

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**KOYUN PULMONER ADENOKARSİNOMLARINDA PRİMER
VE METASTATİK KİTLELERDE EPİTELYAL HÜCRE
MARKIRLARI, SÜRFAKTAN PROTEİNLER VE LENFOSİTİK
FENOTİPLERİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Betül KAVAS

**Danışman
Prof. Dr. Enver BEYTUT**

2023 - KARS

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANA BİLİM DALI

**KOYUN PULMONER ADENOKARSİNOMLARINDA PRİMER
VE METASTATİK KİTLELERDE EPİTELYAL HÜCRE
MARKIRLARI, SÜRFAKTAN PROTEİNLER VE LENFOSİTİK
FENOTİPLERİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Betül KAVAS

Danışman

Prof. Dr. Enver BEYTUT

Bu tez BAP tarafından 2021-TS-35 proje numarası ile desteklenmiştir.

2023 - KARS

ÖNSÖZ

Koyun pulmoner adenokarsinomu, Retrovirüs tip D tarafından oluşturulan ve küçük ruminantlarda sağlık problemleri ile birlikte ekonomiyi olumsuz etkileyen tümöral bir hastalıktır. Hastalığın prevalansı ülkeden ülkeye değişmekle beraber, etkilenen sürülerde yıllık ortalama % 2 ile % 10 arasında ölüme neden olmaktadır. Enfeksiyon genellikle aerosol yol ile bulaşmakla birlikte, süt veya kolostrum ile de taşınabildiği, bu nedenle başarılı bir eradikasyon programı için yeni doğan yavruların sürüden ayrılmasının uygun olacağı açıklanmıştır. Ayrıca tarama ve itlafa dayalı kontrol önlemleri oldukça önemli olup, enfekte hayvanları belirlemek için hassas ve spesifik serolojik testler gereklidir. Koyun pulmoner adenokarsinomu, klasik ve atipik form olmak üzere iki şekilde görülmektedir. Enfeksiyon nadiren yeni doğan kuzularda da görülebilmektedir. Tümörler, makroskopik olarak parlak veya yarı saydam olup, sert ve gri renktedirler. Mikroskopik olarak tümöral proliferasyonlar adenomatoid yapıda veya alveollere doğru uzanan papilliform büyümeler şeklindedir. Özellikle akciğerlerde şiddetli tutulum olan vakalarda nadiren bölge lenf düğümlerine metastazlar yapabilmektedir. Koyun pulmoner adenokarsinomlarında etken virüs özellikle tip II pnömositleri enfekte ederek proliferasyona neden olduğu için sürfaktan protein ekspresyonu artmaktadır. Hastalığın tümorogenezisi ve patolojisi ile ilgili bilimsel çalışmalar literatürde bulunmakla beraber, hastalıkta sürfaktan proteinler ve sitokeratin ekspresyonlarının karşılaştırıldığı sınırlı sayıda bilimsel çalışma mevcuttur. Bu çalışmada pulmoner adenokarsinom saptanan koyunların akciğerlerinde ve bölge lenf düğümlerinde sürfaktan proteinler ve sitokeratin ekspresyonları ile neoplastik dokularda tümöre karşı gelişen immün yanıt için lenfositik fenotipler incelenmiş olup, kullanılan epitelyal markırların koyun pulmoner adenokarsinomlarının ayırıcı tanısına ışık tutma potansiyeli değerlendirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim süresince değerli bilgilerini aktaran danışmanım, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Enver BEYTUT'a, Patoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Serpil DAĞ'a tez süresince yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üy. Emin KARAKURT'a, Arş. Gör. Hilmi NUHOĞLU'na, Arş. Gör. Ayfer YILDIZ'a ve Kars Harakani Devlet Hastanesi Patoloji laboratuvarında çalışan değerli mesai arkadaşlarım

ile Uzm. Biyolog Hatice BEŞEREN'e ve her zaman yanımda olan aileme
teşekkürlerimi sunarım.



ÖZET

Koyun Pulmoner Adenokarsinomlarında Primer ve Metastatik Kitlelerde Epitelyal Hücre Markırları, Sürfaktan Proteinler ve Lenfositik Fenotiplerin İmmünohistokimyasal Olarak Araştırılması

Bu çalışmada OPA'lı akciğer ve metastazlı lenf düğümlerinde gelişen neoplastik proliferasyonların histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan ve bölge mezbahalarında kesilen koyunlardan alınan toplam 20 OPA'lı akciğer ile metastazlı 3 adet mediastinal lenf düğümü materyal olarak kullanıldı. Rutin olarak hazırlanan parafin bloklardan alınan 4 µm kalınlığında seri kesitler normal ve Poly-L-Lysine kaplı lamlara alındı. Normal lamlara alınan kesitler hematoksil-eozin (HE) ile boyanarak histopatolojik olarak incelendi. Poly-L-Lysine kaplı lamlara alınan seri kesitler ise Avidin-Biotin Kompleks Peroksidaz (ABC-P) tekniği ile sürfaktan proteinler (SP) (SP-A, SP-B, SP-C), Multi-Cytokeratin (MCK, AE1/AE3), Pan-Cytokeratin-26 (PCK-26), CD3 ve CD79αcy primer antikörleri kullanılarak immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. OPA'lı akciğerlerde makroskopik olarak değişen boyutlarda düzensiz, grimsi ve sert odaklar tespit edildi. Histopatolojik incelemelerde klasik OPA olarak belirlenen olgularda alveollerde bezsel ya da papiller tarzda tümör hücre proliferasyonlarının akciğer parankimine yayıldığı dikkati çekti. Atipik OPA olgularında ise neoplastik proliferasyonların daha çok nodüler halde parankime yayıldıkları görüldü. Ayrıca her iki OPA tipinde peritümöral alveoler lümende çok sayıda alveoler makrofaj ile nötrofilik eksudasyon izlendi. Üç olguda tümörün mediastinal lenf düğümlerine metastaz yaptığı, subkapsüler, kortikal ve medullar bölgede tümöral proliferasyonların olduğu saptandı. Sürfaktan proteinler için yapılan immün boyamalarda hem klasik hem de atipik OPA olgularında tümör hücrelerinin sitoplazmasında immünopozitif reaksiyon olduğu ancak matür SP-B reaksiyonunun SP-A ve SP-C'ye kıyasla daha şiddetli olduğu saptandı. SP karşı reaksiyonunun özellikle hücrelerin apikal sitoplazmasında şekillendiği görüldü. Ayrıca tümör hücrelerinin yanı sıra normal parankimde tip II pnömositler ile alveoler makrofajlarda SP-A ve SP-B pozitif reaksiyon gözlemlendi. Sitokeratin ekspresyonlarını

değerlendirmek için yapılan boyamalarda akciğerlerde yine hem klasik hem de atipik OPA'da neoplastik odaklarda tümör hücrelerinin sitoplazmasında şiddetli pozitif reaksiyon görüldü. Tümör hücrelerine ilaveten tüm bronş ve bronşial epiteller ile non neoplastik tip I ve tip II pnömositlerde de açık olarak MCK ve PCK-26 immün pozitif şiddetli reaksiyon tespit edildi. Metastazlı lenf düğümlerinde akciğerlere benzer biçimde tümör hücrelerinin şiddetli MCK ve PCK-26 pozitif oldukları belirlendi. SP-B ve MCK için yapılan indirekt immünofloresan (IF) boyamalarda OPA'lı akciğer ve metastazlı lenf düğümlerinde neoplastik ve normal akciğer epitellerinde pozitif reaksiyon saptandı. Akciğerlerde her iki formdaki neoplastik proliferasyonlarda tümör mikro çevresinde gelişen hücrel infiltrasyonlarda CD3⁺ T ve CD79acy⁺ B lenfositlerin bulunduğu ancak T hücrelerin daha baskın olduğu saptandı. Sonuç olarak bu çalışmada koyun pulmoner adenokarsinomlu akciğerler ve metastazlı lenf düğümlerinde neoplastik hücrelerin sürfaktan proteinleri sentezlediği belirlenmiş ve tümör hücre orjinin belirlenmesinde sürfaktan proteinlerin spesifik olması nedeniyle diagnostik öneme sahip olduğu tespit edildi. Yine hem akciğerler hem de metastazlı lenf düğümlerinde neoplastik hücrelerin MCK ve PCK-26 immün pozitif reaksiyon gösterdikleri ve SP antikorlara kıyasla reaksiyonun daha şiddetli olduğu belirlendi. Ancak sitokeratin boyamalarında akciğerlerde tümör hücrelerinin yanı sıra bronşial mukoza ve bez epitelleri ile tip I pnömositlerin de pozitif reaksiyon göstermeleri nedeniyle, sürfaktan proteinlerin tip II pnömositlerin ortaya konulmasında daha spesifik olabileceğini gösterdi. Dolayısıyla, elde edilen bulgular, Jaakiekte tip D Retrovirüsünün tip II pnömositleri enfekte ederek neoplastik transformasyona neden olduğu ve özellikle tümörün akciğerlerde yaygın olduğu vakalarda bölge lenf düğümlerine metastaz potansiyelinin bulunduğu tespit edildi. Sitokeratin markırlarının tüm akciğer epitellerinde pozitif reaksiyon vermesi ile birlikte, tümörün daha çok tip II pnömosit kökenli olması ve sürfaktan ekspresyonlarının sadece bu hücrelere spesifik olması, primer ve metastatik kitlelerde tümör hücre orjinin araştırılmasında SP'lerin daha spesifik olabileceğini ortaya koydu. Ayrıca tümör mikro çevresinde özellikle T lenfosit infiltrasyonun bulunması tümöre karşı hücrel immüniteye işaret etti.

Anahtar Sözcükler: Koyun, Koyun pulmoner adenokarsinoma, Histopatoloji, İmmünohistokimya.

ABSTRACT

Immunohistochemical Investigation of Epithelial Cell Markers, Surfactant Proteins, and Lymphocytic Phenotypes in the Primary and Metastatic Masses in Sheep Pulmonary Adenocarcinomas

In this study, the research of neoplastic proliferation developing in the lungs and metastatic lymph nodes of sheep with adenocarcinoma by histopathological and immunohistochemical methods was aimed. Taken from the archives of the Pathology Department of the Veterinary Faculty of Kafkas University and from the sheep slaughtered in regional slaughterhouses, a total of 20 lungs with OPA and 3 metastatic lymph nodes were used as the material in the study. The serial sections with 4 µm thickness taken from routinely prepared paraffin-embedded blocks were transferred to normal and Poly-L-Lysine-coated glass slides. The sections transferred to normal glass slides were evaluated histopathologically after being stained with hematoxylin-eosin (HE). The serial sections transferred to glass slides coated with Poly-L-Lysine were evaluated immunohistochemically with Avidin-Biotin Complex Peroxidase (ABC-P) technique using surfactant proteins (SP) (SP-A, B, SP-C), Multi-Cytokeratin (MCK, AE1/AE3), pan-Cytokeratin 26 (PCK-26), CD3 and CD79α primary antibodies. In the lungs with OPA, irregular, grayish hard focuses were grossly detected in different sizes. In the histopathological examinations, the fact that glandlike or papillary tumoral cell proliferations spread to lung parenchyma drew attention. In the atypical OPA cases, it was seen that neoplastic proliferations spread to the parenchyma more in nodular form. Also in both OPA types, numerous alveolar macrophages and neutrophilic exudations in peritumoral alveolar lumen were monitored. It was determined that the tumor metastasized in three cases in mediastinal lymph nodes and tumoral proliferations occurred in subcapsular, cortical and medullary regions. It was determined that, in the immunostaining of surfactant proteins, in all classical and atypical OPA cases immunopositive reaction in the cytoplasm of tumor cells occurred, yet SP-B reaction was more severe compared to SP-A and SP-C. The reaction against these proteins were seen especially in the apical cytoplasm. Moreover, in addition to tumor cells, type II pneumocytes in parenchyma and SP-A and SP-B positive reaction were observed in alveolar macrophages. In the stainings practised for the purpose of evaluation of cytokeratin expressions, severe

positive reaction was observed in the cytoplasm of tumor cells in neoplastic focuses in both classical and atypical OPA types. In addition to tumor cells, severe immune-positive MCK and PCK-26 reactions were detected in all bronchi and bronchiolar epithelia and non-neoplastic type I and type II pneumocytes. The tumor cells were also determined to be severe MCK and PCK-26 positive in metastatic lymph nodes similar to the lungs. Indirect immunofluorescent (IF) staining for SP-B and MCK revealed a positive reaction in the neoplastic and normal lung epithelium of the lung with OPA and lymph nodes with metastases. In the cellular infiltrations developing around tumor-micro especially in both classical and neoplastic proliferations in the lungs, it was determined that CD3⁺ T and CD79⁺ B lymphocytes existed, yet T cells were more dominant. In conclusion, it was found that neoplastic cells synthesized surfactant proteins in the lungs and metastatic lymph nodes with OPA and it was identified that they had diagnostic importance due to the fact that the surfactant proteins were specific in the determination of the origin of tumor cells in this study. It was also detected that in both lungs and metastatic lymph nodes, neoplastic cells showed immune-positivity for MCK and PCK-26 and gave more severe reactions compared to the surfactant proteins. However, in addition to the tumor cells, as the bronchial mucosa and glandular epithelium and type I pneumocytes in the lungs showed immune positive reaction in the cytokeratin stainings, the surfactant proteins may be more specific in the detection of type II pneumocytes. Therefore, as a result of the findings it was determined that Jaagsiekte type D Retrovirus infected type II pneumocytes and caused neoplastic transformation resulting in tumors, and it metastasized to regional lymph nodes especially in the cases that the tumor is prevalent in the lung. Although all lung epithelium showed a positive reaction against cytokeratin markers, the fact that the tumor was mostly type II pneumocyte and the surfactant expressions were specific to these cells, revealed that SPs could be more specific in investigating tumor cell origin in primary and metastatic masses. In addition, the presence of T lymphocyte infiltration in the tumor microenvironment indicated cellular immunity against the tumor.

