

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ (VETERİNER)
DOKTORA PROGRAMI

KÖPEKLERDE DOĞAL MEME TÜMÖRLERİNDE HER2
İFADESİNİN ve APOPTOTİK MEKANİZMALARIN
ARAŞTIRILMASI

AYŞE NUR AKKOÇ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihat Toplu

Bu tez ÖYP tarafından 13039 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2020

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Köpeklerde Memenin Morfolojisi	4
2.2.1. Köpeklerde Meme Anatomisi.....	4
2.2.2. Köpeklerde Meme Histolojisi.....	5
2.3. Meme Tümörü	6
2.3.1. Köpeklerde ve İnsanlardaki Meme Tümörünün Moleküler ve Klinik Benzerlikleri	6
2.3.2. Köpeklerde Meme Tümörü	7
2.3.3. Meme Tümörü Çalışmalarında Köpek Modeli Kullanılması	7
2.3.4. Meme Tümöründe Prognoz Değerlendirilmesi	8
2.4. Meme Tümörü Yolakları	8
2.4.1. Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK'lar)	10
2.4.2. Notch Sinyali	12
2.4.3. Wnt Sinyali	13
2.5. Meme Tümörü Oluşumunda Genetik Değişiklikler	13
2.6. Meme Tümörlerinde Apoptozis.....	15
2.7. Meme Tümörlerinde HER2	20
2.8. Köpeklerde Meme Tümörlerinin Sınıflandırması	21
2.8.1. Benign Tümörler	23

2.8.1.1. Basit adenom	23
2.8.1.2. Intraduktal papillar adenom.....	23
2.8.1.3. Duktal adenom (Bazaloid adenom)	24
2.8.1.4. Fibroadenom.....	24
2.8.1.5. Miyoepiteliyom	24
2.8.1.6. Kompleks adenom	24
2.8.1.7. Benign miks tümör	24
2.8.2. Malign Epiteliyal Tümörler	24
2.8.2.1. İn situ karsinom	24
2.8.2.2. Basit karsinom	25
2.8.2.3. Mikropapillar invaziv karsinom	25
2.8.2.4. Solid karsinom.....	25
2.8.2.5. Komedokarsinom	25
2.8.2.6. Anaplastik karsinom.....	26
2.8.2.7. Kompleks adenom/mikst tümörde ortaya çıkan karsinom	26
2.8.2.8. Kompleks karsinom.....	26
2.8.2.9. Karsinom ve malignant miyoepiteliyom	26
2.8.2.10. Karsinoma mikst tip.....	26
2.8.2.11. Duktal karsinom	27
2.8.2.12. İntraduktal papillar karsinom.....	27
2.8.3. Özel Tip Karsinomlar	27
2.8.3.1. Yassı hücreli karsinom	27
2.8.3.2. Adenoskuamöz karsinom	27
2.8.3.3. Müsinöz karsinom	27
2.8.3.4. Lipid-zengin karsinom.....	28
2.8.3.5. İğ hücreli karsinom.....	28
2.8.3.6. İnflamatuvar karsinom.....	28
2.8.4. Malign Mezenkimal Tümörler-Sarkomlar	28
2.8.4.1. Osteosarkom	29
2.8.4.2. Kondrosarkom	29

2.8.4.3. Fibrosarkom.....	29
2.8.5. Karsinosarkom-Malign Mikst Meme Tümörü	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Gereç.....	30
3.1.1. Hayvan ve Doku	30
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Histopatolojik İnceleme.....	30
3.2.2. İmmunohistokimyasal İnceleme.....	31
3.2.3. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling Assay (TUNEL)	34
3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme	35
4. BULGULAR	36
4.1. Histopatolojik Bulgular	36
4.2. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling Assay) Bulguları.....	41
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	44
4.3.1. Kaspaz-3 Bulguları.....	44
4.3.2. Kaspaz-8 Bulguları.....	46
4.3.3. Kaspaz-9 Bulguları.....	48
4.3.4. HER2 Bulguları	50
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	96

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABC	: Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks
AgNOR	: Gümüşe duyarlı nükleolar organize edici bölge
AIF	: Apoptozis indükleyici faktör
AKT	: Protein kinaz B
APC	: Adenomatöz polipozis koli
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ATP	: Adenozin trifosfat
B-katenin	: Katenin beta 1
BAD	: Bcl-2 ilişkili hücre ölüm agonisti
Bak	: Bcl-2 homolog antagonisti
Bax	: Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	: B hücre lenfoma 2
Bcl-XL7	: Ekstra büyük B hücre lenfoma
BH3	: Bcl-2 homolog 3
BID	: Bcl-2 homolog 3 etki alanı ölüm agonisti
BRCA1	: Meme kanseri gen 1
BRCA2	: Meme kanseri gen 2
c-FLIP	: FLICE benzeri inhibitör protein
c-SRC	: Hücresel SRC
Ca²⁺	: Kalsiyum +2
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CDKI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
CD95	: Apoptozisi indükleyen yüzey reseptörü
DAB	: 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DD	: Ölüm domaini
DED	: Ölüm efektör domaini
DISC	: Ölüm indükleyici bileşik kompleksi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
D4-GDI	: Glikoz parçalanma ürünleri ayrışma inhibitörü

E-kaderin	: Epitelyal kaderin
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERBB2	: Avian eritroblastik lösemi viral onkogen homologu 2
ESR1	: Östrojen reseptör 1
FADD	: Fas ilişkili ölüm domaini proteini
FAS	: Apoptozis antijen 1 (APO-1)
FasL	: Fas ligand
FGFR	: Fibroblast büyüme faktör reseptörü
GHR	: Büyüme hormon reseptörü
G0	: Sessiz faz
G1	: İlk aralık
G2	: İkinci aralık
HE	: Hematoksilen ve eozin
HER1	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 1
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (c-erbB2)
HRP	: Horseradish peroxidase
H2O2	: Hidrojen peroksit
IAPs	: Apoptozis inhibitör proteinleri
IHC	: İmmunohistokimya
INK4	: CDK4 inhibitörü
Kaspaz	: Sistein aspartil spesifik proteaz
Ki67	: Proliferasyon markır proteini
KRAS	: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LPC	: Lisofosfatidilkolin
M	: Mitoz
MAPK	: Mitojen aktive protein kinaz
MCF-7	: Michigan Socer Foundation-7
Mcl-1	: Miyeloid hücre lösemi-1
MMP	: Matrik metalloproteaz
MOMP	: Mitokondriyal dış membran geçirgenliği
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NF-κB	: Nükleer faktör κB

NOTCH	: Sinyal yolağı
p-kaderin	: Plasental kaderin
PAS	: Periodic acid schiff
PBS	: Tamponlu fosfat solusyonu
PCNA	: Proliferatif hücre nükleer antijeni
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	: Fosfoinositid 3 kinaz
PI3K/AKT	: Fosfoinositid-3-kinaz-protein kinaz B/Akt
PS	: Fosfatidilserin
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
p14ARF	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
p15/INK4B	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 4B
p16/INK4A	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 4A
p21	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A
p53	: Tümör protein 53 (TP53)
p63	: Transformasyon ilişkili protein
RB1	: Retinoblastoma 1
S	: Sentez
SATB1	: Özel AT-zengin sekans bağlayıcı protein 1
SHH	: Sonic hedgehog
Smac	: İkinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü
SSC	: Salın sodyum sitrat
TdT	: Terminal deoxynucleotidyl transferase
TGFBR	: Transforme edici büyüme faktörü beta reseptörü
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TNF α	: Tümör nekrozis faktör alfa
TNFR1	: Tümör nekrozis faktör reseptörü 1
TRADD	: TNF reseptör aracılı ölüm domaini proteini
TRAIL	: TNF ilişkili apoptozis indükleyici ligand
TRAILR1	: Ölüm reseptörü 4
TRAILR2	: Ölüm reseptörü 5
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling Assay

WHO : Dünya Sağlık Örgütü
Wnt : Sinyal yolağı



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Tubuler karsinom; düzensiz tubuler yapılar oluşturan epitel hücre proliferasyonları; olgu no: 1, HE.....	37
Resim 2. Karsinoma mikst tip; malign epitelyal komponent ve benign kıkırdak komponent; olgu no: 16, HE.....	38
Resim 3. Solid karsinom; solid epitel hücre proliferasyonları; olgu no: 35, HE.	39
Resim 4. Komedokarsinom; merkezinde nekrotik sahalar ile karakterize neoplastik hücre toplulukları; olgu no: 36, HE.....	40
Resim 5. Kompleks karsinom; tubulus lümenlerine dökülmüş epitel hücrelerinde TUNEL pozitif reaksiyonlar; olgu no: 10, TUNEL metot.	42
Resim 6. Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma; TUNEL pozitif apoptotik reaksiyonlar; olgu no: 25, TUNEL metot.....	42
Resim 7. Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma; TUNEL pozitif apoptotik reaksiyonlar; olgu no: 25, TUNEL metot.....	43
Resim 8. Duktal karsinom; düzensiz yapılar oluşturan duktus ve tubul epitellerinde TUNEL pozitif reaksiyonlar; olgu no: 29, TUNEL metot.	43
Resim 9. Kompleks karsinom; tubul epitellerinde kaspaz-3 pozitif reaksiyonlar; olgu no: 9, ABC metot.....	45
Resim 10. Adenom; kaspaz-3 pozitif reaksiyon gösteren epitel hücreleri; olgu no: 1, ABC metot.....	45
Resim 11. Tubuler karsinom; epitel hücrelerinin bazale yakın alanlarında ve miyoepitel hücrelerinde kaspaz-8 pozitif reaksiyonlar; olgu no: 1, ABC metot... ..	47
Resim 12. Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma; düzensiz yapılar oluşturan tubul epitellerinde kaspaz-8 pozitif sitoplazmik boyanmalar; olgu no: 24, ABC metot.	48
Resim 13. Kompleks karsinom; tubul epitellerinde orta şiddetli kaspaz-9 pozitif sitoplazmik boyanmalar; olgu no: 14, ABC metot.....	49
Resim 14. Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma; tubul epitellerinde güçlü kaspaz-9 pozitif sitoplazmik boyanmalar; olgu no: 24, ABC metot.... ..	49
Resim 15. Karsinoma mikst tip; Tubuler karsinom; neoplastik tubul epitellerinde HER2 +1 boyanma; olgu no: 18, ABC metot.....	51
Resim 16. Tubuler karsinom; neoplastik tubul epitellerinde HER2 +3 boyanma; olgu no: 1, ABC metot.....	51
Resim 17. Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma; neoplastik tubul epitellerinde HER2 +3 boyanma; olgu no: 24, ABC metot.....	52

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Çalışma olgularını oluşturan hayvanlara ait bilgiler ve gelişmiş olan adenokarsinomların sınıflandırılması	32
Tablo 2. Çalışma olgularını oluşturan hayvanlara ait bilgiler ve gelişmiş olan adenom ve benign değişimlerin sınıflandırılması	33
Tablo 3. Kullanılan markırlar, sulandırma oranları, hücresel lokalizasyonları ve markaları..	34
Tablo 4. Adenokarsinom olgularında kaspaz-3, -8, -9 ve HER2 immunohistokimyasal bulguları ve TUNEL sonuçları.	53
Tablo 5. Adenomlar ve benign değişim gösteren olgularda kaspaz-3, -8, -9 ve HER2 immunohistokimyasal bulguları ve TUNEL sonuçları.....	54
Tablo 6. Benign ve malign olgularda kaspaz-3, -8, -9, HER2 ekspresyonları ile TUNEL pozitif hücre sayısı ve istatistiksel analizi.....	55

ÖZET

KÖPEKLERDE DOĞAL MEME TÜMÖRLERİNDE HER2 İFADESİNİN VE APOPTOTİK MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI

**Akkoç AN. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji
(Veteriner) Programı Doktora Tezi, Aydın, 2020.**

Köpeklerde en sık görülen tümörlerden meme tümörleri, klinik, patolojik, prognostik önemini; bu evcil hayvanların insanlarla aynı çevresel ortamı ve koşulları paylaşması, genetik olarak insan meme tümörlerine yakınlık taşıması ve her geçen gün veteriner hekimlikte karşılaşılma sıklığının artışından almaktadır. Köpek meme tümörlerinin ileride prognoz ve tedavi sürecine yön verecek olan oluşum, gelişim ve tanı üçgenindeki hem hayvan sahipleri hem de klinisyen veteriner hekimlerin karşılaştığı güçlükler tümörün tipi, agresifliği ve tedavisini içermektedir. Buna yönelik olarak hayvanın yaşam kalitesi bakımından doğru yürütülmesi gereken bu süreç kapsamında, 42 adet meme biyopsi materyali histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelenmiş, tümöre özgü lezyonlar tanımlanarak benign ve malign köpek meme tümörlerinin patogenezi, apoptozis ve HER2'nin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, alınan örnekler histokimyasal yöntemler ile incelenerek tümörler histopatolojik olarak tanımlanmış, tümör dokularında apoptotik indeks TUNEL yöntemi ile belirlenmiş, immunohistokimyasal yöntemle kaspaz-3, -8, -9 ve HER2 ekspresyonları semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. Histopatolojik değerlendirmede tümörlerin 36 tanesi adenokarsinom, 6 tanesi ise adenom ve benign değişimler olarak sınıflandırılmıştır. Malign tümörler; tubuler karsinom, kompleks karsinom, karsinoma mikst tip, karsinoma ve malignant miyoepiteliyoma, karsinosarkom, duktal karsinom, intraduktal papiller karsinom, anaplastik karsinom, solid karsinom ve komedokarsinom olarak adlandırılmıştır. İmmunohistokimyasal boyamada, kaspaz-3, -8, -9, HER2 ekspresyonuna ilişkin değişen lokalizasyon ve şiddette pozitif reaksiyonlar belirlenmiştir. İyi huylu meme tümörlerinde TUNEL hafif pozitif ya da negatif reaksiyonlar; kötü huylu tümörlerde ise malign epitel hücre çekirdeklerinde TUNEL pozitif reaksiyonlar saptanmıştır. Çoğunluğu malign karakterde olan meme tümörlerinde belirlenen apoptotik mekanizmalardaki değişkenlikler hem onkogeneze hem de apoptoziste rol alan genetik çeşitlilikle ilişkilendirilmiştir. Köpek meme tümörlerinde patolojik

araştırmaların yanı sıra hücre büyüme, transkripsiyon, mutasyonların ve ekspresyon analizlerinin de yapılmasını içeren süregen çalışmalar yapılmalıdır. İnsan meme tümörlerinde prognoz ve hayatta kalma süresi açısından önemli olan HER2 immunpozitifliğinin çalışma olgularında yaklaşık 5'te 1 oranında görölmesi insan olguları ile karşılaştırılmış ancak sağlıklı hayatta kalım kayıtları ile yapılacak farklı çalışmalar ile bu bilgilerin anlam kazanacağı ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, HER2, histopatoloji, immunohistokimya, köpek meme tümörü.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF HER2 EXPRESSION AND APOPTOTIC MECHANISMS IN NATURALLY OCCURRING MAMMARY TUMORS IN DOGS

**Akkoc AN. Aydin Adnan Menderes University Institute of Medical Sciences Pathology
(Veterinary) Department PhD Thesis, 2020.**

Canine mammary tumors have clinical, pathological, prognostic significance for dogs as these pets share the same conditions as humans, genetically related to human breast cancers, and mammary tumors have increased frequency in veterinary medicine. Difficulties for both animal owners and clinicians in the formation, development and diagnosis that will shape the future prognosis and treatment of canine mammary tumors include the type, aggressiveness and treatment of the tumor. For this purpose, 42 mammary biopsy materials were examined histopathologically and immunohistochemically, and tumor-specific lesions were identified, and it was aimed to investigate the pathogenesis, apoptosis and HER2 of benign and malignant canine mammary tumors. The tumor samples were examined histopathologically, apoptotic index was determined by TUNEL method and caspase-3, -8, -9 and HER2 expressions were evaluated semi-quantitatively by immunohistochemical method. Histopathologically, 36 of the tumors were classified as adenocarcinoma and 6 were classified as adenoma and benign changes. Malignant tumors were classified as tubular carcinoma, complex carcinoma, carcinoma mixed type, carcinoma and malignant myoepithelioma, carcinosarcoma, ductal carcinoma, intraductal papillar carcinoma, anaplastic carcinoma, solid carcinoma and comedocarcinoma. Positive reactions with varying localization and severity related to caspase-3, -8, -9, HER2 expression were determined immunohistochemically. TUNEL reactions were mild positive or negative in benign mammary tumors, whereas positive reactions were detected in malignant epithelial cell nuclei in malignant tumors. Variations in apoptotic mechanisms determined in malign mammary tumors have been associated with genetic diversity that plays a role in both oncogenesis and apoptosis. Studies including cell growth, transcription, mutations and expression analysis should be conducted in addition to pathological research in canine mammary tumors. HER2 immunopositivity, which

is important for prognosis and survival in human breast cancers, was approximately 1 in 5 in study cases and when compared with human cases, it has been revealed that this information will gain meaning with different studies to be conducted with healthy survival records.

Keywords: Apoptosis, canine mammary tumor, HER2, histopathology, immunohistochemistry.



1. GİRİŞ

Kanser gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünya ülkelerinde halk sağlığı açısından önemli bir problemdir. Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yapılan taramalarda kanserin ölüm sebepleri bakımından ikinci sırada olduğu belirlenmiştir. 2016 yılı içinde Birleşik Devletlerde 1,685,210 adet yeni kanser vakası saptanmış ve bunlardan 595,690'ının ölümle sonuçlanacağı tahmin edilmiştir (Siegel ve ark, 2016). Türkiye'de de kanserin önemli bir sağlık problemi olduğu ve insidansının dünya insidansının üzerinde seyrettiği belirlenmiştir. Dünyada görülme sıklığı en yüksek kanser türlerine benzer şekilde ülkemizde de erkeklerde trakea, bronş ve akciğer kanseri, kadınlarda ise meme kanseri en sık görülen kanser türleridir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilen istatistiklere göre Türkiye'de her yıl yaklaşık 97 bin erkek, 62 bin kadın ve toplamda 159 bin kişi kansere yakalanmaktadır (TC Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Türkiye Kanser İstatistikleri, 2016).

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en sık karşılaşılan ve ölümle sonuçlanan kanser türüdür (Al-Dhaheiri ve ark, 2008). Endojen ya da çevresel östrojenler, diyet, yaşam şekli, coğrafya, yaş, menopoz, doğurganlık ya da çevresel karsinojenler gibi çok sayıda faktör meme kanserinin etiyolojisinde etkilidir (Martin ve Weber, 2000). Hayvan modelleri meme bezi karsinogenezinin anlaşılmasında oldukça faydalı çalışmalara kaynak oluşturmuştur (Russo ve Russo, 2000). Köpek memesi insan memesinin homologudur ve benzer gelişime sahiptir. Memenin esas gelişim aşaması puberta dönemindedir ancak son diferensiyasyon sadece gebelik ile indüklenir (Pena ve ark, 2014). Dişi köpeklerde en sık karşılaşılan neoplazilerden biri meme tümörleridir. İnsan ve köpeklerde akciğer ve deri kanserleri en sık görülme oranına sahipken meme tümörleri görülme sıklığı bakımından bu tümörleri takip eder. İnsanlardakine benzer moleküler ve klinik özellikler gösterdiğinden köpek meme tümörleri çalışmalar için ilgi uyandırmıştır (Lutful Kabir ve ark, 2015).

Köpek meme tümörleri, genetik açıdan benzerlik göstermesi ve insanlarla benzer koşulları paylaşmasından kaynaklanan artış göstermesi nedeniyle dişi köpeklerde sık karşılaşılan tümörler olarak önemini korumaktadır. Hayvan sahipleri/severleri ve klinisyen veteriner hekimler sık karşılaşılan bu hastalığın tanısında-özellikle tümör tipi ve prognozu konusunda- ve tedavisinde çeşitli zorluklar yaşamaktadırlar.

Bu çalışmada sık karşılaşılan ve hayvan refahı açısından önem taşıyan doğal meme tümörü olgularının histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak araştırılması yapılmış,

tümöre özgü lezyonlar tanımlanarak benign ve malign köpek meme tümörlerinin patogenezi ve prognozunda önemi olan apoptozis/yolakları ve insan epidermal büyüme faktör reseptörü (HER2)'nün incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, tüm dokulardan alınan örnekler histokimyasal yöntemler ile incelenerek tümörler histopatolojik olarak tanımlanmış, tümör dokularında apoptotik indeks terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling assay (TUNEL) yöntemi ile belirlenmiş, immunohistokimyasal yöntem ile de kaspaz-3, -8, -9 ve HER2 ekspresyonları semi-kantitatif olarak değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser; doğal genetik esneklik sonucunda hücre büyümesinin teşvik edildiği, hücre ölüm mekanizmalarının devre dışı kaldığı ve hücrelerin immun sistemin denetimi ve ayrıca tedaviden kurtulma fonksiyonlarını kazandığı bir hastalıktır (Hanahan ve Weinberg, 2000). Kanser, hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde meydana gelen değişiklikler sonucu ortaya çıkar. Hücre proliferasyonu karmaşık mekanizmalar tarafından yönetilen oldukça sıkı düzenlenmiş bir işlem olan hücre döngüsü ile gerçekleşir (Lutful Kabir ve ark, 2015).

Ortalama olarak her dört kişiden birinin yaşamı boyunca kansere yakalanma ihtimali bulunmaktadır. Çoğu kanser türü kalıtsal ve çevresel faktörlerin sebep olduğu kontrolsüz proliferasyonun ve hatalı farklılaşmanın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Ghawami ve ark, 2009). Genetik veya çevresel faktörler baskılayıcı veya başlatıcı genleri aktiflemektedir. Genlerde meydana gelen değişiklikler ile beraber onkogenik faktörler tarafından aktive olan mutasyonlar kanser oluşumunda rol oynayan tümör hücrelerinin artışına neden olmaktadır (Chen ve Mellman, 2017). Yapılan pek çok çalışma çoğu kanserde anti-apoptotik proteinler, apoptozis inhibitörleri, transkripsiyonel faktörler, büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri ve tümör baskılayıcı proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen bozuklukların rol oynadığını göstermiştir (Khan ve ark, 2015).

Amerikan Veteriner Tıp Derneği (2020) internet sayfası verilerine göre yaklaşık olarak her 4 köpeğin birinde kanser gelişmekte olup yaş ilerledikçe bu risk artmaktadır. Köpeklerde kanser gelişme riski insanlar ile aynı oranda olduğu tahmin edilmektedir. İnsanlarda olduğu gibi evcil hayvanlarda özellikle de köpek ve kedilerde kanser görülme sıklığı daha iyi bakım, daha iyi beslenme gibi iyileşen koşullar sonucu artan yaşam beklentisi nedeniyle artmaktadır (Merlo ve ark, 2008; Matos ve Santos, 2015).

Endokrin veya hormonal faktörler, iyonlaştırıcı radyasyonlar gibi çevresel kanserojenler, diyet ve sosyoekonomik durum gibi dış faktörler ve ailevi veya genetik faktörler gibi pek çok faktör meme kanseri oluşumunda etkilidir. Ayrıca reproduktif durum (gebelik, doğum gibi) da meme kanseri oluşumunda etki gösterir (Russo ve ark, 1982). Gebeliğin hayvanlarda tümör gelişimine duyarlılığını etkileyen embriyonik antijenlerin gelişimini tetiklediği de ileri sürülmüştür (Coggin ve Anderson, 1974).

2.2. Köpeklerde Memenin Morfolojisi

2.2.1. Köpeklerde Meme Anatomisi

Sadece memelilerde bulunan ve subkutanöz apokrin ter bezlerinden modifiye olan meme bezleri karın duvarının orta hattına paralel uzanan süt hattı boyunca gelişmekte olup (Sleeckx ve ark, 2011), yeni doğanlar için pasif immunité ve besinleri sağlaması açısından önemli role sahiptir (Pena ve ark, 2014; Goldschmidt ve ark, 2017). Köpek ve kedi embriyosunda meme bezleri ventrolateral ektoderm üzerinde özel mezodermle desteklenen iki doğrusal kalınlaşma (aynı zamanda süt veya meme hatları da denir) olarak görünür (Goldschmidt ve ark, 2017). Dişi köpeklerde meme bezleri tüm süt hattı üzerine yerleşmiş haldedir (Sleeckx ve ark, 2011).

Köpeklerde genellikle her biri bir corpus mamma (8–14 lobul, bağ dokusu ve deriden oluşur) ve bir papilla mamma (meme ucu) ile karakterize sağda ve solda beşer tane olmak üzere on meme bulunmaktadır. Dizilişleri iki torasik (M1 ve M2), iki abdominal (M3 ve M4) ve bir inguinal (M5) şeklindedir (Constantinescu ve Schaller, 1992; Goldschmidt ve ark, 2017). Her meme başı genellikle kedilerde 4-7 ve köpeklerde 7-16 (22'ye kadar) papiller kanal ağzına sahiptir. Bu kanalların her biri bağımsız fonksiyonel bir birim olan yetişkin bezinin bir lobunu oluşturacak şekilde dallanmaktadır (Goldschmidt ve ark, 2017).

Torasik bezler kranial yüzeysel epigastrik arterin yanı sıra lateral torasik ve interkostal arter dalları ile, kranial abdominal bez kaudal yüzeysel epigastrik arter ile anastomoz yapan kranial yüzeysel epigastrik arter ile, kaudal abdominal ve inguinal bezler kaudal yüzeyel epigastrik arter ile beslenir. Ayrıca başka arterlerin dalları da meme bezlerinin dolaşımında görev alır. Venöz dolaşım arteriyel dolaşıma paralel seyreder (Miller ve ark, 1964; Barone, 1996). Ayrıca her meme bezinin subkutisteki benzer ağlara katılan ve lenf düğümlerine bağlanan daha büyük damarlar ile konjuge küçük birer lenf ağı bulunmaktadır. Bu yüzden bezde tümör varlığı durumunda bireysel meme lenfatik drenaj karakterizasyonu yararlı olabilir (Sleeckx ve ark, 2011).

2.2.2. Köpeklerde Meme Histolojisi

Meme bezi bağ doku tarafından lobüllere ayrılmış bileşik tubuloalveolar yapıdadır (Sorenmo ve ark, 2011). Parankim (alveol), stroma (bağ dokusu), kanallar, damarlar ve sinirlerden oluşur. İnterlobüler kanallar laktifer sinusa açılan laktifer kanallarda toplanır. Laktifer sinus papillar kanal aracılığıyla meme başına açılan meme başı sinusuna doğru devam eder (Sleeckx ve ark, 2011). Dişi köpekte doğumdan 10 gün sonra başlayıp 40 günde tamamlanacak olan regresyon sonucunda memede sadece önceden var olan kanallar görülür (Goldschmidt ve ark, 2017).

Fibröz ve adipöz dokuya gömülü halde olan meme bezi alveollerden başlayıp duktal kanallar sonrası meme ucundan toplayıcı kanallar ile sonlanan bir yapı gösterir. Gelişimi puberte ile başlar, her östrus siklusunda morfolojik değişimler gösterir (Goldschmidt ve ark, 2017). Memenin tam gelişimi sadece yetişkin dişilerde, gebelik sırasında, duktal epitel hücre proliferasyonu ve lobuloalveolar farklılaşma ile gerçekleşir (Pena ve ark, 2014). Başlangıçta sadece büyük kanalları (meme başından mezenkimal dokuya kısa bir mesafe gösteren) gelişmiş olan memede, pubertada yumurtalıktan östrojen salınımı ile birlikte kanalların terminal uçlarında (terminal uç tomurcukları) hücre proliferasyonu aktive olur. Diöstrus ve gebelik sırasında artan progesteron seviyesi kanalların daha fazla gelişmesini, lobüllerin ve alveollerin (lobuloalveolar birim) oluşumunu tetikler. Prolaktin etkisi altında alveolar hücreler salgı yapan hücrelere farklılaşır, bunun sonucunda meme bezi salgı yapan duktal-lobular-alveolar yapıya dönüşür (Goldschmidt ve ark, 2017).

Meme bezinin duktal ve lobuler sistem epitelı bazal membrana bitişik haldeki luminal epitel ve bazal miyoepitel hücrelerinden oluşurken (Sorenmo ve ark, 2011), meme alveolleri salgı aktivitesine bağlı olarak salgı yeteneğindeki basit kuboidal-kolumnar epitel ile döşelidir. Bu epitelin çevresini kontraktıl yapıda ve süt salgılanmasında sorumlu olan yıldız şekilli miyoepitel hücreler bazal bir lamina oluşturacak şekilde sarar. Nonsekretuvar alveoller ise küçük kanallara benzerler (Sleeckx ve ark, 2011; Sorenmo ve ark, 2011). En küçük kanallar süt salgısı yapan meme bezlerinde salgı özelliği de olabilen basit küboidal epitel ile döşelidir. Daha büyük kanallar ve sinüslerde iki katlı kübik ve kolumnar epitel bulunurken, papiller kanallar çok katlı keratinize skuamöz epitel ile kaplıdır. Bütün kanallar fusiform yapıdaki miyoepitel hücreleri ile çevrelenmiştir. İnteralveoler doku seyrek, iyi bir vaskülarizasyon gösterir ve bol miktarda plazma hücresi barındırır (Salomon ve ark, 2008; Sleeckx ve ark, 2011; Sorenmo ve ark, 2011).

2.3. Meme Tümörü

Kanser dünya çapında gittikçe artan bir problemdir ve meme kanseri de kadınlarda görülen kanser vakalarında en sık tanımlanan türdür. Dünya genelinde artan bir insidansa sahiptir (Kumar ve Aggarwal, 2016). Bu nedenle meme kanseri kadınlar arasında kanser ilişkili ölümlerde en yaygın olarak görülen kanser türüdür (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018). Benzerlikleri ve moleküler değişiklikleri nedeniyle, insan meme kanserine bir model olarak hizmet edebilmesi yönünden köpek meme tümörlerine olan ilgi giderek artmıştır (Klopfleisch ve ark, 2011).

2.3.1. Köpeklerde ve İnsanlardaki Meme Tümörünün Moleküler ve Klinik Benzerlikleri

Son yıllarda insan meme tümörleri ve köpek meme tümörleri arasında klinik ve moleküler benzerlikler tespit edilmiştir (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018). Steroid hormon reseptörü, epidermal büyüme faktörü (EGF), proliferasyon belirteçleri, metalloproteinaz ve siklooksijenaz aşırı ekspresyonu ve tümör protein 53 (p53) mutasyonu dahil olmak üzere moleküler özellikler bakımından köpek meme tümörleri insan meme tümörlerini taklit eder (Queiroga ve ark, 2011). Hücre proliferasyonu, anjiyogenezis, apoptozis, hücre döngüsünün düzenlenmesi, deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı tamiri, sinyal iletimi ve hayatta kalma yolları gibi bir çok özellik bakımından köpek meme tümörleri insanlarda görülen meme tümörleri ile korelasyon içindedir (Lutful Kabir ve ark, 2015). Bunun yanında moleküler markır ekspresyonları, hormonal yatkınlık ve kanser fenotipleri de benzerlik göstermektedir (Lutful Kabir ve ark, 2015; Abdelmegeed ve Mohammed, 2018). Ayrıca klinik evre, tümör boyutları ve lenf noduna invazyon gibi özellikler bakımından da identiktir (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018).

Reproduktif durum meme kanseri oluşumunda etkilidir. Meme kanseri doğum yapmamış kadınlarda, erken menarş yaşayan kadınlarda ve ilk hamileliği 25 yaşından sonra olanlarda daha sık görülmektedir (Russo ve ark, 1982). Benzer şekilde ovariyohistektominin rutin olarak yapılmadığı birçok Avrupa ülkesinde köpeklerde meme bezi tümörleri daha yaygın olarak görülmektedir (Sorenm, 2003). Köpekler, klinik sunumu, tümör genetiği ve heterojenitesi, hastalığın ilerleyişi ve tedaviye yanıt açısından insanlara benzer şekilde kendiliğinden tümör gelişimine yatkındır (Lutful Kabir ve ark, 2015).

