3'e benzer şekilde, VISTA bloke eden monoklonal antikor MIH-63'ün de T hücre proliferasyonunu ve TNF- α ve IFN- γ gibi inflamatuvar faktörleri artırarak kanser (örneğin over ve endometriyal (Mulati ve ark., 2019) ve skuamöz hücreli karsinomda (Kondo ve ark., 2016) hafiflettiği gösterilmiştir. Ek olarak, bu deneyde özellikle ilginç olan bir nokta, tümör hücrelerinde VISTA tespit edilemezken VISTA blokajının etkili olmasıdır (Le Mercier ve ark., 2014).

Anti-VISTA B16OVA ve PTEN/BRAF'ın melanom modellerinde tümör-infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Le Mercier ve ark., 2014). Birçok tümörün karakteristik özellikleri olan anormal miyelopoezis ve MDSC birikimi göz önüne alındığında (Gabrilovich ve ark., 2012), miyeloid bileşenin normalleştirilmesi, diğer NCR blokaj formlarından farklı bir mekanizma olan anti-VISTA ile immunomodülasyon için yeni bir fırsat sunmaktadır. Anti-insan VISTA antikoru şu anda non-küçük hücreli akciğer kanseri gibi diğer kanserlerdeki hastaların değerlendirilmesi için Faz I klinik çalışmada bulunmaktadır. İnsan VISTA knock-in fare surrogatı, insan VISTA knock-in farelerinde miyelomonositik ve T hücre bileşenlerinin modülasyonu yoluyla tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2016).

İnsan pankreas kanserindeki tümör mikroçevresinin stromal bölgesine M2 makrofajlar, MDSC'ler, Treg hücreler de dahil olmak üzere birçok immun hücre infiltre olmaktadır. Kanserle ilişkili VISTA'nın, pankreas kanserinde M2 makrofajlarından olan CD68+ makrofajlarında da yüksek seviyede eksprese olduğu tespit edilmiştir. TME'de stromal bölgede bulunan CD68+ makrofajları anjiogenez, tümör büyümesi ve metastazı tetikleyerek sağkalımı azaltıcı bir etki yapmaktadır (Mohamed ve ark., 2020; Blando ve ark., 2019).

VISTA molekülünün immunosupresör etkisini ortadan kaldırarak, kanserin gelişimini ve invazyonu engellemek amacıyla anti-VISTA antikor terapisi üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. 2014 yılında LeMercier ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre VISTA monoklonal antikorlar kullanılarak tümör mikroçevresi değiştirilmiştir. Bunun sonucunda tümör içine sızan CD8+ T hücresinin efektör fonksiyonu ve proliferasyonu artmıştır. IFN- γ ve granzim B gibi efektör molekül üretimi de artarak tümör gelişimi engellenmiş ve sağkalım da artmıştır. Ayrıca 2019 yılında Mulati ve arkadaşlarının yumurtalık ve endometriyal kanser türlerinde yaptığı çalışmalar ile de VISTA'nın shRNA ile hedeflenmesi sonucunda IFN- γ 'nın up regüle olduğu ve T hücre yanıtının arttığı tespit edilmiştir (Mulati ve ark., 2019; Le Mercier ve ark., 2014).

PD-L1 yerine VISTA'nın bloke edilmesi, tümöre infiltre olan lenfositlerin sitokin üretimini inhibe etmektedir. Bu nedenle, PD-L1 ve VISTA, pankreas kanserinde antitümör T hücresi yanıtlarını baskılayabilen inhibitör yollarını tetiklemektedir (X. Huang ve ark., 2020).

1.4.1. Vista'nın Ligandları

1.4.1.1. P-selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1)

PSGL-1, T-hücreleri, miyeloid hücreler ve trombositlerde yüksek düzeyde ifade edilir. PSGL-1, TME'nin asidik koşullarında (Mahoney ve Freeman 2020; Johnston ve ark. 2019) VISTA'ya bağlanarak T hücre göçünü homeostaz ve inflamatuvar durumlarda (Tinoco ve ark. 2017) düzenler. Ayrıca, PSGL-1, inflamasyonlu kolonik alanlarda CD8 + T hücrelerine bağlanarak transmembran reseptör olarak immun hücre toplama işlemini düzenler (Tinoco ve ark., 2017; Asaduzzaman ve ark., 2009).

PSGL-1'in immunsupresif bir molekül olarak CD8 + T hücreleri ve CD43-defektif T hücreleri proliferasyonunu etkilediği gösterilmiştir (Veerman ve ark., 2012; Matsumoto ve ark., 2009). Ayrıca, Roberto ve ark., tükenmiş CD8 + T hücrelerinin PSGL-1'e bağlanarak TCR ve IL-2 sinyallemesini inhibe ettiğini belirtmiştir (Tinoco ve ark. 2016). Önemli bir şekilde, VISTA, TME'nin asidik pH koşullarında ve PSGL-1'e bağlanarak çoklu histidin kalıntılarını seçici olarak baskılar (Johnston ve ark., 2019). Tüm bunlar bir araya getirildiğinde, PSGL-1, VISTA'nın bir ligandı olarak hareket eder (Im ve ark., 2022).

1.4.1.2. V-Set and Immunoglobulin Domain Containing 3 (VSIG-3)

VSIG-3, immunglobulin süper ailesinin bir üyesi olan (Harada ve ark., 2005) ve ayrıca BT-IgSF veya IGSF11 olarak da bilinen, VISTA'nın bir ligandı olan bir immunglobulin alanı içeren bir protein olarak bulunmuştur (Jinghua Wang ve ark., 2019). VSIG-3, kalsiyum bağımsız bir şekilde hemofilik etkileşim yoluyla hücre adezyon molekülü olarak işlev görür ve birçok kanserde yaygın olarak eksprese edilir

(Harada ve ark., 2005; Jang ve ark., 2016). Benzer şekilde, IGSF11 ekspresyonunun kolorektal kanserlerde, hepatoselüler karsinomlarda ve mide kanserinde arttığı bildirilmiştir (Watanabe ve ark., 2005). Ancak, VSIG-8 ve VISTA arasında hiçbir etkileşim olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca, VSIG-3, IFN- γ , IL-2, IL-17, CCL5 / RANTES, CCL3 / MIP-1 α ve CSCL11 / I-TAC inhibitörü olarak T hücresi proliferasyonunu baskılamakmaktadır (Jinghua Wang ve ark., 2019). Anti-VISTA nötralizasyon mAb ön işlemesi ile VSIG-3 tarafından indüklenen IL-7'in inhibe edildiği gösterilmiştir, bu da VSIG-3'ün bir VISTA ligandı olduğunu ima etmektedir (Jinghua Wang ve ark., 2019).

1.4.1.3. FOXD3

FOXD3'ün melanomda VISTA'nın ekspresyon ve transkript seviyelerini seçici olarak düşürdüğü gösterilmiştir (Rosenbaum ve ark., 2020). Ayrıca, BRAF inhibisyonu FOXD3'ü yükseltir ve VISTA'nın ekspresyonunu baskılar. Bununla birlikte, Abel ve ark., FOXD3'ün melanomda BRAF inhibitörlerine adaptif direnç sağlamak için yükseltildiğini bildirmiştir (Abel ve ark., 2013). FOXD3, VISTA'nın bir ligandı gibi görünse de, FOXD3 ve VISTA arasındaki protein-protein etkileşimi hakkında gelecekte daha fazla çalışma gerekmektedir (Im ve ark., 2022).

1.4.1.4 Galectin-9

Galectin-9'un tümör hücrelerinde hücre birleşimi ve yapışması, anti-proliferasyon ve apoptoz ile ilişkili olduğu iyi belgelenmiştir (Fujihara ve ark., 2013). TIM-3 ligandlarından biri olan Galectin-9, CLEC7A, CD137, CD40 gibi diğer proteinlerle etkileşim kurar ve AMPK'yı aktive eder (Jia ve ark., 2019). Dahası, T hücrelerinde ifade edilen VISTA, AML hücrelerinde salgılanan galectin-9'u ligandı olarak tanır ve AML hücrelerinde salınan çözünür VISTA, ligand-reseptör etkileşimleri yoluyla galectin-9'un etkisini artırır (Yasinska ve ark., 2020).

Bu çalışmanın amacı

2. MATERYAL VE METOT

Tezde Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan, daha önce anabilim dalına gönderilmiş ve meme tümörü tanısı konulmuş 27 adet köpek türüne ait vaka çalışma dokusu olarak kullanıldı. Kullanılan vakaların bilgileri Tablo 2.1.'da verilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan vakalara ait bilgiler

Olgu No	Tür	Yaş	İrk	Tanı
1	Köpek	7	Kangal	Solid karsinom
2	Köpek	12	Terrier	Karsinom ve malignant miyoepitelyoma
3	Köpek	9	Golden Retriever	Kistik papiller karsinom
4	Köpek	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Komedokarsinom
5	Köpek	13	Bilinmiyor	Fibrosarkom
6	Köpek	14	Terrier	Komedokarsinom
7	Köpek	7	Bilinmiyor	Kompleks karsinom
8	Köpek	6	Golden Retriever	Tubulopapiller karsinom
9	Köpek	13	Bilinmiyor	Adenoskuamöz karsinom
10	Köpek	5	Melez	Malignant miks tümör
11	Köpek	9	Terrier	Lipid-rich karsinoma
12	Köpek	12	Terrier	Lipid-rich karsinoma
13	Köpek	12	Golden Retriever	Komedokarsinom
14	Köpek	10	Belgian Malinois	Malignant miks tümör
15	Köpek	14	Golden Retriever	Kompleks Karsinom
16	Köpek	11	Terrier	Malignant miks tümör
17	Köpek	9	Bilinmiyor	Malignant miks tümör
18	Köpek	13	Terrier	Solid karsinom
19	Köpek	10	Cooker	Anaplastik Karsinom
20	Köpek	4	Bilinmiyor	Kompleks karsinom
21	Köpek	4	Cooker	Karsinoma in-situ
22	Köpek	10	Rus finosu	Kistik papiller karsinom

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan vakalara ait bilgiler (devamı)

23	Köpek	9	Golden Retriever	Kistik papiller karsinom
24	Köpek	16	Bilinmiyor	Mikropapiller karsinom
25	Köpek	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Kompleks karsinom
26	Köpek	Bilinmiyor	Jack Russel	Tubulopapiller Karsinom
27	Köpek	9	Golden Retriever	Karsinom ve malignant miyoepitelyoma

Vakalardan histopatolojik ve immunohistokimyasal metotların uygulanması için tezde kullanılan bloklar Leica 2155 rotary mikrotomunda 4-5 µm kalınlığında kesildi ve kesitler normal ve polilizinli lamlara alındı. Hematoksilen & Eozin yöntemi için standart Harris Hematoksilen prosedürü kullanıldı (Presnell ve Schreibman, 1997). Doku kesitleri, 30'ar dakikalık 3 adet ksilol serisiyle deparafinize ve sonrasında %100, %96, %80, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek rehidre edildi. Suyunu geri kazanan doku kesitleri 5 dakika Harris Hematoksilen'de boyanıp amonyaklı sudan geçirildi ve 1,5 dakika Eozinle boyandıktan sonra distile suda yıkandı. Sonrasında %70, %80, %96 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek dehidre edilen doku kesitleri ksilolde parlatıldı, kurutulduktan sonra entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

İmmunohistokimyasal metodun uygulanması için polilizinli lamlara alınan doku kesitleri aynı şekilde 30'ar dakikalık 3 adet ksilol serisiyle deparafinize ve sonrasında %100, %96, %80, %70'lik alkol serilerinde rehidre edilerek distile suya alındı. Dokularda östrojen α (Era) ve progesteron (PR) ekspresyonlarının gösterilmesi için anti-Era (1:100, Santa Cruz sc-71064, Dallas, Texas, USA) ve anti-PR (1:100, Santa Cruz sc-166170, Dallas, Texas, USA) mouse monoklonal primer antikoları ve bunlarla uyumlu anti-mouse sekonder kit (Vectorlabs MP-7602, Newark California, USA), HER2 ve VISTA ekspresyonlarının gösterilmesi için anti-CERBB2 (1:1, VENTANA anti-HER2/neu, 4B5, Roche Diagnostics, Netherlands) ve anti-VISTA D5L5T (1:300, Cell Signaling #54979, Danvers, Massachusetts, USA) rabbit monoklonal primer antikoları ve bunlarla uyumlu anti-rabbit sekonder kit

(Vectorlabs MP-7601, Newark, California, USA) kullanıldı. Antijenlerin açığa çıkarılması için tüm kesitler pH 6.0 hazırlanmış sitrat tampona alınarak 120°C’de 15 dakika otoklavla kaynatıldı. Kaynatma işlemi biten kesitlerin oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra anti-mouse ve anti-rabbit kiti prosedürleri tatbik edildi. Tüm kesitler +4°C’de 1 gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Prosedür sonunda kesitlere Mayer Hematoksilenle karşı boyama yapıldı, entellan kullanılarak lamelle kapatıldı.

Yapılan histopatolojik incelemede tümörler malign ve benign olarak sınıflandırılarak ayrıca histolojik alt tiplendirmeleri yapıldı. Malign tümörler; tubul formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitotik indeks kriterlerine göre değerlendirildi. Tubul formasyonu; %75 ve üzeri 1, %10-75 arası 2 (solid oluşumlar ile beraber orta dereceli tubul dizilimler), %10 ve altı 3 (tubul formasyonu minimal ya da yok) şeklinde semikantitatif olarak skorlandı. Nükleer pleomorfizm; uniform veya düzenli küçük çekirdek ve yer yer çekirdekçik bulunması 1, orta dereceli çekirdek boyut ve şekil farklılığı, hiperkromatik çekirdek ve çekirdekçiklerin varlığı 2, belirgin dereceli çekirdek boyut farklılığı hiperkromatik çekirdek, sıklıkla bir veya daha fazla belirgin çekirdekçik bulunması 3 olarak skorlandı. Mitotik indeks için her vaka başına 10 adet yüksek büyütme alanında sayılan 0-9 mitoz 1, 10-19 mitoz 2, 20’nin üzerinde mitoz skor 3 olarak değerlendirildi. Malign tümörlerin derecelendirilmesi Pena ve arkadaşlarının daha önceden yaptıkları değerlendirme baz alınarak her vakada elde edilen toplam skora göre; 3-5 arası birinci (düşük) derece, 6-7 arası ikinci (orta) derece ve 8-9 arası üçüncü (yüksek) derece olarak değerlendirildi (Pena ve ark., 2013).