Keywords: Sheep, Ovine pulmonary adenocarcinoma, Histopathology, Immunohistochemistry.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	I
ŞEKİL LİSTESİ.....	II
TABLO LİSTESİ.....	III
RESİM LİSTESİ.....	IV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Retrovirüsün Sistematikteki Yeri.....	5
2.2 Retrovirüsün Genomik Organizasyonu ve Replikasyonu	6
2.3 Retrovirüsün Yaşam Döngüsü	8
2.4 Jaagsiekte Sheep Retrovirüs (JSRV) Tropizmi	9
2.5. JSRV ve Tümör Oluşum Mekanizması.....	11
2.6 Koyun Pulmoner Adenokarsinomu Tarihçesi.....	14
2.7 Koyun Pulmoner Adenokarsinomunun Epidemiyolojisi	15
2.8 Koyun Pulmoner Adenokarsinomunun Klinik Belirtileri	16
2.9 Koyun Pulmoner Adenokarsinomunda Makroskopik Lezyonlar	17
2.10 Koyun Pulmoner Adenokarsinomunda Histolojik Bulgular.....	18
2.11 Koyun Pulmoner Adenokarsinomlarında Tanı Yöntemleri.....	19
2.11.1 Rutin Histopatolojik Yöntemler	19
2.11.2 İmmünohistokimyasal Yöntemler	19
2.11.3 Elektron Mikroskobu	19
2.11.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	19
2.11.5 Virüs Nötralizasyon Testleri	20
2.11.6 Western Blot Analizleri	20
2.11.7 Görüntüleme Yöntemleri	20
2.11.7.1 Radyografi ve Bilgisayarlı Tomografi	20
2.11.7.2 Ultrasonografi.....	21
2.12 Çalışmada Kullanılan Primer Antikorlar	21
2.12.1 SP-A.....	21
2.12.2 SP-B.....	21
2.12.3 SP-C.....	22
2.12.4 Multi-Sitokeratin (MCK) (AE1-AE3)	22

2.12.5 Pansitokeratin (PCK-26).....	22
2.12.6 CD3.....	22
2.12.7 CD79acy	23
3. MATERYAL ve METOT	24
3.1. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama Yöntemi	24
3.2. Avidin-Biotin Complex Peroksidaz (ABC-P) Boyama Yöntemi	25
3.3 İndirekt İmmüno Floresan (IF) Boyama Yöntemi	26
4. BULGULAR.....	28
4.1 Makroskopik Bulgular.....	28
4.2 Histolojik Bulgular	28
4.3 İmmünohistokimyasal Bulgular	30
4.3.1 SP-A Boyama Sonuçları	30
4.3.2 SP-B Boyama Sonuçları	31
4.3.3 SP-C Boyama Sonuçları	32
4.3.4 Multi-Sitokeratin (MCK, AE1-AE3) Boyama Sonuçları	33
4.3.5 Pan-Sitokeratin (PCK- 26) Boyama Sonuçları	34
4.3.6 CD3 Boyama Sonuçları	34
4.3.7 CD79acy Boyama Sonuçları.....	35
4.4 İmmüno Floresan (IF) Bulgular	35
4.4.1 SP-B IF Bulgular	35
4.4.2 MCK IF Bulgular	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
RESİMLER.....	49
TABLolar.....	81
KAYNAKLAR.....	83
EKLER.....	89

KISALTMALAR

ABC-P	: Avidin-Biotin Kompleks Peroksidaz
CCSP	: Clara Cell Secretory Protein
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGF	: Epidermal Growth Factor
ENTV	: Enzootic Nasal Tumor Virus
ERK	: Ekstracelluler Signal Regulated Kinases
HNF 3	: Hepatosit Nükleer Faktör
HYAL 2	: Hyalüroglukozaminoasidaz 2
JSRV	: Jaagisekte Sheep Retrovirus
IF	: Immunofluorescence
IHC	: Immunohistochemistry
LTR	: Long Terminal Repeat
MAPK	: Mitojen Aktivasyon Protein Kinaz
MCK	: Multi-Cytokeratin
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
OIE	: Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
OPA	: Ovine Pulmonary Adenocarcinoma
ORF-x	: Open Reading Frame- x
PCK	: Pan-Cytokeratin
PI3k	: Phosphoinositide -3 kinaz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ph	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
RNA	: Ribonükleik asit
SP	: Sürfaktan protein

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Alveoler tip II hücrelerde sürfaktan üretilmesi (ER: Endoplazmik retikulum, G: Golgi cisimciği, LB: Lamellar cisim, MVB: Multiveziküler cisim, TM: Tübüler myelin) (Bediz ve ark. 1998).....	5
Şekil 2. Retrovirüslerin klasifikasyonu (Griffiths ve ark. 2010).....	6
Şekil 3. Retrovirüsün yapısal genomunun şematik gösterimi (Guliyev 2012).	7
Şekil 4. Retrovirüslerin replikasyon mekanizması ve çift iplikli DNA yapısına dönüşümü (Salvatori 2004).	8
Şekil 5. Retrovirüslerin yaşam döngüsü (Griffiths ve ark. 2010).	9
Şekil 6. JSRV transformasyonunu ve tümör oluşumunu gösteren yolak. JSRV envelop protein iki farklı yolak türünü kullanarak farklı hücre hatlarında ekspresyon basamaklarını tamamlar (Leroux ve ark. 2007).....	11
Şekil 7. P13- Akt ve Ras yolaklarının sinyalizasyon aşamaları (Leroux ve ark 2007).	14
Şekil 8. OPA'nın coğrafik dağılımı. Gri renkle belirlenen ülkelerde OPA rapor edilmiştir. Siyah renkle gösterilen ülkelerde OPA rapor edilmezken beyaz renkle gösterilen ülkelerde durum bilinmemektedir (Griffiths ve ark. 2010).....	16

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1.** Çalışmada immünohistokimyasal boyamalarda kullanılan primer antikorların klon numaraları, inkübasyon süreleri ve dilüsyon oranları.81
- Tablo 2:** Çalışmada olgulara ait tümörlerin tiplendirilmesi ile kullanılan markırlara (SP-A, SP-B, SP- C, CD3 ve CD79 α cy, Multisitokeratin (AE1-AE3), Pansitokeratin (PCK-26) karşı IHC sonuçları. Negatif (-), hafif (+), orta (++), şiddetli (+++).82



RESİM LİSTESİ

Resim 1: Klasik olduğu varsayılan vakada kranial loplara yayılmış grimsi görünümde düzensiz tümöral lezyonlar.	49
Resim 2: Atipik OPA olduğu düşünülen olguda kaudal akciğer lobunda grimsi renkte ve düzensiz tümöral lezyonlar.	49
Resim 3: Klasik OPA'lı akciğerde parankime yayılmış tümöral hücre proliferasyonları (H&E x 10).	50
Resim 4: Atipik OPA'lı akciğer parankiminde nodüler tipte yaygın proliferasyonlar (H&E x 4).	50
Resim 5: Tümör mikro çevresinde alveoler lümenlerde çok sayıda alveoler makrofaj (H&E x 20).	51
Resim 6: Atipik OPA'da nodül merkezinde nötrofil lökosit infiltrasyonları (H&E x 20).	51
Resim 7: OPA'lı akciğerde bronşiol lümeninde papiller tümör hücre proliferasyonu (H&E x 40).	52
Resim 8: OPA'lı akciğerde papiller tipte tümöral proliferasyonlar (H&E x 10).	52
Resim 9: Atipik OPA'da yaygın hyalinize kollagen ile desteklenmiş tümöral kitle (H&E x 20).	53
Resim 10: Klasik OPA'da tümöral parankimde aşırı stromal doku ile neoplastik hücrelerde hafif deskuamasyon (H&E x 20).	53
Resim 11: Tümöral odakta neoplastik hücrelerde telefaz evresinde mitotik figür (ok) (H&E x 100).	54
Resim 12: Neoplastik hücrelerin apikal sitoplazmasında lamellar cisimcikler olduğu düşünülen veziküler ovoid yapılar (H&E x 200).	54
Resim 13: Pulmoner adenokarsinomlu akciğerde yaygın miksomatöz proliferasyon (H&E x 10).	55
Resim 14: Akciğerde miksomatöz proliferasyon ile çevrili papiller tipte tümöral lezyonlar (H&E x 10).	55
Resim 15: Akciğerde tümöral doku çevresinde yaygın lenfoid infiltrasyonlar (H&E x 4).	56
Resim 16: Lenf düğümünde subkapsüler bölgeden medullaya doğru yayılan tümöral nodül (H&E x 4).	56

Resim 17: Mediastinal lenf düğümünde kortekste lokalize metastatik kitle (H&E x 4).	57
Resim 18: Mediastinal lenf düğümünde iri tümöral kitle ile lenfoid dokunun silinmesi (H&E x 4).	57
Resim 19: Mediastinal lenf düğümünde metastatik kitle merkezinde nekroz (H&E x 10).	58
Resim 20: Atipik OPA'lı akciğerde papiller proliferasyon gösteren neoplastik hücrelerde SP-A sitoplazmik immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 20).	58
Resim 21: OPA'lı akciğerde terminal bronşiyolde silyumsuz Clara hücrelerinde sitoplazmik SP-A immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).	59
Resim 22: Tümör mikro çevresinde alveoler makrofajların sitoplazmasında SP-A immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 60).	59
Resim 23: Metastazlı mediastinal lenf düğümünde tümöral nodülde neoplastik hücrelerin sitoplazmasında SP-A immün pozitif reaksiyon (ABC-Px 20).	60
Resim 24: Klasik OPA'lı akciğerde tüm parankime yayılmış neoplastik proliferasyonlarda şiddetli SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 4).	60
Resim 25: Akciğerde atipik OPA'da proliferen tümör hücrelerinde SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 10).	61
Resim 26: Atipik OPA'da nodülde özellikle periferik neoplastik hücrelerde SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 20).	61
Resim 27: Kontrol akciğerde alveoller çevresinde az sayıda normal tip II hücrelerde SP-B sitoplazmik pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).	62
Resim 28: Akciğerde tümör hücrelerinin apikal sitoplazmasında kaba granüler SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 100).	62
Resim 29: Akciğerde tümöral hücrelerde lamellar cisimcikler olduğu kabul edilen yapılarda SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 200).	63
Resim 30: Klasik OPA'lı akciğerde bağ doku ile sınırlı tümöral alanda papiller proliferasyonlarda şiddetli sitoplazmik SP-B pozitif reaksiyon (ABC-P x 10).	63
Resim 31: Alveoler makrofajların sitoplazmasında SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 100).	64
Resim 32: Mediastinal lenf düğümünde tümör metastazında yaygın sitoplazmik immün pozitif SP-B reaksiyon (ABC-P x 10).	64

Resim 33: Mediastinal lenf düğümünde kortikal folliküllerde az sayıda tümör hücresinde SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).	65
Resim 34: Klasik OPA'da asiner tipte proliferen tümör hücrelerinin sitoplazmasında ProSP-C immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 20)	65
Resim 35: Klasik koyun pulmoner adenokarsinomunda tümör hücrelerinin apikal sitoplazmasında ProSP-C immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).....	66
Resim 36: Atipik OPA nodülünde özellikle periferall tümör hücre sitoplazmalarında baskın ProSP-C immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).	66
Resim 37: Mediastinal lenf düğümünde metastatik tümöral proliferasyonlarda sitoplazmik ProSP-C immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 10).....	67
Resim 38: Metastazlı lenf düğümünde geniş stromaya sahip tümör nodülünde neoplastik hücrelerde sitoplazmik ProSP-C immün pozitif reaksiyon (ABC-P x20).67	
Resim 39: Klasik OPA'lı akciğerde asiner tipte proliferen neoplastik hücrelerin sitoplazmalarında şiddetli MCK immün pozitif reaksiyon (ABC-P x20).....	68
Resim 40: Tip I ve tip II akciğer epitel hücrelerinde sitoplazmik MCK immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 20).....	68
Resim 41: Bronşiyal mukoza epiteli ile birlikte, lümende alveoler makrofajlar arasında dökülmüş epitel hücrelerinde MCK immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).	69
Resim 42: Metastazlı lenf düğümünde tüm neoplastik hücrelerin sitoplazmalarında şiddetli MCK reaksiyonu (ABC-P x 4).....	69
Resim 43: Lenf düğümünde kortikal bölgede az sayıdaki metastatik tümör hücresinde şiddetli MCK reaksiyonu (ABC-P x 20).	70
Resim 44: Lenf düğümünde bağ doku proliferasyonları arasındaki soliter tümör hücre sitoplazmalarında MCK reaksiyonu (ABC-P x 40).	70
Resim 45: Tümör hücre proliferasyonu olmayan kontrol lenf düğümünde negatif MCK reaksiyonu (ABC-P x 10).	71
Resim 46: Klasik OPA'da asiner tipte proliferen kübik tümör hücrelerinde sitoplazmik PCK-26 pozitif reaksiyon (ABC-P x10).	71
Resim 47: Atipik OPA nodülünde stromal doku ve yangısal infiltrasyon ile çevrili neoplastik hücrelerin sitoplazmasında PCK-26 reaksiyonu (ABC-P x 10).	72

Resim 48: Akciğerde yoğun lenfoid infiltrasyonlar arasında bulunan neoplastik proliferasyonlarda PCK-26 sitoplazmik pozitif reaksiyon (ABC-P x 20).	72
Resim 49: Atipik OPA'da non-neoplastik alanda tip I ve II pnömositlerin sitoplazmasında PCK-26 pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).	73
Resim 50: Klasik OPA'da tümöral stroma ve peritümöral alanda CD3 ⁺ T lenfosit infiltrasyonu (ABC-P x 4).	73
Resim 51: Bronşiyal lümende papiller tümör proliferasyonunda stromal CD3 ⁺ T hücre infiltrasyonu (ABC-P x 20).	74
Resim 52: Metastazlı lenf düğümünde tümör hücreleri arasında CD3 ⁺ T hücreler (ABC-P x20).	74
Resim 53: Akciğerde atipik OPA'da stromal doku ve çevresindeki lenfoid dokuda CD79 ⁺ B hücre artışları. (ABC-P x 10).	75
Resim 54: Klasik OPA'lı akciğerde plazmosit ve CD79 ⁺ B lenfosit artışları (ABC-P x 20).	75
Resim 55: Klasik OPA'lı akciğerde neoplastik hücrelerde SP-B sitoplazmik reaksiyon, (IFx20).	76
Resim 56: Atipik OPA'lı akciğerde tümöral nodülde neoplastik hücrelerin sitoplazmasında SP-B pozitif reaksiyon (IFx20).	76
Resim 57: Atipik OPA'lı akciğerde yüksek büyütmeye neoplastik hücrelerde şiddetli MCK pozitif reaksiyon (IFx40).	77
Resim 58: OPA'lı akciğerde papiller proliferasyonlarda neoplastik hücrelerin sitoplazmasında SP-B pozitif reaksiyon (IFx40).	77
Resim 59: Klasik OPA'lı akciğerde neoplastik odaklar çevresinde alveoler makrofajların (oklar) sitoplazmasında SP-B pozitif reaksiyon (IFx40).	78
Resim 60: Klasik OPA'lı akciğerde asiner neoplastik hücrelerde şiddetli sitoplazmik MCK reaksiyonu (IFx40).	78
Resim 61: Klasik OPA'lı akciğerde bronşiyal lümende papiller proliferasyonlarda şiddetli MCK sitoplazmik pozitif reaksiyon (IFx40).	79
Resim 62: Atipik OPA'lı akciğerde tümör nodülünde şiddetli sitoplazmik MCK pozitif reaksiyon (IFx10).	79
Resim 63: OPA'lı akciğerde tip I pnömositlerin sitoplazmik uzantıları ile alveoler lümende tümör hücrelerinde MCK pozitif reaksiyon (IFx40).	80

Resim 64: Metastazlı lenf düğümünde neoplastik hücrelerde MCK sitoplazmik pozitif reaksiyon, (IFx40).....	80
--	----



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hayvansal ekonominin önemli bir kolu olan koyun yetiştiriciliğinin tüm dünyada ve ülkemizde oldukça büyük bir önemi vardır. Ülkemiz gerek sahip olduğu coğrafik koşulları gerekse iklimsel özelliklerine bağlı olarak gelişen bitki örtüsü ile koyun yetiştiriciliği için oldukça elverişlidir (Semerci ve Çelik 2016). Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinde koyunların et, süt ve yün gibi değişik ürünlerinden faydalanılması, yetiştirilmesinin büyükbaş hayvanlara kıyasla daha kolay olması ve besin ihtiyaçlarının ağırlıklı olarak meralardan karşılanmasından dolayı maliyetinin düşük olması nedeni ile tercih edilen bir hayvancılık türüdür. Bu nedenle ülkemizde ve bölgemizde yetiştirilen koyunlarda görülen hastalıkların tanısı ve bilinmesi koyun yetiştiriciliğinin devamı ve ekonomik kayıpların önlenmesi açısından önem arz etmektedir (Usta 2019).

Koyunlarda solunum sistemi hastalıkları dünyanın hemen her yerinde yaygın olarak görülmekte ve küçükbaş hayvancılığını ekonomik olarak olumsuz etkileyen bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Solunum sistemi enfeksiyonları koyunlarda görülen tüm hastalıkların % 5.6'sını oluşturmaktadır. Kuzu ve koyunları etkileyen ve zamanla kronik hale dönüşen bakteriyel ve viral etkenlerin sebep olduğu hastalıklarda klinik bulgular hastalığın ilerleyen dönemlerinde solunum semptomları ile kendini göstermektedir. Bakteriyel pnömonilere en çok *Mannheimia hemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma* spp., *Bordetella parapertussis*, *Histophilus somni* ve *Bibersteinia trehalosi* yol açarken; viral pnömonilere *Parainfluenza 3* (P13), *Ovine adenovirus*, *Respiratory Syncytial Virus* (RSV), *Reovirus* tip 1, 2, 3 ve *Herpesvirüsler* neden olmaktadır (Kennerman 2017).