2.3.2. Köpeklerde Meme Tümörü

Köpek meme neoplazmaları genellikle iyi sınırlanmış, farklı boyutlarda ve kıvamdadır; deride ülserasyon ve lokal yangısal reaksiyon ile seyredebilir. Tek bir meme bezinde multiple tümör olabildiği gibi birden fazla meme bezini kapsayacak şekilde farklı histolojik tiplerde de tümörlere rastlanabilir (Dantas Cassali ve ark, 2012). Tümör oluşum frekansı kaudal abdominal ve inguinal meme bezlerinde torasik bezlere göre daha yüksektir. Meme tümörleri seksüel olarak sağlam ya da kısırlaştırılmamış orta yaşlı ya da yaşlı dişi köpeklerde görülür (Dantas Cassali ve ark, 2012). Köpek meme tümörlerinde insidans yaşla birlikte artmaktadır (Rungsipipat ve ark, 1999).

İnsanlarda olduğu gibi %0.2 prevalans ile köpek meme tümörleri dişi köpeklerde en yaygın görülen neoplazmalardır ve veteriner tıpta önemli yer tutmaktadır. Histolojik olarak bu neoplazmaların yaklaşık %50'si maligndir ve uzak metastazlar bu kanserde sık görülen ölüm nedenidir (Sorenmo, 2003; Klopffleisch ve ark, 2011; Dantas Cassali ve ark, 2012). Dişi köpeklerde sıklıkla görülen bu tümörler morfoloji ve biyolojik davranış olarak oldukça heterojen bir yapı gösterir (Gama ve ark, 2008). Köpeklerde görülen meme tümörleri patolojik karakteristikleri ve klinik davranışları açısından heterojen yapıda olmaya yatkındır (Yang ve ark, 2006).

2.3.3. Meme Tümörü Çalışmalarında Köpek Modeli Kullanılması

Meme tümörünün yaygınlığı ve ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer alması tümörü önleme ve doğru tedaviyi bulma yönünden araştırmaların artmasına yol açmıştır (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018). Klinik, moleküler ve genetik olarak tanıda meme kanserinin alt tiplendirilebilmesi doğru tedavi seçilmesi açısından önemlidir (Kumar ve Agrawal, 2016).

Yapılan çalışmalarda insan doku örneklerinin az olması ve bu tür araştırmaların insanlarda yapılması ile ilgili etik sorunlar nedeniyle, araştırmalarda in vivo ve in vitro insan meme kanseri modellerine gereksinim duyulmuştur. Rodent modelleri meme tümörü araştırmalarında faydalıdır, ancak bu araştırmalara sınırlı şekilde izin verir (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018). Evcil köpekler (*Canis lupus familiaris*) gibi evcil hayvanlar, kolay erişilebilirliği ve yaşam durumu da dahil olmak üzere birçok nedenden dolayı kanser ve diğer insan hastalıkları için prelinik modeller olarak kabul edilir (Lutful Kabir ve ark, 2015).

Köpek genom dizisinde neredeyse tüm genlerin insan genlerinin ortologları olarak tanımlanması köpek kanserlerinin insan modelleri olarak kabul edilmesine olanak sağlamıştır (Lindblad-Toh ve ark, 2005). Benzerlikler nedeniyle, insan meme kanserine bir model olarak hizmet edebilmesi yönünden köpek meme tümörlerine olan ilgi giderek artmıştır (Klopffleisch ve ark, 2011). Aynı zamanda çoğu köpek popülasyonları ile insanlar aynı çevre, risk faktörleri ve hastalık karakterlerini paylaşır. Bu ortak paylaşımlar da kanser araştırmalarında köpek modellerini önemli bir noktaya getirmiştir (Lutful Kabir ve ark, 2015). İnsanlarda olduğu gibi köpeklerde de yaşlanma, doğum yapmamış olma ve kalıtım (özellikle safkan köpeklerde kalıtıma bağlı kanser görülme oranının yüksek olması) gibi diğer faktörler de meme kanserinin gelişiminde katkıda bulunmaktadır (Singer ve ark, 2012).

2.3.4. Meme Tümöründe Prognoz Değerlendirilmesi

Prognostik değerlendirme açısından tümör boyutu, histolojik sınıflandırma, lenf nodu durumu gibi belirteçlerin yanında proliferasyon, hormon reseptörleri, p53, HER2 gibi markırların köpek meme tümörleri için değerlendirmeye alınması oldukça yaygınlaşmıştır (Gama ve ark, 2008).

Tek bir moleküler markıra bakılarak insan ve köpek meme tümörü gibi heterojen yapıdaki tümörlerin tanımlanması ve prognozuna ilişkin yapılan araştırmalar yetersiz kalacağından hücre büyümesi, diferensiyasyon, proliferasyon ve metastaz gibi birçok faktörü eş zamanlı değerlendirmek önemlidir (Matos ve ark, 2005).

2.4. Meme Tümörü Yolakları

Normal doku homeostazisi hücre bölünmesi ve ölümü olmak üzere iki fizyolojik süreç ile düzenlenir. Bu iki süreçte meydana gelen değişiklikler kanser patogenezinde önemli rol oynamakta olup (Malumbres ve Barbacid, 2001) kanser hücreleri adını verdiğimiz normal hücre çoğalmasını ve homeostazisi yöneten düzenleyici unsurların hatalı olduğu hücrelerin oluşmasına neden olmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000).

Hücre döngüsü, en basitinden gelişmişine tüm canlılarda hücrenin büyüme ve bölünmesini içeren temel biyolojik bir süreçtir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Hücre döngüsü

düzenlemesi sırasında meydana gelen hatalar kanseröz büyüme ve gelişimsel anormalliklere neden olabilir (Panigrahi ve Mai, 2005).

Kanser oluşumu hücre fizyolojisinde temel olarak 6 faktörün değişimini içerir: büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyüme önleyici sinyallere duyarsızlık, programlı hücre ölümünden (apoptozis) kaçma, sınırsız çoğalma potansiyeli, sürekli anjiyogenezis ve dokuya invazyon ve metastaz (Hanahan ve Weinberg, 2000). Neoplastik olmayan epitelin proliferasyonu hücre döngüsü kontrol noktalarını içeren birçok moleküler yolak ile kontrol edilir. Neoplastik meme dokusunda hücre proliferasyonu artmıştır. Köpek meme tümörü hücreleri büyümeyi indükleyen gen ürünlerinde (protoonkogen) artış ve büyümeyi inhibe eden gen ürünlerinde (tümör baskılayıcı) düşüş göstermektedir (Klopfleisch ve ark, 2011).

Kanser sinyal yollarının karşılaştırmalı analizinde, ortolog genlerin önemli bir kısmının hem insan hem de köpek meme tümörlerinde yukarı ve aşağı yönde regüle edildiği gösterilmiştir. Fosfoinositid-3-kinaz-protein kinaz B/Akt (PI3K/AKT), Ki-ras2 Kirsten rat sarkoma viral onkogene homolog (KRAS), mitojen-aktive protein kinaz (MAPK), Wnt-katenin, meme kanseri gen 2 (BRCA2), östrojen reseptör 1 (ESR1) ve plasental kaderin (p-kaderin) gibi belirgin onkogenik yollar ve ilişkili genler çok yüksek seviyelerde; p53, siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A (p16/INK4A), fosfatase ve tensin homologu (PTEN) ve epitelyal kaderin (E-kaderin) gibi tümör baskılayıcı yollar insan ve köpek meme tümöründe düşük seviyelerde gözlenmektedir (Lutful Kabir ve ark, 2015).

Onkogenik mutasyonlar hücre proliferasyonunu öncelikle hücre büyümesinde görevli sinyalleri değiştirerek gerçekleştirir. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlarda ise hücre döngüsü ilerlemesinin negatif olarak düzenlenmesinde sorunlar oluşur ve kanser gelişimine olanak sağlanır (Sherr, 1996). Büyüme sinyalleri hücrelerin dinlenme fazından aktif faza geçmesi için önemlidir. Hücre yüzeyinde bu sinyalleri almak üzere özelleşmiş büyüme faktör reseptörlerinin bulunması gerekmektedir. Sitoplazmada yer alan bağında genellikle tirozin kinaz aktivitesine sahip olan büyüme faktör reseptörlerinin çoğu kanser türünde aşırı eksprese edildiği gözlenmiştir. Örneğin mide ve meme kanserlerinde HER2/neu reseptörünün aşırı ekspresyonu görülmektedir (Slamon ve ark, 1987). Solid insan tümörlerinin çoğu KRAS, tümör protein 53 (TP53), retinoblastoma 1 (RB1), PTEN, adenomatöz poliposis koli (APC), meme kanseri gen 1 (BRCA1) gibi onkogen ve tümör baskılayıcı genlerinde sayısız mutasyona sahiptir. İnsanlarda aşırı ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkili olan özel AT-zengin sekans bağlayıcı protein 1 (SATB1) insan meme tümörü hücrelerinde büyüme ve metastazı uyaran, global bir kromatin düzenleyici ve

transkripsiyon faktörüdür. Köpek meme tümörlerinde ise transkripsiyonal düzeyde tam tersi geçerlidir (Klopfleisch ve ark, 2010).

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-1 (HER1) birkaç tümör sinyal yolağını aktive eden bir epidermal büyüme faktörü reseptörüdür (EGFR). Yapılan bazı çalışmalarda, EGFR'ın tümör boyutu histolojik derecesi ile klinik durumu arasında pozitif ilişki bulunmuştur (Matos ve Santos, 2015).

DNA sentezi ve hücre çoğalması oranı, hücre döngüsünün ilk aralık (G1) ve sentez (S) fazlarının uzunluğu ve DNA eksizyon onarımındaki hücresel yeterlilik bir hücrenin kötü huylu dönüşüme uğrama duyarlılığında etkili özelliklerdir (Russo ve ark, 1982). Siklin bağımlı kinazlar (CDK), Notch, Wnt, sonic hedgehog (SHH), östrojen reseptörü, HER2 gibi birçok protein, yolak ve hormon meme kanseri oluşumunda hücre döngüsü ve hayatta kalma ile ilişkilidir (Nwabo Kamdje ve ark, 2014).

Telomerler tüm ökaryotlarda kromozom sonlarında yer alan, tekrarlayan baz çiftlerini içeren ve kromozomal uçları çift zincir DNA kırılmalarından koruyan bölgelerdir. Fonksiyonlarının bozulması durumunda hücrelerde apoptozis, yaşlanma ve genomik dengesizlik oluşacaktır (Panigrahi ve Mai, 2005). Bu durumlar hücrenin malignan transformasyona uğramasına karşı önemli bariyerler olarak kabul edilir (DePinho ve Polyak, 2004). Telomerik fonksiyon bozukluklarının, telomerde belirgin kısalmanın, genomik instabilite ve meme kanseri oluşumu da dahil olmak üzere birçok karsinogenesisle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Feldser ve Hackett, 2003).

2.4.1. Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK'lar)

Hücre döngüsü G1, S, G2 ve M olmak üzere dört fazdan oluşmuştur. Sessiz faz (G0), G1 fazı, S ve ikinci aralık (G2) fazları arasındaki geçiş gibi hücre bölünmesindeki büyük geçişler spesifik CDK/siklin kompleksleri aracılığıyla yönetilir (Collins ve Garrett, 2005). Ayrıca hücre döngüsünde siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) olmak üzere 3 anahtar molekül sınıfı aracılığıyla etkindir (Nurse, 2002; Collins ve Garrett, 2005). Hayvansal hücreler birçok CDK'ya sahiptir. CDK1, CDK2 ve CDK4 gibi bir kısmı direkt olarak hücre döngüsü ile ilişkilidir. Siklin bağlanması ile aktive olan CDK'lar hedef proteinlerin aktive ya da inaktive olması ile bir sonraki faza girişi organize eder ve siklin-CDK kompleksleri sonraki fazlardaki komplekslerin aktivasyonunu sağlar (Malumbres ve Barbacid, 2009). CDK7, CDK8, CDK9, CDK10 ve CDK11'i içeren diğer grup ise hücre

transkripsiyonun düzenlenmesinden sorumludur ve kanser hücrelerinin hayatta kalmasında rol oynar (Nwabo Kamdje ve ark, 2014).

Birçok malign tümörde siklinler aşırı eksprese edilmekte ve bu sebeple proto-onkogenler olarak düşünülmektedir. Örneğin, siklin D akciğer, meme, mide ve yemek borusu karsinomlarında aşırı eksprese edilmiş bir gen olarak tanımlanmıştır. G1/S fazı geçişinde önemli role sahip siklin E'nin insan meme kanseri, gastrointestinal ve ovarian kanserlerde deregülasyona uğradığı bildirilmiştir (Dobashi, 2005). Köpek meme tümörlerinde detaylı olarak yalnızca siklin A ve D1'in ekspresyon düzeyleri üzerine detaylı araştırmalar yapılmış ve malign tümörlerde bu proteinlerin ekspresyon düzeylerinin arttığı görülmüştür (Klopfleisch ve ark, 2011). Bu kapsamda siklin A ve D1'in ekspresyonu üzerine yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda malign tümörlerin yarısında siklin A için nükleer boyanma, siklin D1 için seyrek boyanma izlenmiştir (Murakami ve ark, 2000). Prekanseroz meme displazisinde benzer şekilde siklin D1 artışı gözlemlendiğinden bu protein artışının prognostik değeri belirsizdir. Sfacteria ve ark (2003) Western blot ve immunohistokimya (IHC) kullanarak yaptığı çalışmada hiperplaziler/displaziler, karsinomlar ve invaziv karsinomlar değerlendirilmiş ve düzensiz siklin D1 ekspresyonunun erken karsinogeneziye rol oynayabildiği, ancak tümörün ilerlemesindeki öneminin sınırlı olduğu bildirilmiştir. 2012'de Mkaouar ve ark tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise siklin D1'in malignite ile korelasyonunun olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle insanlarda olduğu gibi siklin D1'in köpek meme tümörü karsinogeneziinde önemine dair kanıt yoktur (Matos ve Santos, 2015).

Sikline bağımlı kinaz inhibitörleri veya CDK inhibitörleri olarak adlandırılan endojen bir inhibitör protein grubu hücre dışı ve hücre içi sinyallere cevap olarak siklin-CDK aktivitesini kontrol eder ve hücre döngüsü ilerlemesini çoğunlukla G1 fazında ya da DNA hasarından ya da çevreden alınan sinyal doğrultusunda sınırlar (Nwabo Kamdje ve ark, 2014; Lutful Kabir ve ark, 2015). Sikline bağımlı kinaz inhibitörleri bu özellikleriyle aynı zamanda bir tümör baskılayıcı olarak da görev alır. Bu genlerdeki mutasyonlar malignant fenotipler ile sonuçlanır (Harper ve Elledge, 1996). Memeliler yapı, inhibisyon mekanizması ve özgünlük bakımından farklı iki sınıf sikline bağımlı kinaz inhibitörlerine sahiptir. Birincisi siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A (p21) ailesidir ve p53 geni ürünü olan ilk keşfedilen memeli CDKI'sini içerir. Bu inhibitörler G1/S fazında CDK'ları inhibe etmekten sorumludur. İkinci CDKI sınıfı CDK4 inhibitörü (INK4) ailesi olarak adlandırılır ve protein p15, p16, p18 ve p19'u içerir (Harper ve Elledge, 1996). Tüm CDKI'lar arasında p16/INK4A kurucu üyedir ve p53'ten önce ana tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılmıştır. Bu genin heterozigotluğunu kaybettiği durumlar ve mutasyonları melanomlar, lösemiler, gliomalar, akciğer, meme ve

mesane kanserleri dahil olmak üzere birçok kanserde bildirilmiştir. Ayrıca lokusunun köpek malign melanomlarında, meme karsinomlarında ve fibrosarkomlarda mutasyona uğradığı bulunmuştur (Lutful Kabir ve ark, 2015). İnsanda 9p21 kromozomu kısa kolu üzerinde bulunan ve tümör baskılayıcı lokus olarak bilinen bir lokus p16/INK4A, siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (p14ARF) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü 4B (p15/INK4B) olarak adlandırılan üç ürünü kodlar ve bu şekilde siklin-CDK kompleksini inhibe ederek hücre döngüsündeki G1 fazından S fazına geçişi engelleyerek proliferasyonu düzenler (Kamb ve ark, 1994).

Tüm kanserlerde hayatta kalım için hücre döngüsü aktive edilir. Birçok kanserde CDK'lar aşırı aktif veya CDKI proteinleri disfonksiyoneldir. Bu nedenle CDK'ların iyi anlaşılması karsinogenezis ve buna karşı seçilecek terapi açısından önemlidir (Nwabo Kamdje ve ark, 2014).

2.4.2. Notch Sinyali

Notch sinyal yolağı meme kanserinin patogenezinde rol oynamaktadır. Bu sinyal yolağı hücre döngüsü kontrolü (p21 ve siklin D1), transkripsiyon faktörleri, büyüme faktör reseptörleri (HER2 gibi), anjiyogenezis ve apoptozis düzenleyicileri ile ilişkilidir. Bu yolda meydana gelen sorunlar hücre büyümesi, diferensiyasyon, anjiyogenezis ve apoptoziste negatif etkiler oluşturmaktadır (Ronchini ve Capobianco, 2001). Notch yolağının onkogenezisteki rolü östrojen yolağı gibi diğer yollar ile yönlendirilir. Meme tümörlerinin çoğu östrojen reseptörü ifade etmesine rağmen anti östrojenlere direnç göstermektedir. Bunun nedeni Notch sinyalinin aktif olmasıyla anti östrojen inhibe etme özelliklerinin etkisiz kalmasıdır (Rizzo ve ark, 2008). Dolayısıyla insan meme tümörlerinde yapılan çalışmalarda Notch 1'in mesajcı ribonükleik asit (mRNA) olarak yüksek seviyede ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Reedijk ve ark, 2008).

Normal hücrelerde olduğu gibi tümör hücrelerinde de canlılığın devamı için anjiyogenezis önemlidir. Tümörler gelişimleri sırasında anjiyogenezisi indüklemeye ve sürdürme kabiliyeti kazanmış gibi görünmektedir. İnsanlarda görülen premalignant serviks, meme ve deri lezyonlarında anjiyogenezis belirgindir (Hanahan ve Folkman, 1996). Tümör hücrelerinden salınan Notch sinyali ile endotelial Notch aktivasyonu gerçekleşir ve tümör anjiyogenezisi desteklenir (Zeng ve ark, 2005).

2.4.3. Wnt Sinyali

Wnt proteinleri embriyonik indüksiyon, hücre polaritesi oluşumu ve hücrenin yaşama özellikleri gibi birçok süreçte önemli rol oynar ve Wnt sinyalinin aşırı aktivasyonu meme tümörü de dahil olmak üzere birçok solid tümörde tanımlanmıştır. Wnt/katenin beta 1 (β -catenin) yolağının negatif düzenleyicilerinin kaybı pek çok meme tümöründe mevcut olup kötü prognoz ile ilişkilidir (Nwabo Kamdje ve ark, 2014).

2.5. Meme Tümörü Oluşumunda Genetik Değişiklikler

Meme kanseri ile ilişkili çift zincirli DNA onarım proteinlerinin mutasyonları ve bunların telomer stabilitesine dahil olmaları bir fenomendir. BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlar genomik bütünlüğün ve DNA onarımının yetersiz kalmasının bir sonucu olarak meme, ovaryum ya da diğer kanserlerin kalıtsal olarak görülmesinde rol oynar. BRCA1 ve BRCA2 transkripsiyon, DNA onarımı, rekombinasyon, hücre döngüsü ve hücre bölünmesi kontrolü dahil olmak üzere birçok farklı durumda kromozomal yapının korunmasında dolayısıyla telomer korunmasında önemli rollere sahiptir (Panigrahi ve Mai, 2005).

Büyüme faktörü sinyali köpek meme tümörlerinde etkilediği yolak, hücre tipi ve yolak düzenleyicilerin aktivite durumuna bağlı olarak hem uyarıcı hem de inhibe edici etkilere sahiptir. İnsan meme tümörlerine benzer özellikler gösterdiğinden avian eritroblastik lösemi viral onkogen homologu 2'nin (ERBB2/HER2) köpek meme tümörlerindeki durumu ilgi konusu olmuştur (Klopfleisch ve ark, 2011). İnsan meme tümörlerinin %25'inde ERBB2'nin aşırı ifade edildiği ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu görülmüştür (Ferretti ve ark, 2007). ERBB2'nin ekspresyonunda kötü prognozun, östrojen reseptör negatifliği ve bazal hücre markırlarına (P-kaderin, transformasyon ilişkili protein 63/p63 ve sitokeratin 5) bağlı olduğu belirlenmiştir (Gama ve ark, 2008).

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü HER1 birkaç tümör sinyal yolağını aktive eden bir EGFR'dır. Yapılan bazı çalışmalarda, EGFR'nin tümör boyutu, histolojik derecesi ve klinik durumu arasında pozitif ilişki bulunmuştur (Matos ve Santos, 2015).

İnsan örneklerinde yapılan çalışmaların aksine, yapılan bazı çalışmalarda köpek meme tümörlerinde HER2 protein aşırı ekspresyonunun prognozla ilişkisiz ya da daha yüksek hayatta kalma oranları ile ilişkili olma eğiliminde olduğu bulunmuştur (Hsu ve ark, 2009; Matos ve Santos, 2015). Metastatik köpek meme tümörleri transforme edici büyüme faktörü

beta reseptörleri (TGFB β), fibroblast büyüme faktör reseptörü (FGFR), büyüme hormon reseptörü (GHR) gibi çok sayıda transmembran büyüme faktör reseptörü ifadesinde azalma gösterir, ancak klinik prognoz ile ilişkili değildir (Klopfleisch ve ark, 2011). İnsan meme tümörlerinin aksine, bazı köpek meme tümörlerinde güçlü bir miyoepitelyal bileşen vardır ve bu nedenle insanlarda bazal alt tipi sınıflandırmak için kullanılan IHC markerleri, köpekler için uygun olmayabilir (Matos ve Santos, 2015). Köpek meme tümörlerinde PTEN tümör baskılayıcı rolüyle prognostik öneme sahiptir. PTEN hücre proliferasyonunu azaltırken apoptozis indüksiyonu ve hücre adezyonu ile de bağlantılıdır. Malign köpek meme tümörlerinin %76'sında PTEN ekspresyon kaybı daha kısa hayatta kalma süresi ile ilişkilendirilmiştir (Restucci ve ark, 2000).

Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolunun büyüme faktörü reseptörü sinyal transdüksiyonundaki fonksiyonu hücre büyümesini ve besinler ile büyüme faktörlerine karşı proliferatif tepkileri aktive etmektir. PI3K yolağının aktivasyonu tümör hücrelerinin proliferasyonunu yönlendirmek için iyi bir seçenektir ve çoğu tümörlerde bu durum yaygındır. PI3K yolunun tümör hücrelerinde aktivasyonu besin ve büyüme faktörleri sınırlandırıldığında hücre metabolizmasının, protein sentezinin ve hücre büyümesinin aşağı regülasyonunu önler (Jin ve ark, 2007).

Östrojenler bazı nükleer protoonkogenin transkripsiyonunu düzenlemede önemli rol oynar (Sorensen, 2003). Hem insan hem de köpek meme tümörlerinde östrojen reseptörü ekspresyonu hastalığın patolojik özellikleri ve tümör diferensiyasyonunun derecesi ile ilişkilidir (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018). Hormonal etki dışında genetik yatkınlık ve diyet gibi faktörler de tümör gelişiminde önemlidir. English Springer Spaniel, Brittany Spaniel, Cocker Spaniel, English Setter, Pointer, German Shepherd, Maltese, Yorkshire Terrier ve Dachshund gibi ırklarda meme tümörüne yakalanma riskinin diğer ırklara oranla daha yüksek olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Goldschmidt ve ark, 2001). p53 geninin supresyonu insan tümörlerinde en sık karşılaşılan mutasyondur. Bu genin durumu köpeklerde de araştırılmış ve aşırı ekspresyon ve mutasyon sıklığı ile ilgili değişken sonuçlar bildirilmiştir (Sorensen, 2003). BRCA genlerindeki germline mutasyonları belirli köpek ırklarında nispeten yüksek riskli (4 kat) meme tümör gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018).

Malign köpek meme tümörlerinde hücre proliferasyonunda artış açıkça belirlenmiştir. Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA), proliferasyon markır proteini Ki67 (Ki67) ve gümüşe duyarlı nükleolar organize edici bölge (AgNOR), hücre proliferasyonunun belirlenmesinde üç histolojik metoddur (Klopfleisch ve ark, 2011). DNA replikasyonunda ve

tamirinde görev alan çekirdek yerleşimli PCNA G1 ve S fazı süresince pik noktaya ulaşır (Moldovan ve ark, 2007). M fazı boyunca pik yapan Ki67 heterodimer bir proteindir. Ancak yarılanma ömrü kısa olduğundan döngü göstermeyen hücrelerde ya da fazlar arası sürelerde farklılık gösteren malign hücrelerde belirlenmesi nadirdir (Gerdes ve ark, 1983). Köpek meme tümörlerinde PCNA ve Ki67 indekslerinin korelasyonu üzerinde ortak karara varılamamıştır. İki değerin indeksleri arasındaki korelasyon meme tümörü tipine göre değişkenlik göstermektedir. Pek çok çalışmadan elde edilen sonuçları özetleyecek olursak; PCNA mitotik indeks ile uyumludur; yüksek dereceli tümörlerde Ki67 indeksi artış göstermektedir, ancak her ikisi de ırk, köpeğin boyutu, reproduktif durum ve büyüme oranı gibi değerlerle korelasyon göstermemiştir (Klopfleisch ve ark, 2011). AgNOR hücrenin proliferatif aktivitesi ile ilişkilidir ve malign tümörlerde artış gösterir (Löhr ve ark, 1997).

Birçok farklı genetik değişiklik meme bezi tümörü oluşumu ile çoğunlukla ilişkilidir. Bu değişiklikleri incelemadaki amaç malign transformasyonda yer alan mekanizmaları anlamak, tanımlamak ve bu doğrultuda kanseri önleme ve tedavisine olanak sağlayabilmektir. Bunun en popüler örneği tümörün HER2 yönünden durumu ve buna karşı kullanılacak olan trastuzumab tedavisidir. Trastuzumab HER2/c-erbB2 reseptörünün ekstrasellüler domainine bağlanan monoklonal bir insan antikorudur (Sorensen, 2003).

2.6. Meme Tümörlerinde Apoptozis

Apoptozis terimi Yunanca "apo (ayrı)" ve "ptosis (düşen)" kelimelerinden türemiştir ve yaprakların sonbaharda ağaçlardan dökülmesi anlamına gelir (Wong, 2011). "Apoptozis" terimi ilk kez genomik DNA'nın parçalanmasıyla bağlantılı bir hücre ölümünü tanımlamak amacıyla 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmıştır (Kerr ve ark, 1972). Apoptozis organizma içindeki bireysel hücreleri çevre dokunun yapısını koruyarak ortadan kaldıran programlanmış hücre ölümüdür (Parrish ve ark, 2013).

Apoptozis kromatinin yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve hücre hacminin azalması (piknozis olarak bilinir) gibi morfolojik değişiklikler ve kaspaz aktivasyonu, DNA ve protein parçalanması, apoptotik hücrenin fagositik hücreler tarafından tanınmasını ve fagosit edilmelerini sağlayan membran yüzey modifikasyonlarını içeren biyokimyasal değişiklikler ile karakterizedir (Koff ve ark, 2015). Apoptozisin indüklenmesi ile birlikte hücre kabarcıklanır, yüzeyinde fosfatidilserin açığa çıkar, hücre boyutu küçülür, hücre çekirdeği büzülür, DNA yoğunlaşır ve apoptotik cisimler oluşur. Apoptozis sadece hatalı durumların ortadan

kaldırılmasında değil embriyonik gelişimde ve immün yanıtın düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar (Maddika ve ark, 2007). Nekrozun aksine, bir hücrenin belirli uyarınları aldıktan sonra aktif bir şekilde ölüme ilerlemekte olduğunu tarif etmek için kullanılır (Wong, 2011).

Programlanmış hücre ölümü olan apoptozis DNA hasarı sonrasında veya gelişim sırasında meydana gelen hasarlı ya da hatalı hücrelerin düzenli ve verimli bir şekilde ortadan kaldırılması ile sonuçlanan gen seviyesinde hassas düzenlemeler ile yönetilir (Fuchs ve Steller, 2011). Ölmek üzere olan apoptotik hücreler fagositleri çeken ve toplayan “beni bul” ve “beni ye” sinyallerini salgılar. "Beni bul" sinyali apoptotik hücrelerden salınan lisofosfatidilkolin (LPC) ile tanınır. "Beni ye" sinyalinde ise normalde plazma zarı iç yüzünde bulunan ve apoptozis ile zarın dış tarafına salınan fosfatidilserin (PS) ekspresyonu ile ölü hücrelerin makrofajlar tarafından erken tanınması sağlanır ve süreç yangısal hücresel bileşenlerin salınımı olmadan fagositoz ile sonuçlanır (Fuchs ve Steller, 2011; Pistritto ve ark, 2016). Fagositik hücreler genellikle apoptotik cisimler meydana gelmeden önce apoptotik hücreleri fagosit eder (Bucur ve ark, 2001).

Apoptoziste biyokimyasal olarak kaspazlar aktive olur ve sonuçta DNA ve protein kırılması, membran değişiklikleri ve fagositik olarak tanınma gerçekleşir (Wong, 2011). Apoptozis ölüm ligandlarının ölüm reseptörlerine bağlandığı ve ardından kaspaz-8'in aktivasyonu ile tetiklenen dışsal yolak ve sitotoksikite sonucu kaspaz-9'un aktive edildiği "mitokondriyal" yolak olarak bilinen içsel yoldan oluşan iki ana mekanizma ve ayrıca endoplazmik retikulum stres sinyali sonucu gerçekleşen yolak ile gerçekleşir (Ghawami ve ark, 2009; Parrish ve ark, 2013; Zeng ve ark, 2015). Bu yolaklar önemli hücre proteinleri ve hücreyi parçalayan bir dizi sistein aspartil spesifik proteazları (sistein aspartil spesifik proteaz, kaspaz) aktive eder (Koff ve ark, 2015). Ekstrinsik apoptozis hücre dışı mikroçevrenin bozulması ile başlatılan kontrollü hücre ölümü yöntemidir (Galluzzi ve ark, 2018). Reseptör aracılı (dış, ekstrinsik) yolağı tetikleyen reseptörler hücre membranında yer alır ve ekstrasellüler ligandlar tarafından aktive edilir (Ghawami ve ark, 2009). Bu yolakta hücre dışı ölüm sinyalleri hücre içine iletilir. Ölüm reseptörleri ölüm domainleri (DD) ve ölüm efektör domainleri (DED) olarak adlandırılan farklı protein modelleri ve ilgili protein tümör nekrozis faktör (TNF) ailesi ligandları ile karakterize TNF reseptör üst ailesinin bir alt kümesidir (Lin ve ark, 1999; Long ve Ryan, 2012; Pistritto ve ark, 2016). Daha geniş bir şekilde karakterize edilmiş sinyalizasyon sistemleri olan ölüm reseptörleri-ligandları tümör nekrozis faktör reseptörü 1-tümör nekrozis faktör α (TNFR1-TNF α), Apoptozis antijen 1-Fas ligand (FAS/APO-1/CD95-FasL), ölüm reseptörü 4-TNF ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAILR1-TRAIL) ve ölüm reseptörü 5 (TRAILR2)-TRAIL'dir. Ölüm reseptörü karşılık

gelen ligand tarafından uyarıldığı zaman, DD içeren diğer proteinlerle homotipik etkileşimleri desteklemek üzere sitoplazmik DD'sini ortaya çıkarmak için oligomerizasyona ve konformasyonel bir değişikliğe uğrar (Pistritto ve ark, 2016). Ölüm reseptörleri ilgili ligandları ile etkileşime girdikten sonra çoklu bağdaştırıcı molekülleri içerebilen hücre içi ölüm indükleyici bileşik kompleksleri (DISC'ler) oluşturmak için multimerizasyona uğrar (Li ve Yuan, 2008).