İmmunohistokimyasal boyanmaların değerlendirilmesi semikantitatif olarak yapıldı (Kamarlis ve ark., 2018). Bu amaçla hem boyanma yoğunluğu hem de boyanan hücre yüzdesi belirlendi ve ardından total skor elde edildi. Boyanma yoğunluğu 1 (boyanma yok), 2 (zayıf boyanma), 3 (orta dereceli boyanma) ve 4 (güçlü boyanma) şeklinde skorlandı. Ardından pozitif boyanan hücrelerin toplam tümör hücrelerine oranlanması ile elde edilen yüzdelik dilime göre 1 (< %20), 2 (≥ %20-50), 3 (> %50-80) ve 4 (> %80) şeklinde skora yapıldı. Elde edilen skorların çarpılmasıyla 1-16 arasında skor elde edildi ve daha sonra immunoreaktivite skoru düşük (≤5), orta (≥6-10) ve yüksek (≥11-16) şeklinde

belirlendi.

ER'ler ve PR'ler için Allred ve ark. (1998) immunoreaktivite indeksi uygulandı. Nihai puan, boyanan hücrelerin yüzdesine ve boyanmanın yoğunluğuna göre hesaplandı. Puanlar 0 ile 8 arasında değişmektedir. 0-1 puan alan örnekler negatif, 2-8 puan alan örnekler ise pozitif olarak değerlendirilmiştir. Boyanan hücrelerin yüzdesini ölçmek için kullanılan puanlar ve kriterler şöyledi: i) 0, boyanma yok; ii) 1, hücrelerin $\leq 10\%$inde boyanma; iii) 2, %1-10; 3, %11-33; iv) 4, %34-66; ve 5, %67-100. İmmun boyamanın yoğunluğunu belirlemek için kullanılan kriterler ve puanlar ise şöyledi: i) Yok, 0; ii) zayıf, 1; iii) orta, 2; ve iv) güçlü, 3. Boyama yoğunluğu semi-kantitatif olarak belirlendi. Her örnek için bu kriterlerin toplamı nihai puanı belirlendi.

HER2 pozitifliği, 2018 ASCO/CAP yönergelerine göre değerlendirilmiştir (Wolff ve ark, 2018). Bu yönergelere göre, 3+ pozitif skor, %10'dan fazla tümör hücresinde tam ve yoğun membran boyanması ile belirlenir, 2+ eşdeğer skor, %10'dan fazla tümör hücresinde zayıf ila orta derecede tam membran boyanması ile belirlenir ve 1+ negatif, %10'dan fazla tümör hücresinde zar zor algılanabilen eksik membran boyanması ile belirlenir. Hiç boyanma gözlenmediğinde veya %10'dan az tümör hücresinde eksik ve soluk bir membran boyanması olduğunda tümör 0 negatif olarak kabul edilir.

2.1. İstatistiksel Metot

İstatistiksel analizler için Minitab 16 programı kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırma için One Way ANOVA testi kullanıldı. Ayrıca elde edilen skorlar arasındaki korelasyonun ortaya konulması için Pearson korelasyon analizi gerçekleştirildi. Pearson analiz sonuçlarına göre r değeri 0-0.3 arası önemsiz, 0.3-0.5 arası düşük, 0.5-0.7 arası orta, 0.7-0.9 arası yüksek ve 0.9 üzeri çok yüksek korelasyon olarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. Histopatolojik Bulgular

Çalışmada kullanılan olgulara ait tanılar adenoskuamöz karsinom (n=1), anaplastik karsinom (n=1), fibrosarkom (n=1), karsinom ile malign myoepitelyoma (n=2), karsinoma in situ (n=1), kistik papiller karsinom (n=3), komedo karsinom (n=3), kompleks karsinom (n=4), lipid-zengin karsinom (n=2), malign mikst tümör (n=4), mikropapiller karsinom (n=1), solid karsinom (n=2), tubulopapiller karsinom (n=2) olarak belirlendi.

Adenoskuamöz karsinom olgusunda (20-043), tubuler karsinom ile birlikte belirgin şekilde malign yassı hücre farklılaşması gösteren neoplastik alanlar gözlemlendi (Şekil 1A). Olguda zayıf tubul formasyonu, orta dereceli nükleer pleomorfizm ve düşük mitoz oranı gözlemlendi ve tümör derecesi 2 olarak belirlendi.

Anaplastik karsinom olgusunda (21-496) tümöral hücrelerin çoğunlukta tubulopapiller yapı sergilediği fakat bazı alanlarda belirgin anaplastik solid alanların varlığı dikkati çekti. Bu alanlarda neoplastik hücrelerin şiddetli pleomorfizm ve anaplazi sergiledikleri görüldü. Bu olguda orta dereceli tubul formasyonu ile yüksek dereceli mitotik indeks ve nükleer pleomorfizm gözlemlendi ve tümör derecesi 3 olarak belirlendi.

Fibrosarkom olgusunda (14-195), iç içe geçmiş, mekik şekilli, belirgin malignite bulguları sergileyen ve belirgin hücreler arası eozinofilik matris yapısına sahip solid alanlar gözlemlendi (Şekil 1B). Bu olguda tubul formasyonunun zayıf, nükleer pleomorfizm ve mitoz oranının ise orta dereceli olduğu ve tümör derecesinin 2 olduğu belirlendi.

Karsinom ile malign myoepitelyoma olgularında, solid proliferasyonlar şeklinde gözlenen malign epitelyal bileşenlerle birlikte, daha mekik şekilli ve malignite bulguları sergileyen myoepitelyal üremelere rastlandı (Şekil 1C). Bir olguda (12-319) tubul formasyonunun zayıf, nükleer pleomorfizm ve mitoz oranının ise yüksek olduğu ve tümör derecesinin 3 olduğu gözlemlendi. Diğer olgunun (19-797)

ise tubul formasyonunun zayıf fakat mitotik indeks ve nükleer pleomorfizm derecesinin düşük olduğu görüldü ve tümör derecesinin 1 olduğu görüldü.

Karsinoma in situ olgusunda (22-025), kistik genişleme gösteren iki adet tubul içerisinde malignite bulguları sergileyen epitelyal ve mezenkimal özellikte fakat bazal membranı aşmadığı dikkati çeken sınırlı nodüler oluşumlar dikkati çekti (Şekil 1D). Bu olguda orta dereceli tubul formasyonu ile düşük dereceli mitoz ve nükleer pleomorfizm görüldü ve tümör derecesinin 1 olduğu gözlemlendi.

Kistik papiller karsinom olgularında (14-138, 14-269, 20-351), genel olarak kistik genişleme gösteren tubuller ile lümenlerine doğru papiller uzantılar veren neoplastik epitel hücreleri dikkati çekti (Şekil 1E). Neoplastik hücrelerin yüksek oranda tubul yapısı sergilediği, düşük mitoz oranına sahip olduğu ve hafif-orta dereceli nükleer pleomorfizm sergilediği dikkati çekti. Olguların üçünde de tümör derecesi 1 olarak belirlendi.

Komedokarsinom olgularında, neoplastik hücrelerin orta kısımlarında nekrotik alanlar gözlemlendi. Bu alanlarda nekrotik doku debris ve yangı hücrelerinin varlığı dikkati çekti (Şekil 1F). Bir olguda (20-351) tubul formasyonunu ve nükleer pleomorfizm orta dereceli iken, mitoz oranı yüksek bulundu ve tümör derecesi 2 olarak belirlendi. Diğer bir olguda (14-138) zayıf tubul formasyonu ile orta dereceli mitoz ve nükleer pleomorfizm dikkati çekti ve tümör derecesi 1 olarak belirlendi. Son olguda (14-269) ise tubul formasyonu zayıf, pleomorfizm orta dereceli ve mitoz indeksi yüksek olarak görüldü ve tümör derecesi 2 olarak belirlendi.

Kompleks karsinom olgularında, malign epitelyal hücreler ile birlikte benign myoepitelyal bileşenler gözlemlendi (Şekil 1G). Bir olguda belirgin miksoid matriks birikimlerine rastlandı. İki olguda (21-547 ve 22-628) orta dereceli tubul formasyonu, hafif orta dereceli nükleer pleomorfizm ve düşük mitoz oranı görüldü. Tümör derecesi bu iki olgu için de 1 olarak belirlendi. Diğer olgulardan birinde (21-290) orta dereceli tubul formasyonu ve mitoz oranı ile düşük dereceli pleomorfizm gözlemlendi ve tümör derecesi bu olguda da 1 olarak belirlendi. Son olguda (15-168) ise

orta dereceli tubul formasyonu, mitoz oranı ve nükleer pleomorfizm ile tümör derecesinin 2 olduğu görüldü.

Lipit-zengin karsinom olgularında (20-114, 20-293), neoplastik hücrelerin sitoplazmalarında küçüklü büyüklü belirgin vakuollerin bulunduğu gözlemlendi (Şekil 1H). Bazı alanlarda neoplastik üremelerin merkezi kısımlarının nekrotik olduğu görüldü. Bu olgularda düşük tubul formasyonu ile yüksek nükleer pleomorfizm ve orta dereceli mitoz oranı dikkati çekti ve tümör derecesi iki olgu için de 3 olarak belirlendi.

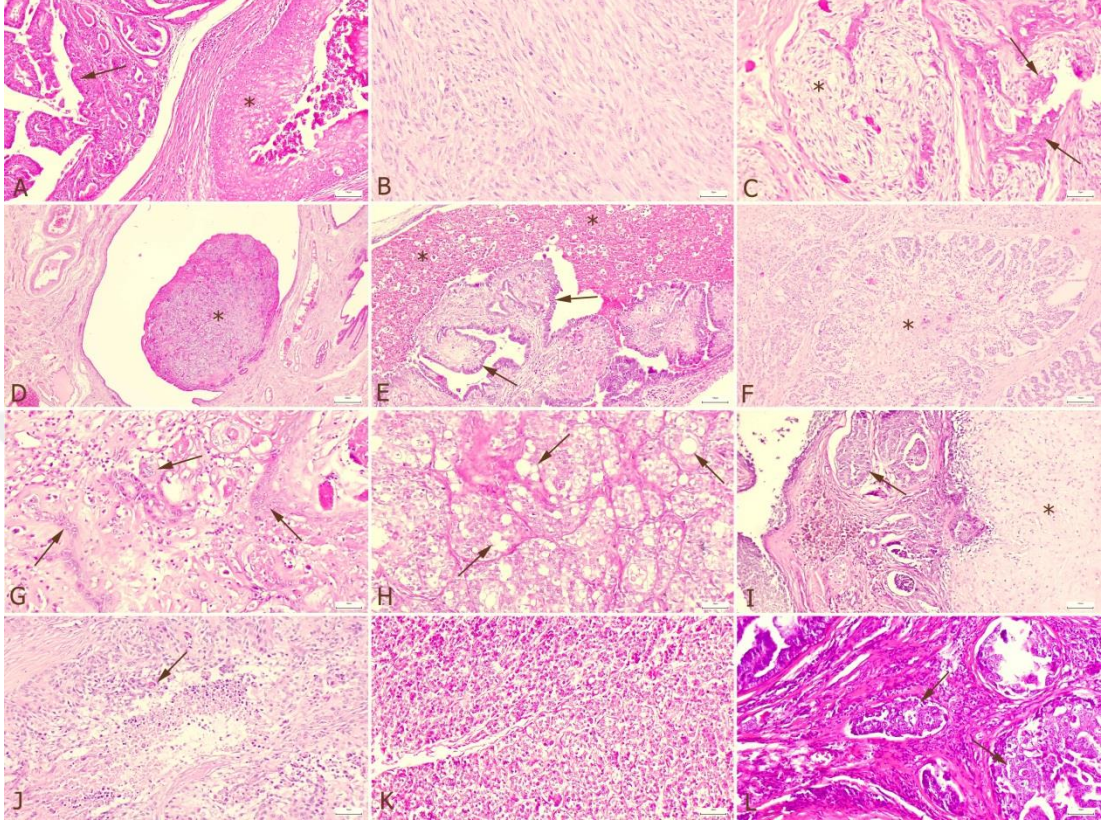
Malign miks tümör tanılı olgularda, genel olarak tubulopapiller proliferasyonlar şeklinde gözlenen neoplastik epitelyal bileşenler ile kıkırdak doku varlığı dikkati çekti (Şekil 1I). Hem epitelyal hem de mezenkimal bileşenlerin malignite bulguları sergilediği görüldü. Neoplastik hücrelerin genellikle orta dereceli nükleer pleomorfizm sergilediği, orta dereceli tubul formasyonuna ve düşük mitoz oranına sahip olduğu gözlemlendi. Olgulardan üçünün (21-054, 21-316, 21-348) derecesi 1 iken bir tümörün (20-052) derecesi ise 2 olarak belirlendi.

Mikropapiller karsinom olgusunda, intraduktal neoplastik hücre proliferasyonları ile birlikte fibrovasküler stroma ile desteklenmeyen küçük papiller proliferasyonlar gözlemlendi (Şekil 1J). Bu olguda tubul formasyonunun zayıf, nükleer pleomorfizm ve mitoz oranının ise orta dereceli olduğu, tümör derecesinin 2 olduğu belirlendi.

Solid karsinom olgularında, neoplastik hücrelerin lümen olmaksızın diziler, kordonlar ve paketler şeklinde proliferasyonu gözlemlendi (Şekil 1K). Bu tümörlerde tubul formasyonunun zayıf olduğu, nükleer pleomorfizmin belirgin ve mitoz oranının ise yüksek olduğu ve tümör derecesinin bir tümörde 2 (06-104), diğerinde (21-493) ise 3 olduğu gözlemlendi.

Tubulopapiller karsinom olgularında (18-192, 19-627), neoplastik tubullerde sesil veya pedünküllü papiller proliferasyonlar gözlemlendi (Şekil 1L). Bu tümörlerde tubul formasyonunun düşük olduğu, nükleer pleomorfizm ve mitoz oranının ise yüksek olduğu görüldü. Her iki olgu için de tümör derecesi 3 olarak belirlendi.

Özetle tümör derecelendirmeleri sonucunda 12 adet tümör derece 1, 8 adet tümör derece 2 ve 7 adet tümör derece 3 olarak belirlendi.