Koyun pulmoner adenokarsinomu (Jaagsiekte), *Retroviridae* ailesine ait Retrovirüs tip D' nin etiyolojik ajanı olduğu bronşio-alveoler bir karsinom türüdür. Hastalık özellikle koyunları etkilemekle birlikte nadiren keçileri de etkilemektedir (Usta 2019). Koyunlarda meydana gelen bronşio-alveoler adenokarsinom vakalarının % 70'i koyun pulmoner adenokarsinomdur. Etken aerosol yolla ya da virüsle kontamine olmuş su ve yemlerin tüketimiyle sindirim yolu ile alınmaktadır. Ayrıca, nadiren intrauterin bulaşma bildirilmiştir (Kennerman 2017). Etken organizmaya alındıktan sonra uzun bir inkübasyon periyodu geçirdiği için genellikle 2 yaşından

büyük koyunlarda klinik belirti ve bulgularla gözlemlenmektedir. Başlıca klinik bulgular kilo kaybı ve dispne ile karakterize olup, hastalıktan etkilenen koyunlarda gelişen sekonder bakteriyel enfeksiyonlar nedeniyle ölüm meydana gelebilmektedir (Kıran ve ark. 2000, Yener ve ark. 2016). Hastalığın kuzularda görüldüğü vakalar ise enfeksiyonun anneden yavruya süt ile geçmiş olabileceğine bağlanmaktadır (Yener ve ark. 2016). Hastalıklı akciğerlerin histolojik olarak muayene sonuçları, virüsün genellikle alveoler tip II pnömositler ile Clara hücreleri olarak bilinen silyumsuz bronşiyal epitel hücrelerinden köken alan neoplastik proliferasyonlara neden olduğunu göstermektedir (Kıran ve ark. 2000, Yener ve ark. 2016).

Ayrıca koyunlarda kronik formda en sık rastlanılan viral hastalıklardan olan pulmoner adenokarsinoma ile birlikte en çok görülen bir başka viral hastalık ise Maedi-Visna'dır. Maedi-Visna onkojenik etki göstermeyen retrovirüs ailesine dâhil bir lentivirüsdür. Hastalığın etiyolojik etkeni olan virüs koyunlarda klinik bulgu olarak intersitisyel pnömoni, mastitis, sinir sistemi ile ilgili bulgular ve artrit ile karakterizedir. Etken aerosol yol ile sütle ya da feçesle dış ortama yayılmakta ve 2 haftaya kadar canlılığını korumaktadır. Virüs 2 yaşından büyük koyunlarda görülmekle beraber özellikle yaşlı koyunları etkilemektedir. Virüsün diğer bir özelliği de lezyonların uzun bir inkübasyon periyodu sonucunda şekillenmesi ve lenfoid hiperplazisi ile sonuçlanmasıdır (Kennerman 2017).

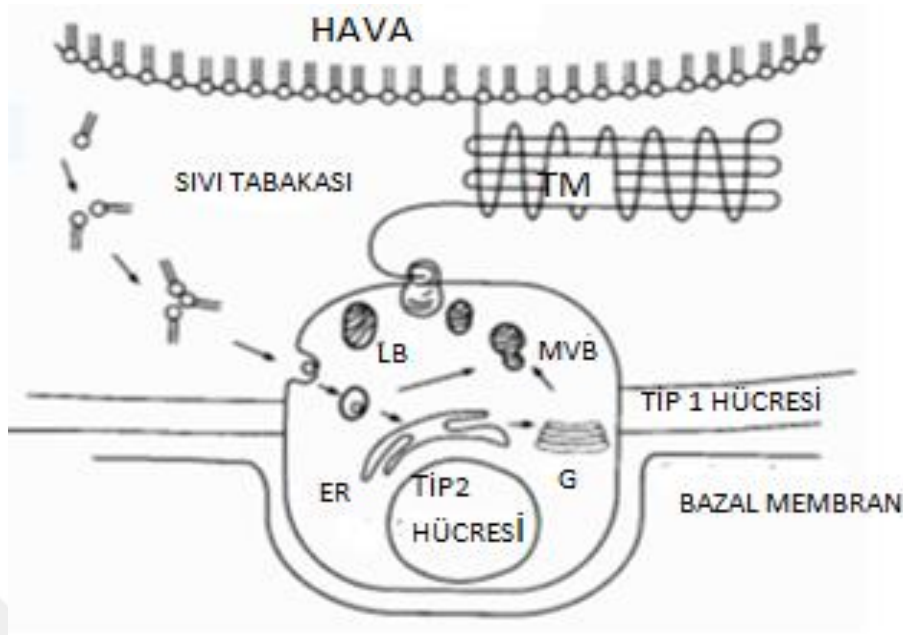
Bu tezde, koyun pulmoner adenokarsinomlarında primer ve metastatik kitlelerde epitelyal hücre markırları ve sürfaktan proteinlerin ekspresyonu ile bunların diagnostik öneminin karşılaştırılması; tümör mikro çevresinde lenfositik fenotiplerin karakterize edilmesi ve tümöre karşı gelişen immün cevap oluşmasında bu hücrelerin rolünün değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Koyunlarda akciğerler (pulmones) respiratuar sistemin en önemli komponentlerinden biri olup sağ (sinister) ve sol (dexter) akciğer olmak üzere iki bölümden oluşur. Sağ ve sol bölüm mediastinum ve kalp ile birbirinden ayrılmış durumdadır. Akciğerler elastik ve süngerimsi yapıda olup rengi küçük yaştaki sağlıklı koyunlarda ve kuzularda pembe görünümde iken yaşı büyük koyunlarda kırmızı renktedir. Her iki akciğerin dış yüzeyleri parlak nitelikte olup seröz bir zarla (plevra) kaplıdır. Akciğerler bronchus principalis dexter ve sinister ile trachea; arteria ve vena pulmonalislerle de kalp ile bağlantı kurar (Dursun 2008). Bronşlar ise sağ ve sol akciğer içinde dallanma göstererek bronş ağacı denilen görünümü oluştururlar. Her bir akciğerin lenf sistemi ise bifurcatio trachea çevresinde yer alan tracheo-bronchial lenf düğümleri ile bağlantılıdır (Kürtül ve Türkmenoğlu 2018).

Akciğerler, parankim ve bağ dokusunu oluşturan intersitisyum ve stromadan oluşup ara yüzleri heterojen yapıdaki epitel hücreleri ve çevre ile karşılıklı olarak etkileşir. Parankimal yapı gaz alışverişinin sağlanması için temel fonksiyon üstlenirken bağ dokuyu salgı bezleri, sinir lifleri, kan ve lenf damarlarını kapsayan elastik ve kolajen dokular oluşturur. Akciğerlerde proksimal havayolları alveollerde yalancı çok katlı epitel ile örtülü olup, distal hava yollarına gidildikçe tek katlı kübik hücre tabakasına dönüşür. Alveollerde akciğer yüzey bölgesinin % 95 'ten daha fazlası ise çok ince epitelyal bir hücre tabakası ile örtülüdür. Organda silyalı, bazal, goblet ve Clara hücreleri dahil birçok hücre tipi havayolları boyunca bulunmakla beraber yalnızca skuamöz tip I ve küboidal tip II epitel hücreler geniş alveoler yüzeyi örter. Akciğerlerin temel fonksiyonu (özellikle alveoler epitelyumun) temel gaz değişimi için gerekli geniş ve ince yüzey alanı sağlamaktır. Akciğer epitelyumu ilave birçok fonksiyon yapmakta fakat temel fonksiyonu gaz değişiminin kapasitesini korumaktır. Bu koruyucu bariyer su ve diğer çözünenlerin hareketini kontrol ederek akciğer sıvı dengesinin korunmasına katkıda bulunmakta ve çevreden gelen yabancı ajanları ayırmak için konağı koruyucu fonksiyonlar üstlenmektedir. Akciğerlerdeki epitel hücreler ksenobiyotik ajanlar ile endojen kaynaklı mediatörlerin mekanizmasında aktif rol üstlenirken akciğer yaralanmalarından sonrada alveollerin fonksiyonlarını ve havayollarının onarılmasına müsaade ederek, rejenerasyonunda

önemli rol oynar. Bunların ötesinde akciğer epitel hücreleri kompleks sekresyonlar üretir. Bu sekresyonlar arasında mukus yapıdaki katman, yüzey aktif ajan ya da diğer adıyla sürfaktanlar olarak adlandırılan ve görevi konağı savunmak olan birçok önemli protein vardır. (Hermans ve Bernard 1999). Alveoler tip II hücrelerde sentez edilen sürfaktan proteinleri alveoler yüzeylerin önemli bir parçasıdır. Bu proteinler solunum esnasında yüzey gerilimini azaltarak alveollerin hayat boyu açık kalması ve solunumun daha kolay olmasına olanak verir. Sürfaktan proteinler ayrıca spesifik olmayan savunma mekanizmalarına destek olmak, lenfositler için immün modülatör bir fonksiyon göstermek ve alveoler makrofajların aktivasyonlarının artırılması gibi durumlarda aktif rol oynar. Sürfaktanın yaklaşık % 90 lipidlerden, % 10'unu ise proteinlerden oluşmaktadır Bugüne kadar sürfaktana özgü dört spesifik protein belirlenmiş ve bunlar kronolojik sıraya göre sürfaktan protein (SP) SP-A, SP-B, SP-C ve SP-D olarak adlandırılmıştır. SP-A'nın lipitlere ve karbonhidratlara bağlanma afinitesi fazladır. Bu yüzden sürfaktan metabolizmasının regülasyonunda etkin rol oynar. Ayrıca alveoler makrofajlarda oksijen radikallerin üretimini indükleyerek bakterisidal aktivasyona katkıda bulunur. SP- B alveoler yüzeylerin stabilizasyonunun sağlanmasında önemli olup, SP-A ile tübüler myelin oluşumuna katkıda bulunur. SP- C ise SP-B ile birlikte alveoler yüzeylerin stabilitesini düzenler ve fosfolipit adsorpsiyonunu sağlar. SP-D ise alveoler makrofajların opsonizasyonunu artırıcı etki gösterir (Bediz ve ark. 1998).



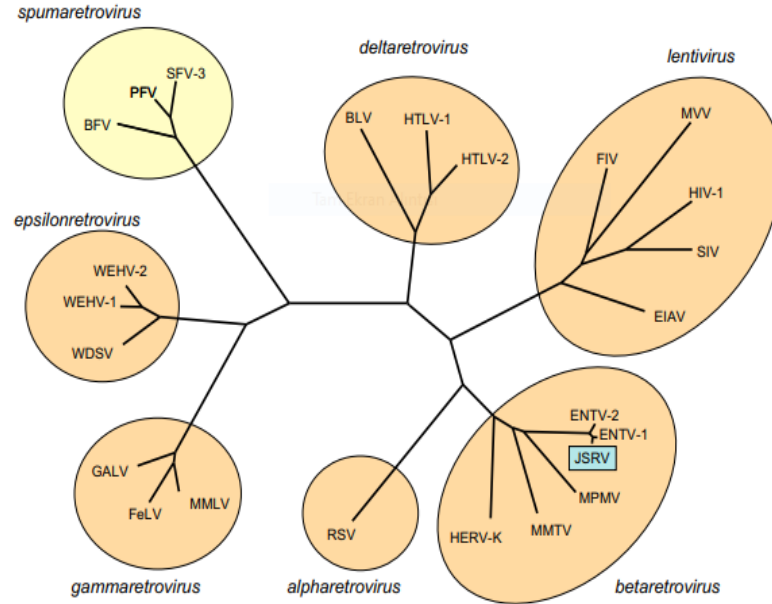
Şekil 1. Alveoler tip II hücrelerde sürfaktan üretilmesi (ER: Endoplazmik retikulum, G: Golgi cisimciği, LB: Lamellar cisim, MVB: Multiveziküler cisim, TM: Tübüler myelin) (Bediz ve ark. 1998).

2.1 Retrovirüsün Sistematikteki Yeri

Retrovirüsler diğer RNA virüslerine kıyasla daha büyük ve gelişmiş bir aileye sahiptir (Salvatori 2004). Boyutları 80-120 nanomikron olup 7 kilobaz büyüklüğündedir. Lineer yapıda tek zincirli, diploid ve pozitif polariteye sahiptir. (Salvatori 2004, Şevik 2013). *Retroviridae* ailesi *Orthoretrovirinae* ve *Spumaretrovirinae* olarak 2 alt familyaya ayrılmıştır. *Orthoretrovirinae* alt familyası *Alpharetrovirüs*, *Gammaretrovirüs*, *Betaretrovirüs*, *Deltaretrovirüs*, *Epsilonlentivirüs*, *Lentivirüs* olarak 6 cinse ayrılır. *Spumaretrovirinae* alt familyası ise *Spumavirüs* cinsini bünyesinde bulundurur (Salvatori 2004).

Nükleokapsid yapıları *Alpharetrovirüs*, *Gammaretrovirüs*, *Deltaretrovirüs* ve *Spumavirüs* alt türlerinde konsantrik iken *Lentivirüs* ve *Betaretrovirüs* alt türlerinde prizmatik kübik bir şekil gösterir (Salvatori 2004). JSRV koyun akciğer adenokarsinomunu indükleyen bir virüs olup *Retroviridae* familyasının *Orthoretrovirinae* alt familyasına ait bir *Betaretrovirüs* tarafından oluşturulur. Betaretrovirüs cinsi ayrıca farelerde meme kansinoma neden olan Mouse Mammary Tümör Virüs (MMTV) ile Rhesus cinsi maymunlardan izole edilen

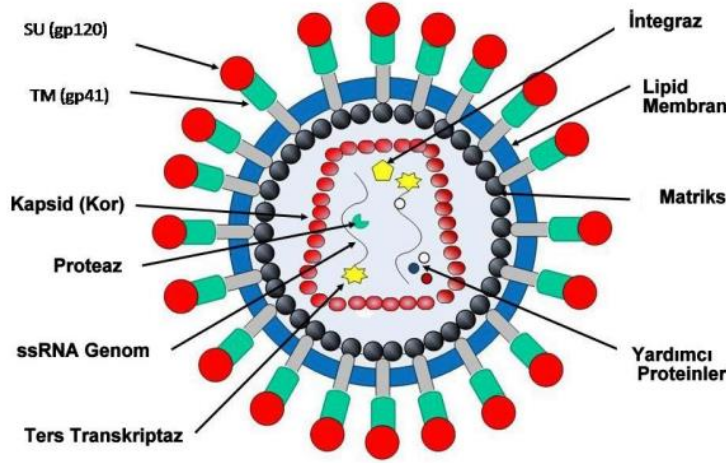
Mason-Pfizer Monkey virüs ve Squirrel Monkey virüslerini de kapsar (Leroux ve ark. 2007).



Şekil 2. Retrovirüslerin klasifikasyonu (Griffiths ve ark. 2010).