Hücre yüzeyindeki apoptozisi indükleyen yüzey reseptörü (CD95) ve TRAIL, Fas ilişkili ölüm domaini proteini (FADD) ve/veya TNF reseptör aracılı ölüm domaini proteini (TRADD) gibi DD içeren molekülleri çekmek üzere ana ölüm reseptörlerinden birine bağlanır. FADD pro-apoptotik yolları tetiklerken, TRADD anti-apoptotik sinyalleri indükler. FADD pro-kaspaz-8 ve -10 gibi diğer DD/DED'leri içeren proteinleri çekerek sitoplazmik bölmede ölüme neden olan DISC oluşumunu destekler (Lin ve ark, 1999; Long ve Ryan, 2012). Reseptör kaynaklı yol ile kaspaz-8 veya -10'un (başlatıcı kaspazlar) DISC'e alınması sağlanır (Ghawami ve ark, 2009). Kaspaz-8/-10'un DISC'e alınması ve oligomerizasyonu otokatalitik aktivasyon ile sonuçlanır ve hücre ölümünün başlatılması için kritik öneme sahiptir (Li ve Yuan, 2008). Aktif kaspaz-8 /-10 daha sonra kaspaz-3 gibi efektör kaspazlarını doğrudan parçalayabilir ve aktive edebilir (Parrish ve ark, 2013). Kaspaz-8 ve -10 aktive edildiğinde efektör kaspazlar -3, -6 ve -7'nin doğrudan aktivasyonu veya Bcl-2 ilişkili X proteini (Bax) ve Bcl-2 homolog antagonisti (Bak)'ne Bcl-2 homolog 3 etki alanı ölüm agonisti (BID)'nin bağlanması ile aktive edilen içsel (intrinsik) yolak aracılığıyla ölüm sinyalini iletir ve kuvvetlendirir (Koff ve ark, 2015). DISC sinyali sinyal aktif olmayan bir DISC oluşumuna yol açan fizyolojik baskın bir negatif kaspaz-8 olan FLICE benzeri inhibitör protein (c-FLIP) ifadesiyle inhibe edilebilir (Li ve Yuan, 2008).

İçsel veya mitokondriyal yolak mitokondri aracılığı ile ilerler ve solunum zinciri bileşeni sitokrom c'nin mitokondrinin intermembran boşluğundan sitoplazmaya salınmasını içerir (Parrish ve ark, 2013). İçsel yolak oksidatif stres, hücre içi Ca²⁺ dengesizliği ve bir dizi patolojik değişiklikler, ışınlama ve sitotoksik ilaçlarla tedavi gibi çeşitli ekstra ve hücre içi stresler tarafından aktive edilir. Bu değişiklikler sonucunda mitokondriyal membran potansiyeli ve permeabilite değişir (Ghawami ve ark, 2009; Zeng ve ark, 2015). İçsel apoptozis için kritik adım mitokondriyal dış membran geçirgenliğidir (MOMP) ve geri dönüşümsüzdür (Galluzzi ve ark, 2018). B hücre lenfoma-2 (Bcl-2) familyasının (Bax, Bak) pro-apoptotik Bcl-2 homolog 3 (BH3) üyelerinin aktivasyonu ile antiapoptotik proteinler Bcl-2, ekstra büyük B hücre lenfoma (Bcl-xl) ve miyeloid hücre lösemi-1 (Mcl-1)'i nötralize edilerek mitokondriyal membran dış membran geçirgenliğinin bozulmasına neden olur. Böylece normalde

intermembran alan içinde sınırlı proteinler sitozole yayılır (Pistritto ve ark, 2016). Pro-apoptotik faktörler olan sitokrom c, apoptozis indükleyici faktör (AIF), ikinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü (Smac) ve apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) gibi bu proteinler apoptozis sürecine katılmak üzere mitokondriden serbest bırakılır. Mitokondriyal yolağa Bax/Bak'ın mitokondriyal zar içine sokulması ve ardından sitokrom c'nin mitokondriyal zar içi boşluktan sitozole salınması aracılık eder (Ghawami ve ark, 2009; Zeng ve ark, 2015). DNA hasarı veya büyüme faktörü yoksunluğu gibi sitotoksik iç uyaranların tespiti üzerine iki proapoptotik Bcl-2 proteini Bax ve Bak aktive olur. Bax ve Bak'ın ikisi de yüzeyinde porlar açmak üzere mitokondriye göç ederler. Bunun sonucunda membran geçirgenliği artar ve mitokondriyal intermembran alanından proteinler salınır. Mitokondriyal membran dışı membran geçirgenliğindeki değişimleri kontrol ederek intrinsik pro-apoptotik ve anti-apoptotik içsel yolağı düzenlediğinden dolayı Bcl-2 protein ailesi “apoptotik anahtar” olarak hizmet eder (Cory ve Adams, 2002; Pistritto ve ark, 2016). Bu salınan proteinlerden en önemlisi, apoptozom oluşumunu başlattığı için, sitokrom c'dir. Sitokrom c Apaf-1'e bağlanır, Apaf-1 aracılığıyla prokaspaz-9 kaspaz-9'a aktive olur. Aktif kaspaz-9 dakikalar içinde gerçekleşecek olan hücre ölümünü sürdürmek üzere kaspaz-3 ve -7'yi aktive eder ve sonucunda DNA parçalanması gerçekleşir (Orrenius, 2004).

Apoptoziste önemli rol oynayan kaspazlar başlatıcı (temel olarak apoptotik yolun başlangıcından sorumlu kaspaz-2, -8, -9 ve -10), infazcı (hücreSEL bileşenlerin parçalanmasından sorumlu kaspaz-3, -6 ve -7) ve sitokin işlemci (kaspaz-1, -4, -5 ve -11, yangıya ilişkin) olmak üzere üçe ayrılır (Zeng ve ark, 2015; Thomberry ve Laxebnik, 1998). Her üç yolak da prokaspaz-3 ve -7'nin proteolitik aktivasyonunun gerçekleştiği ortak bir yolakta birleşir (Ghawami ve ark, 2009). Kaspaz-3, -6 ve -7 aktivasyonu beraberinde poly(ADP-riboz) polimeraz, kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz (DNaz) inhibitörü, gelsolin, glikoz parçalanma ürünleri ayrışma inhibitörü (D4-GDI), epidermal büyüme faktör reseptörü gibi birçok önemli hücreSEL proteinin spesifik bölünmesini katalize eder. Kaspaz-3 (Yama ve apopain olarak da bilinir), apoptozisin yürütülmesinde merkezi bir protein olarak düşünülmektedir (Devarajan ve ark, 2002). DNA'nın parçalanmasından özellikle kaspaz-3 sorumludur. Aktif kaspaz-3'ün immunohistokimyasal değerlendirmesi apoptozisin erken evresinin tespitine izin verir (Rodrigues ve ark, 2016). Bir hücrede kaspaz aktivitesindeki hatalı düzenlemeler karsinogenez, otoimmünite, nörodejenerasyon ve immün yetmezliğe yol açabilecek potansiyelde anormal veya zamansız apoptotik hücre ölümüne neden olabilir (Parrish ve ark, 2013). Pro-kaspazlar canlı hücrelerde yaygın olarak eksprese edilir ve düşük ancak önemli proteaz aktivitesine sahiptir. Sağlıklı hücreler efektör kaspazları non-apoptotik

fonksiyonları için kullanır. Önemli kaspaz inhibitör ailelerinden biri olan apoptozis inhibitör proteinleri (IAPs) canlı hücrelerde uygunsuz kaspaz aktivasyonu ve apoptozisi önlemede gereklidir (Fuchs ve Steller, 2011).

Kaspazların aktivasyonu ve apoptozomun oluşumu adenozin trifosfat (ATP) gerektirdiğinden, apoptozis yüksek enerji gerektiren bir işlemdir. Yapılan çalışmalarda apoptozis sırasında ATP tükenmesi durumunda nekrozun indüklendiği gösterilmiştir (Long ve Ryan, 2012).

Hücre ölümü, mekanizmaları ve morfolojileri göz önüne alındığında temel olarak 3 tipe ayrılır;

-Tip I hücre ölümü ya da apoptozis: sitoplazmik büzüşme, kromatin yoğunlaşması (piknoz), nükleer parçalanma (karyoreksis) ve hücre zarı yüzeyinde çıkıntılar gösterir, fagositik aktiviteye sahip komşu hücreler tarafından alınıp lizozomlar içinde parçalanan, görünüşte bozulmamış küçük veziküllerin (genellikle apoptotik gövdeler olarak bilinir) oluşumu ile sonuçlanır.

-Tip II hücre ölümü ya da otofaji: sitoplazmik vakuolizasyon ile kendini gösterir ve benzer şekilde fagositik alım ve lizozomal parçalanma ile sonuçlanır.

-Tip III hücre ölümü ya da nekroz: diğer tiplerdeki belirgin özellikleri göstermez ve bariz bir fagositik ve lizozomal tutulum yokluğunda ölü hücrelerin ortadan kaldırılması ile sonuçlanır (Galluzzi ve ark, 2018).

Apoptoziste meydana gelen düzensizlikler ve apoptozisten kaçış hücre eliminasyonunu sekteye uğratacağından, apoptozis kanserde önemli niteliklerden biridir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Kanser hücreleri, tümör oluşumuna engel teşkil eden apoptozise paralel olarak, tipik olarak tümör gelişimini ve metastazı kolaylaştıran hatalı bir apoptotik sinyalleme ile sonuçlanan değişiklikleri barındırır (Plati ve ark, 2011).

İnsan meme tümörlerinde apoptozisin karsinogenezisteki rolü ile ilgili fikir birliği yoktur. Bazı araştırmacılar yüksek apoptotik indekslerin tümör agresifliğine ilişkin olduğunu iddia etmektedir. Ancak, bu iki özellik arasında ilişki olmadığını savunan araştırmacılar da bulunmaktadır (Rodrigues ve ark, 2016). Apoptoziste görevli proteinlerin köpek meme tümörlerindeki durumuna ilişkin yapılan çalışmalarda antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-XL) arttığı/değişmediği ve proapoptotik proteinlerin (Bax, kaspaz-8 ve -9) ise azaldığı gözlenmiştir (Yang ve ark, 2006).

2.7. Meme Tümörlerinde HER2

HER2 onkogeni epidermal büyüme faktörü reseptörü ailesine ait bir transmembran tirozin kinaz reseptörü kodlar ve bu reseptör hücre proliferasyonu, hayatta kalma, motilite ve adezyon gibi yolların sinyal iletimini aktive eder (Matsumoto ve ark, 2016). HER2 gen amplifikasyonu meme tümörlerinde daha kısa hayatta kalma süresi, yüksek nüks yüzdesi, kemoterapi ve hormon terapilerine düşük yanıtla ilişkilidir. Ayrıca HER2 proteinin aşırı ifade edildiği tümörlerde tümör kitlesinde artış ve tümör evresinin ileri derecede olduğu gösterilmiştir. HER2 reseptörünün fazla ifade edilmesi insanlarda 17. kromozom üzerinde yer alan genin amplifikasyonu sonucu oluşur. Ancak HER2 proteinin aşırı ifadesi HER2 gen amplifikasyonu olmaksızın gerçekleşebilirken bunun tersi de mümkündür. HER2 gen ve proteinin ifadesi HER2 hedefli terapi seçiminde önemlidir (Wesola ve Jelen, 2015). Her2/neu (c-erbB-2)'nin köpek meme tümörlerindeki ifadesi karsinojenik ve prognostik açıdan insan meme tümörlerine benzerdir (Antuofermo ve ark, 2007).

Köpek HER-2 gen köpek tümörlerinde sıklıkla klonal kromozomal sapmalar gösteren 1q13.1 kromozomunda yer alır (Hsu ve ark, 2009). Embriyo ve yetişkin dokularda hücre proliferasyonu ve diferensiyasyon açısından HER2 gerekli bir mediyatördür (Furrer ve ark, 2015). İnsan meme kanserlerinde hastaların %18-20'sinde ERBB2 (HER2) genin amplifikasyonu ve reseptör aşırı ifadesi görülür (Slamon ve ark, 1987). HER2'nin aşırı ekspresyonu apoptozisi inhibe ederek hücre çoğalmasını destekleyen PI3K/Akt "hayatta kalma" yolunu aktive eder (Menard ve ark, 2003).

İnsan meme tümörlerinin %20-30'unda HER2 proteininin aşırı ifadesi, HER2 geninin amplifikasyonu ya da her ikisinin birden meydana geldiği görülmüştür ve HER2'yi aşırı ifade eden tümörlere sahip hastalarda hastalıktan arı daha kısa bir süre, daha kısa hayatta kalma süresi ve kötü prognoz izlenmiştir (Piccart-Gebhart ve ark, 2005; Hsu ve ark, 2009). HER2 gen amplifikasyonu daha kısa hayatta kalma süresi, mortalite, metastazı teşvik etme, yüksek nüks yüzdesi, daha agresif seyirli hastalık ve trastuzumab, lapatinib gibi HER2 hedefli kemoterapötik ve hormon tedavilerine düşük yanıt ile ilişkilidir. HER ailesi üyelerinin metastatik potansiyeli artırmasındaki kilit rolü matriks metalloproteazlar (MMP'ler) gibi bazal membran bozunumlu enzimlerin salgılanmasını sağlama kabiliyetleridir (Menard ve ark, 2003; Wolff ve ark, 2007; Wesola ve Jelen, 2015). HER2'nin kanser hücrelerindeki yüksek ekspresyonu hücre göçüne dahil olduğunu göstermektedir (Dittmar ve ark, 2002).

Protein kinaz ailesinin üyelerinin çoğalması ve aşırı ekspresyonu gibi proto-onkogenlerin yapısındaki ve ekspresyonundaki değişikliklerin tümörlerin hem başlangıcında hem de ilerlemesinde rol oynadığı gösterilmiş olup insan meme kanserlerinde c-erbB-2 (HER2)'yi içeren tirozin kinaz genlerinin çoğaldığı bulunmuştur (Rungsipipat ve ark, 1999). İnsan meme kanserlerinde hastaların %18-20'sinde ERBB2 (HER2) geninin amplifikasyonu ve reseptör aşırı ifadesi görülür (Slamon ve ark, 1987). İn situ duktal karsinomlarda HER2 protein ekspresyonunun yüksek olması, erken karsinogeneziste önemli olabileceğini düşündürmektedir (Bertagnolli ve ark, 2011). Aşırı ekspresyon olmaksızın gerçekleşen amplifikasyon klinik açıdan önemlidir. Çünkü bu durum hastaların HER2 hedefli tedaviden yararlanmasını önler (Wesola ve Jelen, 2015). Prognostik, tahmini ve terapötik çıkarımları ele alındığında HER2'nin doğru bir şekilde değerlendirilmesi tedavi açısından önemlidir (Furrer ve ark, 2015). HER2 pozitifliğinin prognostik etkisi erken nüksün görüldüğü, ameliyattan sonraki ilk 3-4 yılla ilgilidir. Yara iyileşmesi sürecinde büyüme faktörlerinin salınımına devam etmesinin HER2 pozitif tümörleri stimüle ettiği gösterilmiştir (Menard ve ark, 2003).

2.8. Köpeklerde Meme Tümörlerinin Sınıflandırması

Köpek meme tümörleri biyolojik olarak heterojen neoplazmalardır ve histopatolojik karakteristikleri ve eksprese ettikleri moleküler markırlara göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir (Sleeckx ve ark, 2011). Klinik fenotip, invazyon, derecelendirme (grade) ve prognostik markırlar açısından köpek meme tümörlerini iyi sınıflandırmak önemlidir (Lutful Kabir ve ark, 2015).

Köpek meme tümörlerinde farklı sınıflandırmalar bulunmakla beraber yaklaşık son 20 yılda birçok veteriner patolog Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından onaylı sınıflandırmayı kullanmıştır. Goldschmidt ve ark 2011'de yayınladığı ve 2017'de güncellediği alternatif histolojik sınıflandırmaya göre ise meme tümörleri 7 adet iyi ve 23 adet kötü huylu alt tipten oluşur (Goldschmidt ve ark, 2017). Bu sınıflandırmaya göre;

2.8.1. Benign Tümörler

2.8.1.1. Basit adenom (Adenoma simple)

2.8.1.2. İntraduktal papillar adenom (Intraductal papillary adenoma)

2.8.1.3. Duktal adenom (Ductal adenoma)

- Skuamöz diferensiyasyonlu duktal adenom (Ductal adenoma with squamous differentiation)

- 2.8.1.4. Fibroadenom (Fibroadenoma)
- 2.8.1.5. Miyoepiteliyom (Myoepithelioma)
- 2.8.1.6. Kompleks adenom (adenomiyoepiteliyom) [Complex adenoma (adenomyoepithelioma)]
- 2.8.1.7. Benign mikst tümör (Benign mixed tumor)
- 2.8.2. Malign Epiteliyal Tümörler
 - 2.8.2.1. İn situ karsinom (Carcinoma in situ)
 - 2.8.2.2. Basit karsinom (Carcinoma simple)
 - Tubuler (Tubular)
 - Tubulopapillar (Tubulopapillary)
 - Kistik-papillar (Cystic-papillary)
 - Kribriform (Cribriform)
 - 2.8.2.3. Mikropapillar invaziv karsinom (Carcinoma micropapillary invasive)
 - 2.8.2.4. Solid karsinom (Carcinoma-solid)
 - 2.8.2.5. Komedokarsinom
 - 2.8.2.6. Anaplastik karsinom
 - 2.8.2.7. Kompleks adenom/mikst tümörde ortaya çıkan karsinom
 - 2.8.2.8. Kompleks karsinom
 - 2.8.2.9. Karsinom ve malignant miyoepiteliyom
 - 2.8.2.10. Karsinoma mikst tip
 - 2.8.2.11. Duktal karsinom
 - 2.8.2.12. İntraduktal papillar karsinom
- 2.8.3. Özel Tip Karsinomlar
 - 2.8.3.1. Yassı hücreli karsinom
 - 2.8.3.2. Adenoskuamöz karsinom (Adenosquamous carcinoma)
 - 2.8.3.3. Müsinöz karsinom (Mucinous carcinoma)
 - 2.8.3.4. Lipid-zengin karsinom (Lipid-rich (secretory) carcinoma)
 - 2.8.3.5. İğ hücreli karsinom (Spindle cell carcinoma)
 - Malign miyoepiteliyom (Malignant myoepithelioma)
 - Yassı hücreli karsinom-iğ hücreli varyantı (Squamous cell carcinoma-spindle cell variant)
 - Karsinom-iğ hücreli varyantı (Carcinoma-spindle cell variant)
 - 2.8.3.6. İnflamatuar karsinom (Inflammatory carcinoma)

2.8.4. Malign Mezenkimal Tümörler-Sarkomlar (Malignant Mesenchymal Neoplasms-Sarcomas)

2.8.4.1. Osteosarkom (Osteosarcoma)

2.8.4.2. Kondrosarkom (Chondrosarcoma)

2.8.4.3. Fibrosarkom (Fibrosarcoma)

2.8.4.4. Hemanjiyosarkom (Hemangiosarcoma)

2.8.4.5. Diğer sarkomlar

2.8.5 Karsinosarkom-Malign Mikst Meme Tümörü (Carcinosarcoma-Malignant Mixed Mammary Tumor)

Köpek meme tümörlerinin tanımlamasında genel olarak üç önemli terim; basit, kompleks ve miksttir. Basit terimi tümörün luminal epitelyal ya da miyoepitelyal olmak üzere tek tip hücreden olduğunu belirtir. Tümör hem luminal epitel hem de miyoepitel hücrelerden olmak üzere iki tip hücreden oluşmuşsa kompleks terimi kullanılır. Luminal epitel ya da miyoepitellerin yanında tümör bağ doku elementleri de içeriyorsa mikst tümör olarak adlandırılır (Goldschmidt ve ark, 2017).

2.8.1. Benign Tümörler

Köpeklerde benign meme bezi tümörlerine oldukça yaygın rastlanır ve benign meme bezi tümörlerinin malign meme bezi tümörlerine oranı 70/30'dur (Misdorp, 2008). Türkiye'de yapılan bir çalışmada 236 adet köpeğe ait meme bezi tümörünün 168'nin malign, 68'nin ise benign yapıda olduğu bildirilmiştir (Vural ve Aydın, 2001).

2.8.1.1. Basit adenom: Sınırları belirgin, non-infiltratif, tubul epitellerinden köken alan nodüler lezyonlardır. Köpeklerde oldukça ender görülür (Misdorp, 2008).

2.8.1.2. İntraduktal papillar adenom: Duktus lümenine doğru büyüme gösteren epitel hücrelerden oluşmuş papillar uzantılarla karakterizedir. Bu uzantılar fibrovasküler bir sap ile desteklenir (Goldschmidt ve ark, 2011).

2.8.1.3. Duktal adenom (Bazaloid adenom): Bu tümörler ilk defa progestinlerle ilgili yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Neoplastik kitle genellikle yarık benzeri lümenlerden (Misdorp ve ark, 1999), luminal ve bazal olmak üzere tek tip iki sıralı hücre kordlarından oluşur (Misdorp, 2002).

2.8.1.4. Fibroadenom: Köpeklerde yaygın olarak rastlanan bir tümör tipidir. Bu tümörlerde küboidal ya da kolumnar hücrelerden oluşan tubuller bulunur. Tubulleri çevreleyen stroma yoğun bir sellülerite gösterir (Misdorp, 2002; Gama ve ark, 2003).

2.8.1.5. Miyoepiteliyom: Bazofilik mikzoid matriksten zengin iç ya da yuvarlak şekilli miyoepitel kökenli hücrelerden oluşan bu tümörler oldukça nadir gözlenir (Goldschmidt ve ark, 2017).

2.8.1.6. Kompleks adenom: Köpeklerde yaygın görülen bu tümörler küboidal ya da kolumnar tubul epitelleri ile miyoepitel kökenli hücrelerin proliferasyonu ile karakterizedir (Aydoğan, 2010).

2.8.1.7. Benign mikst tümör: Glanduler yapılar (epitel ve miyoepitel) ile mezenkimal yapıların (kıkırdak ve kemik) benign proliferasyonu ile karakterize ve köpeklerde oldukça yaygın tümörlerdir (Moulton, 1990; Gama ve ark, 2003). Epitel komponentler genellikle küboidal ya da kolumnar epitellerden oluşan tubuller ya da kordlar şeklindedir. Miyoepitel hücreleri içden yuvarlağa değişen şekillerde ve bazı alanlarda kıkırdağa (ve kemik ve/veya adipoz doku) dönüşen bazofilik bir matriks içerisinde bulunur (Monteros ve ark, 2002).

2.8.2. Malign Epiteliyal Tümörler

2.8.2.1. İn situ karsinom: Multisentrik yayılım gösteren ve bazal membrana invazyonun olmadığı, var olan kanallarda veya lobüllerde büyüme gösteren, malign epiteliyal hücrelerden oluşan meme tümörü şeklindedir (Sorenmo, 2003). Neoplastik doku sıkıca paketlenmiş düzensiz

tubul ve kordlardan oluşur. Hücreler poligonal, yuvarlak veya küboidal şekildedir. Orta dereceden şiddetliye anizokaryozis, anizositozis mevcuttur ve mitoz sayısı değişkendir (Goldschmidt ve ark, 2017).

2.8.2.2. Basit karsinom: Tubuler, tubulopapillar, kistik papillar ve kribriform alt tipi bulunan bu tümör tek tip hücreden oluşur ve yaygın olarak görülür. Hücreler baskın olarak tubuler ya da adenoid yapılar gösteriyorsa tubuler, tubullerin lümenlerine doğru uzanan papiller yapılar baskın ise tubulopapiller olarak adlandırılır. Genişlemiş kistik tubul lümenine uzanan papillar uzantıların görüldüğü durumlarda ise kistik-papillar adını alır. Nükleer pleomorfizm belirgindir, stroma miktarında önemli derecede farklılıklar dikkati çeker. Bazı durumlarda mononükleer yangısal infiltrasyonu uyardığı görülür. Çevre dokulara ve damarlara infiltre olma eğilimi gösterirler (Martins ve ark, 2002; Polton, 2009). Çok yaygın görülmeyen, solid karsinomdan elek benzeri görünümü ile ayrılan bir diğer alt tip ise kribriform karsinomdur (Misdorp, 2002).

2.8.2.3. Mikropapillar invaziv karsinom: Dişi köpeklerde son yıllarda tanımlanan bu neoplazmalar, intraduktal alan yerleşimli, fibrovasküler yapı ile desteklenmeyen küçük papillar yapılar ile karakterizedir. Neoplastik hücreler duktal duvarlar boyunca periduktal a-kollajenöz stromaya infiltre olacak şekilde çoğalır (Goldschmidt ve ark, 2017).

2.8.2.4. Solid karsinom: Tubulus ya da lümen oluşturmada, solid yapılar şeklinde proliferasyon gösteren hücrelerden oluşan bu karsinomlar tubuler karsinoma göre daha az görülür (Goldschmidt ve ark, 2011). Stroma miktarı az ya da orta derecededir (Jones ve ark, 1997). Mitotik figürlere sıklıkla rastlanabilir ve lenfoid infiltrasyon genellikle bölge lenf yumrularına metastaz şeklindedir (Toniti ve ark, 2009).

2.8.2.5. Komedokarsinom: Neoplastik hücre topluluklarının merkezinde nekrotik sahalar ile karakterize bu tümörler ince bir fibrovasküler stroma ile sarılmıştır. Olguların çoğu tubul formasyonu göstermediğinden solid karsinomlar olarak anılır (Goldschmidt ve ark, 2017).

2.8.2.6. Anaplastik karsinom: Köpek meme karsinomlarında malignitesi en yüksek olgular olan bu neoplazmalar interlobuler bağ doku ve lenf damarlarına invazyon gösterirler. Tek tek ya da küçük demetler halinde son derece pleomorfik epitel hücrelerinden oluşur. Çok çekirdekli hücreler bulunabilir ve mitotik figürler sıktır (Milli ve ark, 2000; Misdorp, 2002; Polton, 2009; Goldschmidt ve ark, 2017).

2.8.2.7. Kompleks adenom/mikst tümörde ortaya çıkan karsinom: Kompleks adenom veya mikst bir tümörün malignant karakter kazanması ile oluşan bu neoplazmada iyi ve kötü huylu bölümler bir arada bulunur. Karsinoma dönüşme nedeniyle histopatolojik inceleme sırasında önceden var olan benign lezyonun profilini tamamen değiştirebilir (Cassali ve ark, 2014; Goldschmidt ve ark, 2017).

2.8.2.8. Kompleks karsinom: Köpeklerde sık görülebilen bu tümör, fibrovasküler bir stroma ile desteklenmiş malign epitel hücreleri ile birlikte miyoepitel hücrelerin benign proliferasyonundan oluşur. Düzensiz tubul yapıları gözlenir. Kompleks karsinomlar kompleks adenomlardan; tümörün epitel komponentlerinin atipisi infiltratif gelişme, yüksek mitotik aktivite, yüksek oranda sellülarite ve nekrozların varlığı ile ayrılırlar. Özellikle iyi differensiye kompleks karsinomlar ile kompleks adenomların ayırımı oldukça önemlidir (Misdorp, 2002; Goldschmidt ve ark, 2017).

2.8.2.9. Karsinom ve malignant miyoepiteliyom: Epitelyal ve miyoepitelyal komponentlerin birlikte malign karakter gösterdiği tümörlerdir (Sorenmo, 2003). Düzensiz tubuller oluşturan küboidal/kolumnar hücreler arasında interstisyumu genişleten oval/fusiform veziküler çekirdeğe sahip ikinci bir hücre popülasyonu içeren sık görülen varyantının yanında trabeküller dizilimli epitel hücrelerine periferik olarak, iğ şeklinde olan ikinci hücre popülasyonuna sahip ikinci bir varyantı da mevcuttur (Goldschmidt ve ark, 2017).

2.8.2.10. Karsinoma mikst tip: Malign epitelyal komponent ile birlikte kıkırdak ve/veya kemik içeren benign mezenkimal komponentin bir arada olduğu karsinomlardır. Düzensiz tubuller oluşturan epitel hücreleri, iğ şekilli miyoepitel hücreleri ve atipi göstermeyen

kıkırdak/kemik/adipöz doku olmak üzere üç tip hücre yapısına sahiptir. Selülarite, pleomorfizm ve artan mitotik sayı benign mikst tümörden ayırımında önemlidir (Goldschmidt ve ark, 2011).

2.8.2.11. Duktal karsinom: Küçük interlobuler ya da intralobuler duktuslardan oluşan duktal adenomun malign halidir. Tüm karsinomların sadece %19'unu oluşturmalarına rağmen, malign meme bezi karsinomundan kaynaklı ölümlerin çoğunluğunu oluşturur (Sorenmo, 2003).

2.8.2.12. İntraduktal papillar karsinom: İntraduktal papillar adenomun malign karakterli halidir. Benign türevine göre daha yüksek nükleer-sitoplazmik oran, nükleer ve hücrel pleomorfizm ve artmış mitotik figür sayısı mevcuttur (Goldschmidt ve ark, 2011).

2.8.3. Özel Tip Karsinomlar

2.8.3.1. Yassı hücreli karsinom: Köpek meme bezlerinde çok yaygın rastlanmayan bir tümör olan bu neoplazma deride ve vücudun diğer kısımlarında görülen yassı hücreli karsinomlara benzerlikler gösterir (Sassi ve ark, 2008).

2.8.3.2. Adenoskuamöz karsinom: Her türlü karsinoma tipinde oluşabilecek olan ve çok az görülen bu neoplazma türü neoplastik hücrelerin skuamöz diferensiyasyon ve malignite göstermesi ile karakterizedir (Goldschmidt ve ark, 2011).

2.8.3.3. Müsinöz karsinom: Bol miktarda ekstrasellüler müsinöz materyal içeren ve köpeklerde ender olarak rastlanan bu tümörde mukus salgılayan epitel hücreleri tek tek olabildiği gibi tubuller de oluşturabilir (Cassali ve ark, 2014). Müsinöz materyal PAS (periodic acid schiff) pozitif boyanır. Müsinöz materyalden kondroid benzeri intersellüler materyale geçişler görülebilir (Misdorp, 2002).

2.8.3.4. Lipid-zengin karsinom: Çoğu malign meme neoplazminin aksine bu neoplazm daha çok çiftleşmemiş genç köpeklerde gözlenir. Köpeklerde oldukça ender rastlanan bir tümör tipidir (Monteros ve ark, 2002). Makroskobik olarak lobüler kitlelerin kesit yüzünde içi sarı bir sıvı ile dolu, birden çok kistik alanlar içeren lobüler yapılar dikkati çeker. Mikroskobide neoplastik hücrelerin çok sayıda küçük vakuol veya çekirdeği periferite iten tek ve büyük vakuol içeren yuvarlak ila oval sitoplazma yapısında olduğu görülür (Monteros ve ark, 2003).

2.8.3.5. İğ hücreli karsinom: Miyoeitel hücrelerinden köken alan malign miyoepitelyom türünde immunohistokimyasal boyamalarla doğrulanması gereken iğ şeklinde neoplastik hücreler bulunur. Köpek meme bezlerinde oldukça ender rastlanır (Sorenmo, 2003). Mikroskobik olarak iğ (spindle) şeklindeki hücreler genellikle solid ve epitel benzeri dizilimler gösterir (Maemura ve ark, 1997; Gama ve ark, 2003). Yassı hücreli karsinom-iğ hücreli varyantında, ince bir stroma tarafından desteklenen epitel hücre adaları ve kordları bulunur. Fusiform hücreler intrasitoplazmik keratin tonofilamentler, nadiren desmozomlar üretir. Tanıda iğ hücresi kaynaklı olduğu görülen bir tümörde skuamöz farklılaşma odaklarını bulmak önemlidir. Tubular karsinoma benzer yapılar oluşturup bu yapılardaki hücrelerin fusiform tarzda olduğu varyantı ise karsinom-iğ hücreli olarak adlandırılır (Goldschmidt ve ark, 2011). Yapılan bazı çalışmalarda iğ hücreli karsinomlarda iğ şeklindeki hücrelerin büyük bir çoğunluğunun immunohistokimyasal olarak düz kas aktin ve vimentin ile kuvvetli ekspresyonu bildirilmiştir (Milli ve ark, 2000; Gama ve ark, 2003).