Şekil 3.1. A. Adenoskuamöz karsinom olgusunda adenokarsinom alanı (ok) skuamöz karsinom alanları (asterisk). B. Fibrosarkom olgusunda mekik şekilli malign fibroblast proliferasyonları. C. Karsinom ile malign myoepitelyoma olgusunda karsinom alanları (oklar) ile malign myoepitelyal proliferasyonlar (asterisk). D. Karsinoma in situ olgusunda tubul lümeninde gözlenen nodüler tümör alanı (asterisk). E. Kistik papiller karsinom olgusunda kist sıvısı (asterisk) ile papiller proliferasyonlar gösteren karsinom alanları. F. Komedo karsinom olgusunda, merkezi nekrotik (asterisk) epitelyal proliferasyonlar. G. Kompleks karsinom olgusunda malignant epitelyal proliferasyonlar (oklar). H. Lipid-zengin karsinom olgusunda tümör hücre sitoplazmalarında belirgin vakuoller (oklar). I. Malign miks tümör olgusunda karsinom alanları (ok) ve kıkırdak doku oluşumu (asterisk). J. Mikropapiller karsinom olgusunda lümen proliferasyonlar sergileyen karsinom alanları (ok). K. Solid karsinom olgusunda, yoğun şekilde proliferasyon gösteren neoplastik epitel hücreleri. L. Tubulopapiller karsinom olgusunda tubul lümenlerini dolduran papiller epitelyal proliferasyonlar (oklar). H&E.

3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

3.2.1. Moleküler Alt Tiplendirme

Çalışmamızda incelenen meme kanseri türlerine ait ER, PR ve HER2 boyanma sonuçlarına göre belirlenen moleküler alt tipler aşağıdaki gibidir:

Adenoskuamöz karsinom vakalarında ER ve PR negatif, HER2 pozitif olarak saptanmış ve bu tümörler HER 2 pozitif moleküler alt tipte teşhis edilmiştir. Anaplastik karsinom vakalarında ise ER ve PR negatif, HER2 pozitif bulunmuş ve yine HER 2 pozitif moleküler alt tip olarak değerlendirilmiştir.

Fibrosarkom örneklerinde ER negatif, PR pozitif ve HER2 negatif olarak bulunmuş ve Luminal A moleküler alt tipte teşhis edilmiştir. Karsinom ile malign myoepitelyoma vakalarında ise ER pozitif, PR negatif ve HER2 negatif olup, Luminal a moleküler alt tip olarak belirlenmiştir.

Karsinoma in situ vakalarında ER pozitif, PR pozitif ve HER2 negatif olarak tespit edilmiştir ve Luminal A moleküler alt tipte teşhis edilmiştir. Kistik papiller karsinom vakalarında da benzer şekilde ER ve PR pozitif, HER2 negatif olup Luminal A moleküler alt tip olarak değerlendirilmiştir. Ancak, bazı kistik papiller karsinom vakalarında ER pozitif, PR negatif ve HER2 pozitif bulunmuş ve bu vakalar Luminal b moleküler alt tip olarak sınıflandırılmıştır.

Özetle moleküler alt tiplendirmede 14 sayıda olgunun Luminal A, 2 olgunun Lüminal B, 2 olgunun Her2 pozitif ve 9 olgunun üçlü-negatif olduğu gözlemlendi.

ER, PR ve HER2 boyamalarına ait görüntüler Şekil 2-5'te sunulmuştur.

3.2.2. VISTA İmmun Boyama Sonuçları

Çalışmamızda, çeşitli meme kanseri türlerinde VISTA immün kontrol noktası boyanma yoğunluğu ve yüzdesi incelenmiştir. Bu incelemeler hem tümör hücreleri hem de yangı hücreleri için gerçekleştirilmiş olup, boyanma yoğunluğu skoru (TB)

ve boyanma yüzdesi skoru (TY) ile yangı hücrelerinin boyanma yoğunluğu skoru (YB) ve boyanma yüzdesi skoru (YY) değerlendirilmiştir. Boyanma yoğunluk skoru 1 olan vakalar negatif olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, nihai skor olarak tümör hücreleri için T skoru ve yangı hücreleri için Y skoru şeklinde sınıflandırılmıştır. Bu skorlar düşük, orta ve yüksek kategorilere ayrılmıştır. Ayrıca, yangı hücrelerinde boyanma gösteren hücre türleri de belirtilmiştir.

Adenoskuamöz karsinom vakalarında tümör hücrelerinin boyanma yoğunluğu ve yüzdesi orta düzeyde (T: 2) ve yangı hücrelerinde yüksek düzeyde (Y: 3) boyanma gözlenmiştir. Yangı hücreleri nötrofil ağırlıklıdır. Anaplastik karsinom vakalarında ise tümör hücrelerinde orta düzeyde (T: 2) ve yangı hücrelerinde düşük düzeyde (Y: 1) boyanma tespit edilmiştir; bu vakalarda makrofaj boyanması görülmüştür.

Fibrosarkom vakalarında tümör hücrelerinde düşük düzeyde (T: 1) ve yangı hücrelerinde yüksek düzeyde (Y: 3) boyanma gözlenmiş olup, nötrofil ağırlıklı yangı hücreleri bulunmuştur. Karsinom ile malignant myoepitelyoma vakalarının bir kısmında tümör ve yangı hücrelerinde boyanma yoğunluğu düşük düzeyde (T: 1, Y: 1), diğer kısmında ise düşük (T: 1) ve makrofaj boyanması ile birlikte düşük (Y: 1) düzeyde boyanma tespit edilmiştir. Karsinoma in situ vakalarında tümör ve yangı hücrelerinde boyanma yoğunluğu düşük düzeyde (T: 1, Y: 1) bulunmuştur.

Kistik papiller karsinom vakalarının birinde tümör hücrelerinde düşük (T: 1) ve yangı hücrelerinde orta düzeyde (Y: 2) boyanma bulunmuş olup, makrofaj orta dereceli ve nötrofil zayıf boyanma gözlenmiştir. Diğer iki vakada ise, biri yüksek (Y: 3) ve lenfosit ağırlıklı makrofaj boyanması ile diğeri yüksek (Y: 4) ve lenfosit ağırlıklı makrofaj soluk boyanma ile düşük (T: 2) boyanma düzeyleri gözlenmiştir.

Komodo karsinom vakalarının çoğunda tümör ve yangı hücrelerinde boyanma yoğunluğu düşük (T: 1) olup, bir vakada ise lenfosit ve makrofajlarda pozitiflik ile birlikte orta düzeyde (Y: 2) boyanma tespit edilmiştir. Kompleks karsinom vakalarında tümör hücrelerinde düşük (T: 2) ve yangı hücrelerinde yüksek (Y: 3) düzeyde boyanma gözlenmiş olup, nötrofillerde çok fazla boyanma ve makrofajlarda

az boyanma gözlenmiştir. Bir vakada ise, düşük düzeyde (T: 1) tümör ve orta düzeyde (Y: 2) nötrofil boyanması gözlenmiştir.

Lipid-zengin karsinoma vakasından birinde, tümör hücrelerinde yüksek düzeyde (T: 3) ve yangı hücrelerinde düşük (Y: 1) düzeyde boyanma gözlenmiş olup, yangı hücreleri belirtilmemiştir. Diğer vakada ise, tümör ve yangı hücrelerinde orta düzeyde (T: 3, Y: 3) boyanma tespit edilmiş ve nötrofil pozitif boyanma gözlenmiştir.

Malign miks tümör vakalarında, bazı örneklerde düşük (T: 1) tümör boyanması ve yüksek (Y: 3) yangı hücrelerinde makrofaj pozitif boyanma gözlenmiştir. Diğer örneklerde ise, orta düzeyde (T: 2) tümör ve orta düzeyde (Y: 2) nötrofil ağırlıklı boyanma tespit edilmiştir. Bir örnekte ise düşük düzeyde (T: 1) tümör ve düşük (Y: 1) lenfosit pozitif boyanma gözlenmiştir.

Mikropapiller karsinom vakasında, yüksek düzeyde (T: 3) tümör ve yüksek düzeyde (Y: 3) nötrofil ağırlıklı boyanma bulunmuş olup, lenfositler düşük düzeyde boyanmıştır. Solid karsinom vakalarında, bazı örneklerde düşük düzeyde (T: 1) tümör ve yüksek düzeyde (Y: 3) nötrofil ağırlıklı boyanma gözlenirken, diğer örneklerde yüksek düzeyde (T: 3) tümör ve yüksek (Y: 3) nötrofil ve lenfosit ağırlıklı boyanma tespit edilmiştir.

Tubulopapiller karsinom vakalarında ise, orta düzeyde (T: 2) tümör ve düşük (Y: 1) nötrofil pozitif boyanma gözlenmiştir. Diğer vakada ise yüksek (T: 3) tümör ve yüksek (Y: 3) lenfosit ağırlıklı boyanma bulunmuştur.

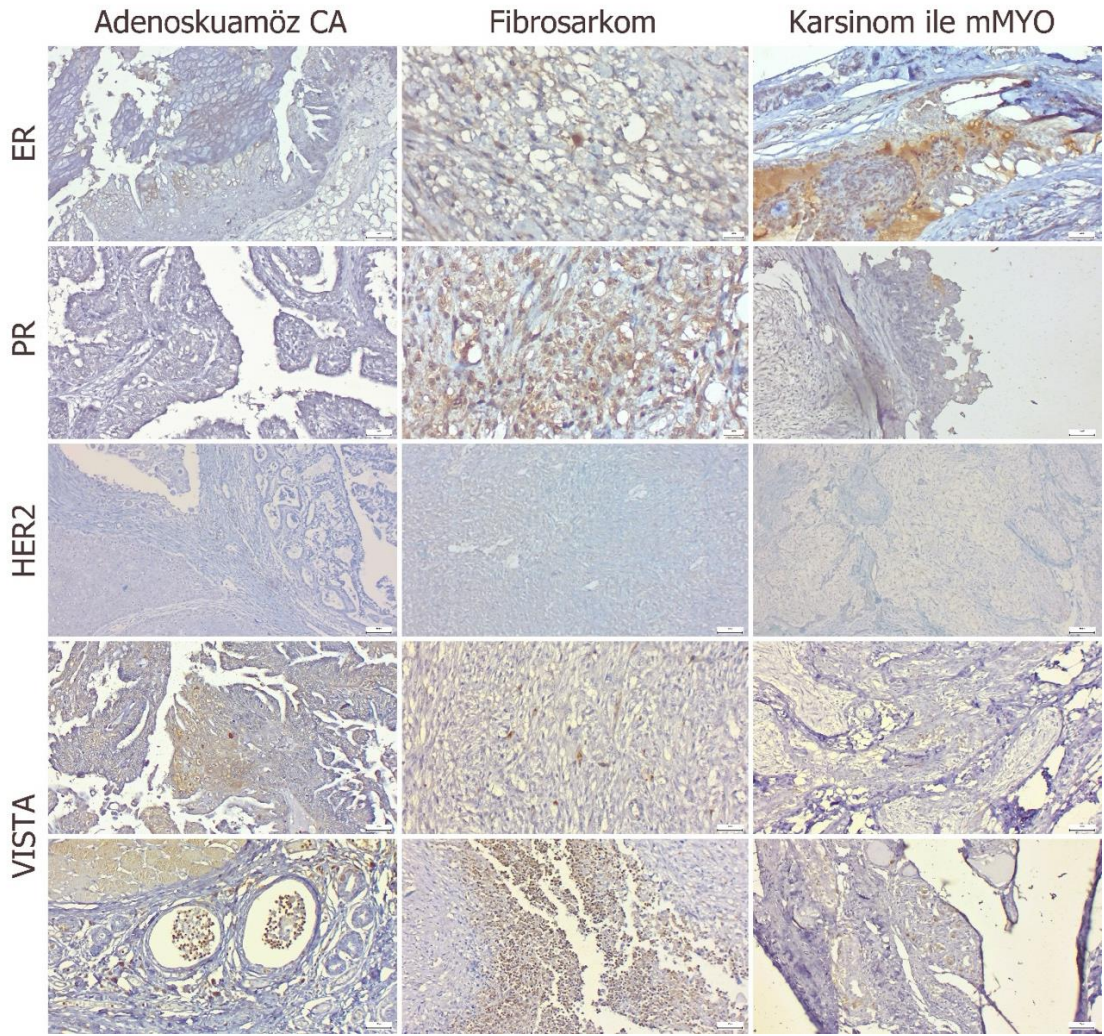
Özetle, VISTA açısından yapılan değerlendirmede çalışmamızda 15 vakada tümör hücrelerinde düşük skor, 6 vakada orta skor ve 2 vakada yüksek skor gözlenmiştir. Yangı hücrelerinde ise 8 vakada düşük skor, 7 vakada orta skor ve 8 vakada yüksek skor tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, çeşitli meme kanseri türlerinde VISTA immun kontrol noktası boyanma yoğunluğu ve yüzdesi incelenmiş olup, tümör ve yangı hücreleri için nihai skorlar düşük, orta ve yüksek kategorilere ayrılmıştır. Yangı hücrelerinin boyanma