2.2 Retrovirüsün Genomik Organizasyonu ve Replikasyonu

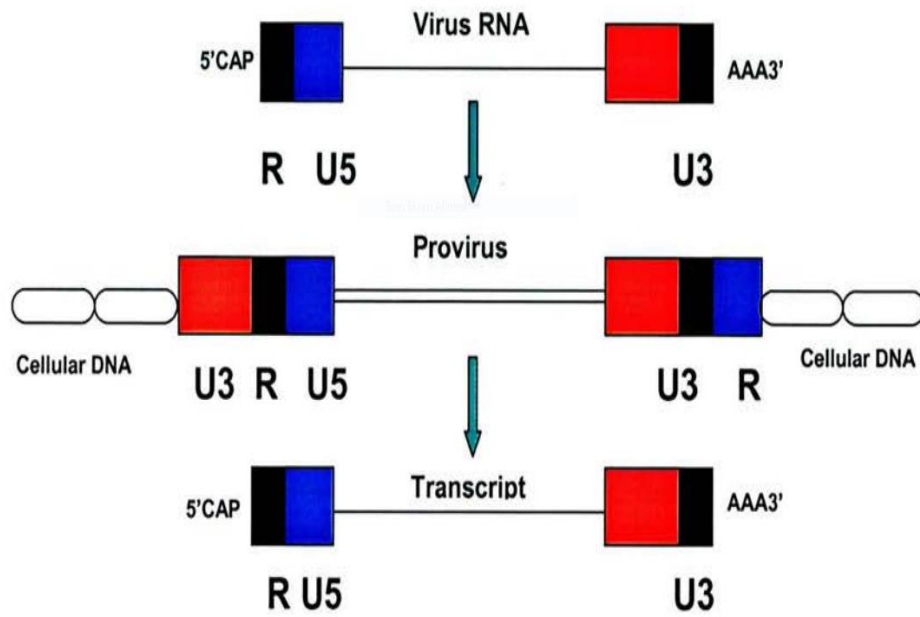
Retrovirüslerin viral genomlarının her iki uç kısmında promotör ve enhancer aktivasyonu olan LTR (Long Terminal Repeat) sekansları yer alır. Retrovirüslere ait DNA'ların provirüsleri gag, pol, env sıralı genleri oluşturur. Virüs revers transkripsiyon basamağında 5' gag- pol- env 3' sıralı düzeninde LTR sekansları ile yan alanlardan desteklenmiş durumdadır ve ORF-x olarak adlandırılan bir açık okuma çerçevesi içerir. ORF-x retrovirüslerde 166 aminoasit ile proteinleri kodlar ve izolasyonu zor olup ayırıcı sekans analizleri gereklidir (Salvatori 2004). Açık okuma çerçevesinin yakınlığında alt genoma ait iki mRNA akciğer kanserlerinde tanımlanmıştır (Leroux ve ark. 2007). Olgun bir haldeki virüsün membranı içinde grup spesifik antijenik genler olarak adlandırılan gag genleri nükleokapsid, kapsid ve matriks gibi temel yapısal proteinleri kodlar (Salvatori 2004, Şevik 2013). JSRV genomu, genomun sonlanan bölgelerinde kodlanmayan bölgeler içerir ki bu virüsün replikasyonu için gereklidir. Pro genler 5'uç bölgesinde dUTPase ve 3'uç bölgesinde proteaz (PRO) olarak adlandırılan proteinle ilgili genleri kodlar (Leroux ve ark. 2007).



Şekil 3. Retrovirüsün yapısal genomunun şematik gösterimi (Guliyev 2012).

Retrovirüslerin replikasyon stratejisini revers transkriptaz enzimi aracılığıyla RNA virionlarının çift zincirli DNA yapısına aktarması oluşturur. Virüsün replikasyonu için hücrelerin genomuna bu çift zincirli DNA'nın integrasyonu zorunlu bir durumdur (Salvatori 2004). Olgunlaşmış virüslerde yaklaşık 10 adet revers transkriptaz kopyası bulunur. Revers transkriptaz enzimleri pol geni ile kodlanmaktadır. Pol genleri revers transkriptaz genleri haricinde entegraz, RNase H, proteaz gibi ürünleri kodlar (Şevik 2013). Virüsün dış zarfı konak hücre membranı aracılığıyla şekillenir. Yüzey antijenleri (kılıf proteinleri) env olarak tanımlanan zarf geni ile kodlanmaktadır. Replikasyonda ara ürün provirüs adı verilen çift iplikli bir DNA kopyası meydana gelir. Konak hücre içinde yer alan provirüsler kromozomların yapısına girer. Çift iplik durumunda olan DNA, kalıp görevi görerek virüse özgü proteinlerin sentezini de sağlamaktadır (Temizkan 2013). Revers transkripsiyon sitoplazmada meydana gelir ve viral DNA retroviral genomun lineer kopyalarını nükleusa aktarır (Salvatori 2004). Ters transkriptaz tRNA primerlere deoksiribonükleotidleri ekler. Yaklaşık 100-200 arası nükleotid R' ve U 'bölgelerine tamamlayıcı olarak eklendikten sonra RNA/DNA bölgesindeki RNA alanı virüse ait bir enzim olan RNaz H aktivitesi ile yok edilir. Ardından ters transkriptaz RNA enziminin genomun 3' ucuna bir atlama hareketi yapması ile R' dizisi bu uçtaki R dizisi ile baz eşleşmesini gerçekleştirir ve RNA'nın U3 bölgesinin sol tarafında bir çentik oluşur. RNA'nın 3'OH ucu primer görevi görerek tek zincirli DNA'ya

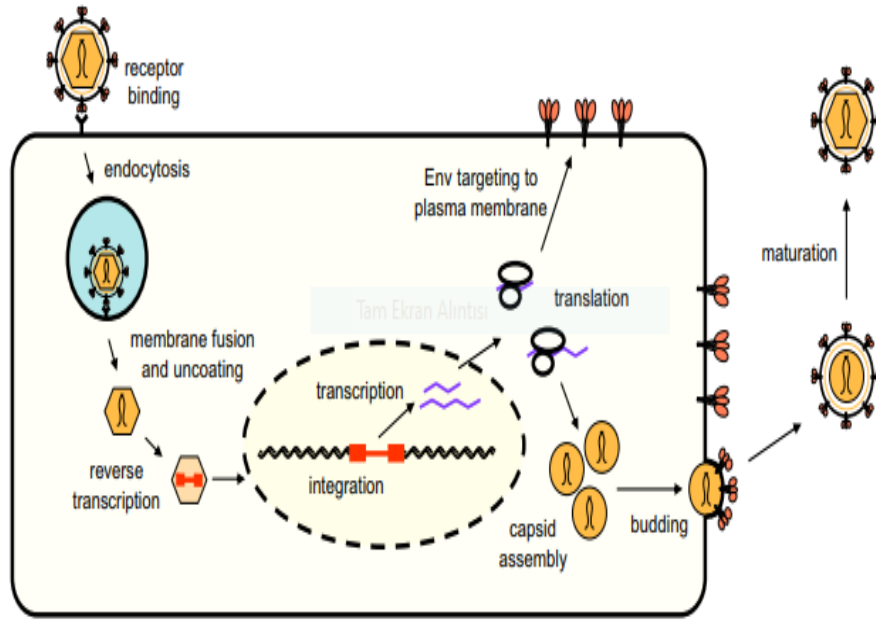
tamamlayıcı çift iplik yapısı meydana getirir. İkinci bir aşamada ise ters transkriptaz enzimi ikinci bir atlama hareketi yaparak çift iplikli DNA ve kalıp DNA'nın primere bağlanma noktaları arasında baz eşleşmesi olur. Bu aşamadan sonra genomik RNA'nın geriye kalan kısmı RNaz H aktivitesi ile yok edilir (Temizkan 2013). Virüs hücre membranının füzyonuna yol açan spesifik plazma membran reseptörlerine yüzey glikoproteinleri ile bağlanarak konak hücreye girer. Stabil formdaki provirüs virion integrazın yardımı ile kromozomal DNA içine girer. Bu entegrasyon provirüslerin doğrusal sırasını değiştirmez (Salvatori 2004).



Şekil 4. Retrovirüslerin replikasyon mekanizması ve çift iplikli DNA yapısına dönüşümü (Salvatori 2004).

2.3 Retrovirüsün Yaşam Döngüsü

Retrovirüsün yaşam döngüsü ters transkriptaz enzimi ile çift iplikli DNA'nın sentezlenmesi, konak hücre yüzeyinin reseptörlerine bağlanması ve genoma integrasyonu aşamalarından oluşur. Tam uzunluktaki viral transkripsiyon ve mRNA sentezi nükleusta gerçekleşir. Ardından düzenleyici ve yapısal proteinler kodlanır ve yeni virionların sentezine izin verilir (Salvatori 2004).



Şekil 5. Retrovirüslerin yaşam döngüsü (Griffiths ve ark. 2010).

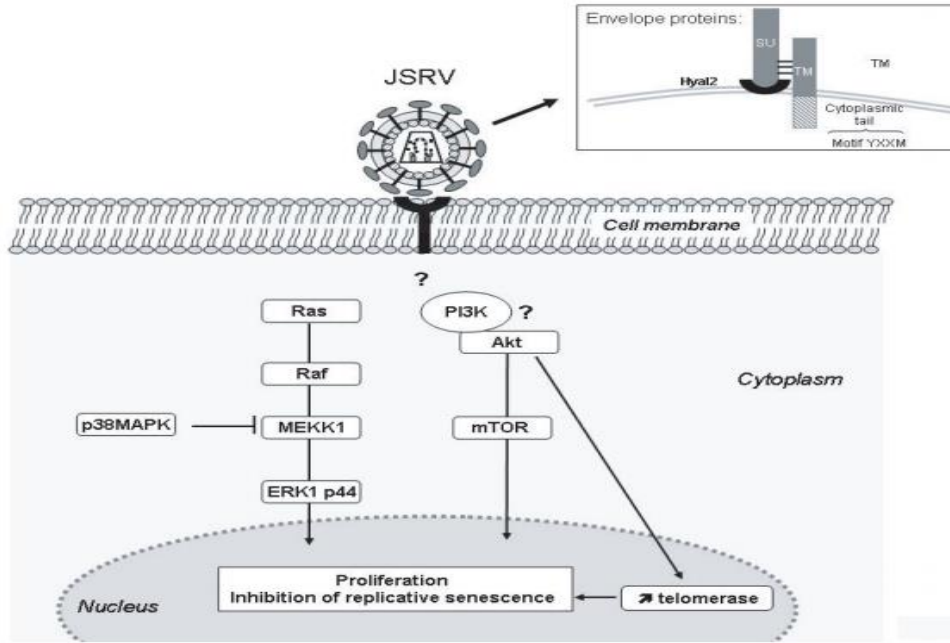
2.4 Jaagsiekte Sheep Retrovirüs (JSRV) Tropizmi

Hastalığın doğal olarak meydana geldiği koyunlarda viral DNA lenfoid dokular, alveoler makrofajlar ve periferik kanda mononükleer hücrelerde saptanmıştır. JSRV enfekte hayvanlarda özellikle akciğerlerde alveoler tip II pnömositler ve terminal bronşiollerdeki silyumsuz Clara hücrelerinde diferansiyel transformasyonu indükleyen tek retrovirüstür. (Leroux ve ark. 2007, Monot ve ark. 2015). Virüse ait zar ve LTR retrovirüsün ekspresyonu ve tropizmini belirleyen esas yapılardır. Viral partikülün yüzeyinde yer alan yüzey glikoproteinleri (SU), spesifik olarak hücre reseptörlerle etkileşerek virüsün hücreye girmesine izin verir (Leroux ve ark. 2007, Monot ve ark. 2015). Bu durum doğal lezyonların ve konakçı seçiciliğinin oluşmasında belirleyici faktördür (Martineau ve ark 2011). Jaagsiekte sheep retrovirüs (JSRV) ile Enzootik nazal tümör (ENTV) memeli hücrelerindeki HYAL 2 (hyaluroglukozaminoasidaz 2) ile bağlantılıdır. HYAL 2, hyaluronoglukozaminoasidaz ailesinin bir üyesi olan bir enzim olup ekstraselüler matriksin temelini oluşturur ve HYAL 2 glukozilfosfolipidilinozitol (GPI) yüzey reseptörleri insan ve fare dokularında da eksprese edilir (Leroux ve ark. 2007). Hyaluronidaz hücre membranlarında bulunan bir polisakkarit olup hyaluronu

parçalar. Ekstraselüler membranda yer alan bu büyük yapıdaki polisakkarit biyolojik süreçlerde ve tümörögenез durumlarında önemlidir (Leroux ve ark. 2007).

Örnek olarak kolorektal kanserlerin ilerleyen aşamalarında HYAL 2 oldukça bol eksprese edilir. HYAL 2'nin hyalüronidaz aktivitesi retrovirüslerin reseptör fonksiyonu için gerekli değildir. JSRV envelop proteini düşük pH ortamında ve füzyon aktivasyonunu düzenleyen sitoplazmik kuyruk yapısı ile hücreye girer. HYAL 2 reseptörü doğal olarak bütün hücre membranlarında bulunduğundan JSRV ve ENTV farklı hücre türlerine girebilir. Ancak aktif replikasyonları nazal kavitenin epitel hücrelerinde ve akciğer parankiminde sınırlanmıştır. Bu durum tropizm restriksiyon olarak adlandırılır (Leroux ve ark. 2007). Konağa ait belirli proteinler (TRIM 5a, APOBEC, tetherin) JSRV tropizmini etkileyip restriksiyon faktörlerini oluştururlar. İn vitro deneysel çalışmalarda JSRV tropizmi incelendiğinde virüsün doğal yollarla tümör oluşturabilmesi için uzun bir inkübasyon periyodu gerektirdiğinden koyun hücre fenotipleri invitro ortamda devam ettirilerek bu zorluğun önüne geçilmiştir. (Martineau ve ark. 2011). JSRV ve ENTV env ekspresyonunu incelemek için farelerin havayollarının distal epitel hücrelerinde tümör indüklenmesini sağlayan adeno bağlantılı virüsler kullanılmış ve bunun sonucunda JSRV ile benzer etkiler görülmüştür. Ayrıca in vitro çalışmalarda JSRV'nin farklı hücre tiplerini etkileyebildiği saptanmış olsa da viral üretimin zayıf olduğu belirlenmiş ve aktif replikasyonun bronşioler epitelyal hücrelerde olduğu görülmüştür (Leroux ve ark. 2007). Retrovirüslerde bulunan LTR selüler transkripsiyon faktörleri ile bağlantılı enhancer ve viral promotör bölgeler içerir. Bunlar özellikle enhancer bölgelerine bağlanarak hücrelerde transkripsiyon faktörlerini önemli ölçüde eksprese eder. Bazı cis regülatör elementler JSRV'te LTR bölgelerinde tanımlanmıştır ve bu elementler akciğer epitel hücrelerinde transkripsiyon için gereklidir. Bu durumu destekleyen kanıtlar tip II pnömositlerde ve Clara hücrelerinden köken alan hücre hatlarında aktif LTR bölgelerinin saptanması ile desteklenmiştir (Martineau ve ark. 2011). Clara hücreleri ve tip II pnömositlerde bulunan spesifik genlerde JSRV enfeksiyonları sonrasında bu genlerin promotör bölgelerinde SP-A, SP-B, SP-C ve CCSP (Clara Cell Secretory Protein) gibi düzenleyici proteinlerin üretimi farklılaşır. JSRV LTR bölgesi transkripsiyon faktörleri için önemli olup HNF 3 (Hepatosit Nucleer Factor) gen bölgesi sürfaktan

proteinlerin ekspresyonunu düzenlerken C/EBP (CCAAT/Enhancer Bağlayıcı Faktör) transkripsiyon için gereklidir (Leroux ve ark. 2007).



Şekil 6. JSRV transformasyonunu ve tümör oluşumunu gösteren yolak. JSRV envelop protein iki farklı yolak türünü kullanarak farklı hücre hatlarında ekspresyon basamaklarını tamamlar (Leroux ve ark. 2007).

2.5. JSRV ve Tümör Oluşum Mekanizması

Retrovirüslerin yapısal genlerinde bulunmayan hücresel kökenli viral onkogenler (v-onc) hücreler enfekte olduktan sonra retrovirüslerin bünyesine dahil olur. Konak hücre içerisine yerleşip entegre olan retrovirüsler hücreyi kontrol eden regülatör genlerin etkisi altında ise bu retrovirüsler hücreye zarar vermez ve endojenik retrovirüsler olarak adlandırılır. Bu retrovirüsler fiziksel ya da kimyasal herhangi bir mutajen ile karşılaştığında virüs aktif bir özellik gösterir ve eksojenik retrovirüs olarak adlandırılır (Şevik 2013). Onkogenik retrovirüsler omurgalıların tüm sınıflarında tümör meydana getirebilir. Tümör indükleyen retrovirüsler rodentler, kediler, sığırlar ve primatlar ile diğer hayvanlardan izole edilmiştir.