2.8.3.6. İnflamatuvar karsinom: Temel olarak farklı bir karsinom türü olmamakla birlikte klinik olarak yangısal seyir gösteren meme tümörleri için kullanılan bir terimdir (Misdorp, 2002). Birçok meme karsinomunda histolojik olarak görülse de özellikle anaplastik, komedo ve lipid-zengin karsinomlarda tanımlanmıştır (Goldschmidt ve ark, 2011).

2.8.4. Malign Mezenkimal Tümörler-Sarkomlar

Köpeklerde meme bezi sarkomları tüm meme bezi tümörlerinin yaklaşık %10-15'i kadardır (Misdorp, 2002). Geniş bir alanı kaplayan, sınırları belirgin, sert kıvamda tümörlerdir. En sık fibrosarkomlar ile osteosarkomlar; nadiren de kondrosarkomlar gözlenir

(Misdorp ve ark, 1973). Özellikle osteosarkomlar bölgesel lenf nodülleri ile akciğerlere metastaz yapmaları nedeniyle kötü prognoz ile değerlendirilir (Langenbach ve ark, 1998).

2.8.4.1. Osteosarkom: Köpek meme bezlerinde en sık gözlenen mezenkimal tümörler olan osteosarkomlar neoplastik hücreler tarafından osteoid üretimi ile karakterize, atipik osteoblastlardan oluşan sarkomlardır (Tateyama ve ark, 2001; Akiyoshi ve ark, 2004; Wensman ve ark, 2010). Meme bezi osteosarkomları ile diğer yumuşak doku ve kemiklerde oluşan osteosarkomlar arasında belirgin bir histolojik farklılık yoktur (Langenbach ve ark, 1998).

2.8.4.2. Kondrosarkom: Nadir görülen, multilobulasyon gösteren bir meme tümörüdür. Değişen miktarlarda bazofilik kondroid matriks görülür (Goldschmidt ve ark, 2011).

2.8.4.3. Fibrosarkom: İğ biçimindeki fibrositler ile retikulum iplikleri ve kollajen matriksten oluşan, köpeklerde retikulum ipliklerinin paralel tarzda yığınlar ya da gelişi güzel bir dağılım yaptığı tümörlerdir. Bazı olgularda matrikste ödem ve mukoid materyal gözlenebilir (Misdorp, 2002).

2.8.5. Karsinosarkom-Malign Mikst Meme Tümörü

Çoğunlukla tubuler karsinom ve osteosarkomun görüldüğü, karsinom ve sarkomun bir arada olduğu ender görülen tümörlerdir (Goldschmidt ve ark, 2017). Makroskopik olarak kıvamları sert ve sınırları belirgindir. Mikroskopik olarak malign epitel (lümen epitel hücreleri, mioepitel hücreler) komponent ve malign mezenkimal komponentlerden meydana gelen alanlardan oluşur (Gama ve ark, 2003; Queiroga ve ark, 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan ve Doku

Çalışma kapsamında 6 yıllık süreç içinde (2013-2019) Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarına meme tümörü şüphesi sonucu mastektomi yapıp gönderilerek rutin incelemeye alınan 42 adet köpeğe ait biyopsi materyali incelenmiştir. Makroskobik olarak incelenen materyaller trimlenerek % 10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edilmiş, rutin takip işlemleri sonunda parafine gömülerek bloklar halinde arşivlenmiştir. Bu çalışmanın olgularını oluşturan biyopsilerin alındığı köpeklere ait bilgiler olgu numaraları ile Tablo 1 ve 2'de verilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Histopatolojik İnceleme

Doku örnekleri 12-24 saat boyunca % 10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edilerek trimlendi. Akan suda 6-8 saat süre ile yıkanan dokular doku takip cihazına (Leica TP1020) alınarak artan derecelerde alkol solüsyonları (70°, 80°, 90°, 96° ve 100°) ve seri ksilol uygulamalarından sonra parafine gömülerek bloklandı. Bu bloklardan 4-5 µm kalınlığında alınan kesitler (mikrotom, Leica RM 2135) lamlara aktararak hematoksilen ve eozin (HE) ile boyandı (Luna, 1968). Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda (Olympus BX51) incelendi ve elde edilen dijital fotoğraflar (Olympus SC180) elektronik ortamda arşivlendi. Tümörlerin histopatolojik tanısı Goldschmidt ve ark tarafından 2017'de yayınlanan ve WHO'nun insan meme kanserlerinin sınıflandırmasında kabul ettiği yöntemin köpek meme tümörlerine uyarlanması ile oluşturulan güncel sınıflandırmaya göre yapılmıştır.

3.2.2. İmmunohistokimyasal İnceleme

Parafin bloklardan alınan seri kesitlerden (mikrotom, Leica RM 2135) bir kısmı Poly-L-lysin'li (Sigma-Aldrich) lamlara aktararak immunohistokimyasal boyamalarda kullanıldı. Boyamlar Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) yöntem hazır test kiti ile üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi (Histostain-Plus 3rd Gen IHC Detection Kit, Invitrogen). Testin her basamağı nem kamarasında gerçekleştirildi ve işlemler arasında doku kesitleri 3x3 dakika süreyle tamponlu fosfat solüsyonu (Phosphate buffer saline, PBS-pH 7,2) ile yıkandı. Parafin kesitler deparafinizasyon için ksilol serilerinden ve rehidrasyon için artan derecelerde alkol serilerinden geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi amacıyla kesitler PBS'te hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) solusyonu ile 30 dakika boyunca karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra antijenik determinantların açığa çıkarılması için doku kesitleri mikrodalga fırın yardımıyla (800 watt, 10 dakika) sitrat tampon solüsyonunda (pH 6.0) 95 °C'ye çıkarıldı. Takibinde 95 °C su banyosuna alınarak 20 dakika bekletilen kesitler süre sonunda 20 dakika dışarıda bekletilerek oda sıcaklığına ulaşıldı. PBS ile yıkanan kesitler spesifik olmayan antijenik bağlanmaları önlemek için kit içeriğindeki blok solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Primer antikor aşamasında kesitler anti-human HER2 protein ile +4 °C'de gece boyunca; anti-caspase 3, anti-caspase 8 ve anti-caspase 9 antikorları ile 37 °C'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Süreç sonunda kesitlere biotinlenmiş sekonder antikor oda sıcaklığında 30 dakika boyunca uygulandı. Sonraki adımda dokular streptavidin-peroksidaz konjugat ile kaplandı ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Kromojenik reaksiyon için kesitlere 3-5 dakika 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Invitrogen® DAB plus Substrate Kit)-H₂O₂ substratı uygulanarak reaksiyon varlığı teyit edildikten sonra işlem sonlandırıldı. Mayer's hematoksilin ile karşıt boyaması yapılan dokular alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi; ksilol serilerinden geçirilerek şeffaflandırıldı ve yapıştırıcı (Entellan-Merck) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelenerek gerekli görülenlerden dijital fotoğraflar (Olympus SC180) alındı ve bilgisayara aktarıldı. Aynı koşullarda ve aynı işlem basamakları ile hazırlanan tüm kesitlerde Tablo 3'de verilen markırların dokulardaki ekspresyon yoğunlukları değerlendirildi. Kaspaz-3, 8 ve 9 için semikantitatif olarak elde edilen bulgular ekspresyona bağlı olarak skorlandı. Buna göre;

- 0; Boyanma yok/negatif
- +1 (Hafif şiddette boyanma); Hücrelerin %25'ine kadar oranda boyanma göstermesi
- +2 (Orta şiddette boyanma); Hücrelerin %26-50 oranında boyanma göstermesi

- +3 (Güçlü boyanma); Hücrelerin %51'i ve daha fazlasında boyanma şeklinde bir değerlendirme yöntemi oluşturuldu.

HER2 değerlendirmesi insanlardakine benzer şekilde Dünya Sağlık Örgütü'nün öngördüğü değerlendirmede belirtildiği gibi;

- 0; Boyanma yok

- +1; Tümör hücrelerinin bir miktarında zayıf, tam olmayan, solgun membran boyanması

- +2; Tümör hücrelerinin %30'una kadar oranda güçlü ve tam membran boyanması (kümes teli görünümü) / hücrelerin en az %10'unda zayıf veya orta heterojenlikte tam membran boyanması

- +3; Tümör hücrelerinin %30'undan fazlasında güçlü, tam ve homojen membran boyanması (kümes teli görünümü)

kriterlerine göre ve sadece +3 skorlu olanlar HER2 pozitif olacak şekilde değerlendirildi (Pena ve ark, 2014).

Tablo 1. Çalışma olgularını oluşturan hayvanlara ait bilgiler ve gelişmiş olan adenokarsinomların sınıflandırılması.

Olgu no	İrk	Yaş	Sınıflandırma
1 (20/19)	Cocker	8 yaşlı	Tubuler karsinom
2 (258/16)	Melez	10 yaşlı	Tubuler karsinom
3 (146/15)	Melez	Bilinmiyor	Tubuler karsinom
4 (289/16)	Melez	7 yaşlı	Tubuler karsinom
5 (297/13)	Melez	13 yaşlı	Tubuler karsinom
6 (161/13)	Melez	Bilinmiyor	Tubuler karsinom
7 (137/14)	Melez	10 yaşlı	Tubulopapiller karsinom
8 (146/17)	Dogo Argentino	6 yaşlı	Tubulopapillar karsinom
9 (284/17)	Golden Retriever	4 yaşlı	Kompleks karsinom
10 (176/15)	Terrier	9 yaşlı	Kompleks karsinom
11 (105/18)	Terrier	9 yaşlı	Kompleks karsinom
12 (33/18)	Melez	Bilinmiyor	Kompleks karsinom
13 (143/17)	Golden retriever	10 yaşlı	Kompleks karsinom
14 (63/13)	Melez	11 yaşlı	Kompleks karsinom
15 (113/17)	Terrier	10 yaşlı	Karsinoma mikst tip
16 (420/15)	Terrier	6 yaşlı	Karsinoma mikst tip

Tablo 1. Çalışma olgularını oluşturan hayvanlara ait bilgiler ve gelişmiş olan adenokarsinomların sınıflandırılması (devam).

17 (237/13)	Cocker	7 yaşlı	Karsinoma mikst tip
18 (175/17)	Av köpeği	8 yaşlı	Karsinoma mikst tip
19 (51/18)	Melez	Bilinmiyor	Karsinoma mikst tip
20 (35/18)	Melez	Bilinmiyor	Karsinoma mikst tip
21 (283/15)	Melez	8 yaşlı	Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma
22 (132/16)	Terrier	7 yaşlı	Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma
23 (43/16)	Terrier	16 yaşlı	Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma
24 (119/13)	Terrier	10 yaşlı	Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma
25 (62/13)	Melez	16 yaşlı	Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma
26 (123/17)	Poodle	5 yaşlı	Karsinosarkom
27 (10/17)	Cocker	12 yaşlı	Karsinosarkom
28 (180/13)	Melez	7 yaşlı	Karsinosarkom
29 (391/15)	Golden Retriever	9 yaşlı	Duktal karsinom
30 (84/18)	Terrier	12 yaşlı	Duktal karsinom
31 (285/17)	Melez	9 yaşlı	İntraduktal papillar karsinom
32 (104/16)	Melez	11 yaşlı	Intraduktal papiller karsinom
33 (108/15)	Terrier	11 yaşlı	Anaplastik karsinom
34 (121/17)	Golden retriever	12 yaşlı	Anaplastik karsinom
35 (140/17)	Melez	9 yaşlı	Solid karsinom
36 (145/18)	Golden retriever	12 yaşlı	Komedokarsinom

Tablo 2. Çalışma olgularını oluşturan hayvanlara ait bilgiler ve gelişmiş olan adenom ve benign değişimlerin sınıflandırılması.

Olgu no	İrk	Yaş	Sınıflandırma
1 (61/18)	Terrier	10 yaşlı	Adenom
2 (280/17)	Terrier	7 yaşlı	Hiperplazi
3 (213/13)	Terrier	13.5 yaşlı	İntraduktal papiller adenom
4 (281/17)	Pekiness	9,5 yaşlı	Benign mikst tümör
5 (157/16)	Terrier	6 yaşlı	Kompleks adenom
6 (32/18)	Melez	Bilinmiyor	Premalignant

Tablo 3. Kullanılan markırlar, sulandırma oranları, hücresel lokalizasyonları ve markaları.

Antikor	Sulandırma Oranları (PBS'te)	Hücresel Lokalizasyon	Marka
HER2	1/1000	Hücre membranı	Dako A0485
Caspase 3	1/100	Sitoplazma	Novus Biologicals NB600-1235
Caspase 8	1/100	Sitoplazma	Bioss bs-0052R
Caspase 9	1/100	Sitoplazma	Bioss bs-0049R

3.2.3. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling Assay (TUNEL)

Dokuda apoptotik hücreler bu hücrelerde DNA kırılmalarını göstermek için TUNEL yöntem ticari kit (Millipore “ApopTag® Plus Peroxidase İn situ Apoptosis Detection Kit”) kullanılarak saptandı. Histokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler için parafin bloklardan alınan seri kesitlerden TUNEL reaksiyon için ayrılan preparatların deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerini takiben dokular distile sudan geçirildi. Ardından proteinaz K (20 µg/ml) ile oda ısısında 15 dakika inkube edilen kesitler 2x2 dakika PBSxTween 20 ile yıkandı. Hidrojen peroksidaz aktivasyonunu önlemek amacıyla kesitler %3'lük H₂O₂ solüsyonunda 10 dakika süreyle karanlıkta tutuldu ve 3x2 dakika PBSxTween 20 ile yıkandı. TUNEL reaksiyon karışımı [Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve Biotin-11-dUTP] her bir doku kesitine 50'şer µl olacak şekilde kaplanarak 37 °C'de 1 saat nemli kamarada inkubasyona bırakıldı. Reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 2xSSC (salin sodyum sitrat) kullanıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkubasyona bırakılmak üzere preparatlara HRP (horseradish peroxidase) streptavidin ve yardımcı bileşenler ile hazırlanmış boyama solüsyonu uygulandı. Son olarak PBSxTween 20 ile 3x2 dakika yıkanan kesitler kromojenik reaksiyon için reaksiyonun varlığı ışık mikroskobu ile kontrol edilerek 5-10 dakika süreyle DAB solüsyonunda tutuldu. Reaksiyon teyidi sonrası dokular PBSxTween 20 ile 3x2 dakika yıkanarak karşıt boyama Mayer's hematoksilen ile gerçekleştirildi. Alkol ve ksilol serileri ile dehidre edilip şeffaflandırılan kesitler lamelle kapatıldı. Negatif kontrol için aynı prosedür terminal transferazı içermeyen TUNEL reaksiyon karışımı ile gerçekleştirildi.

Semikantitatif TUNEL değerlendirmeleri mikroskopta x40 büyütmede gerçekleştirildi. Bu amaçla 10 adet alanda apoptotik hücre sayımı yapılarak ortalamaları alındı. Buna göre;

- 0; Negatif
- +1 (Hafif); 1-3 apoptotik hücre
- +2 (Orta); 4-7 apoptotik hücre
- +3 (şiddetli); 8 ve daha fazla apoptotik hücre şeklinde bir değerlendirme şeması oluşturuldu.

3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme

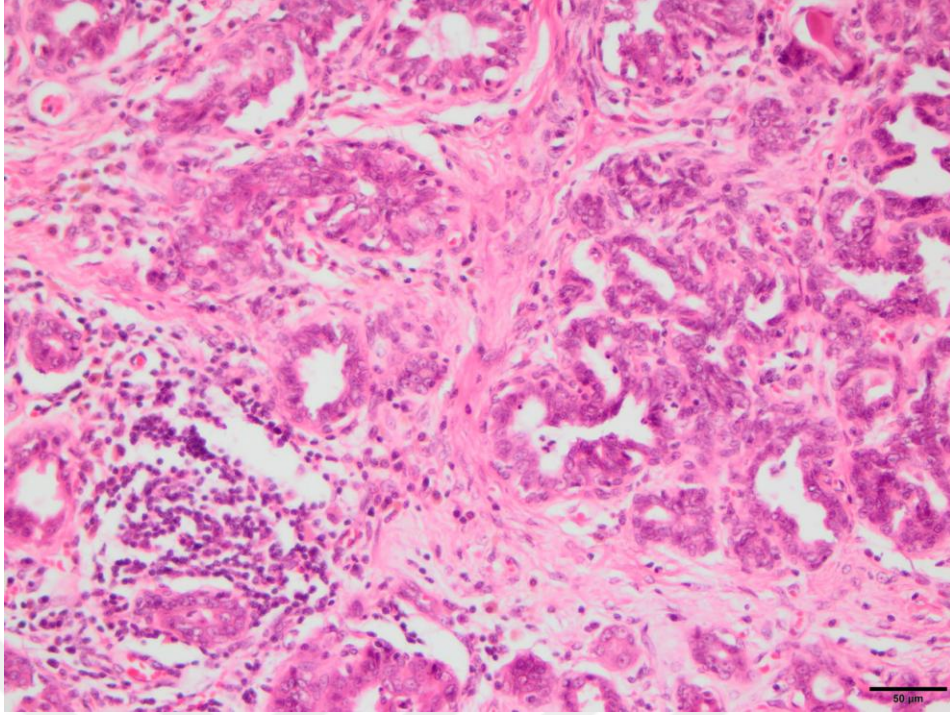
Veriler ortalama değer $\pm$ standart hata ya da ortanca (minimum-maksimum değer) şeklinde sunuldu. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk-W testi ile değerlendirildi. Verilerin analizinde non-parametrik testlerden Mann Whitney-U testi kullanıldı. HER2 ekspresyonu ile TUNEL pozitif hücre sayısı arasındaki ilişki Spearman korelasyon testi ile analiz edildi. Tüm analizlerde SPSS 22.0 paket programı kullanıldı. $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

Çalışmada kullanılan farklı yaşlarda ve ırklardaki köpeklere ait 42 adet meme biyopsisi materyali histopatolojik olarak son güncel sınıflandırmaya göre değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda bu tümörlerin 36 tanesi adenokarsinom, 6 tanesi ise benign meme tümörü ve değişimler olarak sınıflandırıldı. Malign olarak değerlendirilen tümörlerin olgulara göre dağılımı; 8'i tubuler karsinom (olgu no: 1-8); 6'sı kompleks karsinom (olgu no: 9-14); 6'sı karsinoma mikst tip (olgu no: 15-20); 5'i karsinoma ve malignant miyoepiteliyoma (olgu no: 21-25); 3'ü karsinosarkom (olgu no: 26-28); 2'si duktal karsinom (olgu no: 29, 30); 2'si intraduktal papillar karsinom (olgu no: 31, 32); 2'si anaplastik karsinom (olgu no:33, 34); biri solid karsinom (olgu no: 35); biri komedokarsinom olarak sınıflandırıldı (Tablo 1).

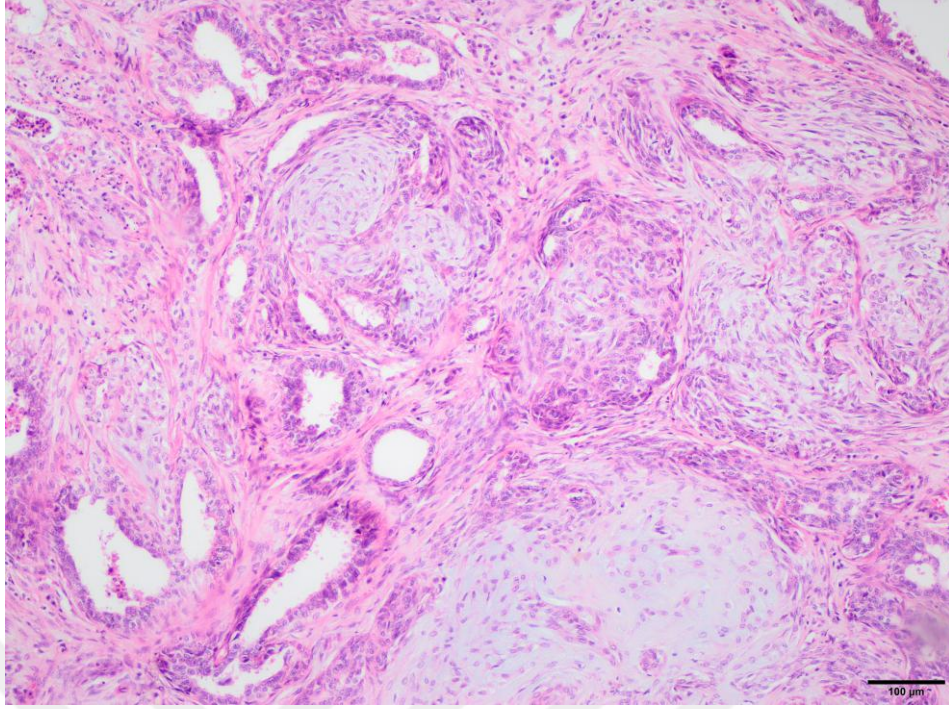
Tubuler karsinom olgularında kübik ya da kolumnar neoplastik epitel hücrelerinin değişik çapta tubuller oluşturduğu, bazı olgularda ise bu tubul lümenlerinde papillar uzantıların dikkati çektiği görüldü (olgu no: 7, 8). Tümörü oluşturan kesitlerin bazı alanlarında kistik tubuler dilatasyonlar da mevcuttu. Bu dilate tubulusların merkezinde nekrotik ve/veya atipik epitel hücreleri de görüldü. Tubulusları oluşturan epitel hücrelerinde anaplastik özellikler belirgindi. Nükleusları farklı şekil ve büyüklükte ve boyanma özellikleri hipokromatik/hiperkromatik olup çekirdekteki nükleolus sayıları değişkenlik göstermekte idi. Atipik mitoz/mitoz gösteren düşükten yükseğe neoplastik hücreler tanımlandı. Düzensiz tubul yapıları stroma ile desteklenmekteydi. 2 numaralı olgu hariç tüm olgularda stromada tümör adacıklarını kuşatmış şekilde ya da tümör içine infiltre olmuş mononükleer yangısal hücre infiltrasyonlarına rastlandı (Resim 1).



Resim 1. Tubuler karsinom; düzensiz tubuler yapılar oluşturan epitel hücre proliferasyonları; olgu no: 1, HE.

Kompleks karsinom olarak belirlenen olgularda (olgu no: 9-14), anaplazik özellikleri belirgin epitel hücrelerinin tubul formasyonları ile birlikte miyoepitel hücrelerinin benign proliferasyonu görüldü. Yer yer yangısal hücre infiltrasyonlarının görüldüğü fibrovasküler stroma belirgindi. Düzensiz tubuler yapılarda yüksek oranda sellülarite, atipi ve yüksek mitotik aktivite gözlemlendi. Epitel hücrelerinde fokal ya da multifokal nekrozlar mevcuttu. Bazı olgularda (olgu no: 9, 10, 11) tubuler yapıları oluşturan hücrelerin iyi differensiye oldukları gözlemlendi.

Düzensiz tubuller oluşturan anaplastik epitelilerle birlikte belirgin mezenkimal dokuya sahip olduğu görülen karsinoma mikst tip olgularında (olgu no: 15-20) malign tubuler/tubulopapiller epitelial hücreler ile birlikte kıkırdak/kemik içeren benign mezenkimal dokunun bir arada olduğu karsinomlar tanımlandı. Tümöral sahalar düzensiz tubulleri ya da tubulopapiller yapıları oluşturan atipik karakterdeki malign epitel hücreleri, neoplastik özellik göstermeyen iç şekilli miyoepitel hücreleri ve kıkırdak/kemik dokulardan oluşmuştu (Resim 2). Tanımlanan mezenkimal dokuya yer yer adipöz doku da katılmıştı.



Resim 2. Karsinoma mikst tip; malign epitelyal komponent ve benign kıkırdak komponent; olgu no: 16, HE.

Epitel ve miyoepitel hücrelerinin birlikte malignite gösterdiği ve karsinoma ve malignant miyoepiteliyoma olarak değerlendirilen olgularda (olgu no: 21-25) epitellerin düzensiz tubuller oluşturduğu dikkati çekerken; intersitisyum yerleşimli iç çekirdekli, anizokaryozisi belirgin miyoepitellerin varlığı görüldü. Neoplastik epitel hücrelerin oluşturduğu düzensiz tubuler yapılar arasında interstisyumu genişleten oval/fusiform veziküler çekirdeğe sahip ikinci bir malign neoplastik hücre popülasyonu tanımlandı. Neoplastik miyoepitel hücrelerin bu dizilimlerinin yanı sıra trabeküler diziliimli epitel hücrelerine periferik olarak iç şeklinde kuşatan alanlar da mevcuttu.

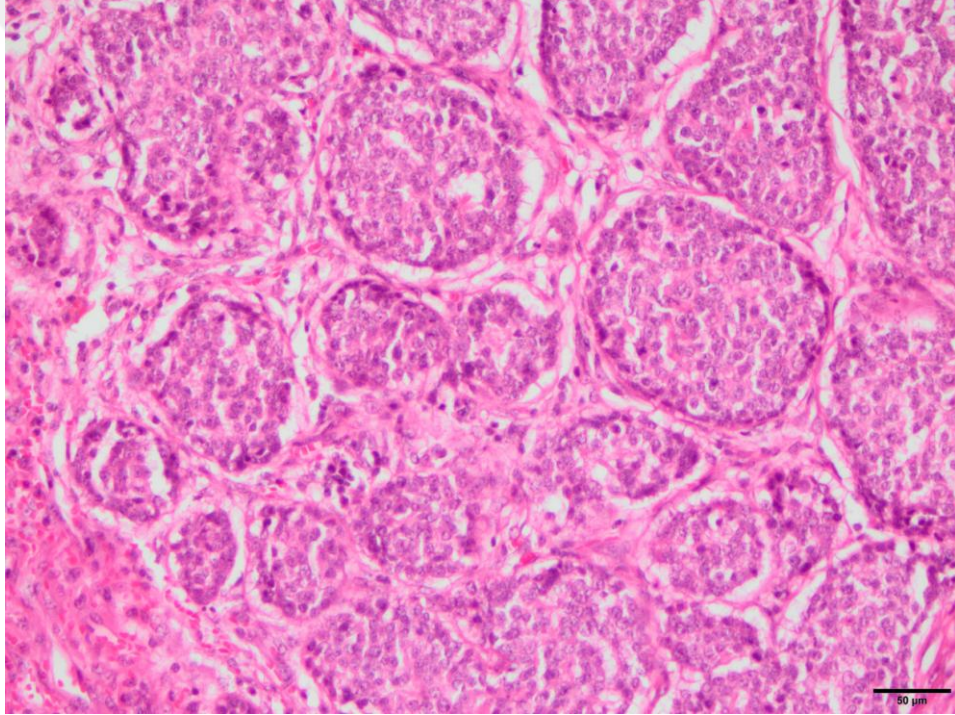
Karsinosarkom olgularında düzensiz malign tubuler yapılara yine malign özellikteki miyoepitel, kondroid/osteoid neoplastik doku eşliği tanımlandı. Karsinomatöz ve sarkomatöz alanların bir arada bulunduğu bu olgularda epitel hücrelerinin tubuler ya da solid alanlar oluşturduğu görüldü. Sarkomatöz alanda kemik ve kıkırdak yapıları bir aradaydı. Epitel hücrelerinde pleomorfizm belirgindi. Mitotik aktivite yüksekti. Bazı olgularda bu görüntülere yangısal mononükleer hücre infiltrasyonları eşlik etmekteydi (olgu no: 27, 28).

Duktal karsinom olgularında (olgu no: 29-32) neoplastik hücre toplulukları yarıklanmaya benzer lümenlere sahip düzensiz kordonlar ve tubuller oluşturmaktaydı. Atipik neoplastik duktal epitel hücrelerinin genellikle çok katmanlı yapı gösterdiği gözlemlendi.

Neoplastik epitel hücrelerinde anizokaryozis, anizositozis ve mitoz belirgindi. İntraduktal papillar karsinomlu olgularda ise düzensiz duktal yapıların lümenlerine doğru uzayan karakterde fibrovasküler stroma ile desteklenmiş papillar yapılar gözlemlendi.

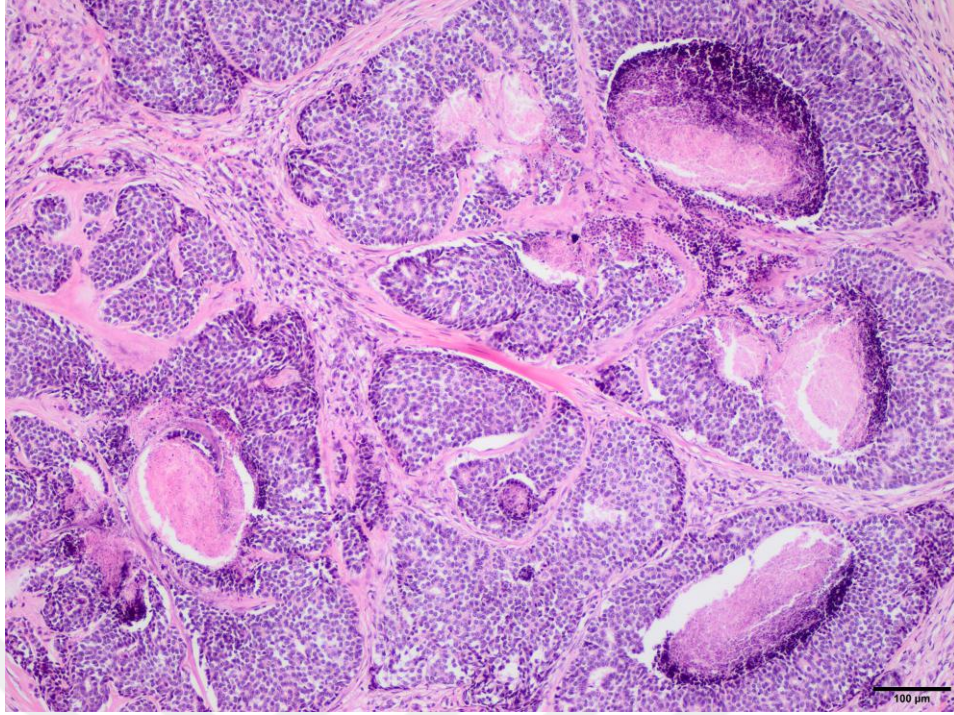
Anaplastik karsinom olgularında (olgu no: 33,34) interlobüler bağ dokuya invaze olmuş neoplastik hücrelerin ovalden poligonale değişen yapıda olduğu, bireysel ya da küçük hücre grupları olarak yer aldığı belirlendi.

Solid karsinom olarak değerlendirilen bir olguda (olgu no: 35) malign neoplastik epitel hücrelerinin tubulus ya da lümen oluşturmada solid yapılar şeklinde proliferasyon gösterdiği, oluşan adacıkların çevresinin stroma ile desteklendiği görüldü (Resim 3). Belirgin anaplaziye sahip neoplastik hücrelerin nükleusları hiperkromatik ve mitotik aktiviteleri yüksekti. Bazı solid hücre adalarının merkezlerinde koagülatif nekroz alanlarının şekillendiği gözlemlendi.



Resim 3. Solid karsinom; solid epitel hücre proliferasyonları; olgu no: 35, HE.

Olgu no 36'da tanımlanan komedokarsinom alt tipinde ise tubul yapısı göstermeyen solid alanlar halindeki neoplastik epitelyal hücre topluluklarının merkezinde nekrotik alanların varlığı belirgindi (Resim 4).