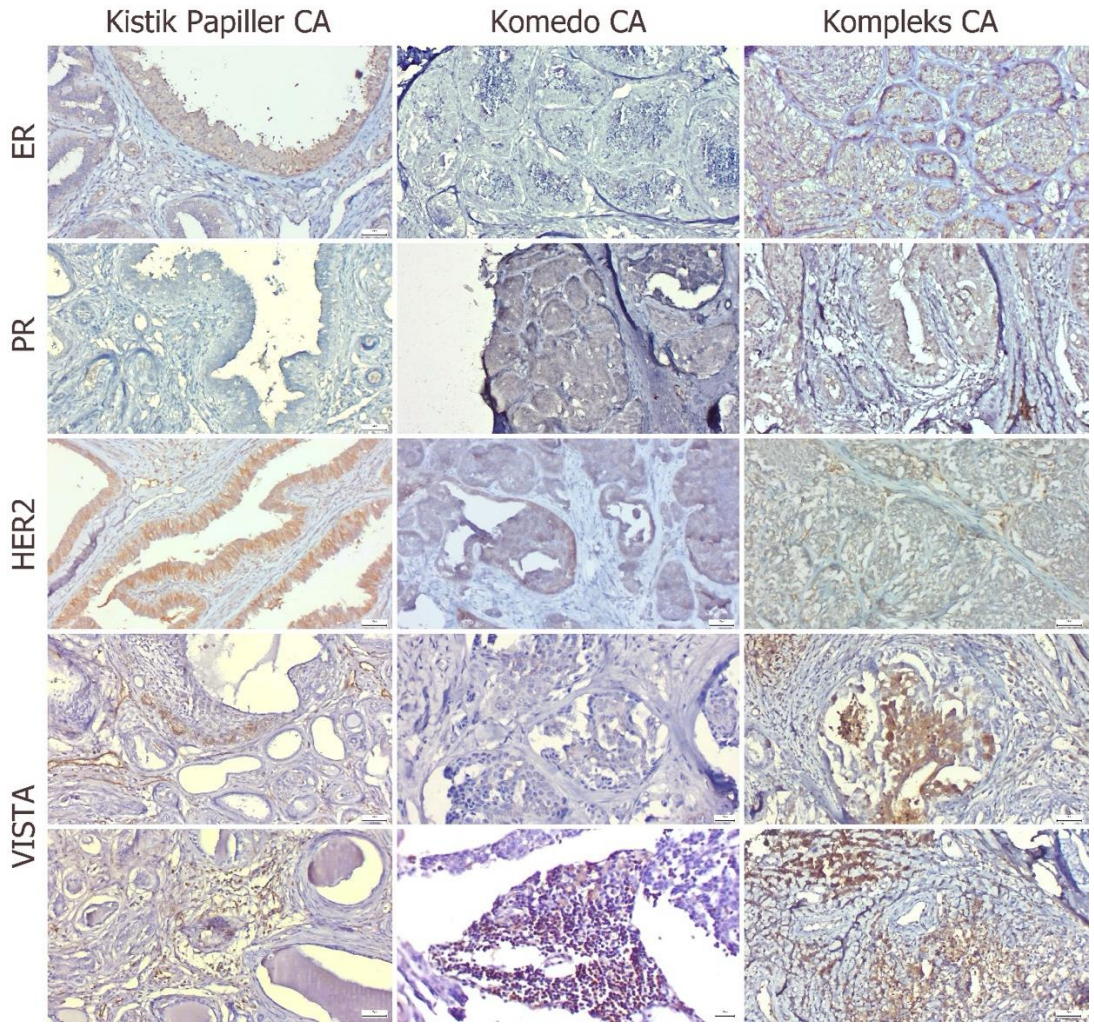
yoğunlukları ve türleri de detaylı bir şekilde değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen veriler ve VISTA'nın hangi yangı hücrelerinde ağırlıklı olduğu aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Düşük nihai yangı skoru olan vakalarda VISTA boyanmasının ağırlıklı olarak makrofajlar ve lenfositlerde olduğu tespit edilmiştir. Orta nihai yangı skoru olan vakalarda VISTA boyanmasının ağırlıklı olarak nötrofiller ve lenfositlerde olduğu belirlenmiştir. Yüksek nihai yangı skoru olan vakalarda ise VISTA boyanmasının nötrofillerde baskın olduğu gözlenmiştir. Bu veriler, VISTA'nın yangı hücrelerinde özellikle nötrofillerde daha yüksek düzeyde boyandığını ve meme kanseri türlerine göre değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

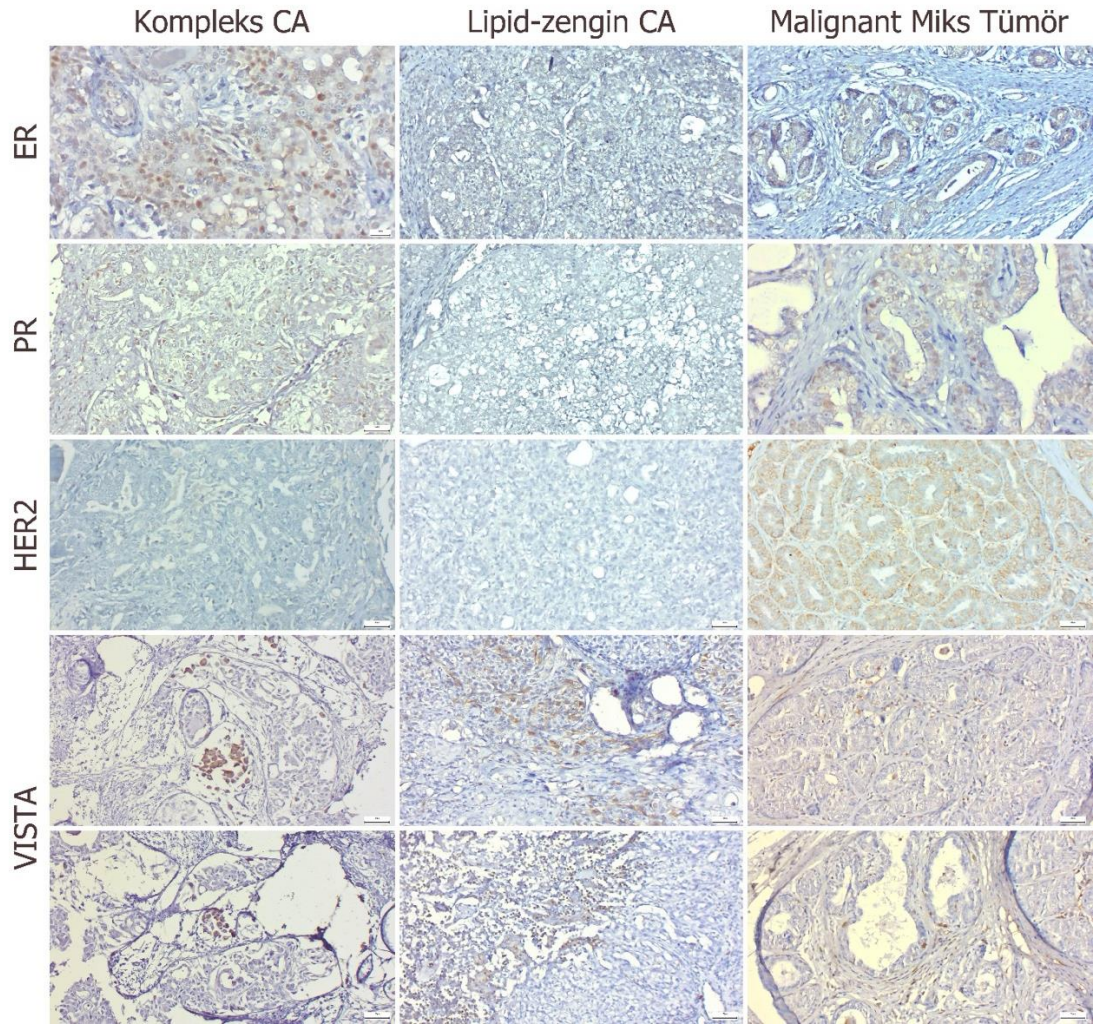
VISTA boyamalarına ait görüntüler Şekil 2-5'te gösterilmiştir.



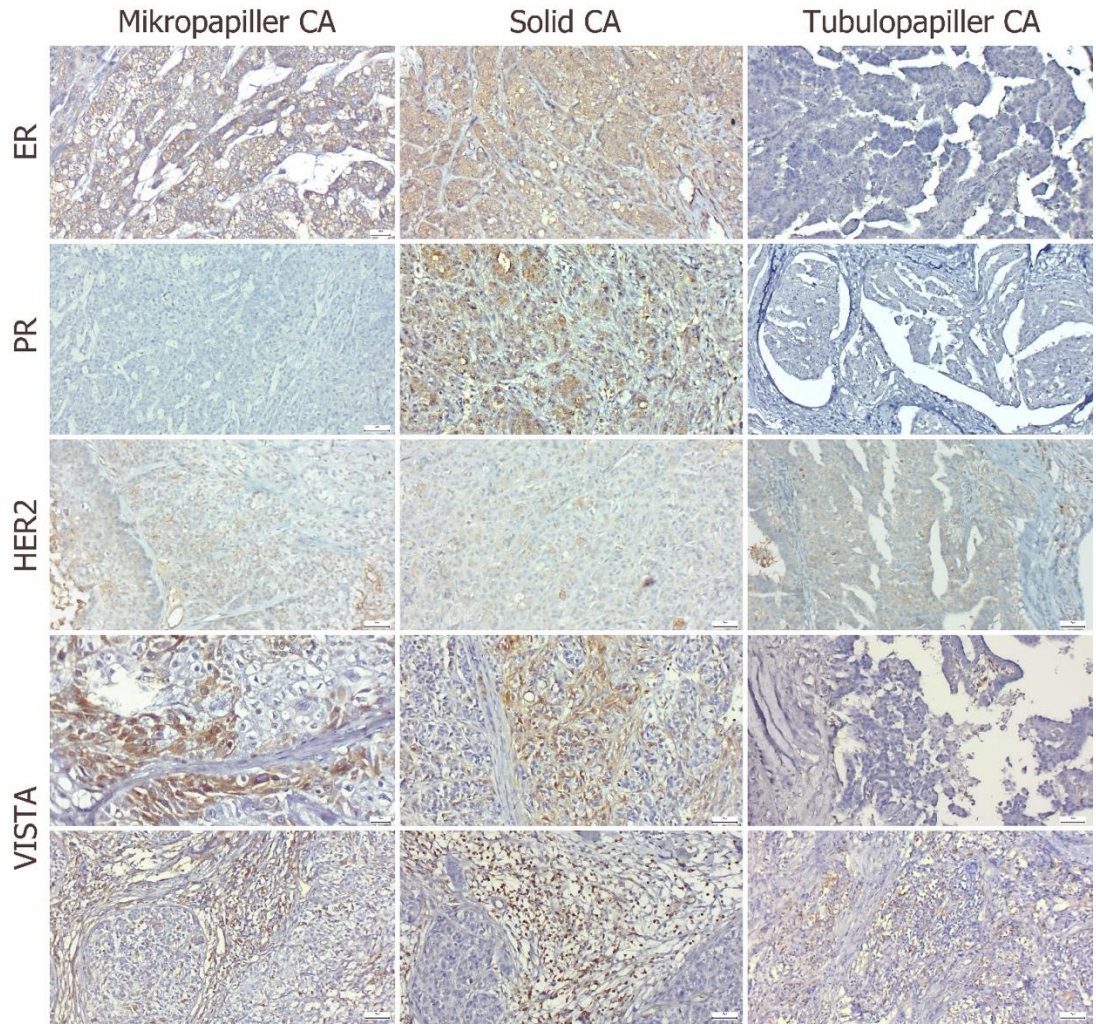
Şekil 3.2. Adenoskuamöz karsinom, fibrosarkom ve karsinom ile malign myoepitelyom olgularında ER, PR, Her2 ve VISTA boyama sonuçları.



Şekil 3.3. Kistik papiller karsinom, komedo karsinom ve kompleks karsinom olgularında ER, PR, Her2 ve VISTA boyama sonuçları.



Şekil 3.4. Kompleks karsinom, lipid-zengin karsinom ve malign miks tümör olgularında ER, PR, Her2 ve VISTA boyama sonuçları.



Şekil 3.5. Mikropapiller karsinom, solid karsinom ve tubulopapiller karsinom olgularında ER, PR, Her2 ve VISTA boyama sonuçları.

Tablo 3.1. Olgulara ait tanımlar ve skorlar

Tanı	ER	PR	HER2	Moleküler Tip	Tümör Derecesi	VISTA TB	VISTA TY	VISTA YB	VISTA YY	VISTA T Skor	VISTA Y Skor
Adenoskuamöz Karsinom	+	-	-	Luminal A	2	2	4	3	4	2	3
Anaplastik Karsinom	-	-	+	Her 2 Pozitif	3	2	3	2	1	2	1
Fibrosarkom	-	+	-	Luminal A	2	1	1	3	4	1	3
Karsinom ile Malign Myoepitelyoma	+	-	-	Luminal A	3	1	1	1	1	1	1
Karsinom ile Malign Myoepitelyoma	+	-	-	Luminal A	1	1	1	2	1	1	1
Karsinoma İn Situ	+	+	-	Luminal A	1	1	1	1	1	1	1
Kistik Papiller Karsinom	+	-	-	Luminal A	1	1	1	3	2	1	2
Kistik Papiller Karsinom	+	+	-	Luminal A	1	1	1	4	3	1	3
Kistik Papiller Karsinom	+	-	+	Luminal B	1	2	1	4	4	1	3
Komodo Karsinom	-	-	-	Üçlü Negatif	1	1	1	1	1	1	1
Komodo Karsinom	+	-	-	Luminal A	2	2	1	1	1	1	1
Komodo Karsinom	-	-	-	Üçlü Negatif	2	2	1	3	2	1	2
Kompleks Karsinom	-	-	-	Üçlü Negatif	1	2	1	4	4	1	3
Kompleks Karsinom	-	-	-	Üçlü Negatif	1	1	1	4	2	1	2
Kompleks Karsinom	+	-	-	Luminal A	1	2	3	4	3	2	3
Kompleks Karsinoma	+	+	-	Luminal A	2	1	1	2	1	1	1
Lipid-Zengin Karsinom	-	-	-	Üçlü Negatif	3	2	4	1	1	2	1

Tablo 3.1. (Devam) Olgulara ait tanılar ve skorlar

Lipid-Zengin Karsinom	-	-	-	Üçlü Negatif	3	3	2	3	3	2	2
Malign Miks Tümör	+	-	-	Luminal A	2	1	1	3	4	1	3
Malign Miks Tümör	+	-	-	Luminal A	1	2	3	3	3	2	2
Malign Miks Tümör	+	+	+	Luminal B	1	1	1	3	2	1	2
Malign Miks Tümör	-	-	+	Her 2 Pozitif	1	2	1	3	1	1	1
Mikropapiller Karsinom	+	-	-	Luminal A	2	3	3	4	3	2	3
Solid Karsinom	-	-	-	Üçlü Negatif	2	1	1	4	4	1	3
Solid Karsinom	+	+	-	Luminal A	3	4	3	4	3	3	3
Tubulopapiller Karsinom	-	-	-	Üçlü Negatif	3	3	2	3	1	2	1
Tubulopapiller Karsinom	-	-	-	Üçlü Negatif	3	4	1	4	4	1	3

3.3. İstatistiksel Bulgular

Elde edilen veriler ışığında tanımlayıcı istatistiksel analizler yapılarak, frekans dağılımları ve ortalama ve standart sapmalar hesaplanmıştır. ER, PR, HER2 ve moleküler tipler (Luminal A, Luminal B, HER2 pozitif, Üçlü negatif) için frekans ve yüzde dağılımları ile tümör derecesi, VISTA TB, VISTA TY, VISTA YB, VISTA YY, VISTA T Skor ve VISTA Y Skor için ortalama, medyan ve standart sapmalar hesaplanmıştır.

3.3.1. Temel İstatistiksel Bulgular

Çalışmamızda yer alan meme kanseri türleri için yapılan VISTA immun kontrol noktası boyanma yoğunluğu ve yüzdesi ile ilgili tanımlayıcı istatistikler aşağıda verilmiştir:

Tablo 3.2. VISTA boyanma yoğunluğu ve tümör derecesine ait tanımlayıcı istatistik verileri.

	Tümör Derecesi	VISTA TB	VISTA TY	VISTA YB	VISTA YY
Count	27.0	27.0	27.0	27.0	27.0
Mean	1.814	1.814	1.666	2.851	2.370
Std	0.833	0.921	1.037	1.099	1.244
Min	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
max	3.0	4.0	4.0	4.0	4.0

Tablo 3.3. Moleküler tip dağılım verileri.