Jaagisekte retrovirüsün onkogeneze mekanizmaları birçok araştırmada yapılmış olup JSRV zar (env proteini) onkogenik olduğu ve zar protein tek başına salınımının in vitro ortamlarda hücrelerin transformasyonu için yeterli olduğu ayrıca immün sistemi baskılanmış olan fare ve kuzularda tümör oluşumuna sebep olduğu

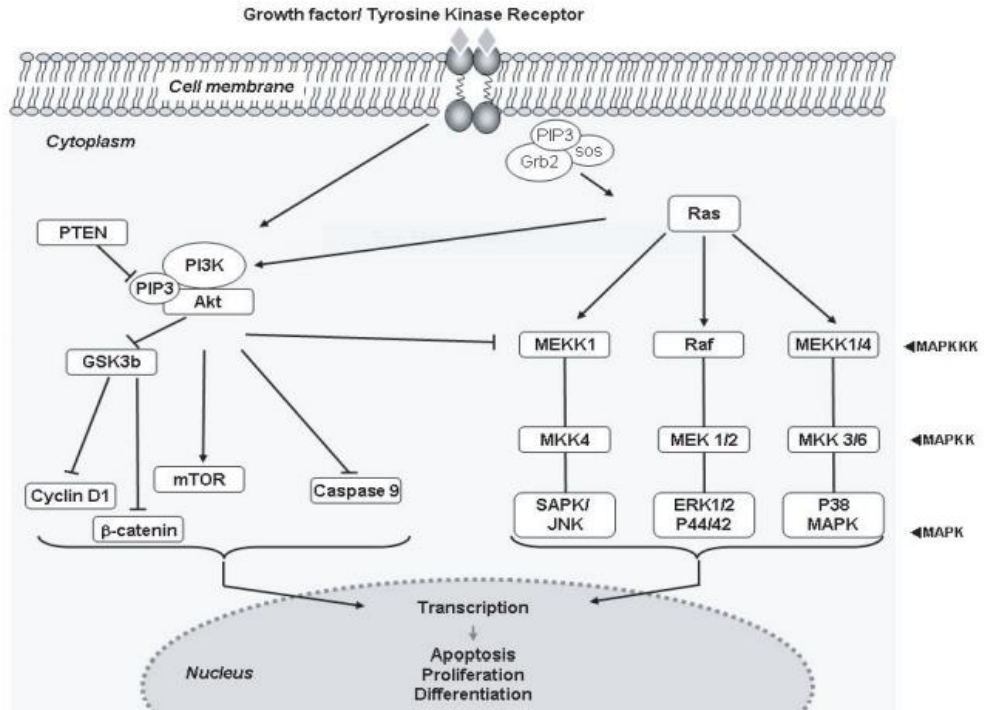
ispat edilmiştir. JSRV enfeksiyonu ve transformasyonunda oluşan erken olayları değerlendiren çalışmalarda JSRV ile enfekte hücreler kuzularda deneysel enfeksiyondan 10 gün sonra saptanmıştır. Fakat *in vivo* olarak böyle çalışmaların yapılması enfeksiyondan çok kısa süre sonra koyun akciğerlerinde JSRV ile enfekte az sayıda hücrenin bulunma zorluklarından dolayı oldukça fazla iş gücü gerektirmektedir (Cousens ve ark. 2015).

Onkogenik retrovirüsler deney hayvanlarında tümör oluşturma hızlarına göre iki gruba ayrılırlar. Bunlar akut transformasyon retrovirüsler ve akut olmayan transformasyon retrovirüslerdir. Akut transformasyon retrovirüsler enfeksiyondan bir ile birkaç hafta sonra tümör oluşturlar (Salvatori 2004, Şevik 2013). Akut transformasyon retrovirüsleri v-onc genler aracılığı ile maligniteye neden olarak sarkoma ya da hematopoetik hücre tümörlerine neden olur. Bu retrovirüsler protoonkogenlerin genomunda delesyon veya nokta mutasyonlarına sebep olarak değişiklik meydana getirirler. (Salvatori 2004). Akut olmayan transformasyon retrovirüsler göreceli olarak uzun süreli bir periyod ile tümörleri meydana getirirler (Leroux ve ark. 2007). Akut olmayan retrovirüslerde LTR aktivasyonları oldukça önemli olup, virüsler selüler protoonkogenlerle bağlantı kurar ve bu durum insersiyonel aktivasyon, cis aktivasyonu ya da insersiyonel mutagenез olarak bilinir. Bu retrovirüsler insersiyon hareketleri ile genom içinde sıçrayarak uzun süreli inkübasyonla tümörleri meydana getirir. (Salvatori 2004). Viral onkogenler hücre düzenlenmesinden sorumlu protoonkogenlerden ya da normal hücre genlerinden köken alır. Virüsle enfekte hücrelerde mutasyona uğrayan protoonkogenler hücre proliferasyonunu yönetemez (Leroux ve ark. 2007).

JSRV enfeksiyonlarında zar proteinin tümör oluşum sürecinde etkili olduğu düşünülmektedir. Şimdiye kadar yapılan *in vitro* çalışmalarda ratların 208F fibroblastlarında, kuşların DF-1 fibroblastlarında, insan bronşiolleindeki BEAS-2B epitelyal hücrelerinde, köpek böbrek MDCK epitel hücrelerinde ve rat böbrek RK3E hücrelerinde zar proteini gösterilmiştir. Farelerde JSRV zar protein ekspresyonunu incelemek için adenovirus bağlantılı bir vektör olarak AAV6 kullanılmış ve fare akciğerlerinde koyun akciğerleri ile benzer sonuçlar gözlenmiştir. Tümörün bronşioalveoler bölgelerde yerleşimi ve tip II pnömositlerde aşırı ekspresyon izlenmiştir (Leroux ve ark. 2007).

Hücre kültürü ile yapılan çeşitli çalışmalarda Env ekspresyonlarına yanıt olarak birçok önemli sinyal yolağı tanımlanmıştır. Özellikle MEK-ERK ve PI3K-Akt yolaklarının neoplastik transformasyonu kapsadığı öne sürülmektedir (Cousens ve ark. 2015). Tümör hücreleri MAPK (Mitojen Aktive Protein Kinaz) sinyal yolağını kullanarak proliferasyonlarını gerçekleştirirler. Bu yolak RAF, MEK ve ERK proteinlerinden meydana gelir ve MAP kinaz (ERK1/2), MAPK kinaz (MEK1 /2) ve MAP kinaz (RAF1, ARAF, BRAF) olmak üzere 6 birimden oluşur. Tümör hücrelerinde RAS'ın onkogenik aktivasyonu MAPK yolağının aktivasyonunu artırır (Pazarbaşı ve ark. 2011). PI3K-Akt yolağı hücre metabolizmasının ve büyümesinin regülasyonunda gerekli bir yolaktır. Akt kinaz fosforillenmiş substratları hücre proliferasyonunu uyaran kaskadları içerir. (Leroux ve ark. 2007, Pazarbaşı ve ark. 2011). PI3K yolağı membran stimüle olduktan sonra RAS ve trozin kinazlar tarafından uyarılır. Karsinogen yolak hücre membranında başlayan PI3K aktivasyonu SH2 domaini ile trozin kinaz reseptörlerinin trozin fosforillerinin P85 alt ünitesine bağlanır. Retrovirüsler PI3K-Akt ve Ras-MEK-MAPK sinyalizasyon yolakları ve Hyal II reseptörlerini kullanarak üç ayrı mekanizma ile tümör oluştururlar. Sinyal yolakları hormonlar, sitokinler ya da büyüme faktörleri gibi çeşitli etkenlerle aktive olabilir. (Hofacre ve Fan 2010).

OPA kökenli tip II pnömositlerde EGF (Epidermal Growth Factor) stimülasyonuna yanıt yoktur ve Akt yolağı bozulmuştur (Hofacre ve Fan 2010). Akt fosforilasyonu GSK 3 (Glikojen Sentaz Kinaz), P24 ya da Kip I ve aktive mTOR gibi inhibe edici proteinler ile düzenlenerek hücre büyümesi kontrol altında tutulur (Leroux ve ark. 2007).



Şekil 7. P13- Akt ve Ras yollarının sinyalizasyon aşamaları (Leroux ve ark 2007).

2.6 Koyun Pulmoner Adenokarsinomu Tarihçesi

Koyun pulmoner adenokarsinomu koyun popülasyonlarında neredeyse iki yüzyıldır görülen bir hastalık olup, Afrika’da Jaagsiekte olarak da tabir edilmektedir. İki kelimenin birleşimi olan Jaagsiekte isminde; ‘Jaag’ sözcüğü hayvanlarda gözlenen solunum sıkıntısına atfedilirken ‘sieekte’ hastalık ile eş değer bir sözcüktür (Leroux ve ark. 2007). Hastalık ilk olarak 1800’lü yılların sonunda Güney Afrika’da koyunlarda çeşitli solunum yolu sıkıntılarının gözlenmesi ile rapor edilmiştir (Toma ve ark. 2020). 1894’lü yılların başlarında virüsler ve kanser arasında bir ilişki olduğu bilinirken, koyunlarda akciğerleri etkileyen bulaşıcı bir hastalığa neden olan virüs henüz tanımlanmamıştı. Peyton Rous adlı bilim insanı hücre kültüründe gerçekleştirdiği deneysel bir inokülasyon yöntemi ile tavuklardan civcivlere tümörü aktarmış ve kanser ile virüs arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüştür (Monot ve ark 2015). Hastalık 1930’lu yıllarda İzlanda’da meydana gelen bir salgından sonra veteriner hekimlerin dikkatini çekmiştir. Bu durum mevcut koyun popülasyonlarının üçte birini etkilemiş ve kapsamlı bir itlaf ile kontrol edilmiştir (Lee ve ark. 2017). Kanserın klinik bulgularını gösteren koyunların akciğerlerinde virüs partiküllerinin

bulunması ile hastalığın viral kaynaklı olduğu kanıtlanmıştır. İlerleyen yıllarda virüs partiküllerinin intratrakeal inokülasyonu ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalar sonucunda koyunların akciğer sekresyonlarında ya da tümöral hücrelerinin sitoplazmik fraksiyonlarında viral partiküllerin saptanması, hastalığın viral etkenli olduğunu bir kez daha kanıtlamıştır (Leroux ve ark. 2007). Rous ve diğer bilim insanları tarafından retrovirüsler ile ilgili çalışmalar 20. yüzyıl başlarında ve sonraki yıllarda bu alanla ilgili çalışmaların temelini oluşturmuştur. Bu nedenle retrovirüs üzerine yapılan çalışmalar karsinogenezis sırasında tümör gelişiminin anlaşılması ve moleküler olayların çözülmesine yardımcı olmuştur (Monot ve ark 2015).

2.7 Koyun Pulmoner Adenokarsinomunun Epidemiyolojisi

Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE)' ne göre OPA Avustralya, Yeni Zelanda ve İzlanda haricinde dünya çapında görülebilmektedir (Kycko ve Reichert 2012). Hastalığın klasik formu atipik formdan daha yaygındır ancak atipik OPA klasik OPA'ya göre daha az bulaşıcıdır (Toma ve ark. 2020). Hastalığın cinsiyet ya da ırklara göre duyarlı olması ile ilgili bir koşul bulunmamaktadır. Etkilenen sürülerde prevalans genellikle % 2.5 olup bu oran % 30'lara çıkabilmektedir. Hastalık Afrika ve İzlanda'dan sonra yaygın olarak İskoçya' da ve dünyanın birçok ülkesinde bildirilmiştir. İspanya ve Peru'da hastalık 1992 yılında görülmüş ve bu ülkelerde görülen vakalar klasik OPA olarak tanımlanmıştır (Summers ve ark 2012).

Sürülerde OPA'nın taranmasına yönelik uygulamalar gelişmediği için hastalığın insidansını değerlendirmek çoğu zaman zordur (Leroux ve ark. 2007). Romanya dahil bazı Avrupa ülkelerinde JSRV ile bağlantılı OPA vakalarının prevalansı bilinmemektedir. Bununla birlikte Avrupa'da klasik OPA İrlanda, Almanya ve İtalya gibi ülkelerde rapor edilmiştir (Toma ve ark 2020). Birleşik krallıkta ise hastalığın endemik olarak görüldüğü bildirilmiştir. OPA'dan etkilenen koyunlarda genellikle sekonder bakteriyel enfeksiyonlar görülmekte ve ölüm şekillenmektedir. Hastalıktan şiddetli etkilenen sürülerde ekonomik kayıplar meydana gelmekte (Mansour ve ark 2019), endemik olarak görüldüğü durumlarda ise ekonomik kayıplar azalmaktadır. İrlanda'nın kuzey kesimlerinde OPA'nın prevalansı düşük olup bildirimi zorunlu hastalıklar listesinde (Walsh ve ark. 2013). Hindistan'da ise bildirimi yapılan OPA vakalarının sayıları sınırlı olup, OPA vakaları

patomorfolojik olarak değerlendirilmiş ve PCR sonuçları ile doğrulanmıştır (Singh ve ark. 2018).



Şekil 8. OPA'nın coğrafik dağılımı. Gri renkle belirlenen ülkelerde OPA rapor edilmiştir. Siyah renkle gösterilen ülkelerde OPA rapor edilmezken beyaz renkle gösterilen ülkelerde durum bilinmemektedir (Griffiths ve ark. 2010).

2.8 Koyun Pulmoner Adenokarsinomunun Klinik Belirtileri

Hastalığın klinik belirti ve bulguları, akciğerlerde tümör gelişiminin boyutlarını gösteren solunum sistemine ait bozukluklardır (Kycko ve Reichert 2012). Tümör gelişen hayvanlarda ateşsiz seyreden solunum sistemine ait belirtiler dispne, taşipne, burun akıntısı, öksürük, akciğer sıvılarının fazla üretimi ve egzersiz intoleransı, kilo ve kondüsyon kaybı olarak görülmektedir. Solunum sisteminde artan sıvı birikimi göğüs duvarının dinlenmesi ve 'bubbling' (köpürme) seslerinin duyulması ile değerlendirilebilir. Öksürük OPA ile enfekte vakaların % 45'inde görülmektedir. Buna ilaveten 'Wheel barrow' testi ile koyunların arka bacaklarının yukarı kaldırılması sonucunda burundan sıvı gelmesi hastalık için ayırt edici bir yöntemdir. Bazı durumlarda 300 ml' ye kadar varan sıvı boşaltımı olabilir (De las Heras ve ark. 2000, Salvatori 2004, Lee ve ark. 2017). Enfeksiyon başladıktan sonra virüs pnömositleri istila etmeden ve neoplastik transformasyonu başlatmadan önce dolaşımdaki lökositlerde uzun süre kalmaya devam eder. Sürüye giren JSRV enfeksiyonları birçok hayvanı enfekte etmesine rağmen bazen belirti vermez. Çünkü

hastalık tümöral lezyonlar oluşmadan hayat boyu kalıcı olabilir (Lee ve ark. 2017). Klinik OPA vakalarında en yaygın belirti nazal boşluklarda akıntı olup, akciğerlerde fazla miktarda sıvı üretilmesinden kaynaklanmaktadır. Atipik vakalarda burundan sıvı akması görülmez fakat yapılan nekropsi ve bilimsel çalışmalarda tümöral lezyonlara rastlanır (Toma ve ark. 2020). Virüs ile doğal olarak enfekte koyunlarda inkübasyon süresi uzun olup koyunlar 2-4 yaşına gelene kadar hastalık belirtisi görülmez (Salvatori 2004). OPA'da ölümler sıklıkla *Mannheimia hemolytica* kaynaklı sekonder bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlar ile ilişkilidir (Salvatori 2004, Karagianni ve ark. 2019).