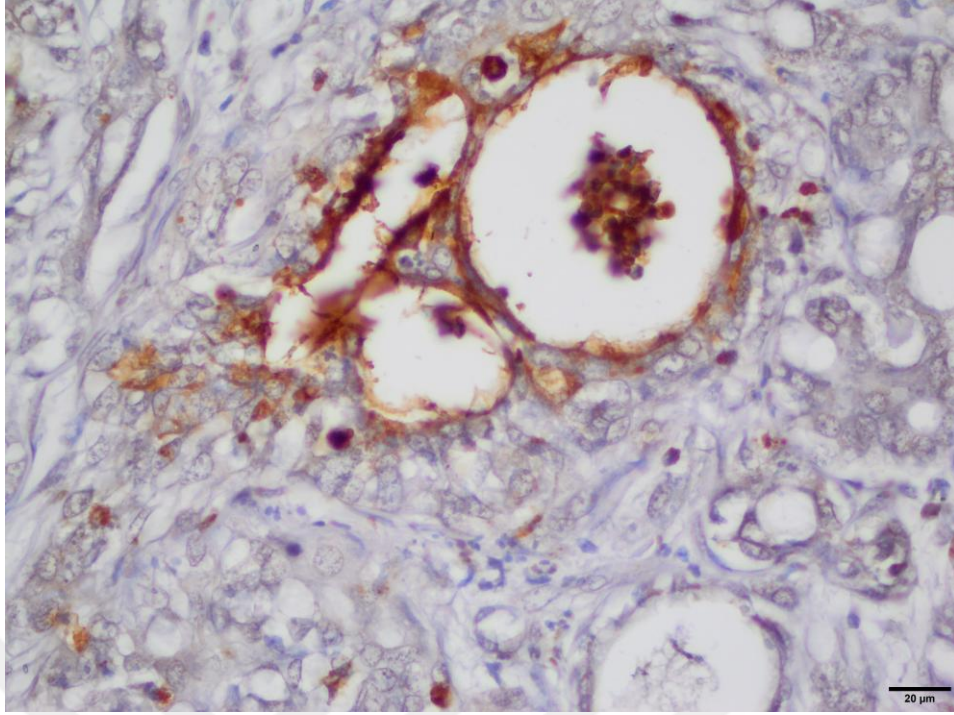
Resim 4. Komedokarsinom; merkezinde nekrotik sahalar ile karakterize neoplastik hücre toplulukları; olgu no: 36, HE.

Benign olarak sınıflandırılan 6 olgunun olgulara göre dağılımı; biri adenom (olgu no: 1); biri hiperplazi (olgu no: 2); biri intraduktal papiller adenom (olgu no: 3); biri benign mikst tümör (olgu no: 4); biri kompleks adenom (olgu no: 5); biri ise premalignant (olgu no: 6) olarak sınıflandırıldı (Tablo 2). Adenom olgusunda (olgu no: 1) benign epitel hücrelerinin oluşturduğu çevre dokuya infiltrasyon göstermeyen nodüler lezyonlar mevcuttu. Tubul epitelleri küboid/kolumnar tek katlı bir dizilim göstermekteydi. Olgu no 2'de intralobuler duktus yapılarının sayıları artmıştı ve tubul yapıları düzenliydi. İntraduktal papillar adenom olgusunda (olgu no: 3) fibrovasküler stroma ile desteklenmiş benign neoplastik epitel hücrelerinin duktus lümenlerine doğru yaptığı uzantılar belirgindi. Olgu no 4'te epitelyal ve miyoepitelyal hücrelerin birlikte benign proliferasyonları izlendi. Epiteller küboid/kolumnar yapıda olup tubul formasyonu göstermekteydi. Miyopitellerin proliferasyon gösterdiği alanlarda yer yer kıkırdak yapısı da gösteren mikzoit matriks belirgindi. Kompleks adenom olgusunda (olgu no: 5) duktus epitelleri ve miyoepitellerde belirgin bir fibröz stroma ile desteklenmiş proliferasyonlar mevcuttu. Olgu no 6'da ise çoğunlukla düzenli tubuler yapılar ile birlikte yer yer anaplastik özellikler gösteren epitel hücreleri izlendi.

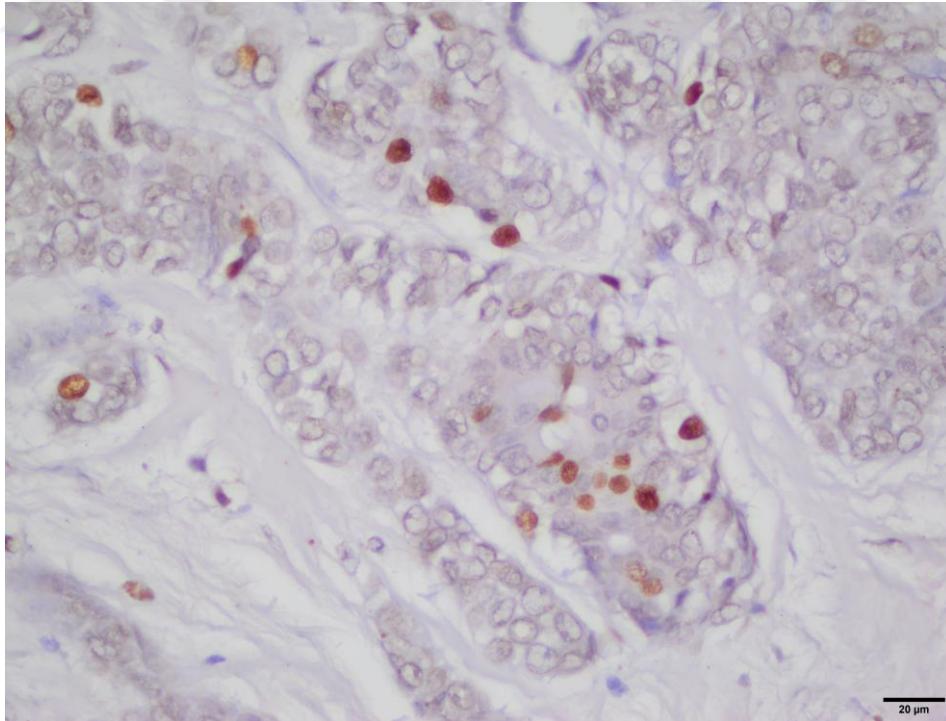
4.2. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling Assay) Bulguları

Hücre çekirdeğinde nükleozomal bölgelerden kaspazlar aracılığı ile gerçekleştirilen DNA kırılma bölgelerini işaretleyerek kromojenik reaksiyonla görünür hale getiren TUNEL reaksiyon iyi huylu ve kötü huylu meme tümörleri kesitlerine uygulandı. Her bir kesitte pozitif reaksiyonların en yoğun olduğu 10 sahada (40'lık objektif büyütme) apoptozisi işaret eden pozitif reaksiyonlar semikantitatif değerlendirme sonuçları Tablo 4'de sunulmuştur. İyi huylu meme tümörlerinde hafif pozitif reaksiyonlar (olgu no: 2, 4, 6) ya da negatif reaksiyonlar (olgu no: 1, 3) belirlendi. Yalnızca bir olguda (olgu no: 5) ise güçlü pozitif reaksiyon gözlemlendi. TUNEL pozitif reaksiyonlar kötü huylu tümörlerde düzensiz ve kontrolsüz bir şekilde proliferen olan neoplastik tubulus ve duktus epitelleri ile solid alanlar şeklinde üreme gösteren malign epitel hücrelerin çekirdeklerinde belirlendi.

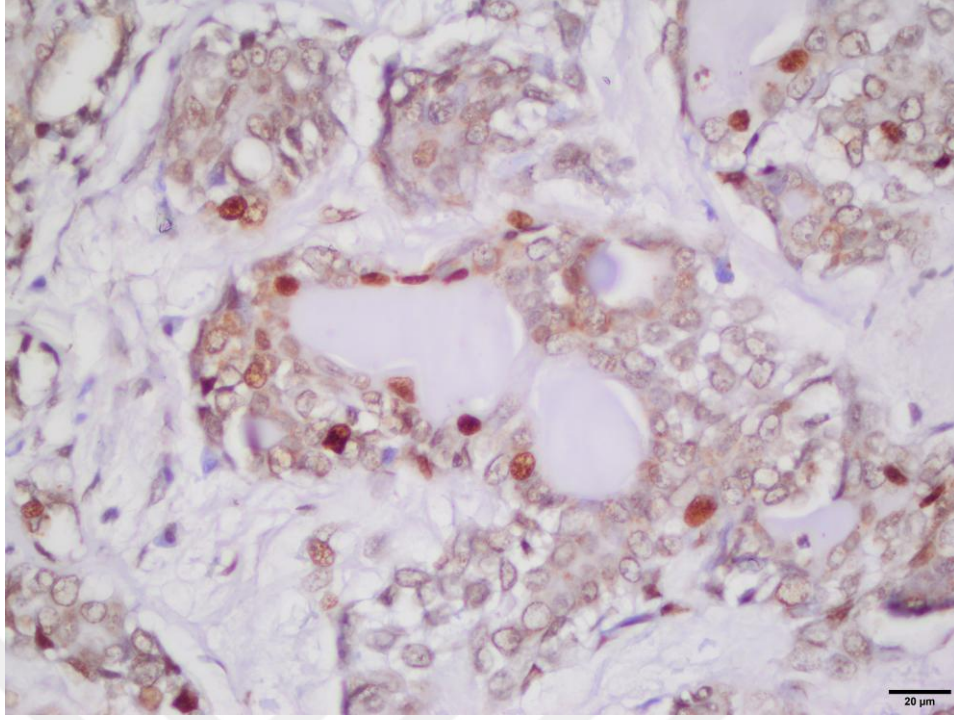
TUNEL reaksiyonlar tubuler ve tubulopapiller karsinom olgularının altısında (olgu no: 1, 2, 5, 6, 7, 8) orta derecede pozitif reaksiyonlar sergilerken; 2 olguda (olgu no: 3, 4) hafif pozitif reaksiyon gözlemlendi. Kompleks karsinom olgularında reaksiyonlar düşük ya da orta şiddette reaksiyonlardan oluşmakta idi. 3 olguda (olgu no: 9, 10, 12) orta şiddette reaksiyon izlenirken diğer 3 olguda (olgu no: 11, 13, 14) hafif dereceli pozitif reaksiyonlar mevcuttu. Karsinoma mikst tip olgularında hafiften şiddetliye kadar değişen reaksiyonlar izlendi. 4 olguda (olgu no: 15, 16, 18, 20) orta şiddetli, 1 olguda (olgu no: 17) güçlü, diğer olguda ise (olgu no: 19) hafif pozitif reaksiyonlar gözlemlendi. Karsinoma ve malignant miyoepiteliyoma olgularında da hafiften şiddetliye kadar değişen reaksiyonlar tanımlandı. 2 olguda (olgu no: 21, 23) hafif; 2 olguda (olgu no: 24, 25) şiddetli (Resim 6 ve 7) ve 1 olguda ise (olgu no: 22) orta şiddette reaksiyonlar belirlendi. Karsinosarkomlu olgularda orta ve şiddetli reaksiyonlar gözlemlendi; 2 olguda (olgu no: 27, 28) orta dereceli, 1 olguda (olgu no: 26) şiddetli pozitif reaksiyonlar tanımlandı. Duktal ve intraduktal papiller karsinom olgularında (olgu no: 29, 30, 31, 32) pozitif reaksiyonlar orta şiddetteydi (Resim 8). Anaplastik karsinom olgularında pozitif reaksiyonlar düşük ve orta şiddette belirlendi. Olgu no 33'te pozitif reaksiyonlar orta şiddette izlenirken olgu no 34'te ise hafif dereceli reaksiyonlar görüldü. Solid ve komedokarsinom olgularında ise (olgu no: 35, 36) reaksiyonlar orta şiddetteydi (Tablo 4).



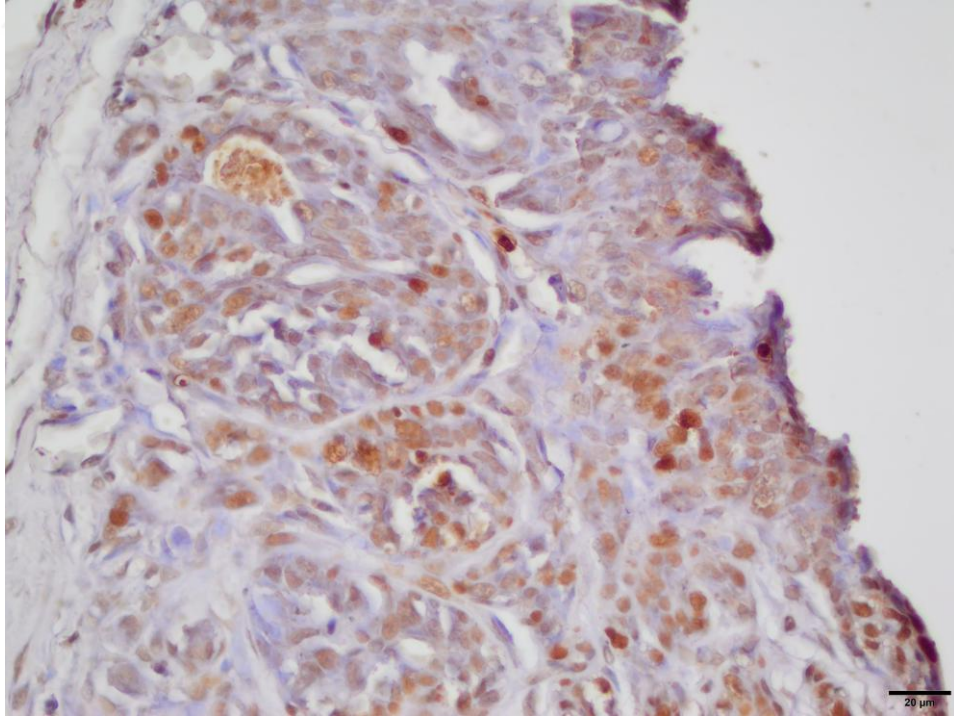
Resim 5. Kompleks karsinom; tubulus lümenlerine dökülmüş epitel hücrelerinde TUNEL pozitif reaksiyonlar; olgu no: 10, TUNEL metot.



Resim 6. Karsinoma ve malignant miyoepiteliyoma; TUNEL pozitif apoptotik reaksiyonlar; olgu no: 25, TUNEL metot.



Resim 7. Karsinoma ve malignant miyoepiteliyoma; TUNEL pozitif apoptotik reaksiyonlar; olgu no: 25, TUNEL metot.



Resim 8. Duktal karsinom; düzensiz yapılar oluşturan duktus ve tubul epitellerinde TUNEL pozitif reaksiyonlar; olgu no: 29, TUNEL metot.

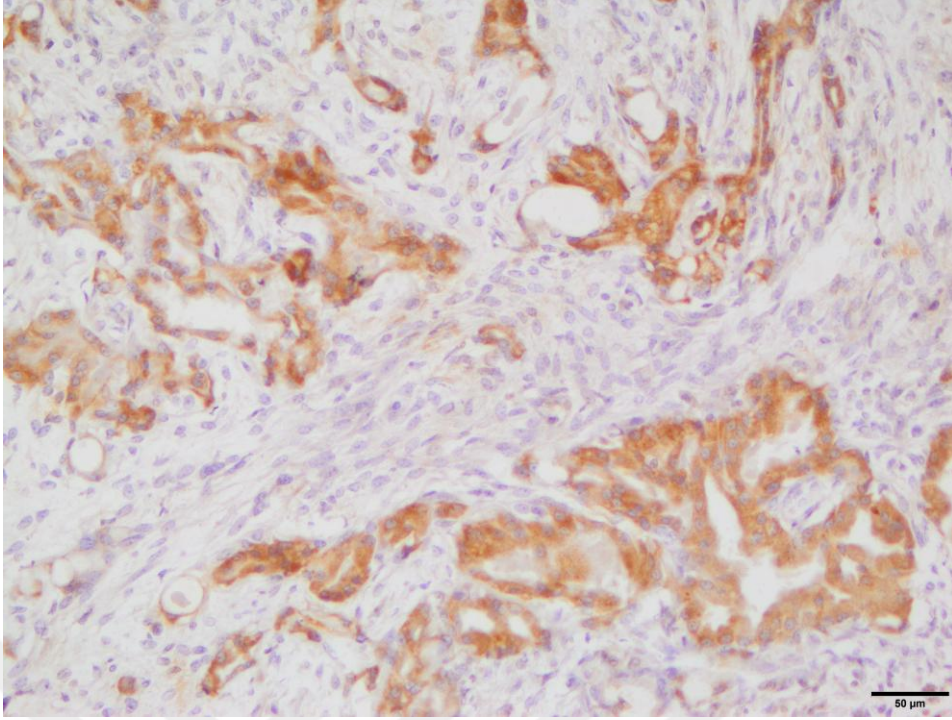
Olguların genelinde TUNEL pozitif reaksiyonlar neoplastik alanları oluşturun tubulus ve duktus epitellerinin çekirdeklerinde ve dökülmüş epitellerin çekirdeklerinde izlenirken (Resim 5) bazı olgularda (olgu no: 1, 12, 23, 25, 27, 30, 36) apoptozomlardan kaynaklı DNA kırılmaları nedeniyle sitoplazmik boyanmalar da izlendi. 24 nolu olguda miyoepitellerin çekirdeklerinde TUNEL boyama belirgindi.

Kötü huylu meme tümörü sınıflandırmaları kapsamında TUNEL reaksiyonlar genel olarak değerlendirildiğinde; tubuler ve tubulopapiller karsinom olgularında genelde orta şiddette, kompleks karsinom olgularında düşük ya da orta şiddette, karsinoma mikst ile karsinoma ve malignant miyoepiteliyoma olgularında düşükten şiddetliye kadar değişen reaksiyonlar, karsinosarkom ve duktal karsinomlu olgularda orta ya da şiddetli reaksiyonlar, anaplastik karsinomlu olgularda ise düşük ve orta şiddette pozitif reaksiyonlar şeklinde dikkati çekti. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda malign tümörlerde TUNEL pozitif hücre sayısı benign tümörlerdekine göre daha yüksek olup aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (Tablo 6).

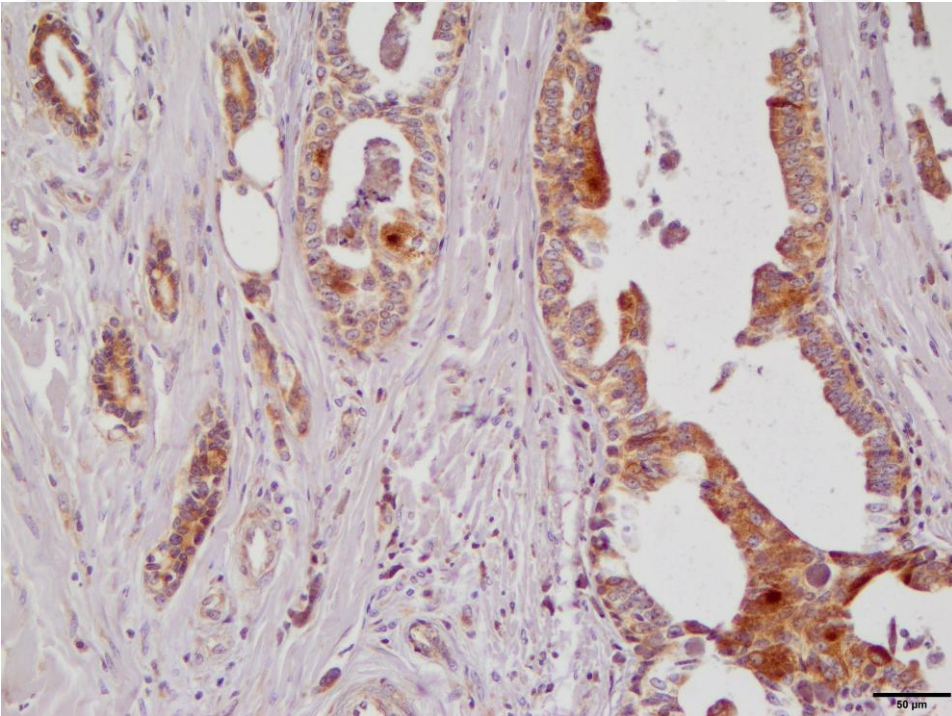
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.3.1. Kaspaz-3 Bulguları

Tablo 4'te yer aldığı şekilde kaspaz-3'ün immunoistokimyasal boyamasında malign adenokarsinomlardan sadece 5 olguda (olgu no: 5, 9, 12, 24, 26) zayıf şekilde pozitif reaksiyonlar görüldü (Resim 9), 31 olgu ise negatifti. Benign olgularda ise sadece 2 olguda (olgu no: 1 ve 5) bir alanda zayıf pozitif reaksiyon mevcuttu (Tablo 5) (Resim 10). Malign ve benign tümörler arasında kaspaz-3 ifadesi bakımından istatistiksel açıdan önemli farklılık bulunmadı (Tablo 6).



Resim 9. Kompleks karsinom; tubul epitellerinde kaspaz-3 pozitif reaksiyonlar; olgu no: 9, ABC metot.



Resim 10. Adenom; kaspaz-3 pozitif reaksiyon gösteren epitel hücreleri; olgu no: 1, ABC metot.

4.3.2. Kaspaz-8 Bulguları

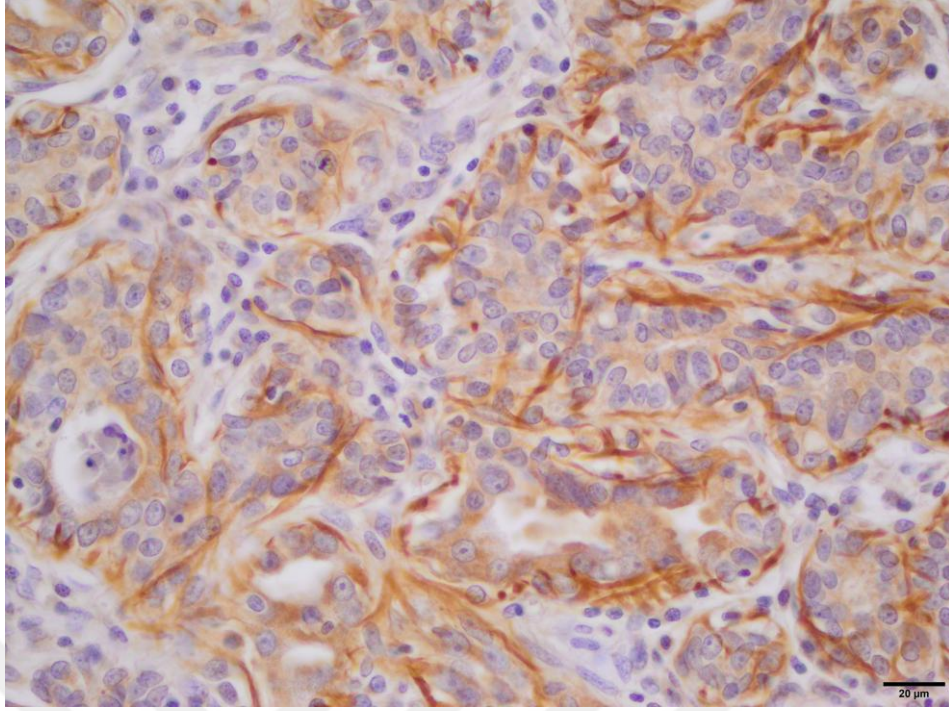
Kaspaz 8 ile yapılan immunohistokimyasal boyamada malign meme tümörlerinden 4 olguda (olgu no: 7, 14, 20, 27) negatif, 15 olguda (olgu no: 4, 6, 8, 12, 13, 17, 18, 19, 26, 28, 29, 30, 32, 34, 36) zayıf; 12 olguda (olgu no: 2, 3, 10, 11, 15, 16, 21, 22, 24, 25, 33, 35) orta ve 5 olguda (olgu no: 1, 5, 9, 23, 31) ise güçlü boyanma izlendi (Tablo 4).

Pozitif reaksiyon gösteren hücreler tubullerin bazaline yakın alanlarda granüler sitoplazmik, ancak özellikle çekirdek etrafında güçlü boyanmalar sergilemekteydi. Ayrıca infiltre olmuş makrofaj hücrelerinin sitoplazmalarında kaspaz 8 immun reaktivitesi görüldü (olgu no: 1, 10).

Çok sınırlı olarak izlenen alanda miyoepitel hücrelerinin pozitif reaksiyon verdiği, az sayıda epitel hücresinde zayıf pozitif reaksiyonların olduğu dikkati çekti (olgu no: 36).

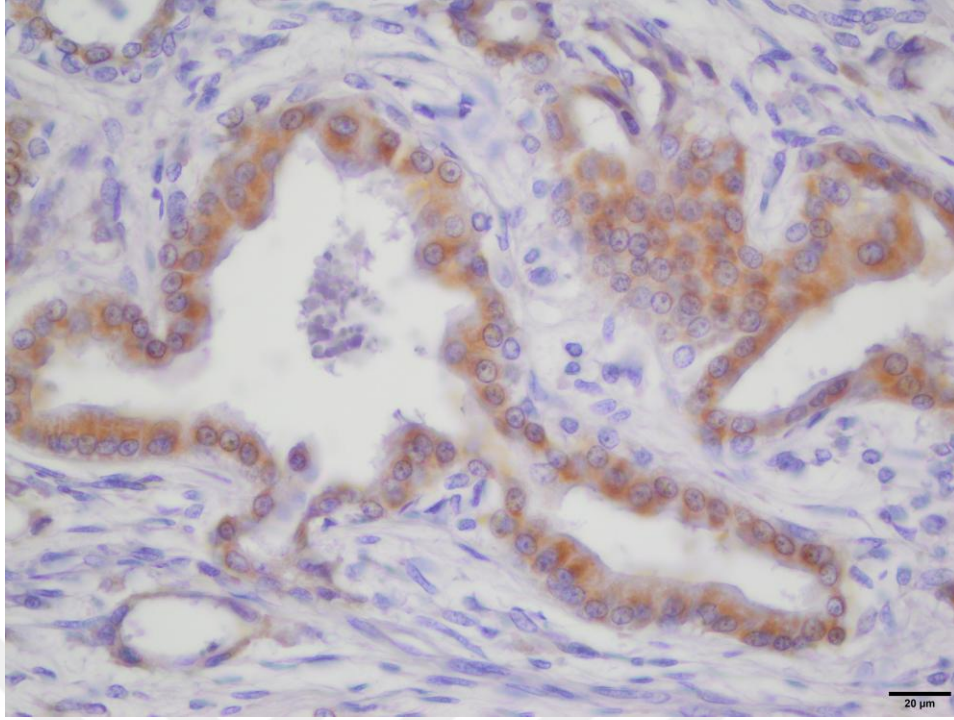
Bazı olgularda stromayı oluşturan mezenkimal hücrelerde pozitif reaksiyonlar görüldü (olgu no: 26).

Pozitif reaksiyonlar epitel hücrelerinin bazale yakın alanlarında ve miyoepitel hücrelerinde izlendi (olgu no: 1, 2, 4, 10, 12, 17, 21) (Resim 11). 13, 17 ve 30 numaralı olgularda pozitif reaksiyonlar yoğun olarak miyoepitel hücrelerinin sitoplazmalarında granüler şekilde görüldü.



Resim 11. Tubuler karsinom; epitel hücrelerinin bazale yakın alanlarında ve miyoepitel hücrelerinde kaspaz-8 pozitif reaksiyonlar; olgu no: 1, ABC metot.

Solid alanlar oluşturan tubul epitellerinde solgun sitoplazmik boyanmalar mevcuttu (olgu no: 35). Düzensiz yapılar oluşturan tubul epitellerinde ve yer yer lümene dökülmüş epitel hücrelerinde sitoplazmik boyanmalar belirgindi (olgu no: 18, 24) (Resim 12). İntraduktal papiller karsinom olarak tanımlanan 32 nolu olguda duktuslardaki papiller uzantıların epitelleri sitoplazmik pozitif reaksiyonlar sergilemekteydi.



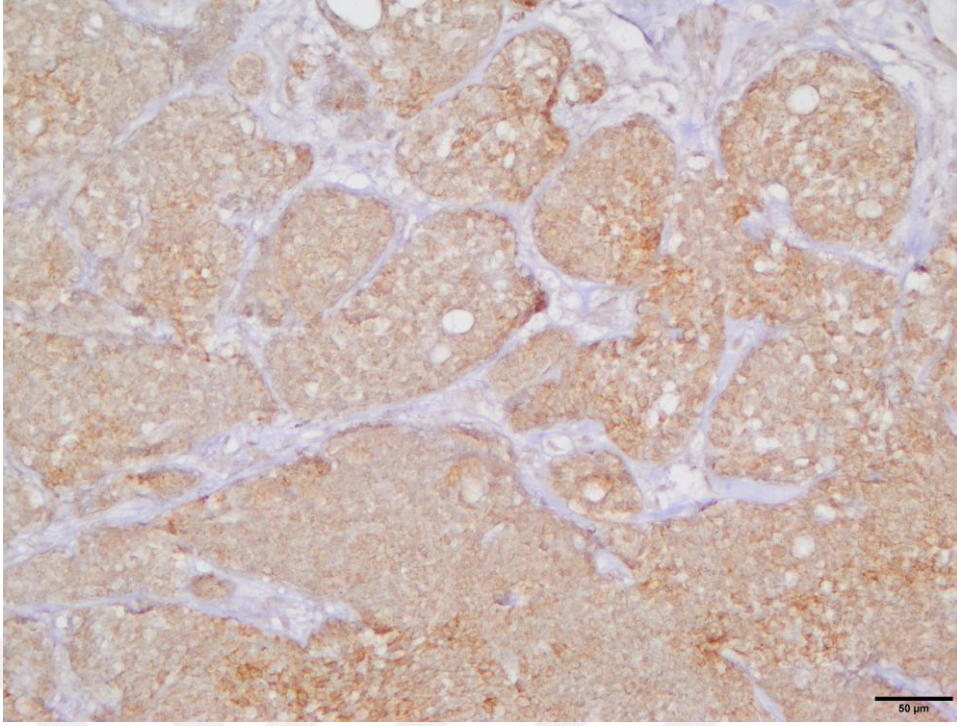
Resim 12. Karsinoma ve malignant miyoepiteliyoma; düzensiz yapılar oluşturan tubul epitellerinde kaspaz-8 pozitif sitoplazmik boyanmalar; olgu no: 24, ABC metot.

Kaspaz 8 ile yapılan immunohistokimyasal boyamada benign özellik gösteren olgularda pozitifliğe rastlanmadı (Tablo 5).

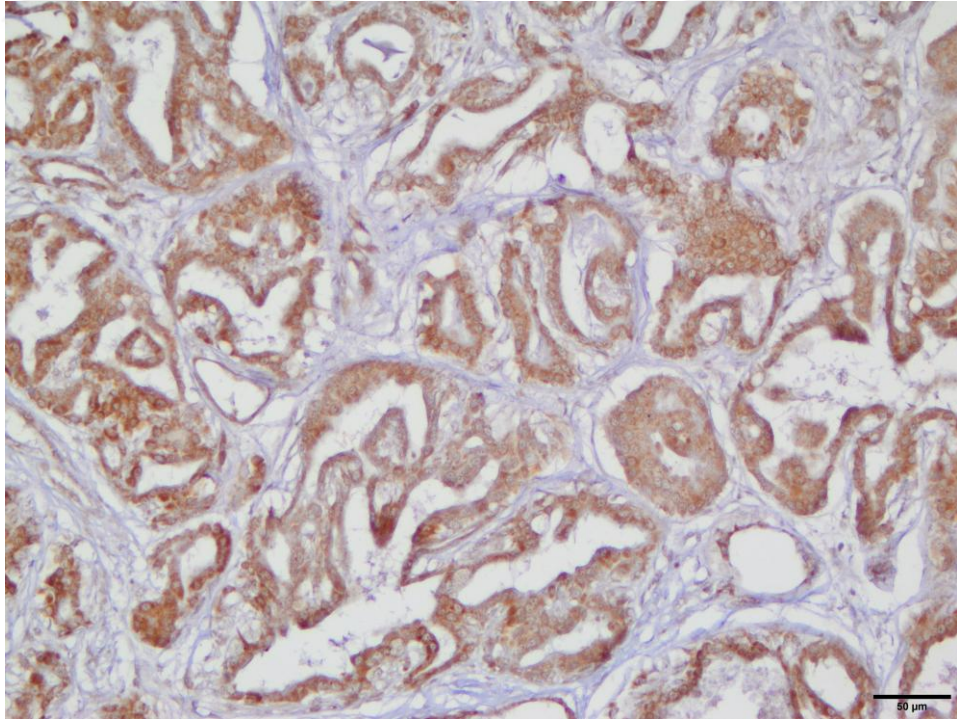
Yapılan istatistiksel analizler sonucunda; malign tümörlerde kaspaz-8 ifadesi benign tümörlerdekine göre daha yüksek olup aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (Tablo 6).