Moleküler Tip	Frekans
Luminal A	14
Üçlü negatif	9
HER2 pozitif	2
Luminal B	2

Tablo 3.4. ER, PR ve HER2 Pozitiflik Durumları.

	ER Negatif	ER Pozitif	PR Negatif	PR Pozitif	HER2 Negatif	HER2 Pozitif
Frekans	13	14	21	6	23	4

Elde edilen veriler ışığında tümör derecesi ortalama 1.81 olup, örneklerin çoğunluğu düşük ile orta arasında derecelendirilmiştir. Tümör derecesi 1 ile 3 arasında değişmektedir. VISTA TB ve TY skorlarının ortalamaları sırasıyla 1.81 ve 1.67 olup, genellikle düşük ile orta arasında yoğunlukta boyanma göstermektedir. VISTA YB ve YY skorlarının ortalamaları sırasıyla 2.85 ve 2.37 olup, yangı hücrelerinin boyanma yoğunluğunun biraz daha yüksek olduğunu göstermektedir. VISTA T skoru ortalama 1.37, VISTA Y skoru ise 2.04'dür. Bu da tümör hücrelerinin boyanma skorlarının genellikle düşük, yangı hücrelerinin boyanma skorlarının ise biraz daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Örneklerin çoğunluğu Luminal A (14) olarak sınıflandırılmış olup, Üçlü negatif tip (9) ikinci sırada yer almaktadır. ER pozitif vakaların (14) sayısı negatif olanlardan (13) biraz daha fazladır. PR negatif vakalar (21) pozitif olanlardan (6) daha fazladır. HER2 negatif vakalar (23) pozitif olanlardan (4) daha fazladır.

Bu sonuçlar, VISTA immun kontrol noktası boyanma yoğunluğu ve yüzdesinin meme kanseri türlerinde farklı dağılımlar gösterdiğini ve moleküler tiplere göre değişiklikler olduğunu ortaya koymaktadır.

3.3.2. Korelasyon Analiz Sonuçları

Aşağıda, VISTA boyanma skorları ve tümör derecesi, ER, PR, HER2 durumu ile moleküler tipler arasındaki Pearson korelasyon katsayıları ve p-değerleri verilmiştir:

Tablo 3.5. Moleküler tipler ile VISTA boyanma skorları ve tümör derecesi, ER, PR, HER2 durumu

Değişken 1	Değişken 2	Korelasyon Değeri	P-değeri
Tümör Derecesi	VISTA TB	0.554	0.00269
Tümör Derecesi	VISTA TY	0.370	0.05716
Tümör Derecesi	VISTA YB	-0.157	0.43416
Tümör Derecesi	VISTA YY	-0.042	0.83312
Tümör Derecesi	VISTA T Skor	0.477	0.01169
Tümör Derecesi	VISTA Y Skor	-0.093	0.64368
VISTA TB	VISTA TY	0.455	0.01685

VISTA TB	VISTA YB	0.351	0.07205
----------	----------	-------	---------

Tablo 3.5. Moleküler tipler ile VISTA boyanma skorları ve tümör derecesi, ER, PR, HER2 durumu (devamı)

VISTA TB	VISTA YY	0.229	0.24900
VISTA TB	VISTA T Skor	0.654	0.00021
VISTA TB	VISTA Y Skor	0.241	0.22582
VISTA TY	VISTA YB	0.022	0.91137
VISTA TY	VISTA YY	0.069	0.73063
VISTA TY	VISTA T Skor	0.874	0.00000
VISTA TY	VISTA Y Skor	0.096	0.63273
VISTA YB	VISTA YY	0.744	0.00000
VISTA YB	VISTA T Skor	0.153	0.44393
VISTA YB	VISTA Y Skor	0.824	0.00000
VISTA YY	VISTA T Skor	0.070	0.72528
VISTA YY	VISTA Y Skor	0.950	0.00000
VISTA T Skor	VISTA Y Skor	0.123	0.53916

Pearson korelasyon analiz sonuçlarına göre, tümör derecesinin VISTA tümör boyanma yoğunluğu (TB) ile orta dereceli ($r=0.554$) ve anlamlı ($P<0.01$) bir korelasyon gösterdiği, VISTA T skoru ile ise düşük dereceli ($r=0.477$) ve anlamlı ($P<0.05$) bir korelasyon gösterdiği tespit edildi. Ayrıca VISTA TB ile VISTA tümör yüzdesi (TY) arasında da anlamlı ($P<0.05$) düşük dereceli bir korelasyon ($r=0.455$) belirlendi. Yine VISTA yangı hücresi boyanma yoğunluğu (YB) ile VISTA yangı hücresi boyanma yüzdesi (YY) arasında yüksek dereceli ($r=0.744$) bir korelasyon görüldü. Beklendiği gibi boyanma yoğunlukları ve boyanma yüzdeleri ile nihai skorlar arasında da pozitif orta ve yüksek dereceli korelasyonlara rastlandı.

3.3.3. Gruplar Arası Karşılaştırma Analizleri

3.3.3.1. Tümör Dereceleri ve VISTA Skorları Arasında

Tümör derecesine göre olgular üç gruba ayrılıp gruplar arası karşılaştırma yapıldığında, korelasyon analizlerine benzer şekilde VISTA TB'nin düşük ve yüksek tümör dereceleri arasında ($P<0.01$) ve yine orta ve yüksek tümör dereceleri arasında ($P<0.05$) anlamlı farklılık gösterdiği belirlendi. Yine VISTA T skorunun da düşük ve

yüksek dereceli tümör grupları arasında anlamlı farklılık gösterdiği tespit edildi ($P < 0.05$).

Tablo 3.6. Tümör derecelerine göre VISTA boyanmalarının istatistiksel tablosu.

Tümör Derecesi	VISTA TB	VISTA TY	VISTA YB	VISTA YY	VISTA T Skor	VISTA Y Skor
Düşük	1.42 ± 0.15 ^a	1.33 ± 0.22	3.00 ± 0.33	2.25 ± 0.33	1.17 ± 0.11 ^a	2.00 ± 0.25
Orta	1.63 ± 0.26 ^{ab}	1.63 ± 0.42	2.88 ± 0.35	2.88 ± 0.48	1.25 ± 0.16 ^{ab}	2.38 ± 0.32
Yüksek	2.71 ± 0.42 ^c	2.29 ± 0.42	2.57 ± 0.48	2.00 ± 0.49	1.86 ± 0.26 ^b	1.71 ± 0.36

3.3.3.2. Moleküler Alt Tipler ile Tümör Derecesi ve VISTA Skorları Arasındaki İlişki

Tümörlere ait moleküler alt tipler ile tümör derecesi ve VISTA skorlarını incelemek için yalnızca yeterli örneklem büyüklüğüne sahip olan alt tipler (Luminal A ve Üçlü negatif) karşılaştırmaya dahil edildi. Bu amaçla yapılan ANOVA (varyans analizi) testi sonuçlarına göre moleküler alt tipler ile VISTA skorları ve tümör derecesi arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P > 0.05$).

4. TARTIŞMA

Malign meme tümörleri dünya çapında kadınlarda görülen en yaygın kanser türüdür ve kanser nedenli ölümlerin en başında gelir (ghoncheh ve ark. 2016). Veteriner hekimlikte de meme tümörleri köpek ve kediler için başlıca neoplazi olarak kabul edilir. Köpek ve kedi meme tümörlerinin insan meme tümörlerine hem moleküler hem de hücrel olarak benzerlik göstermesi ise bu hayvanlardaki meme neoplazilerinin insanlar için model oluşturabileceği yapılan birçok araştırmada belirtilmektedir (Owen 1979; De Maria ve ark., 2005; Queiroga 2011; Madej ve ark., 2013; Wiese ve ark., 2013). Bu tezde kullanılan vakalara yapılan histopatolojik ve immunohistokimyasal değerlendirmeler ışığında köpek meme tümörlerinin gerçekten de moleküler ve hücrel olarak diğer türler ve özellikle insandaki meme tümörlerine benzerlik gösterdiği kaydedildi.

Köpek meme tümörlerinin etiolojisinde hormonlar, yaş, ovariohisterektomi yaşı, gebelik sayısı, genetik gibi faktörler önemli rol oynar ve yapılan araştırmalarda ve literatür bilgilerinde >8 yaşlı köpeklerde daha sık görüldüğü bildirilir (Egenvall ve ark., 2005; Vascellari ve ark., 2016). Tez çalışmasına dahil edilen köpeklerin yaş aralığının 4-14 aralığında olduğunu ve 27 vakada 6 köpeğin 8 yaşından küçük olduğu gözlemlendi. Vakaların %22,2'sinin literatürde belirtilen yaş aralığından küçük olması bu bilgileri doğrular niteliktedir.

Köpek meme karsinomunda sağ kalım ile tümör derecelendirmesi arasında pozitif korelasyon vardır. Üçüncü derece meme karsinomlu köpeklerin sağ kalımları 2. ve 1. derece meme karsinomlu köpeklere göre daha kısa olduğu bildirilmektedir (Karayannopoulou ve ark., 2005). Yapılan bir çalışmada 32 köpek meme karsinomunda %37,5'i (n = 12) derece I, %46,9'u (n = 15) derece II ve %15,6'sı (n = 5) yüksek mitotik indeksli derece III olduğu gözlemlenmiştir (Tavasoly ve ark., 2013). Bu tez çalışmasında malign köpek meme tümörlerin derecelendirmesi 12 (%44,4) adet tümörde derece 1, 8 (%29,6) adet tümörde derece 2 ve 7 (%25,9) adet tümörde derece 3 olarak bulundu. Bu nedenle derece 3 olarak değerlendirilen karsinomlu köpeklerin sağ kalımlarının 1. ve 2. derece karsinomlu köpeklere göre daha kısa olacağı düşünüldü.

Kadınlarda olduğu gibi dişi köpeklerde de seks steroidleri fizyolojik olarak meme dokusu büyümesini uyarır. Epitel üzerine olan proliferatif etkileri neoplastik proliferasyona neden olabilir (Genuth, 1998; Sorenmo ve ark., 2000; Queiroga ve ark., 2005; Thomas, 1984). Yani köpeklerde oluşan meme neoplazileri insanlarda olduğu gibi hormonal olarak kontrol edilmektedir ve hormon bağımlılığı açısından bu iki tür arasında benzerlik bulunmaktadır (Thuroczy ve ark., 2007). Dişi köpeklerde seks steroidlerinin etkisi meme dokusunda eksprese edilen ilgili hormonun reseptörleri sayesinde oluşmaktadır. Progesteron ve östrojen reseptörleri (sırasıyla PR ve ER) hem normal hem de neoplastik dokularda mevcuttur (MacEwen ve ark., 1982; Rutteman ve ark., 1988; Geraldles ve ark., 2000; Nieto ve ark., 2000; de Las Mulas ve ark., 2005; Yang ve ark., 2006). Ancak benign tümörlerde ER varlığı malign olanlara göre anlamlı derecede yüksektir (MacEwen ve ark., 1982; Rutteman ve ark., 1988; Donnay ve ark., 1995; Geraldles ve ark., 2000; de Las Mulas ve ark., 2005; Illera ve ark., 2006; Chang ve ark., 2009). Benzer şekilde, PR ekspresyonunun, hiperplastik/displastikten, benign tümörlerden malign olanlara doğru giderek azaldığı görülmektedir (Geraldles ve ark., 2000; Millanta ve ark., 2005; Chang ve ark., 2009). Hormonal reseptörlerin haricinde HER-2 de önemli bir tümör belirteci olarak kabul edilir ve köpek meme tümörlerinin %30-35'inde eksprese edilir (Kaszak ve ark., 2018; Gray ve ark., 2020). Bu literatür bilgilerine dayanarak tez çalışmasında kullanılan tümörlerdeki ER, PR ve HER2 ekspresyonları değerlendirildi; 27 vakanın 14 tanesinin ER pozitif, 6 tanesinin PR pozitif, 4 tanesinin ise HER2 pozitif immunreaksiyon verdiği görüldü. Üç immunreaksiyonu da negatif olan 9 vaka vardı. Sonuçlar değerlendirildiğinde yukarıda verilen literatür bilgisinden farklı bir şekilde bu reseptörleri bulundurmayan tümörlerin de var olabileceği ve bununla birlikte tezde kullanılan örneklem boyutunun sayısal olarak çok büyük olmaması da dikkate alınarak HER2 ekspresyonu bulunan vaka sayısının %14,8 olması literatür bilgileriyle çelişmektedir. Bunun yanı sıra; moleküler klasifikasyon düşünüldüğünde tez çalışmasında elde edilen ekspresyonların şaşırtıcı olmadığı, moleküler klasifikasyonda tiplere göre bazı reseptörlerin tümörlerde olmayabileceği de yazarlar tarafından bilinmektedir.

Önceden de belirtildiği gibi histolojik ve morfolojik sınıflandırmanın yanında, doğru teşhis, prognoz ve tedavi protokolü oluşturulması için immunohistokimyasal

olarak ortaya konan moleküler klasifikasyonun da yapılması gereklidir (Kwon ve ark., 2023). Bunun için ER, PR, HER2 ekspresyonlarının bakılması gerekmektedir (Wolff ve ark., 2018). Ayrıca bazı kaynaklarda luminal A ve B ayrımı için Ki-67, BLBC ve TNBC ayrımı için ise temel sitokeratin ekspresyonlarının bakılması gerektiği bildirilmiştir (Zong ve ark., 2020). Ancak tez çalışması sırasında yapılan literatür taramalarında zaman zaman Ki-67 ekspresyonunun değerlendirilmesinde, zaman zaman ise HER-2 immunreaksiyonlarının değerlendirilmesinde kaynaklar arasında farklılıklar olduğu görüldü (Zheng ve ark., 2022; Zong ve ark., 2020). Tez çalışmasında Amerikan Klinik Onkoloji Derneği ve Amerikan Patologlar Koleji (ASCO/CAP) uzmanları tarafından revize edilen moleküler değerlendirme sistematigi göz önünde bulundurularak sınıflandırma yapılmıştır. Sonuç olarak %51,85 ile luminal A tiplendirmesi en çok görülürken üçlü-negatif vakalar ise %33,33 bulunarak en çok gözlenen ikinci tiplendirme oldu. Bu iki tiplendirmeyi takiben Luminal B ve HER2 pozitif vakaları %7,4 ile en az görülen tiplendirmeler oldu.