2.9 Koyun Pulmoner Adenokarsinomunda Makroskopik Lezyonlar

Koyun pulmoner adenokarsinomunda makroskopik olarak akciğerlerde sert kıvam ile nodüler alanlar ve diffüz konsolidasyon bölgeleri görülür (Manasa ve ark. 2018). Klasik OPA'da akciğerlerin büyüdüğü ve göğüs kafesi açıldığında kollabe olmadıkları bildirilmiştir (De las Heras ve ark. 2000). Hava yollarında köpüklü eksudat nedeni ile akciğerlere palpasyon yapıldığında sıvı aktığı ve bu sıvının esasen sürfaktan proteinlerden oluştuğu açıklanmıştır (Summers ve ark. 2012, Yener ve ark. 2016). Klasik OPA'da baskın lezyonlar, akciğerlerde kranioventral loplarda 1-2 cm çapında düzensiz grimsi alanlardır. Bu alanlar diffüz ya da nodüler tipte büyüme göstermekte ve kesit yüzeyinde nemli bir görünüm izlenmektedir. Diğer akciğer hastalıklarının sıklıkla tümör ile birlikte görüldüğü ve neoplastik lezyonları maskeleyiği belirtilmiştir. Mediastinal ve trakeo-bronşiyal lenf düğümleri büyüyebilir ve bazen metastazlar bulunabilir. Ayrıca tümörün ekstratorasik metastazları nadiren bildirilmiştir (Minguion ve ark. 2013) Atipik formlar ise genellikle subklinik olup nekropside tesadüfen ortaya çıkmaktadır (Garcia-Goti ve ark. 2000). Atipik OPA'da lezyonlar parlak-beyaz renkli ve kesit yüzeyleri kuru nitelikte olup plevrada kabarıklık yapmayan sert nodüller halindedir ve akciğer parankimi tarafından çevrelenerek iyi bir şekilde sınırlandırılmaktadır (Yener ve ark. 2016, Toma ve ark. 2020). Diğer nodüller ise plevranın altında ya da akciğer dokularının derinlerinde olup bronşiollelerde fazla miktarda sıvı üretimine rastlanmaz (Salvatori 2004). Postmortem muayenelerde OPA ile etkilenmiş olgularda toraks açıldığında akciğerlerin normalden 2-4 kat daha ağır ve iyi kollabe olmadığı izlenir

(Salvatori 2004). Klasik OPA vakalarında hava yollarında köpüklü eksudat bulunup akciğerlere bası yapıldığında bu köpüklü sıvının aktığı görülür (Yener ve ark 2016). Her ne kadar OPA vakalarında ekstratorasik dokulara metastazlar bildirilmekle beraber, hastalıkta metastazların özellikle bölgesel lenf düğümlerinde görüldüğü bildirilmiştir (Salvatori 2004).

2.10 Koyun Pulmoner Adenokarsinomunda Histolojik Bulgular

Klasik OPA vakalarında bronşiyoler ve alveoler bölgelerde epitelyal hücrelerin asiner ya da papiller tipte neoplastik proliferasyonları bulunmaktadır. Bronşioalveolar farklılaşma, alveoler yapıyı bozmadan lepidik yayılma olarak da adlandırılan alveolar septayı takip eden hücrelerin genişlemesi ile karakterize edilir (Leroux ve ark. 2007). Tümör stromasının değişen oranlarda lenfositler, plazma hücreleri ve bağdoku iplikleri ile infiltre olduğu ve tümör mikro çevresinde alveol ve bronşiyollerin lümeninde fazla sayıda makrofajların bulunduğu belirtilmiştir. Sekonder bakteriyel enfeksiyonların geliştiği bazı vakalarda nötrofiller izlenebilir. Mezenkimal doku elementlerinin (miksoid nodüller) değişen oranlarda neoplastik epitelyal komponentler ile birlikte gözlendiği açıklanmıştır (Ortin ve ark. 2019).

Dünya sağlık örgütüne göre OPA miks adenokarsinom olarak değerlendirilmiş ve bronkoalveoler, papiller ve asiner tip olarak sınıflandırılmıştır. Bu tiplendirme hücresel gelişim ve farklılaşma paternine göre yapılır. Papiller subtip, epitel tabakasının üzerinde çıkıntı yapan ve altta yatan alveoler yapıyı değiştiren papilla benzeri yapıların varlığı ile tanımlanır. Asiner subtip bronşiyal bezlere benzeyen hücrelerden oluşur ve tubül ya da boru benzeri bir görünüm sergilediği için asiner tip olarak adlandırılır. Koyun pulmoner adenokarsinomunda tümöral hücreler yaklaşık % 80 oranında alveoler tip II pnömositler ve % 15 oranında ise Clara hücrelerinden köken alır. Tip II pnömositler sürfaktan bileşenlerini fazla miktarda eksprese eder (Leroux ve ark. 2007). Neoplastik hücrelerde çekirdek bazal bölgede yerleşik ve sitoplazma vakuollü, açık ve homojen görünümündedir. Sitoplazmik vakuoler görünümlü makrofajlar neoplastik doku çevresinde izlenir. Bu durum paraadenomatoz karsinom olarak adlandırılır. Hastalığın bir başka histopatolojik bulgusu ise terminal bronşiyal epitelinden gelişen ve lümene uzayan poliplerin oluşmasıdır. Atipik OPA vakalarında ise tümöral odaklarda görülen epitelyal

neoplazilere ilaveten stromada yangı hücreleri ile bağ doku daha yoğun olarak bulunmaktadır. OPA'dan etkilenen akciğerlerin bölgesel lenf düğümlerinde kortikal foliküller yok olmakta ya da medullar alanlarda plazmositozis gelişmektedir. Lenf düğümlerine metastaz yapan tümöral hücreler akciğerlerde olduğu gibi papiller ya da asiner görünüm sergilemektedir. Bölgesel lenf düğümlerine metastaz klasik OPA'da, atipik OPA'ya nazaran daha sık görülmektedir (Salvatori 2004).

2.11 Koyun Pulmoner Adenokarsinomlarında Tanı Yöntemleri

2.11.1 Rutin Histopatolojik Yöntemler

Akciğer ve lenfoid dokulardan alınan örnekler % 10 tamponlu formaldehit ile fiksasyonundan sonra rutin doku takip işlemleri uygulanan kesitler hematoxilen eozin boyanıp ışık mikroskopta değerlendirilir (Beytut ve ark. 2009).

2.11.2 İmmünohistokimyasal Yöntemler

Akciğer ve lenf dokularından alınan kesitlere Jaagsiekte sheep retrovirüs ile neoplastik hücre orijini için Avidin Biotin Complex-Peroxidase (ABC-P) tekniği ile Clara hücre ve sürfaktan protein antikorları kullanılarak immün boyamalar uygulanır (Palmarini ve ark. 1996, Platt ve ark. 2002).

2.11.3 Elektron Mikroskobu

Doğal ya da deneysel olarak yapılmış çalışmalarda çoğu kez elektron mikroskobu kullanılmış ve transforme hücreler topografik olarak düzenlenerek morfolojik olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla viral etiyolojik ajanların neden olduğu neoplazmlar kanıtlanmış ve tümörlerin morfolojik özelliklerinde çeşitliliğin dereceleri tanımlanmıştır (De las Heras ve ark. 2003).

2.11.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bronşioalveoler lavaj örnekleri ile yapılan PCR uygulamaları OPA'nın erken identifikasyonunda başarılı bir metottur. Ancak bu teknik klasik OPA ile atipik OPA ayrımını yapamayabilir. Kan örnekleri ile gerçekleştirilen PCR uygulamalarında exJSRV aranması çoğunlukla yanlış sonuç verebilir. Viral genetik materyal veya

proteinlerle gerçekleştirilen PCR uygulamalarında akciğer ve lenfoid doku örneklerinde etkenin varlığı gösterilebilir. Farklı coğrafik bölgelerde saptanan exJSRV örneklerinin dizileri arasında farklılıklar bulunmaktadır (Toma ve ark. 2020). Polimeraz zincir reaksiyonunda JSRV'nin LTR U3 bölgesi ile gerçekleştirilen moleküler çalışmalarda exJSRV belirlenmesi epidemiyolojik çalışmalarda önemlidir (Singh ve ark. 2018).

2.11.5 Virüs Nötralizasyon Testleri

JSRV enfeksiyonu virüs ihtiva eden nötralizasyon serumları ile belirlenebilir. Virüs Env proteininden oluşan ve yapısal genler gag-pol paketlenmiş biçimde plasental alkalın fosfataz kodlayan retroviral vektör kullanılarak oluşturulur (Hudachek ve ark. 2010).

2.11.6 Western Blot Analizleri

JSRV beta retrovirüsü envelop proteini ve kapsid proteinleri için spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak tanımlanır (Walsh ve ark. 2013).

2.11.7 Görüntüleme Yöntemleri

2.11.7.1 Radyografi ve Bilgisayarlı Tomografi

Radyografi ve bilgisayarlı tomografi OPA tanısı için tavsiye edilen görüntüleme yöntemlerinden biridir (Gray ve ark. 2019). Radyografi kullanımı sınırlı olan bir yöntemdir. Kullanımı ancak taşınabilir X ray cihazının mevcudiyetine bağlı olup çiftliklerdeki sağlık ve güvenlik koşullarını karşılama maliyeti ve yeteneği ile sınırlıdır. Torasik radyografilerde farklı boyut ve konumlarda nodüller gösterilebilir ve diffüz tümörler nodüler bir patern sergileyebilir (Quintas ve ark. 2021) Bilgisayarlı tomografi özellikle kranial lobların ventral bölgesinde lokalize olan küçük akciğer lezyonlarını tespit eder. Ancak radyografi ve bilgisayarlı tomografi yeterli ekipman ve sedasyon gerektirdiği için maliyetli bir yöntemdir (Gray ve ark. 2019).

2.11.7.2 Ultrasonografi

Ultrasonografi koyun pulmoner adeokarsinomu için oldukça kullanışlı bir tekniktir (Gray ve ark. 2019). Muayenelerde sağlıklı akciğerler hiperekoik bir beyaz çizgi (visseral plevra) ve havalandırılmış parankimin altında birkaç artefaktı sunar (Quintas ve ark. 2021) Kronik akciğer lezyonları ve visseral plevra yerleşimli 1-2 cm çapında OPA lezyonları ayırt edilebilir (Gray ve ark. 2019).

2.12 Çalışmada Kullanılan Primer Antikorlar

2.12.1 SP-A

Alveoler sıvıda en fazla bulunan SP-A total sürfaktan proteinlerin % 50'sini oluşturur. SP-A yüzey reseptörlerine yüksek bağlanma özelliği sayesinde mikroorganizmaların opsonizasyonu ve fagositozu uyarmak için alveoler makrofajlara bağlanır (Sakai ve ark. 1992, Rooney ve ark. 1994, Durgun ve Keskin 1997). SP-A'nın bir diğer fonksiyonu ise alveoler tip II pnömositlerce sürfaktan fosfolipitlerin salınımını artırarak sürfaktan konsantrasyonunu düzenlemektir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda normal tip II pnömositlerde, silyumsuz Clara hücreleri tarafından salgılandığını, ayrıca makrofajlarda bulunduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca hiperplazi gösteren tip II hücreler ve neoplastik hücrelerde immünohistokimyasal olarak daha yoğun bağlanma göstermektedir (Hermans ve Bernads 1999, Beytut ve ark. 2009).

2.12.2 SP-B

Sürfaktan B proteini hidrofilik yapıda olup sürfaktan proteinlerin fonksiyonunu artırıcı etki gösterir (Durgun ve Keskin 1997). SP-B alveollerdeki tip II pnömositler ve Clara hücreleri tarafından üretilir. SP-B'nin immün modülatör veya düzenleyici işlevi yoktur. Ancak lamellar cisimcikler ve tübüler miyelin organizasyonunda ve ayrıca alveoler yüzey üzerinde fonksiyonel olarak optimal ve stabil yüzey aktif madde oluşumunda anahtar protein olarak görülür. Olgun SP-B proteini yalnızca lamellar cisimciklerde bulunur (Hermans ve Bernads 1999). İmmünohistokimyasal boyamalarda SP-B ekspresyonu neoplastik hücrelerde ve tip II

pnömositlerin apikal sitoplazmalarında granüler yapıda ortaya çıkar (Beytut ve ark. 2009).

2.12.3 SP-C

Düşük moleküler ağırlığa sahip SP-C, matüre alveolar tip II hücrelerine özgü son derece hidrofobik bir proteindir. Diğer surfaktan proteinlerle birlikte alveolar yüzeyde düşük yüzey geriliminin oluşturulmasından sorumludur ve bugüne kadar serumda varlığı tespit edilememiştir. SP-A ve SP-B hem tip II pnömositler hem de silyumsuz Clara hücreleri tarafından salgınırken, SP-C yalnızca akciğerlerde tip II hücrelerde eksprese edilir ve bu hücrelerin identifikasyonu için oldukça spesifik bir belirteçtir (Hawgood 1989, Hermans ve Bernard 1999, Kalina ve ark. 1992).

2.12.4 Multi-Sitokeratin (MCK) (AE1-AE3)

Sitokeratin AE1/AE3 patolojide en çok kullanılan geniş spektrumlu bir keratin antikor kokteylidir. Monoklonal nitelikte AE1 antikorları asidik (tip I) keratinler olup bünyesinde keratin 10,14,15,16 ile 19 ihtiva ederken, AE3 antikorları bazik (tip II) keratinler olup 1,2,3,4,5,6,7 ve 8'i bünyesinde bulundurur. Her iki klon immünojen olarak epidermal keratin şeklinde kullanılmaktadır (Nelson ve Ordonez 2013).

2.12.5 Pansitokeratin (PCK-26)

Sitokeratinler intrasitoplazmik hücre iskeletinde bulunan proteinler olup temel fonksiyonları hücrelere mekanik strese karşı kendilerini koruyabilme yeteneğini sağlarlar (Lee ve ark. 2018). PCK-26 epitelyal antikorunu immünohistokimyasal açıdan epitelyal diferansiyonları tanımak için kullanılır (Perry ve Brat 2010).

2.12.6 CD3

CD3 gerek sitotoksik gerekse yardımcı T lenfositlerin aktive edilmesinde önemli rol oynayan bir protein kompleksi olup T hücresi ko-reseptörüdür. CD3 antijeni alfa ve beta T hücre reseptörleri ile bağlantılı olup sitoplazmik uzantıları T hücre reseptörlerinden uzundur. Bu sayede $\alpha\beta$ T hücre reseptörü heterodimerinin

algılamış olduğu sinyalleri intraselüler bölgeye dolayısı ile çekirdeğe ulaştırmada etkin fonksiyon üstlenirler (Aras ve Sarı 2017).

2.12.7 CD79acy

CD79, hemen hemen yalnızca B hücreleri ve B hücreli neoplastik hücreler tarafından salınan, CD79a ve CD79b bileşenlerinden oluşan proteindir. CD79a ve CD79b ekspresyonu, B hücresi ontogenisi sırasında immünoglobulin (Ig) ağır zincir genin yeniden düzenlemesi ve CD20 ekspresyonundan önce gelir ve B lenfositlerin plazma hücrelerine farklılaşmasının geç dönemlerinde kaybolur. Bu nedenle, CD79a ve CD79b'ye karşı hazırlanan antikorlar özellikle B hücre orjinli tümörlerin T hücreli neoplazmlardan ayırt edilmesinde kullanılır. Ayrıca, CD79a ve CD79b antikorları, B-akut lenfoblastik löseminin (B-ALL öncesi) teşhisinde yararlı belirteçlerdir (Peiguo ve Daniel 2001).

3. MATERİYAL ve METOT

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivi ile mezbahada kesilen koyunlardan alınan 20 OPA'lı akciğer ve 3 metastazlı üç mediastinal lenf düğümü çalışmada materyal olarak kullanılmıştır. Ayrıca 3 koyuna ait normal akciğer ve lenf düğümleri ise kontrol olarak değerlendirilmiştir. OPA şüpheli lezyonların bulunduğu akciğerler makroskopik olarak incelendikten sonra tüm akciğerler ve lenf düğümlerinden doku örnekleri % 10'luk formalin solüsyonunda tespit edilmişlerdir.