4.3.3. Kaspaz-9 Bulguları

Kaspaz 9 ile yapılan immunohistokimyasal boyamada malign meme tümörlerinden 7 olguda (olgu no: 4, 16, 23, 26, 27, 30, 36) negatif, 16 olguda (olgu no: 2, 3, 5, 9, 10, 11, 12, 19, 20, 21, 22, 25, 28, 32, 33, 34) zayıf, 10 olguda (olgu no: 1, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 17, 18, 29) orta (Resim 13) ve 3 olguda (olgu no; 24, 31, 35) ise güçlü boyanma (Resim 14) izlendi (Tablo 4).



Resim 13. Kompleks karsinom; tubul epitellerinde orta şiddetli kaspaz-9 pozitif sitoplazmik boyanmalar; olgu no: 14, ABC metot.



Resim 14. Karsinoma ve malignant miyoepiteliyoma; tubul epitellerinde güçlü kaspaz-9 pozitif sitoplazmik boyanmalar; olgu no: 24, ABC metot.

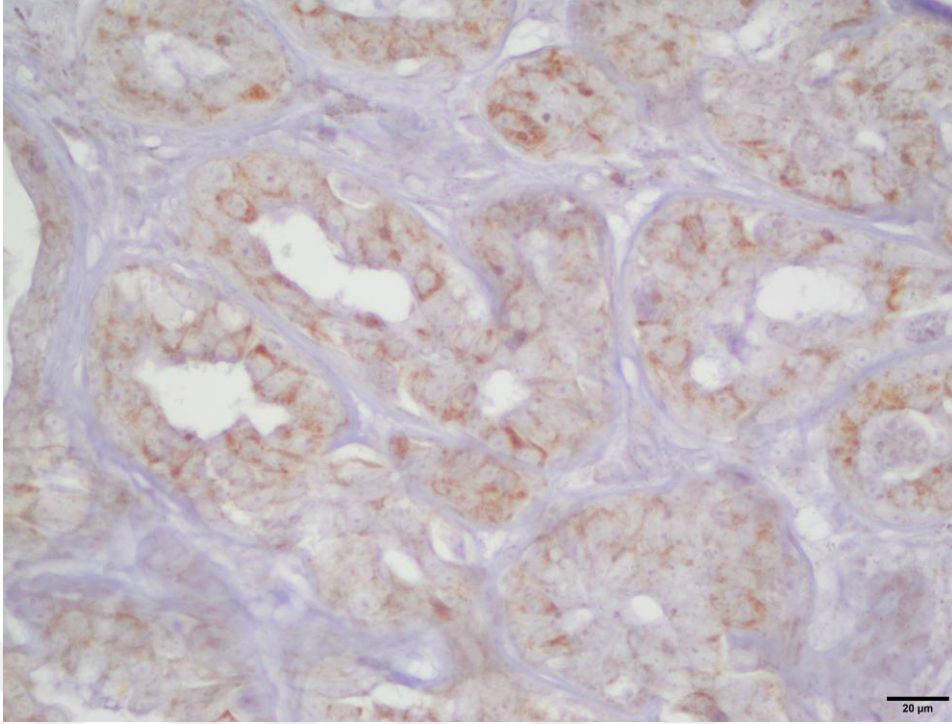
Tubulleri oluşturan epitellerin sitoplazmalarında, düzensiz tubul yapılarının merkezine yakın alanlarında ve lümeneye dökülen epitel hücrelerinin sitoplazmalarında granüler tarzda boyanmalar görüldü (olgu no: 1, 9). Bazı alanlarda sitoplazmik boyanmanın yanı sıra yaygın çekirdek boyanmaları dikkati çekti (olgu no: 10). Komedokarsinom tanımı mevcut olan 36 nolu olguda solid alanların merkezindeki nekrozlara yakın alanlardaki sitoplazmik epitel boyanmaları belirgindi. Bazı olgularda yeni hücrelerinin sitoplazmalarında granüler boyanmalar izlendi (olgu no: 8, 9, 11). 21 nolu olguda miyoepitel hücrelerinin sitoplazmalarında granüler tarzda pozitif reaksiyonlar mevcuttu.

Benign olgularda kaspaz-9 immunreaktivitesi 4 olguda (olgu no: 1, 2, 5, 6) negatif; 1 olguda (olgu no: 3) zayıf ve 1 olguda (olgu no: 4) ise orta şiddette olarak kaydedildi (Tablo 5).

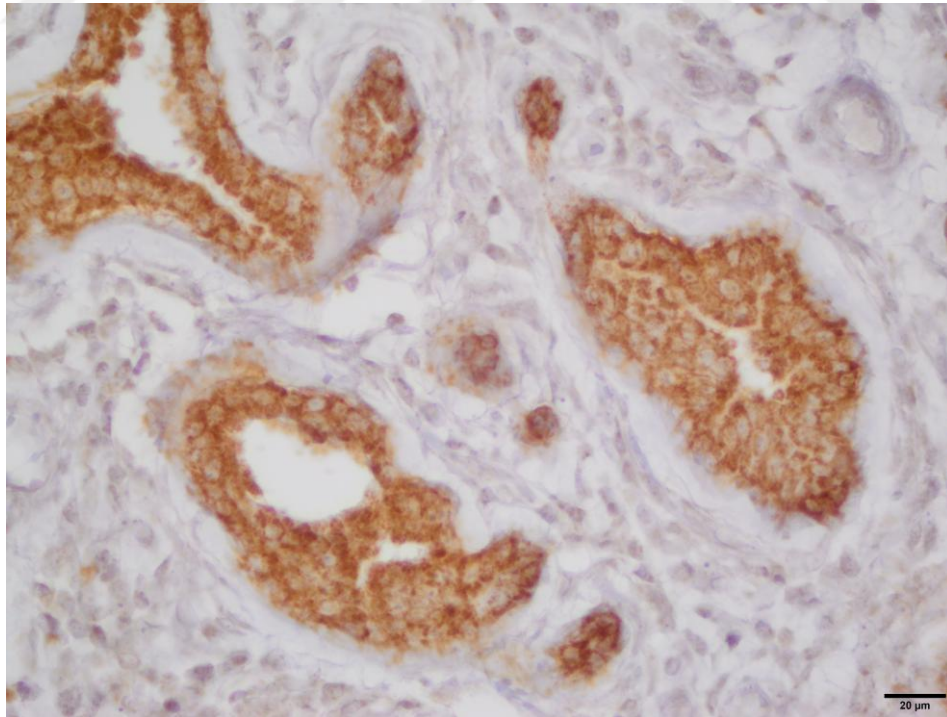
Yapılan istatistiksel analizler sonucunda malign tümörlerde kaspaz-9 ifadesinin benign tümörlere göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi (Tablo 6).

4.3.4. HER2 Bulguları

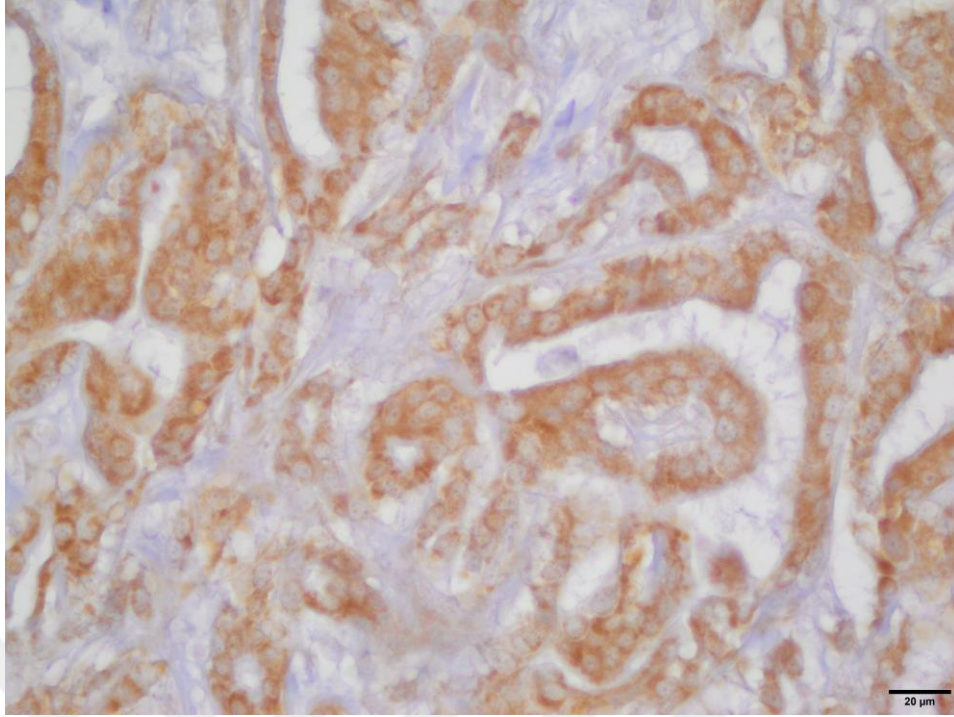
İnsan meme tümörlerinde prognostik ve prediktif açıdan önemli olan HER2 antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamada malign olguların 22 tanesinde 0 ve +1 (Resim 15), 7 adet olguda (olgu no: 8, 9, 11, 13, 16, 17, 31) +2, kalan 7 olguda ise (olgu no: 1, 7, 10, 14, 15, 24, 27) +3 değer (Resim 16 ve 17) belirlendi (Tablo 4).



Resim 15. Karsinoma mikst tip; neoplastik tubul epitellerinde HER2 +1 boyanma; olgu no: 18, ABC metot.



Resim 16. Tubuler karsinom; neoplastik tubul epitellerinde HER2 +3 boyanma; olgu no: 1, ABC metot.



Resim 17. Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma; neoplastik tubul epitellerinde HER2 +3 boyanma; olgu no: 24, ABC metot.

Adenom ve benign değişimler olarak belirlenen 6 olguda tüm olgular 0 ve +1 olarak değerlendirildi (Tablo 5). Hafif pozitif reaksiyonlar tubulus ve duktusları oluşturan epitellerde izlendi.

Malign tümörlerde HER2 ifadesi benign tümörlerdekine göre daha yüksek olup aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. Yapılan korelasyon analizinde HER2 ifadesi ve TUNEL pozitif hücre sayısı arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunamadı (Tablo 6).

Tablo 4. Adenokarsinom olgularında kaspaz-3, -8, -9 ve HER2 immunohistokimyasal bulguları ve TUNEL sonuçları.

Olgu no	Kaspaz-8	Kaspaz-9	Kaspaz-3	TUNEL*	HER2	Sınıflandırma
1 (20/19)	+++	++	-	5	+3	Tubuler karsinom
2 (258/16)	++	+	-	5	+1	Tubuler karsinom
3 (146/15)	++	+	-	3	0	Tubuler karsinom
4 (289/16)	+	-	-	3	+1	Tubuler karsinom
5 (297/13)	+++	+	+	4	0	Tubuler karsinom
6 (161/13)	+	++	-	5	+1	Tubuler karsinom
7 (137/14)	-	++	-	4	+3	Tubulopapiller karsinom
8 (146/17)	+	++	-	6	+2	Tubulopapillar karsinom
9 (284/17)	+++	+	+	4	+2	Kompleks karsinom
10 (176/15)	++	+	-	6	+3	Kompleks karsinom
11 (105/18)	++	+	-	3	+2	Kompleks karsinom
12 (33/18)	+	+	+	4	+1	Kompleks karsinom
13 (143/17)	+	++	-	2	+2	Kompleks karsinom
14 (63/13)	-	++	-	3	+3	Kompleks karsinom
15 (113/17)	++	++	-	5	+3	Karsinoma mikst tip
16 (420/15)	++	-	-	4	+2	Karsinoma mikst tip
17 (273/13)	+	++	-	10	+2	Karsinoma mikst tip
18 (175/17)	+	++	-	4	+1	Karsinoma mikst tip
19 (51/18)	+	+	-	1	+1	Karsinoma mikst tip
20 (35/18)	-	+	-	6	+1	Karsinoma mikst tip
21 (283/15)	++	+	-	2	+1	Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma
22 (132/16)	++	+	-	4	+1	Karsinoma ve malignant myoepitelyoma
23 (43/16)	+++	-	-	3	+1	Karsinoma ve malignant myoepitelyoma
24 (119/13)	++	+++	+	9	+3	Karsinoma ve malignant miyoepitelyoma
25 (62/13)	++	+	-	8	0	Karsinoma ve malignant myoepitelyoma
26 (123/17)	+	-	+	8	+1	Karsinosarkom
27 (10/17)	-	-	-	5	+3	Karsinosarkom
28 (180/13)	+	+	-	5	0	Karsinosarkom
29 (391/15)	+	++	-	5	0	Duktal karsinom
30 (84/18)	+	-	-	4	+1	Duktal karsinom

Tablo 4. Adenokarsinom olgularında kaspaz-3, 8, 9 ve HER2 immunohistokimyasal bulguları ve TUNEL sonuçları (devam).

31 (285/17)	+++	+++	-	4	+2	İntraduktal papillar karsinom
32 (104/16)	+	+	-	5	0	Intraduktal papiller karsinom
33 (108/15)	++	+	+	4	+1	Anaplastik karsinom
34 (121/17)	+	+	-	3	+1	Anaplastik karsinom
35 (140/17)	++	+++	-	5	+1	Solid karsinom
36 (145/18)	+	-	-	4	+1	Komedokarsinom

* Semikantitatif değerlendirme: 0; Negatif; +1 (hafif); 1-3 apoptotik hücre; +2 (orta); 4-7 apoptotik hücre; +3 (şiddetli); 8 ve daha fazla sayıda apoptotik hücre.

Tablo 5. Adenomlar ve benign değişim gösteren olgularda kaspaz-3, 8, 9 ve HER2 immunohistokimyasal bulguları ve TUNEL sonuçları.

Olgu no	Kaspaz-8	Kaspaz-9	Kaspaz-3	TUNEL*	HER2	Sınıflandırma
1 (61/18)	-	-	+	Negatif	+1	Adenom
2 (280/17)	-	-	-	3	0	Hiperplazi
3 (213/13)	-	+	-	Negatif	0	İntraduktal papiller adenom
4 (281/17)	-	++	-	2	+1	Benign mikst tümör
5 (157/16)	-	-	+	12	+1	Kompleks adenom
6 (32/18)	-	-	-	1	0	Premalignant

* Semikantitatif değerlendirme: 0; Negatif; +1 (hafif); 1-3 apoptotik hücre; +2 (orta); 4-7 apoptotik hücre; +3 (şiddetli); 8 ve daha fazla sayıda apoptotik hücre.

Tablo 6. Benign ve malign olgularda kaspaz-3, -8, -9, HER2 ekspresyonları ile TUNEL pozitif hücre sayısı ve istatistiksel analizi.

Değişkenler	Gruplar		P değeri
	Benign	Malign	
TUNEL	2,9 ± 0,7 ^a	4,7 ± 0,1 ^b	< 0,001
Kaspaz-3	3,3 ± 1,0 ^a	2,9 ± 0,5 ^a	> 0,05
Kaspaz-8	0,0 ± 0,0 ^a	23,7 ± 1,7 ^b	< 0,001
Kaspaz-9	5,7 ± 2,1 ^a	16,5 ^b	< 0,001
HER2	0,5 (0-1) ^a	1 (0-3) ^b	< 0,05

*Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Türkiye’de pet hayvanlarına karşı ilginin giderek artışı, özellikle köpek ve kedilerin sosyal yönünün önemi ve bu durumla doğru orantılı şekilde evcil hayvanlardan köpeklerin insanlar tarafından bakım ve beslemesinin toplum hayatında yaygınlaştığı görülmektedir (Özen ve ark, 2014). Evcil hayvanların özellikle kentlerde insanlarla aynı çevresel toksisite ve stres koşullarına maruz kaldığı, bunun yanı sıra beslenme ve hormonal dengesizliklerin de buna eklenmesi ile köpeklerde başta neoplastik ve otoimmün hastalıkların karşılaşma olasılığını ve hızını artırdığı bir gerçektir (Knapp ve Waters, 1997).

Köpek meme tümörleri dişi köpeklerde en sık görülen kanser türlerindendir. Köpek meme tümörlerinin oluşum mekanizmaları, hangi durumlarda ortaya çıktığı, genetik defektlerin etkileri gibi birçok açıdan anlaşılması hem köpeklerde hem de insanlarda yapılacak olan çalışmalara ışık tutacaktır. Köpek meme tümörleri insan meme tümörüne uygun model oluşturması, moleküler değişimlerde farklılık ve benzerliklerinin olması açısından artan bir ilgiyle çalışılmaktadır (Klopffleisch ve ark, 2011; Nunesa ve ark, 2019). Bu çalışma son yıllarda artan köpek meme tümörü olgularının dikkate alınması ile epitel büyüme faktörü yolağının köpek meme tümörlerindeki etki mekanizmasını aydınlatmak ve apoptozis ile olası bağlantılarını ortaya koyabilmek amacı ile gerçekleştirilmiştir.

Kimyasal karsinogenez süreci başlangıç, gelişme ve ilerlemeyi içeren çok basamaklı bir süreçtir. Hücre bölünmesini indükleyen ve kontrol eden kritik genlerdeki mutasyonlar/delesyonlar ilk neoplastik hücre oluşumlarından sorumlu tutulurken, gelişme aşamasında ise hiperfosforilasyon, yangı ile ilişkili genlerin ifadesinin uyarılması ve apoptozise götüren gen ekspresyonlarının azalması ile süreklilik sağlanır (Ghavami ve ark, 2009; Saminathan ve ark, 2014). Rutin muayenelerde tümör tanısı histopatolojik yöntemle belirlenir. Bu tanıda malignitenin sitolojik kriterleri anizositozis, nukleus/sitoplazma oranının nukleus lehine artması, nukleolusların sayı, büyüklük ve şekillerindeki farklılıklar, kromatin granüllerinin büyüklüklerinde farklılıklar, irreguler kromatin biçimleri, hücrelerde nükleer ve sitoplazmik membranlarda bozulma ve dev çekirdekli hücre formasyonlarıdır. Bunlara ilaveten, mitotik aktivite ve sellülaritenin derecesi de malignite için önemli kriterlerdir (Dutra ve ark, 2004; Dutra ve ark, 2008). Meme bezi tümörlerinde güvenilir tanı amacıyla tümörün köken aldığı dokunun ortaya konulmasında (epitel, miyoepitel, mezenkimal) ve prognoz tahmininde histokimyasal teknikler tek başına yeterli olmamakta, immunohistokimyasal bazı

spesifik markırların da kullanılmasını zorunlu kılmaktadır (Karelina ve Golubeva, 1983; Milli ve ark, 2000; Toniti ve ark, 2009). Veteriner patolojide hayvan türlerine spesifik immunhistokimyasal ve moleküler markırların ticari olarak yeterince bulunamaması nedeniyle hayvan tümörlerindeki uygulamalar mecburen insan dokuları için hazırlanmış olan ve kros-reaksiyon veren markırların kullanımı ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu durum genellikle araştırmalarda ve rutin uygulamalarda optimal sonuçların elde edilmesinde sıkıntılar doğurabilmektedir. Sunulan çalışmada da HER2 ve apoptozis için kullanılan markırlar deney hayvanlarında insan epitoplara karşı hazırlanmış antikordur. Diğer yandan HER2 yolağı ve apoptozisi kontrol eden mekanizmalar için gerekli markırlar tez bütçesinin yetersizliği nedeniyle çalışılamamıştır. Bunun yanında diğer araştırmacılar kişisel ilişkiler yolu ile temin edilen ya da antikor arşivimizde yer alan PTEN, Bax, Bcl-2, Ki-67 gibi antikordur da hayvan doku uyumsuzluğu nedeni ile sonuç alınamamıştır. Sunulan tez çalışmasında olanaklar doğrultusunda HER2 ekspresyonu ile apoptozis markırlarından kaspaz-3, -8, -9 ve TUNEL metot çalışılmıştır.

Dişi köpeklerde spontan gelişen meme tümörleri en sık karşılaşılan neoplazmalardan olmakla birlikte çoğu durumda vakaların %50'ye ulaşan oranlarda malignite gösterdiği bilinmektedir (Pena ve ark, 2014). Malign tümörler arasında en sık karşılaşılan alt tipler sırasıyla tubuler karsinom, papiller karsinom, solid karsinom, kompleks karsinom ve karsinosarkomlardır (Salas ve ark, 2015). Tablo 1 ve 2'de belirtildiği gibi çalışmada kullanılan 42 adet köpek meme biyopsisi materyalinin 36'sı (%85,7'si) adenokarsinom, 6 tanesi ise (%14,3'ü) benign olarak belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi 36 adet malign meme tümörünün değerlendirilmesi sonucu en çok bildirilen alt tipin tubuler karsinom olduğu görülmüştür (Goldschmidt ve ark, 2017). Bu alt tipi sırasıyla kompleks karsinom, karsinoma mikst tip ve karsinoma ve malignant miyoepiteliyoma takip etmiştir. Malign epitelyal komponentin düzensiz tubul formasyonu ile beraber miyoepitel hücrelerinin benign proliferasyonunun izlendiği kompleks karsinom olgularında fokal ya da multifokal neoplastik epitel hücre nekrozları yapılan çalışmalar ile uyumluluk göstermiştir (Misdorp ve ark, 1973). Karsinoma mikst tiplarda sıklıkla karşılaşıldığı üzere mezenkimal doku kemiğe kadar dönüşüm göstermektedir (Al-Mansour ve ark, 2018). Karsinoma ve malignant miyoepiteliyoma olgularında daha sıklıkla karşılaşılan varyantında olduğu gibi epitellerin düzensiz tubuler yapılar oluşturduğu ve buna eşlik eden iğ çekirdekli miyoepitellerin eşlik ettiği görülmüştür (Rasotto ve ark, 2012).

Apoptozis hücre bölünmesi sırasında ya da differensiye hücrelerde karsinogeneze yönelebilecek hücrelerin organizmadan eliminasyonu için doğal (innate) bağışıklığın önemli

bir savunma mekanizmasıdır. Defektli hücrelerin apoptozis ölüm mekanizması ile dokulardan uzaklaştırılması sağlanır. Hücre bölünme siklusunda G1/S fazında p53 geni aracılığı ile bölünme durdurulur ve p21 geni aracılığı ile hücre apoptozise sürüklenir. Onkogenik ya da artan proliferatif uyarı, ultraviyole etkiye bağlı DNA hasarı, radyasyon, kemoterapötik ilaçlar ile aktive olan p53 aracılığıyla p21 ekspresyonu indüklenerek ve devamında siklin D/CDK'ların inhibisyonu sonucu hücrenin G1 fazından S fazına geçişi önlenir (Pucci ve ark, 2000). Bunun yanı sıra p53 aynı zamanda siklin B1 transkripsiyon ve sentezini azaltarak hücrenin G2/M kontrol noktasında tutulmasında, mitotik döngüde hasarlar oluşması durumunda DNA'nın tekrar replikasyonunu önleyerek hücrenin S fazına geçişini önlemede de fonksiyonlara sahiptir (Agarwal ve ark, 1995). Eğer bu aşamada DNA tamir mekanizmaları işlevsiz kalacak olursa, hücre apoptozise yönlendirilerek eliminasyonu gerçekleştirilir. Apoptozis ölüm ligandlarının ölüm reseptörlerine bağlandığı ve ardından kaspaz-8'in aktivasyonu ile dışsal ya da sitotoksikite sonucu kaspaz-9'un aktive edildiği "mitokondriyal" yolak olarak bilinen içsel yolak ile gerçekleşir (Ghawami ve ark, 2009; Parrish ve ark, 2013; Zeng ve ark, 2015). Her iki yolak da prokaspaz 3 aktivasyonu ile devam eder ve DNA nükleozomal bölgelerden parçalanır (Ghawami ve ark, 2009). Önemli hücre proteinleri ve hücreyi parçalayan bir dizi sistein aspartil spesifik proteazların aktive olması apoptozisin temel bileşenlerindendir (Koff ve ark, 2015). Apoptoziste önemli rol oynayan kaspazlar başlatıcı (temel olarak apoptotik yolun başlangıcından sorumlu kaspaz-2, -8, -9 ve -10), infazcı (hücre proteinlerinin parçalanmasından sorumlu kaspaz-3, -6 ve -7) ve sitokin işlemci (kaspaz-1, -4, -5 ve -11, yangıya ilişkin) olmak üzere üçe ayrılır (Thomberry ve Laxebnik, 1998). Hücre döngüsü sürecinde apoptozisi kontrol eden genlerde oluşacak ve bütünleyici mutasyon/delesyonlar neoplastik hücre kurulumunda önemli roller üstlenirler. Çoğu kanser hücresi antiapoptotik moleküllerin ekspresyonlarını manüpile ederek ya da proapoptotik hücre ölüm komponentlerini inaktive ederek apoptozisten kaçmayı sağlayan mekanizmalar geliştirmişlerdir (Koff ve ark, 2015). Malign hücrelerin apoptozisten kaçışı ya da apoptozise karşı direnç kazanması proapoptotik/antiapoptotik proteinler arası dengenin bozulması; kaspaz fonksiyonlarının azalması ve ölüm reseptörü sinyallerinde bozulma olmak üzere başlıca üç mekanizma ile gerçekleşir (Wong, 2011). Pro ve antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin dengesinde meydana gelen bozulmalar kanser hücresinin apoptozise direncini artırarak hayatta kalmasına neden olur. Bax ve BH3 proteinleri gibi Bcl-2 ailesine ait pro-apoptotik proteinleri kodlayan genleri hedef alan genetik ve epigenetik değişimler birçok kanser türünde tanımlanmıştır (Plati ve ark, 2011). Benzer şekilde Bcl-2 ailesine ait anti-apoptotik proteinleri kodlayan genlerdeki değişimler ölüm reseptörü bağımlı yolları etkileyerek TRAIL'in

indüklediği apoptozise karşı hücrelere direnç kazandırır (Hetschko ve ark, 2007). Sadece embriyonik dokularda bulunan bir IAP olan survivin birçok kanser türünde bulunmuş olup yüksek ekspresyonu durumunda hücrelerde apoptozise duyarlılık azalmakta ve kötü prognoz, tedavide başarısızlık ve nüks durumları tetiklenmektedir. Ayrıca belli başlı IAP'ler sitokinez ve sinyal iletimi gibi diğer süreçleri düzenlediğinden, genlerinde meydana gelen düzensizlikler kaspazların doğrudan inhibisyonuna ve sonucunda apoptozisten kaçışa neden olur (Koff ve ark, 2015). Tümör baskılayıcı proteinlerin en iyi bilineni p53'ü kodlayan gende meydana gelen değişimler birçok insan kanserinde tanımlanmış olup tümörün agresifliğinde, proliferasyon yeteneğinde ve apoptozisten kaçışta artışa neden olduğu belirlenmiştir (Wong, 2011). Apoptozisin temel bileşenleri olan kaspazların aktivitelerindeki azalmalar veya sorunlar apoptoziste düşüşlere neden olur ve karsinogeneze öncülük eder. Bir veya daha fazla kaspazın düzenlenmesinde meydana gelen sorunlar tümör hücresinin büyüme ve gelişmesi ile sonuçlanır (Fong ve ark, 2006).

Genellikle hayatta kalma sinyallerine PI3K/AKT yolu aracılık eder. Çoğu tümör PI3K/AKT yolağını yukarı regüle ettikleri için hayatta kalma sinyallerinden bağımsızdır. Epidermal büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri ve interlökinler gibi sitokinler PI3K/AKT yolağını aktive ederler. Aktif AKT yolağı pro-apoptotik Bcl-2 ailesi proteini Bcl-2 ilişkili hücre ölüm agonisti (BAD)'ni fosforile ederek inhibisyonuna ve ayrıca transkripsiyon faktörü nükleer faktör κ B'yi (NF- κ B) aktive ederek anti-apoptotik genlerin ekspresyonuna yol açabilir. Aktif AKT ile oluşturulan hayatta kalma sinyali tümör baskılayıcı PTEN tarafından dengelenir (Igney ve Krammer, 2002). TNFR1 ve Fas gibi ölüm reseptörleri ve ölüm reseptör ligandları apoptozisin dışsal yolağında kilit oyuncularındır. Reseptörün aşağı regülasyonu ya da reseptör fonksiyonundaki sorunlar, ölüm sinyallerindeki düşüşler sinyal kaybına ve dolayısıyla apoptozisin azalmasına neden olur (Wong, 2011). PTEN çeşitli sinyal iletim ve diğer biyolojik yolların düzenlenmesinde yer alan hücrel farklılaşma, üreme ve apoptozisin yanı sıra hücrel adezyon ve mobilitede önemli bir gendir. Bu nedenle bu gende ve/veya kodladığı proteinde meydana gelen değişimler tümör gelişmesinde önemli role sahiptir. PTEN'in düşük ekspresyonu kaspaz-3 ekspresyonunu azaltarak tümör hücrelerinde apoptotik fonksiyon bozukluğuna neden olur (Yang ve ark, 2008).

Hücre çekirdeğinde nükleozomal bölgelerden kaspazlar aracılığı ile gerçekleştirilen DNA kırılma bölgelerini işaretleyerek kromojenik reaksiyonla görünür hale getiren TUNEL reaksiyonu sitolojik ve histolojik kesitlerde kolayca uygulanabilir olması ve hücre morfolojilerini aynı anda inceleme olanağı sağlaması avantajından dolayı bu çalışmada tercih nedeni olmuştur. Apoptotik hücre sayısı, mevcut tümör hücrelerinin yüzdesi ya da diğer bir

ifadeyle neoplastik dokunun milimetresi başına düşen apoptotik hücre sayısıdır ve genellikle apoptotik indeks olarak adlandırılır (Lipponen, 1999). Bazı araştırmacılar apoptotik indeksin yüksek olduğu durumlarda tümörün daha yavaş, düşük olduğunda ise hızla büyüdüğünü düşünmektedir (Cameron, 1951). Öte yandan tümör büyümesi sırasında çoğalma ve hücre ölüm arasında apoptozisin yer aldığı bir denge olduğu düşünülürse, yüksek apoptotik hücre sayısı yüksek bir hücresel çoğalma oranı ve olumsuz bir prognoz ile orantılı görünebilir (Pereira ve ark, 2003). Ancak, çoğu kanser hücresinin antiapoptotik moleküllerin ekspresyonlarını manüpile ederek ya da proapoptotik hücre ölüm komponentlerini inaktive ederek apoptozisten kaçmayı sağlayan mekanizmalar geliştirdikleri bilinmektedir (Koff ve ark, 2015). Ayrıca, apoptotik hücre sayısı arttıkça hücresel proliferasyonun ve tümöral agresifliğin daha yüksek olduğu sonucuna varılmaktadır (Pereira ve ark, 2003). İnsan meme tümörlerinde apoptotik indeksin belirlenmesi için TUNEL reaksiyonun gerçekleştirildiği bir çalışmada benign olgular düşük figürler sergilerken, atipik hiperplazi ve derece 1'de daha düşük apoptotik indeks gösteren invaziv karsinom durumlarında yüksek figürler belirlenmiştir (Mustonen ve ark, 1997). Köpek meme tümörlerinde TUNEL boyama ile apoptotik indeksin prognoz ile ilişkisinin var olduğunu gösteren çalışmaya (Pereira ve ark, 2003) karşın ülkemizde hasta takibine ilişkin prosedürlerin tam olarak oluşturulamaması nedeniyle bu konuda bir bilgi de bulunmamaktadır. Bu çalışmada, TUNEL pozitif reaksiyonlar malign tümörler ve alt sınıflandırmaları arasında bile değişkenlikler göstermiştir. Şiddetli pozitif reaksiyonlar genel olarak sınırlı sayıda (4 olgu) olup orta şiddette (24 olgu) ve zayıf (6 olgu) şeklindeki reaksiyonlar literatür bilgilerinde yer alan apoptozisin farklı yollar ve genler tarafından kontrol edildiğini göstermektedir (Pereira ve ark, 2003). Bu çalışmadaki olgularda histolojik olarak aynı morfolojiyi ve maligniteyi gösteren tümörlerdeki oldukça değişken TUNEL pozitiflikler; apoptozisi indükleyici/kontrol mekanizmalarındaki gen ekspresyonlarının olgulara özgü değişkenliklerini de içerdiğini göstermektedir. Bunun yanı sıra yangısal tümör yanıtında rol alan ve dışsal apoptotik yolağı indükleyen makrofaj, sitotoksik T lenfosit ve doğal katil hücrelerin (natural killer cell) moleküler etki mekanizmalarının kilitlenmesinin de önemli olabileceğini düşündürmektedir. Malign tümörlerde apoptotik hücre sayılarının benign olgulara göre daha az olması Rodrigues ve ark (2016) tarafından yayınlanmış bulgularla uyumludur.