VISTA, T hücre aktivasyonunu baskılayan bir immün kontrol noktası molekülüdür. Le Mercier ve arkadaşlarının 2014'te yaptığı bir çalışmada VISTA ekspresyonunun tümör infiltrate edici nötrofillere özgü olduğunu, tümör hücrelerinde ise VISTA ekspresyonunun bulunmadığını ifade etmişlerdir. Yapılan bir çalışmada tümör hücrelerinde VISTA ekspresyonunun MMP yolağını tetiklediği bulunmuştur. MMP yolağı tümör büyümesi ve tümörün metastazına katkı sağlar. Tez çalışmasında tümör hücrelerinde VISTA TB ve TY skorlarının sırasıyla 1,81 ve 1,67 olduğu, bu sonuç da VISTA'nın meme tümörü hücrelerinde düşük orta seviyede eksprese edildiğini gösterdi. Bu bulgular ışığında tezde kullanılan meme tümörü vakalarında VISTA nedeniyle gelişen bir tümör büyümesi ve/veya tümör metastazı gerçekleşme olasılığının zayıf olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca VISTA ekspresyonunun düşük orta seviye bile olsa tümör hücrelerinde bulunması, Le Mercier ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla uyumsuzdur.

VISTA sitotoksik T hücrelerinde bulunduğu gibi antijen sunan hücreler veya tümör hücrelerinde de bulunmaktadır (Li Wang ve ark., 2011). Yapılan tez çalışmasında tümör derecelerine göre sınıflandırılmış meme kanseri dokularının VISTA boyanma dereceleri değerlendirildiğinde; tümör derecesiyle VISTA

ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu görüldü. Bu da tümörün malignitesi veya agresifliği arttıkça VISTA ekspresyonunun arttığı sonucunu düşündürmüştür. Bununla birlikte VISTA ekspresyonu ile tümör prognozu arasında negatif bir korelasyon olduğu söylenebilir.

Çalışmadaki tümör hücreleri ve tümör mikroçevresinin VISTA immunreaksiyonları değerlendirildiğinde; tümör derecesine göre tümör mikroçevresinin VISTA reaksiyonlarında anlamlı bir fark olmamasına karşın, tümör derecesine göre tümör hücrelerinde VISTA ekspresyonlarında anlamlı bir fark olduğu, bunun sonucunda tümörün malignitesi değişse de mikroçevredeki VISTA ekspresyonunun değişmediği anlamı çıkarılabilir.

Yapılan tez çalışmasında moleküler alt tiplendirmeye göre sınıflandırılan vakaların 14 tanesinin Luminal A, 9 tanesinin TNBC ve ikişer tanesinin ise Luminal B ve HER2 pozitif olduğu tespit edildi. Moleküler alt tiplendirmeye alakalı istatistiksel değerlendirme yapılırken örneklem boyutunun Luminal B ve HER2 pozitif vakalar açısından yeterli büyüklükte olmaması nedeniyle bu alt tipler değerlendirme dışı bırakıldı. Ancak tüm moleküler alt tiplerin VISTA boyanması kontrol edildiğinde; çalışma VISTA immun kontrol noktası boyanma yoğunluğu ve yüzdesinin meme kanseri türlerinde farklı dağılımlar gösterdiğini ve moleküler tiplere göre değişiklikler olduğunu ortaya koymaktadır. Luminal A ve TNBC grupları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, VISTA immunreaksiyonları açısından anlamlı bir fark bulunmadığı dikkati çekti.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada 27 adet köpek meme tümörü vakası, histopatolojik olarak derecelendirildi ve moleküler olarak alt tiplere ayrıldı. Bu vakaların maligniteleri ve moleküler alt tipleri ile VISTA immun kontrol noktası arasındaki ilişki değerlendirildi. Sonuç olarak tümörün agresifliği ile VISTA arasında pozitif bir korelasyon olduğu, moleküler alt tiplerin VISTA immun kontrol noktası miktarına herhangi bir etkide bulunmadığı sonucuna varıldı. Ancak çalışmada kullanılan vakaların moleküler alt tip çeşitlerinin tamamını karşılamadığı, Luminal B ve HER2 pozitif alt tiplerinde vaka sayısının azlığı nedeniyle, moleküler alt tiplerine göre VISTA korelasyonunun gösterilmesi için fazla sayıda vakaya ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışma sonuçlarına göre köpek meme tümörlerinde VISTA varlığı hem tümör hem de yangı hücrelerinde gösterilmiştir. Böylece ileriye yönelik VISTA inhibisyonuna dayalı tedavi stratejilerinin önünü açma potansiyeline sahiptir.

KAYNAKLAR

Abadie J, Nguyen F, Loussouarn D, Peña L, Gama A, Rieder N, Belousov A, Bemelmans I, Jaillardon L, Ibisch C, Campone M (2018). Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Res. Treat.*, **167**, 459–468.

Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Balmey RW, Robertson JFR, Nicholson RI, Ellis IO (2004). Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J. Pathol.*, **203**, 661–671.

Abel E V., Basile KJ, Kugel CH, Witkiewicz AK, Le K, Amaravadi RK, Karakousis GC, Xu X, Xu W, Schuchter LM, Lee JB, Ertel A, Fortina P, Aplin AE (2013). Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J. Clin. Invest.*, **123**, 2155–2168.

Agrawal B (2019). New therapeutic targets for cancer: the interplay between immune and metabolic checkpoints and gut microbiota. *Clin. Transl. Med.*, **8**, 23.

Aloia L, Parisi S, Fusco L, Pastore L, Russo T (2010). Differentiation of embryonic stem cells 1 (Dies1) is a component of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) signaling pathway required for proper differentiation of mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.*, **285**, 7776–7783.

Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Cell Press Immunity* **44**, 989–1004.

Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, Schuster SJ, Millenson MM, Cattry D, Freeman GJ, Rodig SJ, Chapuy B, Ligon AH, Zhu L, Grosso JF, Kim SY, Timmerman JM, Shipp MA, Armand P (2015). PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, **372**, 311–319.

Asaduzzaman M, Mihaescu A, Wang Y, Sato T, Thorlacius H (2009). P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 mediate rolling of activated CD8⁺ T cells in inflamed colonic venules. *J. Invest. Med.*, **57**, 765–768.

Asproni P, Millanta F, Ressel L, Podestà F, Parisi F, Vannozzi I, Poli A (2021). An Immunohistochemical Study of the PTEN/AKT Pathway Involvement in Canine and Feline Mammary Tumors. *Animals (Basel) Animals* : **11**, 1–15.

Baş Aksu Ö, Şengül Ş (2020). Immune Checkpoints and Inhibitors. *J. Ankara Univ. Fac. Med.*, **72**, 262–267.

Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH (2016). Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu. Rev. Immunol.*, **34**, 539–573.

Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee J-L, Fong L, Vogelzang NJ,

Benavente MA, Bianchi CP, Aba MA (2016). Canine mammary tumors: risk factors, prognosis and treatments. *J. Vet. Adv.*, **6**, 1291–1300.

Blando J, Sharma A, Higa MG, Zhao H, Vence L, Yadav SS, Kim J, Sepulveda AM, Sharp M, Maitra A, Wargo J, Tetzlaff M, Broaddus R, Katz MHG, Varadhachary GR, Overman M, Wang H, Yee C, Bernatchez C, Iacobuzio-Donahue C, Basu S, Allison JP, Sharma P (2019). Comparison of immune infiltrates in melanoma and pancreatic cancer highlights VISTA as a potential target in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **116**, 1692–1697.

Böcker W, Moll R, Poremba C, Holland R, Van Diest PJ, Dervan P, Bürger H, Wai D, Diallo RI, Brandt B, Herbst H, Schmidt A, Lerch MM, Buchwallow IB (2002). Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab. Invest.*, **82**, 737–745.

Borge KS, Børresen-Dale AL, Lingaas F (2011). Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Vet. Comp. Oncol.*, **9**, 241–250.

Borghesi J, Giancoli Kato Cano da Silva M, de Oliveira Pimenta Guimarães K, Mario LC, de Almeida da Anunciação AR, Silveira Rabelo AC, Gonçalves Hayashi R, Lima MF, Miglino MA, Oliveira Favaron P, Oliveira Carreira AC (2021). Evaluation of immunohistopathological profile of tubular and solid canine mammary carcinomas. *Res. Vet. Sci.*, **136**, 119–126.

Brønden LB, Rutteman GR, Flagstad A, Teske E (2003). Study of dog and cat owners' perceptions of medical treatment for cancer. *Vet. Rec.*, **152**, 77–80.

Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature*, **328**, 267–270.

Carlow DA, Gossens K, Naus S, Veerman KM, Seo W, Ziltener HJ (2009). PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis. *Immunol. Rev.*, **230**, 75–96.

Carosella ED, Ploussard G, LeMaout J, Desgrandchamps F (2015). A Systematic Review of Immunotherapy in Urologic Cancer: Evolving Roles for Targeting of CTLA-4, PD-1/PD-L1, and HLA-G. *Eur. Urol.*, **68**, 267–279.

Carvalho MI, Guimarães MJ, Pires I, Prada J, Silva-Carvalho R, Lopes C, Queiroga FL (2013). EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Res. Vet. Sci.*, **95**, 1094–1099.

Ceeraz S, Eszterhas SK, Sergeant PA, Armstrong DA, Ashare A, Broughton T, Wang L, Pechenick D, Burns CM, Noelle RJ, Vincenti MP, Fava RA (2017). VISTA deficiency attenuates antibody-induced arthritis and alters macrophage gene expression in response to simulated immune complexes. *Arthritis Res. Ther.*, **19**, 270.

Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ (2013). B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol.*, **34**, 556–563.

Climent MA, Petrylak DP, Choueiri TK, Necchi A, Gerritsen W, Gurney H, Quinn DI, Culine S, Sternberg CN, Mai Y, Poehlein CH, Perini RF, Bajorin DF (2017). Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **376**, 1015–1026.

Dariavach P, Mattéi M -G, Golstein P, Lefranc M -P (1988). Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 1901–1905.

Deng CX, Scott F (2000). Role of the tumor suppressor gene Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation. *Oncogene*, **19**, 1059–1064.

Deng J, Le Mercier I, Kuta A, Noelle RJ (2016). A New VISTA on combination therapy for negative checkpoint regulator blockade. *J. Immunother. Cancer*, **4**.

Derré L, Rivals JP, Jandus C, Pastor S, Rimoldi D, Romero P, Michielin O, Olive D, Speiser DE (2010). BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8⁺ T cells that can be partially reversed by vaccination. *J. Clin. Invest.*, **120**, 157–167.

DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A (2011). Breast cancer statistics, 2011. *CA. Cancer J. Clin.*, **61**, 408–418.

Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Cells E, Chen L (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.*, **8**, 793–800.

Egenvall A, Bonnett BN, Öhagen P, Olson P, Hedhammar Å, Von Euler H (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev. Vet. Med.*, **69**, 109–127.

EITanbouly MA, Croteau W, Noelle RJ, Lines JL (2019). VISTA: a novel immunotherapy target for normalizing innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.*, **42**.

EITanbouly MA, Schaafsma E, Noelle RJ, Lines JL (2020). VISTA: Coming of age as a multi-lineage immune checkpoint. *Clin. Exp. Immunol.*, **200**, 120–130.

EITanbouly MA, Zhao Y, Nowak E, Li J, Schaafsma E, Le Mercier I, Ceeraz S, Lines JL, Peng C, Carriere C, Huang X, Day M, Koehn B, Lee SW, Morales MS, Hogquist KA, Jameson SC, Mueller D, Rothstein J, Blazar BR, Cheng C, Noelle RJ (2020). VISTA is a checkpoint regulator for naïve T cell quiescence and peripheral tolerance. *Science*, **367**.

Emens LA, Ascierto PA, Darcy PK, Demaria S, Eggermont AMM, Redmond WL, Seliger B, Marincola FM (2017). Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape. *Eur. J. Cancer*, **81**, 116–129.

Erbakan N, Ali D, Uncu T (2021). Fen bilimleri enstitüsü pankreas kanserinde toll - like reseptör 4 (tlr4) yolağının immün check-point vısta üzerindeki etkilerinin araştırılması yüksek lisans tezi moleküler biyoloji ve genetik anabilim dalı konya her hakkı saklıdır özet yüksek lisans.

Fhaikrue I, Srisawat W, Nambooppha B, Pringproa K, Thongtharb A, Prachasilchai W, Sthitmatee N (2020). Identification of potential canine mammary tumour cell biomarkers using proteomic approach: Differences in protein profiles among tumour and normal mammary epithelial cells by two-dimensional electrophoresis-based mass spectrometry. *Vet. Comp. Oncol.*, **18**, 787–795.

Flies DB, Han X, Higuchi T, Zheng L, Sun J, Ye JJ, Chen L (2014). Coinhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4⁺ T cell-mediated immunity. *J. Clin. Invest.*, **124**, 1966–1975.

Flies DB, Wang S, Xu H, Chen L (2011). Cutting edge: A monoclonal antibody specific for the programmed death-1 homolog prevents graft-versus-host disease in mouse models. *J. Immunol.*, **187**, 1537–1541.

Foy SP, Mandl SJ, dela Cruz T, Cote JJ, Gordon EJ, Trent E, Delcayre A, Breitmeyer J, Franzusoff A, Rountree RB (2016). Poxvirus-based active immunotherapy synergizes with CTLA-4 blockade to increase survival in a murine tumor model by improving the magnitude and quality of cytotoxic T cells. *Cancer Immunol. Immunother. : CIL.*, **65**, 537–549.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.*, **192**, 1027–1034.

Fujihara S, Mori H, Kobara H, Rafiq K, Niki T, Hirashima M, Masaki T (2013). Galectin-9 in cancer therapy. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.*, **7**, 130–137.

Gabrilovich DI (2017). Myeloid-derived suppressor cells. *American Association for Cancer Immunol. Res.*, **5**, 3–8.

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.*, **12**, 253–268.

Gama A, Alves A, Schmitt F (2008). Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch.*, **453**, 123–132.

Gama A, Alves A, Schmitt F (2010). Expression and prognostic significance of CK19 in canine malignant mammary tumours. *Vet. J.*, **184**, 45–51.

Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L, Carcereny E, Ahn M-J, Felip E, Lee J-S,

Hellmann MD, Hamid O, Goldman JW, Soria J-C, Dolled-Filhart M, Rutledge RZ, Zhang J, Luceford JK, Rangwala R, Lubiniecki GM, Roach C, Emancipator K, Gandhi L (2015). Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.*, **372**, 2018–2028.