3.1. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama Yöntemi

Hematoksilen-Eozin doku örneklerinin histolojik açıdan değerlendirilmesi için histopatoloji laboratuvarlarında en yaygın kullanım alanı olan boyama yöntemidir. %10'luk formalin solüsyonunda tespit edilmiş doku örneklerine rutin takip işlemleri uygulandıktan sonra parafin bloklar hazırlanmış ve bloklardan 4 mikrometre kalınlıkta alınan seri kesitler etüvde 70 °C'lik ısıda 60 dakika bekletildikten sonra H&E ile boyanmıştır.

Boyama prosedürü:

1. Ksilol- 5 Dakika
2. Ksilol- 5 Dakika
3. % 100'lük Alkol- 3 Dakika
4. % 95'lik Alkol- 2 Dakika
5. % 90'lik Alkol- 2 Dakika
6. % 70'lik Alkol- 2 Dakika
7. Distile Suda Yıkama -2 Dakika
8. Hematoksilen- 5 dakika
9. Çeşme Suyunda Yıkama- 1 Dakika
10. Asit Alkol (% 1'lik)- 15-20 Saniye
11. Distile Suda Yıkama- 1 Dakika
12. Amonyaklı Su (% 1'lik)- 30 Saniye
13. Distile Suda Yıkama- 2 Dakika
14. Eozin- 2-3 Dakika

15. % 95'lik Alkol- 1 Dakika
16. % 100'lük Alkol- 1 Dakika
17. Ksilol- 5 Dakika
18. Ksilol- 5 Dakika
19. Ksilol-5 Dakika
20. Entellan ile kapatma

3.2. Avidin-Biotin Complex Peroksidaz (ABC-P) Boyama Yöntemi

İmmünohistokimyasal çalışmalarda kullanılan histokimyasal boyalar antijen ya da antikorun tespiti için rutin histolojik boyalara alternatif olarak geliştirilmiş yöntemler bütünüdür. İmmunperoksidaz tekniği enzimlerle işaretli reaktiflerin meydana getirdiği antijen ve antikor kompleksinin tespit edilmesi prensibine dayanmaktadır. Boyama sonucunda antijen ve buna karşı hazırlanan antikorun oluşturduğu kompleks uygun kromojenler aracılığı ile ışık mikroskopta görülebilir hale getirilmektedir (Çabalar 1993).

H&E boyanan kesitlerin ışık mikroskopta incelenmesi ile OPA tanısı konulan akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinden hazırlanan yaklaşık 4 mikron kalınlıktaki seri parafin kesitleri Poly-L-Lysin ile kaplanmış lamlara alınarak 70 °C etüvde 60 dakika bekletildi. Kesitler ABC-P tekniği ile SP-A, SP-B ve SP-C ile Multi-Sitokeratin (MCK, clone: AE1/AE3), Pan-Sitokeratin (PCK-26), CD3 ve CD79acy ticari antikorları kullanılarak üretici firmanın prosedürlerine uygun olarak boyandı. Çalışmada kullanılan primer antikorların inkübasyon süresi, klon numaraları, dilüsyon oranları Tablo-1'de verilmiştir. İmmün boyaların yürütülme aşamalarının tümü Thermo Fisher UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent HRP (kullanıma hazır) kiti kullanılarak yapıldı. Seri kesitler etüvde bekletilip ksilende deparafinize edildikten sonra dereceli alkoller ve distile sudan geçirilerek dehidrasyon işlemi uygulandı. Ardından endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi için kesitler %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 20 dakika inkübe edildi. Üç farklı Phosphat Buffered Saline (PBS, pH 7.6) tampon solüsyonunda 5'er dakika tutulduktan sonra, antijen salınımı için Citrate Buffer Saline (pH 6.0) solüsyonu içinde mikrodalga fırında (max watt) 15 dakika kaynatıldı ve soğuması için 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Üç farklı PBS solüsyonunda inkübasyonu takiben,

kesitlerin kenarları kurulandıktan sonra arka plan boyamasını engellemek için blocking solüsyonunda (Reagent A) 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Kesitler PBS ile yıkanmaksızın her bir primer antikor için önerilen dilüsyonlarda oda ısısında 2 saat veya buzdolabında gece aşırı 4-6 °C'de inkübe edildi. Primer antikor ile inkübasyonu takiben kesitler 3 farklı PBS solüsyonunda 5'er dakika yıkandıktan sonra biotinize goat-anti-rabbit veya biotinize rabbit-anti-mouse sekonder antikorları (Reagent B) ile oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Tekrar 3 farklı PBS solüsyonunda 5'er dakika yıkanan kesitler peroksidaz solüsyonunda (Reagent C) 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Negatif kontrol olarak kullanılan kesitlerde ise primer antikor yerine tampon solüsyonları ile primer antikor uygulanan kesitlerle aynı süre ve koşullarda inkübe edildi. Tekrar 3 farklı PBS solüsyonunda yıkamadan sonra kesitlere AEC veya DAB kromojenleri yaklaşık 10 dakika uygulanarak reaksiyon açığa çıkarıldı. Kesitler distile suda 5 dakika yıkandıktan sonra, Mayer's hemotoksilende yaklaşık 1 dakika bekletildi. Tüm kesitler çeşme suyunda beş dakika yıkandıktan sonra; AEC kromojeni uygulananlar distile suda bekletildikten sonra AEC özel yapıştırıcı ile kapatıldı. DAB kromojeni kullanılan kesitler ise düşük dereceden başlayarak yüksek dereceli alkoller ve ksilenden geçirildikten sonra entellan ile yapıştırılarak ışık mikroskobunda değerlendirildiler.

3.3 İndirekt İmmüno Floresan (IF) Boyama Yöntemi

İmmüno Floresan yöntemler herhangi bir doku ya da hücrede birçok bileşenin görselleştirilmesine izin veren bir tekniktir. Bu geniş yetenek floroforlarla etiketlenmiş spesifik antikorların kombinasyonları yoluyla elde edilir (Im ve ark. 2019). Yöntem prensip olarak immünohistokimyasal boyama yöntemi ile benzerlik gösterse de sekonder antikor olarak floresan işaretli antikor kullanılmasından dolayı immünohistokimyasal boyamadan farklılık göstermektedir. Parafin kesitler etüvde bekletildikten sonra deparafinizasyon işlemi için ksilen ve dehidrasyon için dereceli alkoller ile distile sudan geçirildi. Ardından endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi için, kesitler %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 20 dakika inkübe edildi. Üç farklı Phosphat Buffered Saline (PBS, pH 7.6) tampon solüsyonunda 5'er dakika tutulduktan sonra, antijen salınımı için citrate buffer saline (pH 6.0) solüsyonunda mikrodalga fırında 70 ile 95 °C (max watt) 15 dakika kaynatıldı ve

kesitlerin soğuması için 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. PBS solüsyonunda (3x5 dk) inkübasyonu takiben, kesitlerin kenarları kurulandıktan sonra arka plan boyamasını engellemek için blocking solüsyonunda (Reagent A) 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Kesitler PBS uygulanmaksızın her bir primer antikor için önerilen dilusyonda buzdolabında 4-6 °C de gece aşırı inkübe edildi. Kesitler PBS solüsyonunda (3x5 dk) yıkandıktan sonra doku kenarları kurutuldu. Primer olarak SP-B kullanılan kesitler için Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Fitch işaretli sekonder antikor (Alexa Flour 488, A-11008); MCK primeri kullanılan kesitlerde ise Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Alexa Flour 555, A-21422) Texas Red işaretli sekonder antikorlar ile oda ısısında 60 dakika karanlıkta inkübe edildiler. Bu inkübasyon işleminin ardından kesitler distile suya alındı. Ardından üç farklı PBS solüsyonunda 5'er dakika bekletildi. Doku kenarları kurutularak DAPI damlatıldı ve 5 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra lamelle kapatılarak floresan mikroskopta incelendi.

4. BULGULAR

4.1 Makroskopik Bulgular

Mezbahalarda kesime sunulan koyunlardan alınan ve OPA olduğu düşünülen akciğerlerde farklı loplarda genellikle düzensiz sert alanlar görüldü. Böyle akciğerlerin çoğunlukla iyi kollabe olmadıkları dikkati çekti. Etkilenen akciğerlerin kranial, medial ve kaudal loplarında bulunan lezyonların boyutlarına bağlı olarak ağırlaşmış ve büyümüş olduğu gözlemlendi (Resim 1). Muhtemelen klasik OPA olduğu değerlendirilen bu olgularda akciğerlerde tümörlerin düzensiz görünümde ve kaudal loplarda yaygın olduğu dikkati çekti. Neoplastik alanlarda doku kesit yüzeyinin nemli, bronş ve bronşiollede ise köpüklü eksudat bulunduğu izlendi. Atipik OPA olduğu varsayılan olgularda ise kaudal loplarda değişen boyutlarda ayrı, düzensiz, sert ve grimsi görünümde nodüler yapıların olduğu belirlendi (Resim 2). Bazı olgularda ise kranial akciğer loplarında tümöral kitlenin sınırlı kaldığı belirlendi. Akciğerlerde tümöral alanların genellikle normal parankimden iyi sınırlandırıldığı saptandı. Kimi vakalarda da tümörlerin tüm kranial ve kaudal loblara yayıldığı gözlemlendi. Tümörlü olgulardan alınan bronşiyal veya mediastinal lenf düğümlerinde makroskopik olarak hafif büyüme dikkati çekti.

4.2 Histolojik Bulgular

Koyun pulmoner adenokarsinomlu akciğer kesitlerinde klasik OPA olgularında tüm parankime yayılmış alveoler epitelizasyona benzer biçimde asiner tipte proliferasyonların geliştiği görüldü (Resim 3). Buna karşın atipik OPA vakalarında ise değişen büyüklüklerde oval görünümlü soliter veya multifokal tümöral hücre proliferasyonlarının akciğer parankimine yayıldığı belirlendi (Resim 4). Ancak bazı alanlarda bezsel yapıların tam oluşmadığı dikkati çekti. Bezsel proliferasyonların lümeninde ve çevre alveollerde bol miktarda alveoler makrofajların bulunduğu gözlemlendi (Resim 5). Alveoler makrofajların sitoplazmalarının genellikle genişlediği ve fagositik materyalle dolduğu tespit edildi. Tümör hücrelerinin genellikle adenomatoid görünümde oldukları ve tümör odaklarının çevresinde alveoler makrofajlara ilaveten yaygın alveoler ödem ile tümör parankiminde yaygın nötrofilik eksudasyon dikkati çekti (Resim 6). Tümöral

proliferasyonların bazı olgularda şiddetli bir şekilde akciğer dokusunu etkilediği ve hem bronşçuklar (Resim 7) hem de akciğer parankiminde yaygın papiller tarzda proliferere olduğu görüldü (Resim 8). Tümör hücre proliferasyonların yer aldığı bazı nodüllerin hyalinize kollagen ile sınırlandırıldığı (Resim 9) ve tümöral parankimde neoplastik hücrelerin yer yer lümene deskuame olduğu dikkati çekti (Resim 10). Bazı tümöral odaklarda ise bezsel yapıların yer yer epitelizasyon şeklinde gelişme gösterdiği ve tümör hücrelerinde sınırlı sayıda mitozların olduğu görüldü (Resim 11). Yüksek büyütmelelerde neoplastik hücre sitoplazmalarının lümene doğru belirgin olarak genişlediği ve sitoplazmalarında lamellar cisimcikler olduğu varsayılan açık görünümlü veziküler ve ovoid yapıların bulunduğu dikkati çekti (Resim 12). Az sayıda vakada tümöral proliferasyonlara verminöz pnömoninin eşlik ettiği ve bağ doku artışı olduğu izlendi.

Neoplastik hücrelerde çekirdeklerin pleomorfik olduğu bazılarının da ise nükleusun hiperkromazi gösterdiği ve yer yer veziküler çekirdeklere sahip oldukları görüldü. Neoplastik odaklardaki hücrelerin bazılarında çekirdek membranının kalınlaştığı ve tümör hücre çekirdeklerinin adeta histiyositik görünüm kazandıkları dikkati çekti. Bronşların çeperlerinde şiddetli yangısel infiltrasyon ile lümenlerinde deskuamatif hücreler izlendi. Atipik formdaki pulmoner adenokarsinomlarda parankimde değişen büyüklüklerde oval yapıda tümör nodülleri saptandı. Bu nodüllerin sıklıkla asiner yapıda olduğu fakat bazılarının lümenlerine yansımış tümör hücre gruplarının bulunduğu görüldü. Akciğer parankiminde ise septal kalınlaşma, akciğer ödemi ve bant halinde kollagen demetlerinden oluşan fibrotik alanlar saptandı.

İki OPA'lı akciğerde nodüler tarzda yaygın miksomatöz proliferasyonlar tespit edildi (Resim 13). Miksomatöz proliferasyonların bazı alanlarda adenomatoid proliferasyonları çevrelediği görüldü. (Resim 14). Ayrıca bazı olgularda tümör odakları çevresinde yoğun yangısal hücre infiltrasyonları arasında çok çekirdekli Langhans tipi dev hücrelerine rastlandı. Bazı olgularda ise hem normal alveoler bölgelerde hem de tümör odakları çevresinde germinal merkeze sahip çok sayıda lenfoid folliküller saptandı (Resim 15). Tümöral proliferasyonların yoğun destek doku ile çevrelediği vakalarda, diğer olgulardan farklı olarak tümör hücrelerinin adeta endotel ya da kist epiteli görünümüne sahip oldukları dikkati çekti.

Mediastinal lenf düğümlerinde üç olguda yaygın metastazlar tespit edildi. Lenf düğümlerinde hem kortikal hem de medullar bölgede oldukça yaygın tümöral proliferasyonların olduğu ve kitlelerin sıklıkla subkapsüler (Resim 16) ya da kortikal bölgede lenf folliküllerinin arasına yerleştiği gözlemlendi (Resim 17). Bazı alanlarda özellikle oldukça iri tümör kitlelerinin neredeyse tüm lenf düğümünü istila ettiği ve normal doku yapılarının silindiği görüldü (Resim 18). Birçok tümöral nodülün merkezi kısımlarının ileri düzeyde nekrotik olduğu, yaygın nötrofilik eksudasyon ile yer yer kalsifikasyonların bulunduğu görüldü (Resim 19). Özellikle subkapsüler metastatik kitlelerin tamamen lenfoid dokuyu istila ettiği ve kortikal lenf folliküllerinde germinal merkezlerin tamamen ortadan kalktığı dikkat çekti.

4.3 İmmünohistokimyasal Bulgular

4.3.1 SP-A Boyama Sonuçları

Koyunların OPA'lı akciğer ve metastazlı mediastinal lenf düğümlerinde yapılan SP-A protein boyamasında özellikle papiller tarzdaki proliferasyonlarda belirgin intrasitoplazmik reaksiyon görüldü (Resim 20). Çalışmamızda hem klasik hem de atipik OPA vakalarında sitoplazmik SP-A reaksiyonları görülmüş ve klasik OPA olduğu değerlendirilen vakalarda immün reaksiyonun kısmen daha şiddetli olduğu dikkati çekmiştir. İmmün reaksiyonun neoplastik odaklarda özellikle tümör hücrelerinin apikal sitoplazmasında olduğu saptandı. Tümöral dokuların yanı sıra hem normal akciğerler hem de OPA'lı akciğerlerde non-neoplastik alanlarda bulunan tip II pnömositlerde de benzer reaksiyon belirlendi. Gerek neoplastik gerekse normal tip II pnömositlerin dışında özellikle terminal bronşiyollerde silyumsuz Clara hücrelerinde sitoplazmik immünpozitif reaksiyon görüldü (Resim 21). OPA'lı akciğerlerde özellikle neoplastik proliferasyonlar çevresindeki alveoler makrofajlarda da intrasitoplazmik reaksiyon gözlemlendi (Resim 22). Miksomatöz proliferasyonlarda ise SP-A'nın negatif reaksiyon verdiği gözlemlendi. Lenf düğümlerine metastaz yapmış olgularda tümör hücrelerinde açık olarak intrasitoplazmik immün pozitif reaksiyon tespit edildi (Resim 23). İmmün pozitif reaksiyonun, primer OPA kitlesi bulunan akciğer dokuları ile metastazlı mediastinal lenf düğümlerinin karşılaştırılmasında lenf düğümlerinde akciğerlere kıyasla neoplastik hücrelerdeki immün reaksiyonun kısmen zayıf olduğu dikkati çekti.