Kanser hücreleri tümör gelişimini ve metastazı kolaylaştıran hatalı bir apoptotik sinyalleme ile sonuçlanan değişiklikleri barındırır (Plati ve ark, 2011). İnsan meme tümörlerinde apoptozisin karsinogenezisteki rolü ile ilgili fikir birliği yoktur ancak, bazı araştırmacılar yüksek apoptotik indekslerin tümör agresifliğinin göstergelerinden biri

olabileceğini iddia etmektedirler (Rodrigues ve ark, 2016). Bu tür olgularda apoptozisi bloke eden genlerin etkinliğinde bir değişiklik olmadığı, ancak apoptozisin tek başına neoplastik hücre bölünme hızının da önüne geçemediği değerlendirilmektedir (Plati ve ark, 2011). Benzeri bir durum diğer bir ölüm mekanizması olan nekroz için de geçerlidir. Histolojik olarak agresif görünümlü malign tümörlerde neovaskülarizasyon uyum problemlerine bağlı olarak gelişen yaygın nekrozların da neoplastik invazyonların ve metastazların önüne geçemediği iyi bilinmektedir (Proskuryakov ve ark, 2003). Bu bakımdan histopatolojik tümör tipinin belirlenmesinin yanı sıra tümörün agresifliği konusunda programlı hücre ölümü apoptozisin de prognostik bir belirteç olarak kullanılabilirliği için kapsamlı çalışmalar gerekmektedir (Gonzalez-Campora ve ark, 2000).

Apoptozis insan kanserlerinde sık çalışılan bir konudur ve birçok kanserde apoptotik veya kaspaz sinyali genlerine ilişkin mutasyonlar belirlenmiştir (Rodrigues ve ark, 2016). Apoptozisin baskılanması kanserin başlangıcında ve ilerlemesinde kritik bir olay olmakla birlikte çoğu sitotoksik antikanser ajanın apoptozisi indükleyerek tümör gerilemesine imkan sağlaması nedenleriyle apoptozisin malignitenin belirlenmesinde büyük önemi vardır (O'Donovan ve ark, 2003). İnsan onkolojisinde apoptozise ilişkin veriler çelişkili olmakla birlikte bazı araştırmacılar yüksek apoptozis seviyelerinin nükleer derece, diferensiyasyon, artan metastatik risk ve östrojen reseptör kaybı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ancak, köpek meme tümörlerinde apoptozisi düzenleyen genlerdeki mutasyonlara ilişkin araştırmaların sayısı oldukça sınırlıdır (Rodrigues ve ark, 2016). Çok sayıda genin apoptozis mekanizmasında görev almasına rağmen odak noktası kaspazlardır (O'Donovan ve ark, 2003). Anormal kaspaz ekspresyonu ve/veya aktivasyonu birçok kanser türünde ortaya konulmuştur (Pu ve ark, 2017). Efektör kaspazlardan en çok çalışılan kaspaz-3 apoptozisin tüm yolaklarında kilit rol oynamakta ve yapılan birçok çalışmada takstanlar, doksorubisin gibi kemoterapötik ilaçlara yanıtta apoptozisin indüksiyonu için kaspaz-3 aktivasyonunun gerekli olduğu bilinmektedir (Keane ve ark, 1999; Pu ve ark, 2017). Kaspaz-3'ün ekspresyonu apoptozisin seviyesini yansıtmakla birlikte aynı zamanda apoptotik başlangıç faktörünün varlığını da gösterir. Kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığı durumlarda apoptozis düzensizleşir ve bu durum meme kanserinin oluşumu ile yakından ilişkilidir (Yang ve ark, 2008). Apoptozisin erken evresinin tespitinde aktif kaspaz-3'ün immunohistokimyasal değerlendirmesi önemlidir (Rodrigues ve ark, 2016). İnsan meme tümörlerinde kaspaz-3'e ilişkin yapılan bir çalışmada meme karsinomlarının fibroadenomlardan veya normal meme dokusundan daha yüksek apoptozis oranları gösterdiği ortaya konulmuştur (O'Donovan ve ark, 2003). Kaspaz-3 yoksun Michigan Socer Foundation-7 (MCF-7) meme kanseri hücre

kültüründe kaspaz-3 eksikliğinin hücreleri apoptozise duyarlı hale getirdiği ortaya konmuş ve bu nedenle kaspaz-3 eksikliğinin kemorezistans için olası bir mekanizma olabileceği düşünülmüştür (Devarajan ve ark, 2002). Yapılan bir diğer çalışmada ise kaspaz-3 değerlerinin tümör derecesi, östrojen ve progesteron durumları ile belirgin bir ilişki göstermediği ortaya konulmuştur (Vakkala ve ark, 1999). Pu ve ark (2017) yaptığı çalışmada, yüksek kaspaz-3 ekspresyonunun, hastalığa özgü sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kaspaz-3'ün apoptoziste kritik bir mediyatör olması ve apoptotik indeksle korelasyon göstermesi nedeniyle sisplatin indüklenmiş apoptoziste kaspaz-3'ün prokaspaz-9 sürecinde gerekli olduğunun belirlenmesi, kaspaz-3'ün kemoterapötik ajanlara cevapta potansiyel bir markır olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Blanc ve ark, 2000). İnsan meme kanserine ilişkin yapılan bir araştırmada meme tümörlerinin %75'inde (35/46 olgu) kaspaz-3 transkripti ve protein ekspresyonu bulunmadığı ve kalan örneklerde de ekspresyonun önemli ölçüde az olduğu gösterilmiştir (Devarajan ve ark, 2002). Yang ve ark (2008) yaptığı çalışmada benzer şekilde insan meme kanserinde kaspaz-3 ekspresyonunun kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bongiovanni ve ark (2014) tarafından aktif kaspaz-3 antikoruna kullanılarak yapılan bir çalışmada klinikopatolojik parametreler ve kaspaz-3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. İnsan meme kanserinde ve köpek meme tümörüne ilişkin literatür bilgide belirtildiği gibi bu çalışmanın olgularında da malign meme tümörlerinde kaspaz-3 oldukça az bir boyanma (%14) göstermiştir. Yine Rodrigues ve ark (2016) yaptığı çalışmada benign ve malign kaspaz-3 yüzdesi açısından benign ve malign köpek meme tümörleri arasında anlamlı bir fark gözlemiştir. Benzer şekilde Aydoğan ve ark 2018'de yaptığı çalışmada kaspaz-3'ün immunohistokimyasal olarak değerlendirmesinde malign tümörlerde kaspaz-3 boyanması yüzde olarak düşük ve reaksiyonlar zayıf olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise köpek meme tümörlerinde kaspaz-3 immunreaktivitesi yüksek bir yüzde (%53) göstermektedir. Benign olgularda bu durum %8 olarak belirlenmiştir (Dolka ve ark, 2016). Sunulan çalışmada ise benign tümörlerin ikisinde (%33,3) kaspaz-3'ün zayıf şiddette immunreaktivite gösterdiği belirlenmiştir. Benign tümörlerde kaspaz-3 yüzdesinin malign tümörlere göre yüksek olması, tümör gelişimi sırasında kaspaz bağımlı apoptotik yolların inhibisyona uğradığını düşündürmektedir. Ancak, ülkemizde hastaların klinik takibi ve yaşam sürelerine yönelik bütüncü çalışmaları eksikliğinden dolayı literatür bilgide verilen kaspaz-3'ün hastalığa özgü sağkalım ile ilişkisi ortaya konulamamıştır. Ayrıca köpek meme tümörlerinde kaspaz-3'e ilişkin immunohistokimyasal boyamaların hem dünya genelinde hem de ülkemizde oldukça

sınırlı sayıda çalışmada yer alması nedeniyle mevcut çalışma bu açıdan öncülerden olabilecektir.

Kaspaz-8'in apoptozisin başlatıcısı olarak iyi tanımlanmış bir rolü vardır. Ayrıca prokaspaz-8'in öncülük ettiği hücre motilitesi ile kaspaz-8 tarafından indüklenen apoptozis arasında moleküler bir şalter olarak da önemli bir role sahiptir (Frisch, 2008). Olgun formu olan kaspaz-8'e dönüşüm, aktivitesi birçok tümör tipinde yukarı regüle edilen bir proto-onkogen olan tirozin kinaz hücreSEL SRC (c-SRC) tarafından fosforilasyonu ile kontrol edilir. Bu nedenle kaspaz-8'deki kansere ilişkin varyantların bu süreçleri nasıl etkilediğini belirlemek önemlidir (Shephard ve ark, 2009). Kaspaz-8 eksikliği apoptozisin azalması yanında etkilenen hücrelerin hareketliliğinin artmasına da neden olabilir (Krelin ve ark, 2008). Son yıllarda yapılan çalışmalarda başlatıcı kaspaz olan kaspaz-8'in varyantlarının meme kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kaspaz-8 ekspresyonunu kodlayan gende meydana gelen değişimler birçok tümör tipinde ve meme kanseri hücre hatlarında ortaya konulmuştur (Yang ve ark, 2007). In vitro yapılan çalışmalarda östrojenin kaspaz-8'in ve diğer kaspazların aktivasyonunu önlediği bilinmektedir (Zhang ve ark, 2001). Önceki çalışmalardan farklı olarak meme kanseri hücre hatları yerine hastalardan alınan örnekler üzerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aracılığıyla yapılan bir çalışmada tümör dokularında kaspaz-8 ekspresyonunun komşu normal dokulara kıyasla azalmış olduğu gösterilmiştir (Aghababazadeh ve ark, 2017). Pu ve ark (2017) yaptığı çalışmada ise yüksek kaspaz-8 ekspresyonunun meme kanseri hastalığına özgü sağkalım ile herhangi bir ilişkisi olmadığı ortaya konulmuştur. Apoptozisin hangi yönde indüklendiğine yönelik uygulamalarla bu çalışmada kaspaz-8'in immunohistokimyasal değerlendirmesinde %41,7'lik oran ile malign olguların en çok zayıf pozitif reaksiyonlar gösterdiği ve olguların yalnızca 5'inde (%14) güçlü boyanma belirlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmanın karsinoma ve malignant miyoepitelyoma olgularında orta ve güçlü olacak şekilde kaspaz-8'in ifade edildiği, ancak diğer alt tiplerde buna benzer bir homojenitenin olmadığı görülmüştür. Benign olguların tümünde kaspaz-8'in ifade edilmediği izlenmiştir. Aydoğan ve ark (2018) yaptığı çalışmada ise malign olgularda %89 oranında kaspaz-8 negatifliği izlenmiştir. Aynı çalışmada zayıf pozitif reaksiyon olguların yalnızca %11'inde belirlenmiştir. Tümör alt tipi bazında ele alındığında Aydoğan ve ark (2018) yaptığı çalışmada 31 adet kompleks karsinomdan yalnızca 3'ünde, 17 karsinosarkomun 2'sinde zayıf pozitiflik gözlenirken bu çalışmada 6 adet kompleks karsinomun 5'inde zayıftan şiddetliye değişen pozitif reaksiyon ve 3 adet karsinosarkomun 2'sinde zayıf pozitif reaksiyon izlenmiştir.

Sitokrom c'nin mitokondriden salınmasına yanıt olarak Apaf-1'e bağlanarak mitokondriyal yolakta merkezi bir role sahip, başlatıcı bir kaspaz olan kaspaz-9'a ilişkin gendeki polimorfizmlerin kanser duyarlılığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Theodoropoulos ve ark, 2012; Zhang ve ark, 2019). Yapılan çalışmalar ile artan kanıtlar kaspaz-9'un fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında aktive edilmemesinin dejeneratif ve gelişimsel bozukluklara ve kansere neden olabileceğini göstermiştir (Laperchia ve ark, 2017). Ancak, Ulybina ve ark (2011) yaptıkları çalışmada apoptotik genlerde meydana gelen polimorfizmlerin meme kanserine yatkınlıkta önemli bir rol oynamadığını iddia etmektedir. Aydoğan ve ark (2018) köpek meme karsinomlarında yaptığı çalışmada kaspaz-9 immunreaktivitesi %17 oranda negatif sonuç verirken, bu çalışmada bu oran %19,4 ile benzer bir sonuç göstermiştir. Kaspaz-9'un vakaların %44,4 oranında en fazla zayıf pozitiflik verdiği gözlenmiş olup, alt tiplerde homojen bir dağılıma rastlanmamıştır. Yukarıdaki yüzdelik oranlara göre dağılımı verilen kaspaz immunpozitif reaksiyonlardan anlaşıldığı üzere malign meme tümörlerinde olgularda bir örnekliğin olmadığı oldukça değişken semikantitatif değerlerin elde edildiği görülmektedir. Bu sonuçlar TUNEL verileri eşliğinde değerlendirildiğinde, aynı tümör tiplerinde dahi apoptozisi kontrol eden mekanizmalar ile bloke edildiği görülmektedir.

HER2 onkogeni epidermal büyüme faktörü reseptörü ailesine ait bir transmembran tirozin kinaz reseptörü kodlar ve bu reseptör hücre proliferasyonu, hayatta kalma, motilite ve adezyon gibi yolların sinyal iletimini aktive eder (Matsumoto ve ark, 2016). HER2 gen amplifikasyonu meme tümörlerinde daha kısa hayatta kalma süresi, yüksek nüks yüzdesi, kemoterapi ve hormon terapilerine düşük yanıtla ilişkilidir (Wahler ve Suh, 2015). Ayrıca HER2 proteinin aşırı eksprese edildiği tümörlerde tümör kitlesinde artış ve tümör evresinin ileri derecede olduğu gösterilmiştir. HER2 reseptörünün fazla eksprese edilmesi insanlarda 17. kromozom üzerinde yer alan genin amplifikasyonu sonucu oluşur. Ancak HER2 proteinin aşırı ekspresyonu HER2 geni amplifikasyonu olmaksızın gerçekleşebilirken, bunun tersi de mümkündür. HER2 geni ve proteinin ekspresyonu HER2 hedefli terapi seçiminde önemlidir (Wesola ve Jelen, 2015). HER2/neu (c-erbB-2)'nin köpek meme tümörlerindeki ekspresyonu karsinojenik ve prognostik açıdan insan meme tümörlerine benzerdir (Antuofermo ve ark, 2007). İnsan meme kanserlerinde prognoz ve tedavi açısından HER2 markırı önemli bir yer tutmakla birlikte, hem insan hem de köpeklerde görülen meme tümörlerinin %30'unda HER2 ekspresyonu kaydedilmiştir (Singer ve ark, 2012). HER2 ekspresyonunun mitotik indeks, yüksek histolojik derece ve tümör boyutu ile korelasyonlu olduğunu bildiren çalışmalarla birlikte kötü prognozla ilişkili olduğunu düşündüren çalışmalar da mevcuttur (Kaszak ve ark, 2018). Ancak bununla birlikte farklı görüşü savunan ve HER2 eksprese eden malign tümöre

sahip köpeklerin HER2 negatif köpeklere göre daha uzun süre hayatta kaldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Hsu ve ark, 2009; Goldschmidt ve ark, 2017). Veteriner hekimlikte HER2'nin serumu ve doku ifadesi arasında pozitif bir korelasyon fark edilmiştir (Campos ve ark, 2015). Bu çalışmada olgular HER2 yönünden, yalnızca arşiv parafin dokulara uygulanan immunohistokimyasal yöntem ile belirlendiğinden, bu konuda bir sonuca varılamamıştır. Muhammadnejad ve ark (2012) malign köpek meme tümörü oranını %34.3 olarak saptamıştır ve bu insanlardaki oranlarla uyumludur. Ancak, Campos ve ark (2015) ve Nguyen ve ark (2018) çalışmalarında köpek meme karsinomlarının insan HER2 antikorunun immunohistokimyasal reaksiyonu ile yapılan değerlendirmesinde HER2+ olguya rastlanmamıştır. Bu çalışmada ise HER2 antikor ile yapılan boyamada +3 değer gösteren olguların pozitif kabul edildiği durumda önceki bir çalışmaya benzer şekilde %19,4 ile düşük bir oranda HER2+ olgular belirlenmiştir (Shinoda ve ark, 2014). İnsan ve köpek HER2 antijenleri arasında homolojinin yüksek olması, trastuzumab veya setuksimab ile antikor bazlı immunoterapilerin ilerleyen zamanlarda HER2 ekspresyonu olan hasta köpeklerde kullanılabilir olduğu düşünülmektedir (Singer ve ark, 2012). Ancak, Hsu ve ark (2009) terapiye yönelik kullanımlar için daha fazla çalışma yapılması gerektiğini vurgulamaktadır. HER2 protein ekspresyonu seviyesinin vücut ağırlığı, tümör evresi, tümör boyutu, etkilenen bezin yerleşimi, tümör sayısı, histolojik sınıflandırma, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, ölüm ve gözlem zamanı ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir (Hsu ve ark, 2009; Kaszak ve ark, 2018). Bu çalışmada malign meme tümürlü olgularda tümör boyutu, metastazları, uygulanan tedavi protokolleri ve sağkalım süre ile arşiv kayıtlarının tutulmaması nedeniyle HER2 immunohistokimyasal pozitifliği ile tanımlanan klinik-patolojik durumlar arasındaki ilişkiler de değerlendirilememiştir. Bu da çalışmanın yalnızca histolojik kesitlerde durum değerlendirmesi olarak sınırlı kalmasına neden olmuştur. Ancak, 4 olgudaki özellikle invaziv tümöral sahalarda yüksek HER2 pozitifliği insan olgularındaki gibi doku içi infiltrasyonlara/metastazlara önemli katkılar sağlayabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle HER2 ile ilgili çalışmaların klinik-patolojik veriler eşliğinde devam ettirilmesi gerekmektedir.

HER2 aktivasyonunun prognostik değerinin yanı sıra hücre proliferasyonunu tetiklediği ve apoptozisin inhibe edilmesine neden olduğu bilinmektedir (Park ve ark, 2008). HER2'nin aşırı ekspresyonu apoptozisi inhibe ederek hücre çoğalmasını destekleyen PI3K/Akt "hayatta kalma" yolunu aktive eder (Menard ve ark, 2003). HER2'nin aşırı ekspresyonu ile hücre döngüsü ve apoptozisi düzenleyen proteinlerin işlevi bozularak çoğalma indüklenir (Xia ve ark, 2004). Pu ve ark (2017) yaptığı çalışmada yüksek kaspaz-3 ekspresyonunun HER2 pozitifliği ile anlamlı olarak ilişkili olduğu görülmüştür. Kaspaz-3'ün diğer substratlarla

etkileşime girmesi ve potansiyel olarak HER2 sinyal yolağı aracılığıyla apoptozisi düzenlemesi mümkün olabilir (Pu ve ark, 2017). HER2'nin aktivasyonunun PI3K/AKT yolakları aracılığıyla aşağı yönlü sinyallemeyi tetikleyebildiği ve AKT sinyallesinin kaspaz-9 aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Rimawi ve ark, 2015). Aghababazadeh ve ark (2017) insan meme kanseri hastalarında kaspaz-8 ekspresyonu ve HER2 durumu arasında anlamlı ilişkiler olduğunu belirtmektedir. Bu çalışmada köpeklerde kaspaz-8'in HER2 pozitifliği arasında homojen bir uyum göstermediği, tümör alt tipleri arasında da kaspaz-8/HER2 ilişkisinin olmadığı görülmüştür. Örneğin 1 nolu olguda kaspaz-8 ve HER2'nin ikisinin de güçlü ifade edildiği görülürken; aynı şekilde tubuler karsinom alt tipinde değerlendirilen 5 nolu olguda kaspaz-8 güçlü ifade edilirken HER2 negatif olarak değerlendirilmiştir. Benzer durum kaspaz-9 ve HER2 pozitifliği arasında da görülmektedir. Ancak, burada tümör alt tipine bakılmaksızın 4 adet karsinom olgusunda (olgu no: 1, 7, 14, 15) kaspaz-9'un orta şiddette ifadesine karşılık HER2 pozitifliği göze çarpmaktadır. Kaspaz-3 ile HER2 sonuçları arasındaki ilişkiye bakıldığında ise, 24 nolu olgu (kaspaz-3 zayıf ifade edilirken HER2 pozitif olarak değerlendirilmiştir) dışında diğer olgularda zayıf şiddette kaspaz-3 pozitif ile sınırdaki HER2 ekspresyonu gözlenmiştir. Pu ve ark (2017) yaptığı bir çalışmada kaspaz-3 ile HER2 ekspresyonlarında benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada HER2 ve apoptozis arasında bir korelasyonun olmaması apoptozisten kaçışta rolü olan HER2'nin malign meme tümörlerinde apoptozis ve hücrenin hayatta kalmasında sağlıklı bir hücredeki gibi tek başına bir rol üstlenemediğini düşündürmektedir. Bu nedenle ileride yapılacak araştırmalarda HER2 ekspresyonunun hücre döngüsünde görevli diğer yollardaki genlerin pozitif/negatif ilişkilerini de sorgulayacak çalışmalar önemli olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Histopatolojik bulgular değerlendirildiğinde, çalışmadaki olguların daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde büyük oranda malign karakterde olduğu görülmüştür. Karsinom olarak değerlendirilen örneklerin tümör alt tiplerinin belirlenmesinde en çok karşılaşılan karsinom tipleri olan tubuler karsinom ve kompleks karsinomların sayıca daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Malign özellikteki meme tümörleri arasında ve hatta aynı alt sınıflandırmaya ait olgular arasında apoptotik indeksin oldukça değişken parametreler göstermesi, apoptozisi indükleyici/kontrol mekanizmalarında yer alan genlerin baskılandığını ya da aktive edildiğini göstermektedir. Diğer yandan apoptozisin içsel/dışsal indüklenme sürecinde rol oynayan genlerdeki mutasyon ya da delesyonların neoplazilerin oluşumuna primer katkı sağladığı göz önünde bulundurulursa, sunulan tez çalışmasında aynı tümör tipinde de görülen apoptotik indeksteki bu değişiklikleri açıklamak zor olmayacaktır. Ancak, bir hücrede apoptozise giden süreç birçok gen tarafından regüle edildiğinden düşük apoptotik indeksin mekanizmasını çözmek için her bir kanser hastasının ayrı ayrı ele alınması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Bu durum şu an için oldukça maliyetli gibi görünse de, ileride bireylere göre etkin tedavi seçeneklerin sunumunda önemli olacaktır. Buna karşın, yüksek apoptotik indeksli olgularda tümörün daha agresif seyretmesi, neoplastik hücrelerin apoptotik eliminasyon mekanizmasından kurtulmak için bölünme hızlarını kat kat artırdıklarının işaretidir. Bu şekilde apoptozisten kaçış mekanizmalarının çözümü klinik-patolojik olarak hasta hayvan ve insanlarda bireysel tedavi seçeneğinin gücünü artıracaktır. İnsanlarda hücre büyüme ve transkripsiyon yollarındaki mutasyonların ve ekspresyon analizlerinin rutin uygulamalar haline gelmesi ile birlikte, daha etkin tedavi seçenekleri sunulmaya başlanmıştır. Ancak, veteriner patolojide bu analizler araştırma boyutunda yer almakta ve henüz rutin uygulamalara dönüşmemiştir. Bu nedenle neoplastik hücrelerin en önemli eliminasyon mekanizması olan apoptozis mekanizmalarının kapsamlı olarak açıklanması gerekmektedir.

Apoptozise duyarlılık, sağkalım ve kemoterapötik ajanlara yanıtla ilişkili olduğu bilinen kaspaz-3'ün diğer çalışmalara paralel olarak malign köpek meme tümörlerinde oldukça az boyanması, kaspaz-3'ün meme tümörünün oluşumu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Benign tümörlerde kaspaz-3 yüzdesinin malign tümörlere göre yüksek olması tümör gelişimi sırasında kaspaz bağımlı apoptotik yolların inhibisyona uğradığını düşündürmektedir. İnsan

olgularında olduğu gibi, köpek meme tümörlerinde neoplastik hücrelerde önemli olan kaspaz-3 ekspresyonundaki düşük değerlere neden olan mekanizmaların çözüme kavuşturulması ileride kurgulanacak çalışmalar için önemli olacaktır. Veteriner onkolojide buna ilişkin çalışmaların sınırlı olması nedeniyle bu çalışma literatür bilgiye ayrıca bir katkı sağlayacaktır. Diğer yandan, köpek malign meme tümörlü olgularda kaspaz-8' ve -9'a ilişkin immunopozitif reaksiyonlarda bir örnekliliğin olmadığı ve oldukça değişken semikantitatif değerlerin elde edildiği görülmektedir. Bu durum neoplastik meme epitel hücrelerinin içsel yol ile indüklenen mitokondriyal yolakta kaspaz-9 aktivasyonunu indükleyen mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin bozulması aşamasında görevli pro-apoptotik (sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması gibi) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-xL) genleri/proteinleri bloke edici mekanizmalar, dışsal yolakta da makrofaj, sitotoksik T lenfosit ve doğal öldürücü hücreler aracılığı ile indüklenen CD95, TRAIL, FADD/TRADD gibi hücre yüzeyindeki ölüm domainlerinin görev aldığı yolakta genleri/proteinleri bloke edici mekanizmalar geliştirdiklerini göstermektedir. Bu çalışma veteriner alandaki diğer çalışmalar gibi apoptozise giden süreçte kaspaz-8 ve -9'un ekspresyonunu belirlemiştir, ancak bu enzimleri bloke eden mekanizmaların aydınlatılması için ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

HER2 onkogen gen ve protein ekspresyonu insan meme tümörlerinde daha kısa hayatta kalma süresi, yüksek nüks yüzdesi, kemoterapi ve hormon terapilerine düşük yanıtla ilişkilidir. Köpek meme tümörü olgularının yaklaşık %30'unda bunların aşırı ekspresyonu saptanmış olmasına karşın, karsinojenik ve prognostik açıdan etkisi halen tartışmalı bir konudur. Köpek meme tümörlerinde, insanlardaki gibi, HER2 ekspresyonunun mitotik indeks, yüksek histolojik derece ve tümör boyutu ile ilişkili kötü prognoza yorumlayan çalışmalar (Kaszak ve ark, 2018) yanında, HER2 eksprese eden malign tümöre sahip köpeklerin HER2 negatif köpeklere göre daha uzun süre hayatta kaldığını gösteren çalışmalar da yer almaktadır (Hsu ve ark, 2009; Goldschmidt ve ark, 2017). Bu nedenle trastuzumab ve lapatinib gibi monoklonal tedavi protokelleri köpek meme tümörlerinin tedavisinde uygulanamamaktadır. Çalışmada olguların %19,4'ünde saptanmış olan yüksek HER2 immunpozitifliği sağlıklı kayıt sisteminin olmamasından dolayı hayvanlardaki prognoz ve hayatta kalma süresi ile ilişkilendirilememiştir. Daha sağlıklı sonuçlar ve öngörüler için ülkemizde tümörlere ilişkin bütün kayıt sistemlerinin ve hasta hayvanların hayatta kalma sürelerinin titizlikle arşivlenmesi gerekmektedir. Arşivlemedeki sıkıntılara (klinikten patolojiye) karşın, bu çalışmada 4 olgunun immunohistokimyasında invaziv karakter kazanmış malign epitel hücrelerindeki yüksek HER2 pozitifliği, yüksek mitotik aktivite ve düşük apoptotik indeksin metastazla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. HER2 reseptör

ekpresyonu, apoptozis ve yolaklarına ilişkin verilerin elde edildiği ve yorumlandığı bu tez çalışmasının Türkiye’de nc çalışmalardan biri ve ileride yapılacak ayrıntılı çalışmalar için bir basamak olacağı düşüncesindeyiz.



KAYNAKLAR

Abdelmegeed SM, Mohammed S. Canine mammary tumors as a model for human disease. *Oncology Letters* 2018, 15(6):8195-8205.

Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1995, 92:8493–8497.

Aghababazadeh M, Dorraki N, Javan FA, Fattahi AS, Gharib M, Pasdar A. Downregulation of caspase 8 in a group of Iranian breast cancer patients - A pilot study. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* 2017, 29(4):191-195.

Akiyoshi T, Uchida K, Tateyama S. Expression of bone morphogenetic protein-6 and bone morphogenetic protein receptors in myoepithelial cells of canine mammary gland tumors. *Veterinary Pathology* 2004, 41: 154-163.

Al-Dhaheri WS, Hassouna I, Al-Salam S, Karam SM. Characterization of breast cancer progression in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008, 1138:121-3.

Al-Mansour MA, Kubba MAG, Al-Azreg SA, Dribika SA. Comparative histopathology and immunohistochemistry of human and canine mammary tumors. *Open Veterinary Journal* 2018, 8(3):243-249.

Antuofermo E, Miller MA, Pirino S, Xie J, Badve S, Mohammed SI. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs-a model of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention* 2017, 16(11):2247-56.

Aydoğın A. Köpek meme tümörlerinin tanısında histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler, Doktora tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010.

Aydoğan A, Özmen O, Haligur M, Sipahi C, İleri D, Haligur A. Immunohistochemical evaluation of bcl-2, ER-alpha, Caspase -3, -8, -9, PCNA and Ki-67 expressions in canine mammary carcinomas. *Biotechnic and histochemistry* 2018, 93(4):286-292.

Balsari A, Casalini P, Bufalino R, Berrino F, Menard S. Role of hormonal risk factors in HER2-positive breast carcinomas. *British Journal of Cancer* 2003, 88(7): 1032–1034.

Barone R. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 5: Angiologie. Edition Vigot Paris 1996.

Bertagnolli A, Lavallo G, Tavares W, Ferreira E, Silva A, Campos C. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary neoplasms in dogs. *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings* 2009.

Bertagnolli AC, Ferreira E, Dias EJ, Cassali GD. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Australian Veterinary Journal* 2011, 89(8):312-7.

Blanc C, Deveraux QL, Krajewski S, Janicke RU, Porter AG, Reed JC, Jaggi R, Marti A. Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Research* 2000, 60:4386-4390.

Bongiovanni L, Romanucci M, Malatesta D, D'Andrea A, Ciccarelli A, Della Salda L. Survivin and related proteins in canine mammary tumors: immunohistochemical expression. *Veterinary Pathology* 2014, 52, 269–275.

Bucur O, Nat R, Cretoiu D, Popescu LM. Phagocytosis of apoptotic cells by microglia in vitro. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2001, 5(4):438-41.

Cameron GD. The tissue cell (continued). In: *Pathology of the cell*. Edinburgh: Olyver and Boyd, 1951, 81.425.

Campos LC, Silva JO, Santos FS, Araujo MR, Lavallo GE, Ferreira E, Cassali GD. Prognostic significance of tissue and serum HER2 and MUC1 in canine mammary cancer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2015, 27:531-5.

Cassali G, Lavallo G , De Nardi A , Ferreira E , Bertagnolli A, Lima A , Alessi A, Daleck C, Salgado BS , Fernandes CG, Sobral RA, Amorim RL, Gamba CO , Damasceno KA , Auler PA , Magalhães GM , Silva JO , Raposo JB, Ferreira AMR, Oliveira LO, Malm C, Zuccari DAPC , Tanaka NM, Ribeiro LR, Campos LC, Souza CM , Leite JS, Soares LMC , Cavalcanti MF, Fonteles ZGC, Schuch ID, Paniago J, Oliveira TS, Terra EM , Castanheira TLL, Felix AOC, Carvalho GD, Guim TN, Guim TN, Garrido E , Fernandes SC, Maia FCL, Dagli MLZ , Rocha NS, Fukumasu H, Grandi F , Machado JP, Silva SMMS, Bezerril JE, Frehse MS, Paes de Almeida EC, Campos CB. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 2014, 7(2):38-69.