Garris CS, Arlauckas SP, Kohler RH, Trefny MP, Garren S, Piot C, Engblom C, Pfirschke C, Siwicki M, Gungabeesoon J, Freeman GJ, Warren SE, Ong SF, Browning E, Twitty CG, Pierce RH, Le MH, Algazi AP, Daud AI, Pai SI, Zippelius A, Weissleder R, Pittet MJ (2018). Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- γ and IL-12. *Immunity*, **49**, 1148-1161.

Gavrieli M, Watanabe N, Loftin SK, Murphy TL, Murphy KM (2003). Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 1236–1243.

Gelao L, Criscitiello C, Esposito A, Goldhirsch A, Curigliano G (2014). Immune checkpoint blockade in cancer treatment: a double-edged sword cross-targeting the host as an ‘innocent bystander’. *Toxins (Basel)* **6**, 914–933.

Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.*, **17**, 542–551.

Goldschmidt MH, Peña L, Rasotto R, Zappulli V (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*, **48**, 117–131.

Goldschmidt MH, Peña L, Zappulli V (2016). Tumors of the Mammary Gland. *Wiley Tumors in Domestic Animals* 723–765.

Goodall KJ, Poon IKH, Phipps S, Hulett MD (2014). Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PloS one* **9**.

Gray M, Meehan J, Martínez-Pérez C, Kay C, Turnbull AK, Morrison LR, Pang LY, Argyle D (2020). Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. *Front. Oncol.*, **10**.

Guimarães MJ, Carvalho MI, Pires I, Prada J, Gil AG, Lopes C, Queiroga FL (2014). Concurrent expression of cyclo-oxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in canine malignant mammary tumours. *J. Comp. Pathol.*, **150**, 27–34.

Hampe J, Organization WM-B of the WH (1974). Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull. World Health Organ*, **50**, 33-111.

Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S (2009). Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.*, **183**, 937–944.

Harada H, Suzu S, Hayashi Y, Okada S (2005). BT-IgSF, a novel immunoglobulin

superfamily protein, functions as a cell adhesion molecule. *J. Cell. Physiol.*, **204**, 919–926.

Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ (2018). Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. Elsevier B.V. *Int. Immunopharmacol.*, **62**, 29–39.

Haymaker C, Wu R, Bernatchez C, Radvanyi L (2012). PD-1 and BTLA and CD8(+) T-cell ‘exhaustion’ in cancer: ‘Exercising’ an alternative viewpoint. *Oncoimmunology*, **1**, 735–738.

Hennigs A, Riedel F, Gondos A, Sinn P, Schirmacher P, Marmé F, Jäger D, Kauczor HU, Stieber A, Lindel K, Debus J, Golatta M, Schütz F, Sohn C, Heil J, Schneeweiss A (2016). Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study. *BMC cancer*, **16**.

van Hooren L, Sandin LC, Moskalev I, Ellmark P, Dimberg A, Black P, Tötterman TH, Mangsbo SM (2017). Local checkpoint inhibition of CTLA-4 as a monotherapy or in combination with anti-PD1 prevents the growth of murine bladder cancer. *Eur. J. Immunol.*, **47**, 385–393.

Huang CC, Lu YF, Wen SN, Hsieh WC, Lin YC, Liu MR, Chiang E, Chang CN, Lin RH (2005). A novel apoptosis-inducing anti-PSGL-1 antibody for T cell-mediated diseases. *Eur. J. Immunol.*, **35**, 2239–2249.

Huang X, Zhang X, Li E, Zhang G, Wang X, Tang T, Bai X, Liang T (2020). VISTA: an immune regulatory protein checking tumor and immune cells in cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.*, **13**.

Huard B, Prigent P, Tournier M, Bruniquel D, Triebel F (1995). CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 2718–2721.

Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, Sasmal DK, Huang J, Kim JM, Mellman I, Vale RD (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science.*, **355**, 1428–1433.

Im E, Sim DY, Lee HJ, Park JE, Park WY, Ko SG, Kim B, Shim BS, Kim SH (2022). Immune functions as a ligand or a receptor, cancer prognosis potential, clinical implication of VISTA in cancer immunotherapy. *Semin. Cancer Biol.*, **86**, 1066–1075.

Inwald EC, Koller M, Klinkhammer-Schalke M, Zeman F, Hofstädter F, Gerstenhauer M, Brockhoff G, Ortmann O (2015). 4-IHC classification of breast cancer subtypes in a large cohort of a clinical cancer registry: use in clinical routine for therapeutic decisions and its effect on survival. *Breast Cancer Res. Treat.*, **153**, 647–658.

Jang S, Oh D, Lee Y, Hossy E, Shin H, Van Riesen C, Whitcomb D, Warburton JM, Jo J, Kim D, Kim SG, Um SM, Kwon SK, Kim MH, Roh JD, Woo J, Jun H,

Lee D, Mah W, Kim H, Kaang BK, Cho K, Rhee JS, Choquet D, Kim E (2016). Synaptic adhesion molecule IgSF11 regulates synaptic transmission and plasticity. *Nat. Neurosci.*, **19**, 84–93.

Jia J, Abudu YP, Claude-Taupin A, Gu Y, Kumar S, Choi SW, Peters R, Mudd MH, Allers L, Salemi M, Phinney B, Johansen T, Deretic V (2019). Galectins control MTOR and AMPK in response to lysosomal damage to induce autophagy. *Autophagy*, **15**, 169–171.

Jiang X, Leu J, Singh I, Snyder L, Research WW-C (2016). Development of a mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic model to characterize tumor killing effect of an anti-VISTA monoclonal antibody in tumor.

Johnston RJ, Su LJ, Pinckney J, Critton D, Boyer E, Krishnakumar A, Corbett M, Rankin AL, Dibella R, Campbell L, Martin GH, Lemar H, Cayton T, Huang RYC, Deng X, Nayeem A, Chen H, Ergel B, Rizzo JM, Yamniuk AP, Dutta S, Ngo J, Shorts AO, Ramakrishnan R, Kozhich A, Holloway J, Fang H, Wang YK, Yang Z, Thiam K, Rakestraw G, Rajpal A, Sheppard P, Quigley M, Bahjat KS, Korman AJ (2019). VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1. *Nature*, **574**, 565–570.

KAMARLIS, R. K., LUBIS, M. N. D., HERNOWO, B. S., KAR, A. S., & GANI, B. A. (2018). Frequency and distribution of cytoplasmic and Nuclear P63 in recognizing the Basal-Like and Non-Basal-Like types of breast cancer based on Age. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **11(1)**, 195-199.

Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC (2005). Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J. Comp. Pathol.*, **2005**;133(4):246–252

Karayannopoulou M, Lafioniatis S (2016). Recent advances on canine mammary cancer chemotherapy: a review of studies from 2000 to date.

Kaszak I, Ruszczak A, Kanafa S, Kacprzak K, Król M, Jurka P (2018). Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Vet. Scand.*, **60**.

Keane C, Law SC, Gould C, Birch S, Sabdia MB, de Long LM, Thillaiyampalam G, Abro E, Tobin JW, Tan X, Xu-Monette ZY, Young KH, Gifford G, Gabreilli S, Stevenson WS, Gill A, Talaulikar D, Jain S, Hernandez A, Halliday SJ, Bird R, Cross D, Hertzberg M, Gandhi MK (2020). LAG3: A novel immune checkpoint expressed by multiple lymphocyte subsets in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv.*, **4**, 1367–1377.

KEGG Breast Cancer. <https://www.genome.jp/entry/map05224>. (Erişim Tarihi: 12.04.2024)

Kim JH (2020). PIK3CA mutations matter for cancer in dogs. *Res. Vet. Sci.*, **133**, 39–41.

Kim NH, Lim HY, Im KS, Shin JI, Kim HW, Sur JH (2014). Evaluation of

clinicopathological characteristics and oestrogen receptor gene expression in oestrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *J. Comp. Pathol.*, **151**, 42–50.

Kim TM, Yang IS, Seung BJ, Lee S, Kim D, Ha YJ, Seo M kyoung, Kim KK, Kim HS, Cheong JH, Sur JH, Nam H, Kim S (2020). Cross-species oncogenic signatures of breast cancer in canine mammary tumors. *Nat. Commun.*, **11**.

Kondo Y, Ohno T, Nishii N, Harada K, Yagita H, Azuma M (2016). Differential contribution of three immune checkpoint (VISTA, CTLA-4, PD-1) pathways to antitumor responses against squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, **57**, 54–60.

Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprie GS, Buczkowski KA, Richards WG, Gandhi L, Redig AJ, Rodig SJ, Asahina H, Jones RE, Kulkarni MM, Kuraguchi M, Palakurthi S, Fecci PE, Johnson BE, Janne PA, Engelman JA, Gangadharan SP, Costa DB, Freeman GJ, Bueno R, Hodi FS, Dranoff G, Wong KK, Hammerman PS (2016). Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat. Commun.*, **7**.

Krummel MF, Allison JP (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.*, **182**, 459–465.

Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, Jervis S, van Leeuwen FE, Milne RL, Andrieu N, Goldgar DE, Terry MB, Rookus MA, Easton DF, Antoniou AC, McGuffog L, Evans DG, Barrowdale D, Frost D, Adlard J, Ong KR, Izatt L, Tischkowitz M, Eeles R, Davidson R, Hodgson S, Ellis S, Nogues C, Lasset C, Stoppa-Lyonnet D, Fricker JP, Faivre L, Berthet P, Hooning MJ, van der Kolk LE, Kets CM, Adank MA, John EM, Chung WK, Andrulis IL, Southey M, Daly MB, Buys SS, Osorio A, Engel C, Kast K, Schmutzler RK, Caldes T, Jakubowska A, Simard J, Friedlander ML, McLachlan SA, Machackova E, Foretova L, Tan YY, Singer CF, Olah E, Gerdes AM, Arver B, Olsson H (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, **317**, 2402–2416.

Kumar P, Kumar Amrita Vishwa Vidyapeetham R, SINGH Pawaiya R, Manjunatha Reddy G, Kumar R, Pawaiya R, Ravindran R (2009). Histopathological classification and incidence of canine mammary tumours.

Kumaraguruparan R, Prathiba D, Nagini S (2006). Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res. Vet. Sci.*, **81**, 218–224.

Kwon JY, Moskwa N, Kang W, Fan TM, Lee C (2023). Canine as a Comparative and Translational Model for Human Mammary Tumor. *J. Breast Cancer*, **26**, 1–13.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T,

Sharpe AH, Freeman GJ (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.*, **2**, 261–268.

Leach DR, Krummel MF, Allison JP (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, **271**, 1734–1736.

Li N, Xu W, Yuan Y, Ayithan N, Imai Y, Wu X, Miller H, Olson M, Feng Y, Huang YH, Jo Turk M, Hwang ST, Malarkannan S, Wang L (2017). Immune-checkpoint protein VISTA critically regulates the IL-23/IL-17 inflammatory axis. *Sci. Rep.*, **7**.

Li R, Perez N, Karumuthil-Melethil S, Prabhakar BS, Holterman MJ, Vasu C (2007). Enhanced engagement of CTLA-4 induces antigen-specific CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁻TGF-beta 1⁺ adaptive regulatory T cells. *J. Immunol.*, **179**, 5191–5203.

Li Z, Song W, Rubinstein M, Liu D (2018). Recent updates in cancer immunotherapy: a comprehensive review and perspective of the 2018 China Cancer Immunotherapy Workshop in Beijing. *J. Hematol. Oncol.*, **11**.

Li Z, Yin S, Zhang L, Liu W, Chen B (2017). Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, **8**, 16445–16455.

Linsley PS, Ledbetter JA (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.*, **11**, 191–212.

Lo B, Abdel-Motal UM (2017). Lessons from CTLA-4 deficiency and checkpoint inhibition. *Curr. Opin. Immunol.*, **49**, 14–19.

Magkou C, Nakopoulou L, Zoubouli C, Karali K, Theohari I, Bakarakos P, Giannopoulou I (2008). Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res.*, **10**.

Mahoney KM, Freeman GJ (2020). Acidity changes immunology: a new VISTA pathway. *Nat. Immunol.*, **21**, 13–16.

Mainenti M, Rasotto R, Carnier P, Zappulli V (2014). Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *Vet. J.*, **202**, 62–68.

Manieri NA, Chiang EY, Grogan JL (2017). TIGIT: A key inhibitor of the cancer immunity cycle. *Trends Immunol.*, **38**, 20–28.

Marhelava K, Pilch Z, Bajor M, Graczyk-Jarzynka A, Zagozdzon R (2019). Targeting Negative and Positive Immune Checkpoints with Monoclonal Antibodies in Therapy of Cancer. *Cancers*, **11**.

Markham A, Duggan S (2018). Cemiplimab: First Global Approval. *Drugs*, **78**, 1841–1846.

- Martín De Las Mulas J, Ordás J, Millán Y, Fernández-Soria V, Ramón Y Cajal S (2003).** Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast cancer res. treat.*, **80**, 363–367.
- Matsumoto M, Miyasaka M, Hirata T (2009).** P-selectin glycoprotein ligand-1 negatively regulates T-cell immune responses. *J. immunol.*, **183**, 7204–7211.
- Le Mercier I, Chen W, Lines JL, Day M, Li J, Sergent P, Noelle RJ, Wang L (2014).** VISTA regulates the development of protective antitumor immunity. American Association for Cancer Research Inc. *Cancer Res.*, **74**, 1933–1944.
- Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A (2005).** Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res. Vet. Sci.*, **79**, 225–232.
- Miller TW (2012).** Initiating breast cancer by PIK3CA mutation. *Breast Cancer Res.*, **14**.
- Mohamed O, El Bastawisy A, Allahlobi N, Abdellateif MS, Zekri ARN, Shaarawy S, Korany Z, Mohanad M, Bahnassy AA (2020).** The role of CD68+ macrophage in classical Hodgkin lymphoma patients from Egypt. *Diagn. Pathol.*, **15**.
- Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, De Palma A, Mauri PL, Monegal A, Rescigno M, Savino B, Colombo P, Jonjic N, Pecanic S, Lazzarato L, Fruttero R, Gasco A, Bronte V, Viola A (2011).** Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.*, **208**, 1949–1962.
- Montalban G, Bonache S, Bach V, Gisbert-Beamud A, Tenés A, Moles-Fernández A, López-Fernández A, Carrasco E, Balmaña J, Diez O, Gutiérrez-Enríquez S (2021).** BRCA1 and BRCA2 whole cDNA analysis in unsolved hereditary breast/ovarian cancer patients. *Cancer Genet.* **258–259**, 10–17.
- Mulati K, Hamanishi J, Matsumura N, Chamoto K, Mise N, Abiko K, Baba T, Yamaguchi K, Horikawa N, Murakami R, Taki M, Budiman K, Zeng X, Hosoe Y, Azuma M, Konishi I, Mandai M (2019).** VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function. *Br. J. Cancer*, **120**, 115–127.
- Murphy KM, Nelson CA, Šedý JR (2006).** Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat. Rev. Immunol.*, **6**, 671–681.
- Muscatello L V., Gobbo F, Di Oto E, Sarli G, De Maria R, De Leo A, Tallini G, Brunetti B (2022).** HER2 Overexpression and Cytogenetical Patterns in Canine Mammary Carcinomas. *Vet. Sci.*, **9**.
- Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, Herber DL, Schneck J, Gabrilovich DI (2007).** Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.*, **13**, 828–835.

- Nallasamy P, Chava S, Verma SS, Mishra S, Gorantla S, Coulter DW, Byrareddy SN, Batra SK, Gupta SC, Challagundla KB (2018).** PD-L1, inflammation, non-coding RNAs, and neuroblastoma: Immuno-oncology perspective. *Semin. Cancer Biol.*, **52**, 53–65.
- Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, Sánchez MA, Flores JM, Castaño M (2000).** Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet. Pathol.*, **37**, 239–247.
- Nieto A, Pérez-Alenza MD, Del Castillo N, Tabanera E, Castaño M, Peña L (2003).** BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: Relationship with prognostic variables. *J. Comp. Pathol.*, **128**, 260–268.
- Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, Bronte V, Chouaib S (2014).** PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.*, **211**, 781–790.
- Nosalova N, Huniadi M, Horňáková L, Valenčáková A, Horňák S, Nagoos K, Vozar J, Cizkova D (2024).** Canine Mammary Tumors: Classification, Biomarkers, Traditional and Personalized Therapies. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**.
- Nowak EC, Lines JL, Varn FS, Deng J, Sarde A, Mabaera R, Kuta A, Le Mercier I, Cheng C, Noelle RJ (2017).** Immunoregulatory functions of VISTA. *Immunol. Rev.*, **276**, 66–79.
- Ohno T, Kondo Y, Zhang C, Kang S, Azuma M (2017).** Immune Checkpoint Molecule, VISTA Regulates T-Cell-Mediated Skin Inflammatory Responses. *J. Invest. Dermatol.*, **137**, 1384–1386.
- Ott PA, Hodi FS, Robert C (2013).** CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clin. Cancer Res.*, **19**, 5300–5309.
- Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, Mcever RP, Moore KL (1996).** P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells.
- Papparella S, Crescio MI, Baldassarre V, Brunetti B, Burrai GP, Cocumelli C, Grieco V, Iussich S, Maniscalco L, Mariotti F, Millanta F, Paciello O, Rasotto R, Romanucci M, Sfacteria A, Zappulli V (2022).** Reproducibility and Feasibility of Classification and National Guidelines for Histological Diagnosis of Canine Mammary Gland Tumours: A Multi-Institutional Ring Study. *Vet. Sci.*, **9**.
- Pardoll DM (2012).** The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 252–264.
- Pastor N, Caballé NC, Santella M, Ezquerro LJ, Tarazona R, Duran E. (2018).** Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. *J. Vet. Sci.*, **50(3)**, 143-147.

Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP (2009). Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J. Exp. Med.*, **206**, 1717–1725.

Peña L, Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, Díez L, Gärtner F, Hellmén E, Kiupel M, Millán Y, Miller MA, Nguyen F, Poli A, Sarli G, Zappulli V, de las Mulas JM (2014). Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet. Pathol.*, **51**, 127–145.

Peña LL, Nieto AI, Pérez-Alenza D, Cuesta P, Castaño M (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 237–246.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Renshaw MW, Doody J, Kim H, Traverso G, Lissner L, Havelka T, Egevad A, Perou CM, Colla S, Westin S, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **406**, 747–752.

Presnell JK, Schreibman MP, Humason GL (1997). Humason's animal tissue techniques. Johns Hopkins University Press. p. 108-15, 305-6.

Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF (2018). Molecular classification of breast cancer. *PET clin.*, **13**, 325–338.

Queiroga F, Raposo T, Carvalho M, Prada J, vivo IP (2011). Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo*, **25(3)**, 65-455.

Queiroga FL, Perez-Alenza MD, González-Gil A, Silván G, Peña L, Illera JC (2017). Quantification of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tumours by ELISA assay: clinical and prognostic implications. *Vet. Comp. Oncol.*, **15**, 383–390.

Queiroga FL, Pérez-Alenza MD, Silvan G, Peña L, Lopes CS, Illera JC (2008). Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumours. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **110**, 76–82.

Rasotto R, Goldschmidt MH, Castagnaro M, Carnier P, Caliarì D, Zappulli V (2014). The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. *J. Comp. Pathol.*, **151**, 166–180.

Ressel L, Millanta F, Caleri E, Innocenti VM, Poli A (2009). Reduced PTEN protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumors. *Vet. Pathol.*, **46**, 860–868.

Rivera P (2010). Biochemical markers and genetic risk factors in canine tumors.

- Rivera PJ, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, Von Euler H (2009).** Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res.*, **69**, 8770–8774.
- Rosenbaum SR, Knecht M, Mollae M, Zhong Z, Erkes DA, McCue PA, Chervoneva I, Berger AC, Lo JA, Fisher DE, Gershenwald JE, Davies MA, Purwin TJ, Aplin AE (2020).** FOXD3 Regulates VISTA Expression in Melanoma. *Cell Rep.*, **30**, 510-524.
- 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*, **10**.
- Schneider R (1970).** Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, **26(2)**, 419-426.
- Schneider R, Dorn CR, Taylor DON (1969).** Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, **43(6)**, 61-1249.
- Schütz F, Stefanovic S, Mayer L, Von Au A, Domschke C, Sohn C (2017).** PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. *Oncol. Res. Treat.*, **40**, 294–297.
- Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, Hurchla MA, Lindsley RC, Hildner K, Scheu S, Pfeffer K, Ware CF, Murphy TL, Murphy KM (2005).** B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.*, **6**, 90–98.
- Shafiee R, Javanbakht J, Atyabi N, Kheradmand P, Kheradmand D, Bahrami A, Daraei H, Khadivar F (2013).** Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell Int.*, **13**.
- Sleekx N, de Rooster H, Veldhuis Kroeze EJB, van Ginneken C, van Brantegem L (2011).** Canine mammary tumours, an overview. *Reprod. Domest. Anim.*, **46**, 1112–1131.
- Sorenmo K (2003).** Canine mammary gland tumors. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **33**, 573–596.
- Sorenmo K, Worley DR, Goldschmidt MH (2013).** Tumors of the mammary gland **27**, 538-556.
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL (2001).** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 10869–10874.
- Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S**

(2010). Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.*, **70**, 68–77.

Sumariwalla PF, Malfait AM, Feldmann M (2004). P-selectin glycoprotein ligand 1 therapy ameliorates established collagen-induced arthritis in DBA/1 mice partly through the suppression of tumour necrosis factor. *Clin. Exp. Immunol.*, **136**, 67–75.

Susan E. Lana, Gerard R. Rutteman, Stephen J. Withrow (2007). Tumors of the Mammary Gland, 619-636

Talmadge JE, Gabrilovich DI (2013). History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat. Rev. Cancer*, **13**, 739–752.

Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, Inoue K (2010). Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin. Med. Insights Oncol.*, **4**, 15–34.

Teft WA, Kirchoff MG, Madrenas J (2006). A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu. Rev. Immunol.*, **24**, 65–97.

Tinoco R, Carrette F, Barraza ML, Otero DC, Magaña J, Bosenberg MW, Swain SL, Bradley LM (2016). PSGL-1 Is an Immune Checkpoint Regulator that Promotes T Cell Exhaustion. *Immunity*, **44**, 1190–1203.

Tinoco R, Otero DC, Takahashi AA, Bradley LM (2017). PSGL-1: A New Player in the Immune Checkpoint Landscape. *Trends Immunol.*, **38**, 323–335.

Tong J, Zhang H, Sun D, Wang Y, Yang C, Liu Y (2016). Over-expression of PTEN on proliferation and apoptosis in canine mammary tumors cells. *Anim. Cells Syst.*, **20**, 325–334.

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM (2015). Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, **27**, 450–461.

Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, Hercend T (1990). LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J. Exp. Med.*, **171**, 1393–1405.

Türkoğlu M, Kahveci K (2019). İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri Ctl-4 ve Pd-1/Pd-11'in İmmünoterapideki Yeri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **10**, 210–218.

Varallo GR, Gelaleti GB, Maschio-Signorini LB, Moschetta MG, Lopes JR, de Nardi AB, Tinucci-Costa M, Rocha RM, de Campos Zuccari DAP (2019). Prognostic phenotypic classification for canine mammary tumors. *Oncol. Lett.*, **18**, 6545–6553.

Vascellari M, Capello K, Carminato A, Zanardello C, Baioni E, Mutinelli F (2016). Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer.

Prev. Vet. Med., **126**, 183–189.

Vazquez E, Lipovka Y, Cervantes-Arias A, Garibay-Escobar A, Haby MM, Queiroga FL, Velazquez C (2023). Canine Mammary Cancer: State of the Art and Future Perspectives. *Animals*, **13**.

Veerman KM, Carlow DA, Shanina I, Priatel JJ, Horwitz MS, Ziltener HJ (2012). PSGL-1 regulates the migration and proliferation of CD8(+) T cells under homeostatic conditions. *J. Immunol.*, **188**, 1638–1646.

Veronesi MC, Battocchio M, Rizzi C, Sironi G (2003). Relationship between dysplastic and neoplastic mammary lesions and pseudopregnancy in the bitch. *Vet. Res. Commun.*, **27**, 245–247.

Walker LSK, Sansom DM (2015). Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol.*, **36**, 63–70.

Wang G, Tai R, Wu Y, Yang S, Wang J, Yu X, Lei L, Shan Z, Li N (2020). The expression and immunoregulation of immune checkpoint molecule VISTA in autoimmune diseases and cancers. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **52**, 1–14.

Wang J, Sanmamed MF, Datar I, Su TT, Ji L, Sun J, Chen L, Chen Y, Zhu G, Yin W, Zheng L, Zhou T, Badri T, Yao S, Zhu S, Boto A, Sznol M, Melero I, Vignali DAA, Schalper K, Chen L (2019). Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3. *Cell*, **176**, 334-347.e12.

Wang J, Wu G, Manick B, Hernandez V, Renelt M, Erickson C, Guan J, Singh R, Rollins S, Solorz A, Bi M, Li J, Grabowski D, Dirx J, Tracy C, Stuart T, Ellinghuysen C, Desmond D, Foster C, Kalabokis V (2019). VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits human T-cell function. *Immunol.*, **156**, 74–85.

Wang L, Le Mercier I, Putra J, Chen W, Liu J, Schenk AD, Nowak EC, Suriawinata AA, Li J, Noelle RJ (2014). Disruption of the immune-checkpoint VISTA gene imparts a proinflammatory phenotype with predisposition to the development of autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **111**, 14846–14851.

Wang L, Rubinstein R, Lines JL, Wasiuk A, Ahonen C, Guo Y, Lu LF, Gondek D, Wang Y, Fava RA, Fiser A, Almo S, Noelle RJ (2011). VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *J. Exp. Med.*, **208**, 577–592.

Wang XB, Fan ZZ, Anton D, Vollenhoven A V., Ni ZH, Chen XF, Lefvert AK (2011). CTLA4 is expressed on mature dendritic cells derived from human monocytes and influences their maturation and antigen presentation. *BMC immunol.*, **12**.

Watanabe T, Suda T, Tsunoda T, Uchida N, Ura K, Kato T, Hasegawa S, Satoh S, Ohgi S, Tahara H, Furukawa Y, Nakamura Y (2005). Identification of immunoglobulin superfamily 11 (IGSF11) as a novel target for cancer immunotherapy of gastrointestinal and hepatocellular carcinomas. *Cancer Sci.*, **96**,

498–506.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctlα-4. *Science*, **270**, 985–988.

Welsh PL, King MC (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 705–713.

Wolchok JD, Saenger Y (2008). The Mechanism of Anti-CTLA-4 Activity and the Negative Regulation of T-Cell Activation. *Oncologist*, **13**, 2–9.

Wolff AC, Elizabeth Hale Hammond M, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JM, Bilous M, Ellis IO, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, McShane LM, Dowsett M, Hopkins Sidney J, Jude S (2018). Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **142**, 1364–1382.

Xu F, Liu J, Liu D, Liu B, Wang M, Hu Z, Du X, Tang L, He F (2014). LSECtin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res.*, **74**, 3418–3428.

Xu W, Dong J, Zheng Y, Zhou J, Yuan Y, Minh H, Miller HE, Olson M, Rajasekaran K, Ernstoff MS, Wang D, Malarkannan S, Wang L (2019). Immune-checkpoint protein vista regulates antitumor immunity by controlling myeloid cell-mediated inflammation and immunosuppression. *Cancer Immunol. Res.*, **7**.

Xu W, Hi u TM, Malarkannan S, Wang L (2018). The structure, expression, and multifaceted role of immune-checkpoint protein VISTA as a critical regulator of anti-tumor immunity, autoimmunity, and inflammation. *Cell. Mol. Immunol.*, **15**, 438–446.

Yasinska IM, Meyer NH, Schlichtner S, Hussain R, Siligardi G, Casely-Hayford M, Fiedler W, Wellbrock J, Desmet C, Calzolari L, Varani L, Berger SM, Raap U, Gibbs BF, Fasler-Kan E, Sumbayev V V (2020). Ligand-Receptor Interactions of Galectin-9 and VISTA Suppress Human T Lymphocyte Cytotoxic Activity. *Front. Immunol.*, **11**.

Yoon KW, Byun S, Kwon E, Hwang SY, Chu K, Hiraki M, Jo SH, Weins A, Hakrrouch S, Cebulla A, Sykes DB, Greka A, Mundel P, Fisher DE, Mandinova A, Lee SW (2015). Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science*, **349**.

Yoshikawa Y, Morimatsu M, Ochiai K, Ishiguro-Oonuma T, Wada S, Orino K, Watanabe K (2015). Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors. *BMC Vet. Res.*, **11**.

Youn J-I, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, Gabrilovich DI, Lee H (2012).

Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Leukoc. Biol.*, **91**, 167–181.

Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI (2008). Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice. *J. Immunol.*, **181**, 5791–5802.

Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, Tom I, Ivelja S, Refino CJ, Clark H, Eaton D, Grogan JL (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.*, **10**, 48–57.

Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, Wang Z, Wu Q, Peng H, Wei H, Sun R, Tian Z (2018). Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat. Immunol.*, **19**, 723–732.

Zong L, Mo S, Yu S, Zhou Y, Zhang M, Chen J, Xiang Y (2020). Expression of the immune checkpoint VISTA in breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, **69**, 1437–1446.