Chen D, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017, 541(7637):321-330.

Coggin JH Jr, Anderson NG. Cancer, differentiation and embryonic antigens: some central problems. *Advances in Cancer Research* 1974, 19(0):105-65.

Collins I, Garrett MD. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology* 2005, 5(4):366-73.

Constantinescu GM, Schaller O. Illustrated Veterinary Anatomical Nomenclature. Stuttgart, Germany: Ferdinand Enke 1992.

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *National Reviews. Cancer* 2002, 2(9):647-656.

Dantas Cassali G, Cavalheiro Bertagnolli A, Ferreira E, Araújo Damasceno K, de Oliveira Gamba C, Bonolo de Campos C. Canine mammary mixed tumours: a review. *Veterinary Medicine International* 2012, 2012: 274608, doi: 10.1155/2012/274608.

DePinho RA, Polyak K. Cancer chromosomes in crisis. *Nature Genetics* 2004, 36(9):932-4.

Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, Sapino A, Zhang F, Sharma D, Yang XH, Tora AD, Mehta K. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 2002, 21(57):8843-51.

Dittmar T, Husemann A, Schewe Y, Nofer JR, Niggemann B, Zänker KS, Brandt BH. Induction of cancer cell migration by epidermal growth factor is initiated by specific phosphorylation of tyrosine 1248 of c-erbB-2 receptor via EGFR. *FASEB* 2002, 16(13):1823-5.

Dobashi, Y. Cell cycle regulation and its aberrations in human lung carcinoma. *Pathology International* 2005, 55(3):95-105.

Dolka I, Krol M, Sapierzynski R. Evaluation of apoptosis-associated protein (bcl-2, bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: an immunohistochemical and prognostic study. *Research in Veterinary Science* 2016, 105:124-33.

Dutra AP, Azevedo Junior GM, Schmitt FC, Cassali GD. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2008, 60 (6), 1403-1412.

Dutra AP, Granja NVM, Schmitt FC, Cassali GD. c-erb-B-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004, 37, 1673-1681.

Feldser DM, Hackett JA, Greider CW. Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. *Nature Reviews. Cancer* 2003, 3(8):623-627.

Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F. HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2007, 19(1):56-62.

Fong PC, Xue WC, Ngan HYS, Chiu PM, Chan KYK, Tsao GSW, Cheung ANY. Caspase activity is downregulated in choriocarcinoma: a cDNA array differential expression study. *Journal of Clinical Pathology* 2006, 59(2):179-183.

Frisch SM. Caspase-8: fly or die. *Cancer Research* 2008, 68:4491-3.

Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 2011, 147: 742-758.

Furrer D, Sanschagrin F, Jacob S, Diorio C. Advantages and disadvantages of technologies for HER2 testing in breast cancer specimens. *American Journal of Clinical Pathology* 2015, 144(5):686-703.

Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov A, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson V, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, García-Sáez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin P, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton S, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA,

Molkentin JD, Moll UM, Muñoz-Pinedo C1, Nagata S, Nuñez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation* 2018, 25(3):486-54.

Gama A, Alves A, Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 2008, 453(2):123-32.

Gama A, Alves A, Gartner F, Schmitt F. p63: A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Veterinary Pathology* 2003, 40: 412-420.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer* 1983, 31:13-20.

Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiehac E, Halayko AJ, Los M. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of Medical Genetics* 2009, 46(8):497-510.

Goldschmidt M, Pena L, Zappulli V. Tumors of the Mammary Gland. In: Donald J. Meuten (Ed), Tumors in Domestic Animals. 5th Ed. John Wiley & Sons, Inc, California, 2017, s 723-764.

Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* 2011, 48(1):117-31.

Goldschmidt M, Shofer FS, Smelstoys JA. Neoplastic lesions of the mammary gland. In: Mohr U, editor. Pathobiology of the aging dog. Ames, IA: Iowa State University Press 2001, 168–78.

Gonzalez-Campora R, Galera Ruiz MR, Vazquez Ramirez F, Rios Martin JJ, Fernandez Santos JM, Ramos Martos MM, Gomez Pascual A. Apoptosis in breast carcinoma. *Pathology Research Practicing* 2000, 196(3):167-74.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996, 86(3):353-64.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 7;100(1): 57-7.

Harper JW, Elledge SJ. Cdk inhibitors in development and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development* 1996, 6(1):56-64.

Hetschko H, Voss V, Horn S, Seifert V, Prehn JH, Kogel D. Pharmacological inhibition of Bcl-2 family members reactivates TRAIL-induced apoptosis in malignant glioma. *Journal of Neuro-Oncology* 2007, 86:265–272.

Hsu WL, Huang HM, Liao JW, Wong ML, Chang SC. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Veterinary Journal* 2009, 180(1):116-23.

Ignely FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2002, 2(4):277-88.

Jin S, DiPaola RS, Mathew R, White E. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *Journal of Cell Science* 2007, 120(Pt 3):379-83.

Jones TC, Hunt RD, King NV. *Veterinary Pathology*, 6 th Ed., Williams & Wilkins 1997, p: 1193-1197, Baltimore.

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994, 15;264(5157):436-40.

Karelina TV, Golubeva VA. Immunomorphological identification of myoepithelial cells in mixed mammary gland tumors in dogs. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1983, 96 (4), 1453-1455.

Kaszak I, Ruszczak A, Kanafa S, Kacprzak K, Król M, Jurka P. Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2018, 29:60(1):66.

Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK, Lipkowitz S. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Research* 1999, 59:734-741.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972, 26(4):239-57.

Khan M, Maryam A, Qazi JI, Ma T. Targeting apoptosis and multiple signaling pathways with icarisperide II in cancer cells. *International Journal of Biological Sciences* 2015, 11(9):1100-12.

Klopfleisch R, Klose P, Gruber AD. The combined expression pattern of BMP2, LTBP4, and DERL1 discriminates malignant from benign canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* 2010, 47(3):446-5.

Klopfleisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gärtner F, Gruber AD. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Veterinary Pathology* 2011, 48(1):98-116.

Knapp DW, Waters DJ. Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Molecular Medicine Today* 1997, 3:8-11.

Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2015, 16(2):2942-55.

Krelin Y, Zhang L, Kang T, Appel E, Kovalenko A, Wallach D. Caspase-8 deficiency facilitates cellular transformation in vitro. *Cell Death and Differentiation* 2008, 15(9):1350-5.

Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2016, 293(2):247-69.

Langenbach A, Anderson MA, Dambach DM, Sorenmo KU, Shofer FD. Extraskelatal osteosarcomas in dogs: A retrospective study of 169 cases (1986- 1996). *Journal of the American Animal Hospital Association* 1998, 34 (2): 113-120.

Laperchia C, Tesoriero C, Seke-Etét PF, La Verde V, Colavito V, Grassi-Zucconi G, Rodgers J, Montague P, Kennedy PGE, Bentivoglio M. Expression of interferon-inducible chemokines and sleep/wake changes during early encephalitis in experimental African trypanosomiasis, *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2017, 18;11(8):e0005854.

Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 2008, 27(48):6194-206.

Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu Z. Cleavage of the death domain kinase RIP by Caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes and Development* 1999, 13(19): 2514–2526.

Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, DeJong PJ, Kirkness E, Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin CW, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L, Koepfli KP, Parker HG, Pollinger JP, Searle SM, Sutter NB, Thomas R, Webber C, Baldwin J, Abebe A, Abouelleil A, Aftuck L, Ait-Zahra M, Aldredge T, Allen N, An P, Anderson S, Antoine C, Arachchi H, Aslam A, Ayotte L, Bachantsang P, Barry A, Bayul T, Benamara M, Berlin A, Bessette D, Blitshteyn B, Bloom T, Blye J, Boguslavskiy L, Bonnet C, Boukhgalter B, Brown A, Cahill P, Calixte N, Camarata J, Cheshatsang Y, Chu J, Citroen M, Collymore A, Cooke P, Dawoe T, Daza R, Decktor K, DeGray S, Dhargay N, Dooley K, Dooley K, Dorje P, Dorjee K, Dorris L, Duffey N, Dupes A, Egbiremolen O, Elong R, Falk J, Farina A, Faro S, Ferguson D, Ferreira P, Fisher S, FitzGerald M, Foley K, Foley C, Franke A, Friedrich D, Gage D, Garber M, Gearin G, Giannoukos G, Goode T, Goyette A, Graham J, Grandbois E, Gyaltzen K,

Hafez N, Hagopian D, Hagos B, Hall J, Healy C, Hegarty R, Honan T, Horn A, Houde N, Hughes L, Hunnicutt L, Husby M, Jester B, Jones C, Kamat A, Kanga B, Kells C, Khazanovich D, Kieu AC, Kisner P, Kumar M, Lance K, Landers T, Lara M, Lee W, Leger JP, Lennon N, Leuper L, LeVine S, Liu J, Liu X, Lokyitsang Y, Lokyitsang T, Lui A, Macdonald J, Major J, Marabella R, Maru K, Matthews C, McDonough S, Mehta T, Meldrim J, Melnikov A, Meneus L, Mihalev A, Mihova T, Miller K, Mittelman R, Mlenga V, Mulrain L, Munson G, Navidi A, Naylor J, Nguyen T, Nguyen N, Nguyen C, Nguyen T, Nicol R, Norbu N, Norbu C, Novod N, Nyima T, Olandt P, O'Neill B, O'Neill K, Osman S, Oyono L, Patti C, Perrin D, Phunkhang P, Pierre F, Priest M, Rachupka A, Raghuraman S, Rameau R, Ray V, Raymond C, Rege F, Rise C, Rogers J, Rogov P, Sahalie J, Settipalli S, Sharpe T, Shea T, Sheehan M, Sherpa N, Shi J, Shih D, Sloan J, Smith C, Sparrow T, Stalker J, Stange-Thomann N, Stavropoulos S, Stone C, Stone S, Sykes S, Tchuinga P, Tenzing P, Tesfaye S, Thoulutsang D, Thoulutsang Y, Topham K, Topping I, Tsamla T, Vassiliev H, Venkataraman V, Vo A, Wangchuk T, Wangdi T, Weiland M, Wilkinson J, Wilson A, Yadav S, Yang S, Yang X, Young G, Yu Q, Zainoun J, Zembek L, Zimmer A, Lander ES. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 2005, 438(7069):803-19.

Lipponen P. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocrinology Related Cancer* 1999, 6(1):13-6.

Long JS, Ryan KM. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene* 2012, 31(49):5045-60.

Löhr CV, Teifke JP, Failing K, Weiss E. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Veterinary Pathology* 1997, 34: 212-221.

Luna LG. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Edition 1968, McGraw-Hill, New York.

Lutful Kabir FM, DeInnocentes P, Bird RC. Altered microRNA expression profiles and regulation of INK4A/CDKN2A tumor suppressor genes in canine breast cancer models. *Journal of Cellular Biochemistry* 2015, 116(12):2956-69.

Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Anti microbial and Anticancer Chemothrepy* 2007, 10(1-2):13-29.

Maemura M, Lino Y, Oyama T, Hikino T, Yokoe T, Takei H, Horiguchi J, Ohwada S, Nakajima T, Morishita Y. Spindle cell carcinoma of the breast. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 1997, 27 (1): 46-50.

Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews. Cancer* 2001, 1(3):222-31.

Martin AM, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2000, 92(14):1126-35.

Martins AMCRPF, Tamaso E, Guerra. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2002, 39 (1): 38-42.

Matos AJ, Santos AA. Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine mammary tumours: part 1. Proliferation, apoptosis and DNA repair. *Veterinary Journal* 2015, 205(2):136-43.

Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 2005, 447(4):688-94.

Matsumoto A, Jinno H, Ando T, Fujii T, Nakamura T, Saito J, Takahashi M, Hayashida T, Kitagawa Y. Biological markers of invasive breast cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2016, 46(2), 99-105.

Menard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene* 2003, 22(42):6570-8.

Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, Ratto A, Sambucco PL, Sestito V, Tanara G, Bocchini V. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Medicine* 2008, 22(4):976-84.

Miller ME, Christensen GC, Evans HE , The mammary gland. *Anatomy of the Dog*. W.B. Saunders, Philadelphia 1964, 789–803.

Milli ÜH, Hazıroğlu R, Aydın Y, Gülbahar MY. Köpek meme tümörlerinde sitokeratin, vimentin ve alfa-düz kas aktin intermedier ve mikro filamentlerinin immunohistokimyasal lokalizasyonu. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 2000, 24: 81-92.

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

Misdorp W. Tumors of the Mammary Gland Book Editor(s): Donald J. Meuten DVM, PhD 2008.

Misdorp W, Cotchin E, Hampe JF, Jabara AG, von Sandersleben J. Canine malignant mammary tumours: II. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. *Veterinary Pathology* 1972, 9:447–470.

Misdorp W, Cotchin E, Hampe JF, Jabara AG, Von Sandersleben J. Canine malignant mammary tumours. III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. *Veterinary Pathology* 1973, 10:241-256.

Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP. Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat, 2nd series, Vol. 7. *Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization*, 1999, Washington, D.C.

Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 2007, 129:665–679.

Monteros AEL, Hellmen E, Ramirez GA, Herraes P, Rodriguez F, Ordas J, Millan Y, Lara A, Mulas JML. Lipid-rich carcinomas of the mammary gland in seven dogs: Clinicopathologic and immunohistochemical features. *Veterinary Pathology* 2003, 40:718-723.

Monteros AEL, Millan MY, Ordas J, Carrasco L, Reymundo C, Las Mulas JM. Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: Assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. *Veterinary Pathology* 2002, 39:247-256.

Moulton JE. Tumors of the Mammary Gland, Moulton JE (ed), Tumors in Domestic Animals, 3 rd Ed., University of California Press 1990, p: 518, California.

Muhammadnejad A, Keyhani E, Mortazavi P, Behjati F, Haghdoost IS. Overexpression of HER-2/neu in malignant mammary tumors; translation of clinicopathological features from dog to human. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012, 13(12):6415-21.

Murakami Y, Tateyama S, Rungsipipat A, Uchida K, Yamaguchi R. Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 2000, 62, 743–750.

Mustonen M, Raunio H, Paakkö P, Soini Y. The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. *Histopathology* 1997, 31(4):347-54.

Nguyen F, Peña L, Ibisch C, Loussouarn D, Gama A, Rieder N, Belousov A, Campone M, Abadie J. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Research and Treatment* 2018, 167(3):635-648.

Nunesa FC, Damasceno KA, Campos CB, Bertagnolli AC, Lavalle GE, Cassal GD. Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. *Veterinary and Animal Science* 2019, 100039.

Nurse PM. Nobel Lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Bioscience Reports* 2002, 22(5-6):487-99.

Nwabo Kamdje AH, Seke Etet PF, Vecchio L, Muller JM, Krampera M, Lukong KE. Signaling pathways in breast cancer: therapeutic targeting of the microenvironment. *Cell Signal* 2014, 26(12):2843-56.

O'Donovan N, Crown J, Stunell H, Hill ADK, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Caspase 3 in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2003, 9, 738-742.

Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology Letters* 2004, 149(1-3):19-23.

Özen D, Gürcan S, Kaya U. Ankara ilinde yer alan sahipli kedi ve köpek popülasyonunun belirlenmesi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* 2014, 85(1):9-16.

Panigrahi S, Mai S. Telomeres, Genomic Instability, DNA Repair and Breast Cancer. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 2005, 4(4), 421-428.

Park HL, Ziogas A, Chang J, Desai B, Bessonova L, Garner C, Lee E, NeuhausenSL, Wang SS, Ma H, Clague J, Reynolds P, V Lacey Jr J, Bernstein L, Anton-Culver H.

Novel polymorphisms in caspase-8 are associated with breast cancer risk in the California Teachers Study. *BioMed Central Cancer* 2016, 12;16:14.

Park JW, Neve RM, Szollosi J, Benz CC. Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2. *Clinical Breast Cancer* 2008, 8(5):392-401.

Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013, 5(6). pii: a008672.

Pena 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. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 2014, 51(1):127-45.

Pereira KS, Zuccari DAPC, Cury PM, Cordeiro JA. Apoptosis as a prognostic marker in canine mammary tumors by TUNEL. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2003, 40:359-365.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Gnant V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 2005, 353(16):1659-72.

Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* 2016, 8(4):603-619.

Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative Biology* 2011, 3(4):279-96.

Polton G. Mammary tumours in dogs. *Irish Veterinary Journal* 2009, 62(1): 50-56.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* 2003, 283:1–16.

Pu X, Storr SJ, Zhang Y, Rakha EA, Green AR, Ellis IO, Martin SG. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis* 2017, 22(3):357-368.

Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia* 2000, 2(4):291-299.

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

Rasotto R, Zappulli V, Castagnaro M, Goldschmidt MH. A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Veterinary Pathology* 2012, 49:330–340.

Reedijk M, Pinnaduwa D, Dickson BC, Mulligan AM, Zhang H, Bull SB, O'Malley FP, Egan SE, Andrulis IL. JAG1 expression is associated with a basal phenotype and recurrence in lymph node-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2008, 111(3):439-48.

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

Rimawi MF, Schiff R, Osborne CK. Targeting HER2 for the treatment of breast cancer. *Annual Review of Medicine* 2015, 66:111-128.

Rizzo P, Miao H, D'Souza G, Osipo C, Song LL, Yun J, Zhao H, Mascarenhas J, Wyatt D, Antico G, Hao L, Yao K, Rajan P, Hicks C, Siziopikou K, Selvaggi S, Bashir A, Bhandari D, Marchese A, Lendahl U, Qin JZ, Tonetti DA, Albain K, Nickoloff BJ, Miele L. Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. *Cancer Research* 2008, 68(13):5226-35.

Rodrigues H, Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL. Clinicopathological significance of caspase-3 and Ki-67 expression in canine mammary gland tumours. *Acta Veterinaria Hungarica* 2016, 64(1):78-89.

Ronchini C, Capobianco AJ. Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch: Implication for cell cycle disruption in transformation by Notch. *Molecular and Cellular Biology* 2001, 21(17), 5925- 5934.

Rungsipipat A, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K, Miyoshi N, Hayashi T. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary medicine Science* 1999, 61(1):27-32.

Russo J, Russo I. Atlas and Histologic Classification of Tumors of the Rat Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2000, 5(2):187-200.

Russo J, Tay LK, Russo IH. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Research and Treatment* 1982, 2(1):5-73.

Salas Y, Marquez A, Diaz D, Romero L. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002–2012: A growing animal health problem. *PLoS ONE* 2015, 18:10(5).

Salomon FV, Geyer H, Gille U, Milchdruse, Mamma. Anatomie für die Tiermedizin, 2nd edn. Enke, Stuttgart 2008, pp. 645–655.

Saminathan M, Rai RB, Dhama K, Ranganath GJ, Murugesan V, Kannan K, Pavulraj S, Gopalakrishnan A, Suresh C. Histopathology and immunohistochemical expression of N-Methyl-N-Nitrosourea (NMU) induced mammary tumours in Sprague-Dawley rats. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 2014, 10, 621.

Sassi F, Sarli G, Brunetti B, Morandi F, Benazzi C. Immunohistochemical characterization of mammary squamous cell carcinoma of the dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2008, 20: 766-773.

Sfacteria A, Bertani C, Costantino G, Del Bue, Paiardini M, Cervasi B, Piedimonte A, De Vico G. Cyclin D1 Expression in Pre-cancerous and Cancerous Lesions of the Canine Mammary Gland. *Journal of Comparative Pathology* 2003, 128:245–251.

Shephard ND, Abo R, Rigas SH, Frank B, Lin WY, Brock IW, Shippen A, Balasubramanian SP, Reed MW, Bartram CR, Meindl A, Schmutzler RK, Engel C, Burwinkel B, Cannon-Albright LA, Allen-Brady K, Camp NJ, Cox A. A breast cancer risk haplotype in the caspase-8 gene. *Cancer Research* 2009, 1;69(7):2724-8.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996, 274(5293):1672-1677.

Shinoda H, Legare ME, Mason GL, Berkbighler JL, Afzali MF, Flint AF, Hanneman WH. Significance of ER α , HER2, and CAV1 expression and molecular subtype classification to canine mammary gland tumor. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2014, 26(3):390-403.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *A cancer journal for clinicians* 2016, 66(1):7-30.

Singer J, Weichselbaumer M, Stockner T, Mechtcheriakova D, Sobanoy Y, Bajna E, Wrba F, Horvat R, Thalhammer JG, Willmann M, Jensen-Jarolim E. Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. *Molecular Immunology* 2012, 50(4-3): 200–209.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987, 235(4785):177-82.

Sleeckx N, de Rooster H, Veldhuis Kroeze EJ, Van Ginneken C, Van Brantegem L. Canine mammary tumours, an overview. *Reproduction in Domestic Animals* 2011, 46(6):1112-31.

Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 2003, 33(3):573-96.

Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology* 2011, 48(1):85-97.

Tait SW, Green DR. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013, 5(9). pii:a008706.

Tateyama S, Uchida K, Hidaka T, Hirao M, Yamaguchi R. Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumor. *Veterinary Pathology* 2001, 38: 703-709.

TC Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Türkiye Kanseri İstatistikleri, 2016. [http://www.onkoloji.gov.tr/attachments/article/8653/Ana%20Rapor%202016%20\(v01.2\).pdf](http://www.onkoloji.gov.tr/attachments/article/8653/Ana%20Rapor%202016%20(v01.2).pdf) (10.01.2020).

Theodoropoulos GE, Michalopoulos NV, Pantou MP, Kontogianni P, Gazouli M, Karantanos T, Lymperi M, Zografos GC. Caspase 9 promoter polymorphisms confer increased susceptibility to breast cancer. *Cancer Genetics* 2012, 205(10):508-12.

Thomberry NA, Laxebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998, 281:1312-1316.

Toniti W, Buranasinsup S, Kongcharoen A, Charoonrut P, Puchadapirom P, Kasorndorkbua C. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2009, 10: 907-911.

Ulybina YM, Kuligina ES, Mitiushkina NV, Sherina NY, Baholdin DV, Voskresenskiy DA, Polyakov IS, Togo AV, Semiglazov VF, Imyanitov EN. Distribution of coding apoptotic gene polymorphisms in women with extreme phenotypes of breast cancer predisposition and tolerance. *Tumori* 2011, 97(2):248-51.

Vakkala M, Paakkö P, Soini Y. Expression of caspases 3, 6, and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *British Journal of Cancer* 1999, 81:592-599.

Vural SA, Aydın Y. Ankara’da 1973-1998 yılları arasında incelenen köpek meme tümörleri. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 2001, 25:233-239.

Wahler J, Suh N. Targeting HER2 positive breast cancer with chemopreventive agents. *Current Pharmacology Reports* 2015, 1, 324-335.

WEB_1. (2020). American Veterinary Medical Association website. <https://www.avma.org/public/PetCare/Pages/Cancer-in-Pets.aspx> (08.01.2020).

Wensman H, Flama V, Pejler G, Hellmen E. Plasticity of cloned canine mammary spindle cell tumor, osteosarcoma and carcinoma cells. *Veterinary Pathology* 2010, 45 (6): 803-815.

Wesola M, Jelen MA Comparison of IHC and FISH cytogenetic methods in the evaluation of HER2 status in breast cancer. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 2015, 24(5), 899-903.

Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, Bilous M, Ellis IO, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Press MF, Spears PA1, Vance GH, Viale G, McShane LM, Dowsett M. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline focused update. *Journal of Clinical Oncology* 2018, 36(20):2105-2122.

Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2011, 26:30-87.

Wong SCC, Chan JKC, Lee KC, Hsiao WLW. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Journal of Pathology* 2001, 194:35-42.

Xia W, Chen J, Zhou X, Sun P, Lee D, Liao Y, Zhou BP, Hung M. Phosphorylation/cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 is associated with HER2/neu overexpression and provides a novel combination predictor for poor prognosis in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2004, 10(11):3815-24.

Yang WY, Liu CH, Chang CJ, Lee CC, Chang KJ, Lin CT. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *Journal of Comparative Pathology* 2006, 134(1):70-9.

Yang S, Liu J, Thor AD, Yang X. Caspase expression profile and functional activity in a panel of breast cancer cell lines. *Oncology Reports* 2007, 17(5):1229–36.

Yang X, XinY, Mao L. Clinicopathological significance of PTEN and caspase-3 expressions in breast cancer. *Chinese Medical Sciences Journal* 2008, 23(2):95-102.

Zeng M, Zheng M, Lu D, Wang J, Jiang,W, Sha O. Anti-tumor activities and apoptotic mechanism of ribosome-inactivating proteins. *Chinese Journal of Cancer* 2015, 34:30.

Zeng Q, Li S, Chepeha DB, Giordano TJ, Li J, Zhang H, Polverini PJ, Nor J, Kitajewski J, Wang CY. Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer Cell* 2005, 8(1):13-23.

Zhang L, Zhang X, Wang X, He M, Qiao S. MicroRNA-224 promotes tumorigenesis through downregulation of caspase-9 in triple-negative breast cancer. *Disease Markers* 2019, 11;2019:7378967.

Zhang Y, Tounekti O, Akerman B, Goodyer CG, LeBlanc A. 17-beta-estradiol induces an inhibitor of active caspases. *Journal of Neuroscience* 2001, 21(20):RC176.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : AKKOÇ, Ayşe Nur
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Yeşilova / 31.07.1988
E-mail : anakkoc@adu.edu.tr
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
İlköğretim	Evrenosbey İlköğretim Okulu	2002
Lise	Şarköy Lisesi	2006
Lisans	Ankara Üniversitesi	2011

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2012-2013	Milli Eğitim Bakanlığı	Ücretli Öğretmenlik
2013-2014	Tarım ve Orman Bakanlığı	Veteriner Hekim
2014-	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	Araş. Gör.

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Akkoc AN, Toplu N. Kanser kök hücresi. *Animal Health, Production and Hygiene*, 2017, 5(1):416-422.

Akkoç AN, Toplu N. RNA interferens. *Animal Health, Production and Hygiene*, 2017, 6(1):468-476.

Avcı H, Epikmen ET, İpek E, Tunca R, Birincioğlu SS, Akşit H, Sekkin S, Akkoç AN, Boyacıoğlu M. Protective effects of silymarin and curcumin on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2017, 14;69(5):317-327.

Birincioğlu SS, Aypak S, Avcı H, Birincioğlu B, İpek E, Akkoç AN. Şişe burunlu bir yunusta (*Tursiops truncatus*) patolojik ve parazitolojik incelemeler. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2017, 23(6):1011-1014.

Oğuzoğlu TÇ, Toplu N, Koç BT, Doğan F, Epikmen ET, İpek E, Akkoç AN. First molecular detection and characterization of Akabane virus in small ruminants in Turkey. *Archives of Virology* 2015, 160(10):2623-7.

Toplu N, Özcan E, Oğuzoğlu TÇ, Albayrak H, Epikmen ET, İpek E, Akkoç AN. Gökkuşaağı alabalıklarında infeksiyöz pankreatik nekrozun patogenezi Üzerine deneysel bir araştırma: Tip 1 interferonların innate (doğal) bağışıklıktaki rolü. *Animal Health, Production and Hygiene* 2017, 6(2):493-498.

Toplu N, Oğuzoğlu TÇ, Akkoç AN, İpek E, Epikmen ET, Koç BT. Akabane virus infection in a Calf in Aegean Region of Turkey. *Animal Health, Production and Hygiene* 2018, 7(2):596-595.

2. PROJELER

Gökkuşaağı Alabalıklarında İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozun Patogenezi Üzerine Deneysel Bir Araştırma Apoptosis ve Tip 1 İnterferonların İnnate Doğal Bağışıklıktaki Rolü, 01.01.2014.

Mevcut nekropsisi salonunun Avrupa Veteriner Eğitim Kurumları Birliğı standartlarına uygun olarak yeniden yapılandırılması, 24.03.2014.

İnfeksiyöz Pankreatik Nekroz IPN'un Tanısı için İn Situ Hibridizasyon Moleküler kitinin Geliştirilmesi, 01.08.2015.

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Akkoç AN, Epikmen ET, Aypak S, Bakırcı S, Avcı H, İpek E, Birincioğlu SS. Mediterranean monk seal deaths in the Aegean sea: Pathological and parasitological investigations. 4th International Congress on Veterinary and Animal Sciences (Özet bildiri) 10.07.2018, Nevşehir.

Akkuş T, Peker C, Akkoç AN, Uçar EH. Meme tümörlerinde preoperatif ultrasonografi gerekliliğine bir örnek: Tümör-fıtık birlikteliği. Türk Veteriner Jinekoloji Derneği VII. Ulusal I. Uluslararası Kongresi (Özet bildiri) 12.10.2017, Muğla.

Avcı H, Epikmen ET, İpek E, Tunca R, Birincioğlu SS, Akşit H, Sekkin S, Akkoç AN, Boyacıoğlu M. Protective effects of silymarin and curcumin on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants "Natural and Healthy Life" (Özet bildiri) 09.05.2017, Konya.

Birincioğlu SS, Aypak S, Avcı H, İpek E, Akkoç AN. Pathological and parasitological investigations in an adult bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). 18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish (Özet bildiri) 10.10.2017, Belfast, United Kingdom.

Epikmen ET, İpek E, Tunca R, Akkoç AN, Avcı H, Birincioğlu SS, Toplu N. Oncogenesis of canine mast cell utmors: Investigation of activating mutations in c-KIT. 4th International Congress on Veterinary and Animal Sciences, (Özet bildiri) 10.07.2018, Nevşehir.

Gür M, Berke E, Akkoç AN. Results of *Aeromonas veronii* cases in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) 2. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi, (Tam metin bildiri) 25.10.2019, Aydın.

Hesapçıoğlu M, Akkoç AN, Avcı H. Mast cell tumor in an 11 years old dog 2. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi, (Tam metin bildiri) 25.10.2019, Aydın.

İpek E, Epikmen ET, Tunca R, Toplu N, Akkoç AN. Pathologic and molecular diagnosis of canine nonepitheliotropic cutaneous T-cell lymphoma: Case report and literature review. 2. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi, (Tam metin bildiri) 25.12.2019, Aydın.

Tuna B, Akkuş T, Peker C, Uçar EH, Akkoç AN. Two common types of vaginal masses in female dogs. II. International Congress on Advances in Veterinary Sciences and Technics (Özet bildiri) 25.10.2017, Skopje, Macedonia.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Birincioğlu SS, Avcı H, İpek E, Epikmen ET, Avsever ML, Akkoç AN, Berke E. Erişkin levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) kronik fotobakteriyozis enfeksiyonunda patolojik ve immunohistokimyasal incelemeler. 8. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi (Özet bildiri) 03.09.2016, Samsun.

Birincioğlu SS, İpek E, Akkoç AN, Avcı H. İki aylık holstein ırkı bir buzağıda fallot tetralojisi. 8. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi (Özet bildiri) 03.09.2016, Samsun.

Toplu N, Epikmen ET, İpek E, Akkoç AN. Arşiv parafin bloklardan köpek viseral Leishmaniasisin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile Leishmania infantumun genomik DNA'sının belirlenmesi 8. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi (Özet bildiri) 03.09.2016, Samsun.

Toplu N, Oğuzoğlu TÇ, Akkoç AN, Epikmen ET, İpek E, Koç BT. Ege bölgesinde bir sığır işletmesinde Akabane enfeksiyonu. 8.Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi (Özet bildiri) 03.09.2016, Samsun.

Toplu N, Özcan E, Albayrak H, Oğuzoğlu TÇ, Epikmen ET, İpek E, Akkoç AN. Gökkuşáğı alabalıklarında deneysel olarak oluşturulan persiste infeksiyöz pankreatik nekrozis hastalığında apoptozis ve tip 1 interferonların doğal bağışıklıktaki rolü. 8. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi (Özet bildiri) 03.09.2016, Samsun.