4.3.2 SP-B Boyama Sonuçları

Koyun pulmoner adenokarsinomlu akciğerlerin tümünde neoplastik dokularda tümör hücrelerinde şiddetli ve yaygın SP-B pozitif reaksiyon tespit edildi (Resim 24). Bazı atipik OPA'lı olgularda değişen büyüklüklerde oval görünümlü nodüller tipte parankime yayılmış tümöral proliferasyonların SP-B pozitif oldukları açık olarak görüldü (Resim 25). Bununla birlikte tümör nodüllerinde bazı neoplastik hücrelerinde SP-B immün reaksiyonun oluşmasına rağmen aynı nodülde diğer bazı tümöral proliferasyonların negatif reaksiyonu dikkati çekti (Resim 26). Tüm SP-B boyamalarda hem neoplastik hücrelerin hem de gerek kontrol gerekse OPA'lı akciğerlerin non-neoplastik alanlarında normal tip II pnömositlerin de sitoplazmik pozitif oldukları görüldü (Resim 27). Ancak normal akciğer parankiminde tip II hücrelerde SP-B immün reaksiyonun neoplastik hücrelerdeki kadar şiddetli olmadığı dikkati çekti. Neoplastik doku dışında tümör stroması, tip I pnömositler ve yangısal infiltrasyonlar ile bronşiyal bez epitellerinin sürfaktan negatif reaksiyonları gözlemlendi. SP-A immün boyamalarda olduğu gibi; tümöral proliferasyonlarda SP-B immün reaksiyonların baskın bir biçimde apikal sitoplazmada gerçekleştiği ancak tümöral stromaya yakın olan sitoplazmik bölgede reaksiyonun oluşmadığı veya zayıf olduğu görüldü. İmmün reaksiyon ürünlerinin genellikle tümör hücrelerinin sitoplazmasında kaba granüler tarzda olduğu ve bunların yüksek olasılıkla ozmiyofilik lamellar cisimcikler olduğu düşünüldü (Resim 28, 29). Miksomatöz proliferasyonların bulunduğu odaklarda ise SP-B'nin negatif reaksiyon verdiği gözlemlendi. Klasik OPA vakalarında neoplastik proliferasyonlarda özellikle alveollere uzayan papiller proliferasyonlarda yoğun ve diffuz SP-B immün pozitif reaksiyon saptandı (Resim 30). Atipik OPA'lı vakalarda ise bazı tümör nodüllerinde periferik neoplastik hücrelerde immün reaksiyon oluşmasına rağmen nodüllerin merkezinde bulunan hücrelerin SP-B'ye karşı zayıf immün reaktif oldukları veya reaksiyon vermedikleri görüldü. Tüm olgularda tümöral proliferasyonlarda tümör mikro çevresinde çok yaygın olan alveoler makrofajların sitoplazmalarının SP-B immün pozitif reaksiyon verdikleri saptandı (Resim 31).

Metastazlı lenf düğümlerinde, akciğerlerdeki tümöral alanlara paralel olarak, lenfoid doku arasında kalan neoplastik odaklarda yaygın SP-B pozitif reaksiyon

tespit edildi (Resim 32). SP-B pozitif neoplastik proliferasyonların kortekste veya medullada nekrotik doku arasında olduğu ve kimi olgularda tüm lenf düğümüne yayıldığı saptandı. Tümöral proliferasyonların sıklıkla bezsel veya papiller tarzda olduğu ve sürfaktan proteinlerle pozitif reaksiyon verdikleri açıkça gözlemlendi. Özellikle H&E boyamalarda lenfoid hücreler arasında zor farkedilen ve çok az sayıda tümör hücresinden oluşan küçük neoplastik odakta SP-B boyaması sayesinde kolayca tespit edildi (Resim 33).

4.3.3 SP-C Boyama Sonuçları

Klasik OPA olarak kabul edilen vakalarda tüm akciğer parankiminde bezsel tarzda proliferatif tümör hücre odaklarında belirgin sitoplazmik SP-C reaksiyonları tespit edildi (Resim 34). İmmün reaksiyonun tümör hücrelerinde özellikle perinükleer bölgelerde olduğu (Resim 35) ve yoğun reaksiyon şekillenen nodüllerde bezsel proliferasyon gösteren alanlarda şiddetli immün reaksiyonların bulunduğu görüldü. Ancak neoplastik hücreler dışında kalan stromal doku ve infiltratif yangı hücrelerinde herhangi bir immün reaksiyon oluşmadığı tespit edildi. Atipik olgularda tümöral proliferasyonlarda bazı nodüllerde periferik neoplastik hücrelerde şiddetli reaksiyon oluşmasına rağmen nodül merkezindeki hücrelerde immün reaksiyonun sınırlı olduğu ya da hiç oluşmadığı dikkati çekti (Resim 36). İmmün reaksiyon ürünlerinin ince granüler biçimde olduğu belirlendi. Atipik OPA vakalarında SP-C reaksiyonlarının kısmen zayıf olması ile beraber alveoler makrofajlarda da sınırlı reaksiyonlar olduğu görüldü. Miksomatöz alanların bulunduğu odaklarda ise SP-C'nin negatif reaksiyon verdiği gözlemlendi. Yine gerek tümöral alanlar gerekse normal parankimde silyumsuz Clara hücrelerinin SP-C negatif oldukları saptandı. Metastazlı mediastinal lenf düğümlerinde de yaygın SP-C immün pozitif reaksiyonlar gözlemlendi. Reaksiyonların hem kortikal hem de medullar alanlardaki neoplastik dokularda şekillendiği saptandı (Resim 37). Yine SP-A ve SP-B boyamalarda olduğu gibi, SP-C immün reaksiyonların stromal doku arasındaki küçük bezsel tümör hücre proliferasyonlarında da pozitif reaksiyon saptandı (Resim 38).

4.3.4 Multi-Sitokeratin (MCK, AE1-AE3) Boyama Sonuçları

Koyunların OPA'lı akciğer ve lenf düğümlerinde MCK boyamaları neticesinde tüm neoplastik proliferasyonların immün pozitif boyandığı görüldü (Resim 39). Tümör hücrelerinin yanı sıra hava yolu epitelleri, bronşiyal bez epitelleri ve normal parankimde tip II pnömositlerin sitoplazmalarının pozitif reaksiyon verdikleri görüldü. Ayrıca H&E boyamalarda zor ayırt edilebilen oval nükleuslu tip II pnömositlerin yanı sıra, tip I alveolar epitellerin sitoplazmik uzantıları da sitokeratin boyaması sayesinde rahatlıkla tespit edilebildi (Resim 40). Ayrıca yaygın akciğer fibrozisi oluşmuş parankimal dokuda sınırlı sayıda tümör hücresinden oluşan ve H&E boyamalarda gözden kaçırılacak neoplastik odaklar rahatlıkla identifiye edildi. Akciğerlerde tüm neoplastik odakların pozitif boyanmalarına rağmen, alveoler makrofajların negatif olduğu ancak bu hücreler arasında kalan tek tük epitel hücreler veya neoplastik proliferasyonların pozitif reaksiyon verdikleri görüldü (Resim 41).

Metastazlı lenf düğümlerinde tümöral hücrelerin MCK boyaması ile şiddetli sitoplazmik pozitif oldukları tespit edildi (Resim 42). MCK boyamada lenf düğümlerinde tümöral proliferasyonların ağırlıklı olarak korteks ve medullada olduğu dikkati çekti. Özellikle lenf düğümlerinde iri tümör nodüllerinin yanı sıra nekrotik odaklarda normal H&E boyama ile ayırt edilmesi zor olan sınırlı sayıdaki tümör hücre odaklarının ortaya çıkarılmasında MCK boyamasının oldukça katkılı olduğu görüldü. Yine kortekste H&E boyamada görülemeyen sınırlı sayıdaki tümör hücresinden oluşan küçük metastazlar MCK immün pozitif reaksiyon sayesinde rahatlıkla ortaya konuldu (Resim 43). İmmün reaksiyon ürünlerinin tüm sitoplazmaya yayılmış ince granüler tarzda olduğu görüldü. Ayrıca MCK boyamalarda epitel hücreleri dışındaki lenfoid ve destek doku hücrelerinin tamamen negatif reaksiyonu gözlemlendi. Hem klasik hem de atipik OPA tiplerinde MCK boyamaların şiddetli olduğu belirlendi. Ayrıca, MCK markırının epitelyal hücrelerde yüksek reaktivitesi sayesinde, lenf düğümlerinde bazı sahalarda gelişen fibrotik bağ doku unsurları arasında kalan (Resim 44) ve sürfaktan boyamalarda nispeten zayıf boyanan çok az sayıdaki tümör hücresinden oluşan neoplastik odaklar rahatlıkla tespit edilebildi. Metastatik lenf düğümlerinde tümör hücresi bulunmayan lenfoid doku ile kontrol lenf düğümlerinde negatif MCK boyama gözlemlendi (Resim 45).

4.3.5 Pan-Sitokeratin (PCK- 26) Boyama Sonuçları

Koyunların OPA'lı akciğer ve metastazlı lenf düğümlerinde PCK-26 ile yapılan boyamalarda tüm vakalarda tümöral proliferasyonlarda pozitif reaksiyon görüldü. Klasik OPA olgularında alveollerde asiner tipte proliferasyon olmuş kübik neoplastik hücrelerde sitoplazmik PCK-26 reaksiyon gözlendi (Resim 46). Aynı şekilde atipik OPA'lı akciğerlerde tümör hücrelerinde değişen yoğunlukta immün pozitif boyanmalar saptandı (Resim 47). Özellikle bazı OPA'lı akciğerlerde yer yer lenfoid follikül oluşumu ile karakterize şiddetli yangısal infiltrasyon bulunan alanlarda az sayıda tümör hücresinden oluşan nodüller PCK-26 boyanması ile ortaya konuldu (Resim 48). Papiller tarzda proliferasyon olan bazı atipik OPA vakalarında ise neoplastik hücrelerdeki pozitif reaksiyonlara nazaran stromadan zengin tümör nodüllerinde reaksiyonun daha zayıf şekillendiği dikkati çekti. Tümör hücrelerinin yanı sıra normal bronş ve bronşcularda mukozal örtü epitelyal hücreleri ile alveoler septada hem tip I hem de tip II pnömositlerde sitoplazmik reaksiyon görüldü (Resim 49). Gerek neoplastik gerekse non-neoplastik epitel hücreleri PCK-26'ya karşı belirgin pozitif reaksiyon gösterirken stromal hücreler, alveoler makrofajlar ve diğer doku hücrelerinin negatif reaksiyon verdikleri belirlendi. Atipik OPA olduğu saptanan bazı olgularda neoplastik hücrelerin pozitif reaksiyonu ile birlikte sekonder bakteriyel pnömoni oluşan ve yoğun nötrofilik infiltrasyon ile karakterize alanlarda nötrofillerde herhangi bir reaksiyon görülmedi. Metastazlı lenf düğümlerinde de MCK ve SP boyamalara benzer biçimde tüm neoplastik hücrelerin PCK-26 ile sitoplazmik pozitif boyandıkları tespit edildi.

4.3.6 CD3 Boyama Sonuçları

Hem klasik hem de atipik OPA olgularında neoplastik doku stroması ve peritümöral infiltratif hücrelerde şiddetli CD3⁺ reaksiyon görüldü. Klasik OPA'lı akciğerlerde CD3⁺ reaksiyonun özellikle tümör mikro çevresinde fokal ya da diffüz dağılım gösteren infiltratif lenfoid hücrelerde olduğu gözlendi (Resim 50). CD3⁺ T hücrelerin tümör mikro çevresinin yanı sıra fokal lenfoid dokularda daha yoğun olarak olduğu dikkati çekti. Ayrıca akciğer parankiminde görülen tümör nodülleri ile birlikte bazı bronşiyollerin lümeninde papiller proliferasyonlarda da CD3⁺ T hücrelerin bulunduğu tespit edildi. İmmün reaksiyonun tamamen hücrelerin çekirdeği

dışında oluştuğu ve çekirdeği ince bir halka halinde çevrelediği görüldü. Atipik OPA'lı akciğerlerde $CD3^+$ T lenfositlerin tümör nodüllerinde sıklıkla tümöral destek dokusu içine infiltre oldukları dikkati çekti (Resim 51). Bazı olgularda verminöz pnömoniye neden olan yoğun paraziter yapıların eşlik ettiği tümör mikro çevrelerinde T lenfositlerin baskın olarak havayolları çevresinde lenfoid odakları oluşturduğu saptandı. Metastazlı lenf düğümlerinde ise tümör nodüllerine infiltre olmuş infiltratif lenfositlerde $CD3^+$ reaksiyon oluştuğu ancak immün pozitif hücre sayısının akciğerlere kıyasla az olduğu dikkati çekti (Resim 52). Metastatik tümör nodülleri dışında normal lenfoid dokuda şiddetli immün pozitif reaksiyonlar görüldü.

4.3.7 CD79acy Boyama Sonuçları

Akciğerlerde neoplastik proliferasyonlarda tümör mikro çevresinde $CD79acy^+$ B lenfosit artışları görüldü (Resim 53). İmmün reaksiyonların görüldüğü bölgelerin özellikle tümör mikro çevresine yakın lenfoid odaklar ve yangısal infiltrasyon alanları olduğu belirlendi. Tümör mikro çevresi dışında tümöral destek dokularında ve bezsel proliferasyonlara infiltre olmuş lenfoid hücrelerde CD79 pozitif reaksiyonlar izlendi (Resim 54). Neoplastik proliferasyonların stroması dışında özellikle bazı olgularda görülen germinal merkezli lenfoid dokularda ve hava yolları çevresindeki peribronşiyal lenfoid dokularda da CD79acy pozitif hücreler saptandı. Metastazlı lenf düğümlerinde de hem tümör stroması hem de normal lenfoid folliküllerde CD79acy pozitif reaksiyonlar tespit edildi.

4.4 İmmünofluoresan (IF) Bulgular

4.4.1 SP-B IF Bulgular

SP-B için uygulanan indirekt IF boyamada, IHC boyamalarda olduğu gibi hem klasik hem de atipik OPA olgularında neoplastik proliferasyonlarda sitoplazmik pozitif reaksiyon gözlemlendi. IF reaksiyonun klasik OPA olgularında asiner tipte proliferasyon alan tümör hücrelerinin büyük çoğunluğunda oluştuğu görüldü (Resim 55).

Atipik OPA olarak değerlendirilen vakalarda IF reaksiyonun tümöral nodülleri oluşturan tüm neoplastik hücrelerde oluştuğu belirlendi (Resim 56). Ayrıca, IF reaksiyonun olgular arasında farklılık gösterdiği ve papiller proliferasyonlarda

şiddetli olduğu dikkati çekti (Resim 57). Yüksek büyütmelede IF boyanmanın açık olarak apikal sitoplazmada olduğu ve şiddetli SP-B pozitifliği görüldü (Resim 58). Neoplastik proliferasyonlara ilaveten non-neoplastik akciğer parankiminde normal tip II pnömositler ile peritümöral alveoler makrofajlarda zayıf IF reaksiyon gözlemlendi (Resim 59). Primer akciğer kitlelerinde olduğu gibi mediastinal lenf düğümlerinde de metastatik tümör nodüllerinde IF pozitif reaksiyon saptandı.

4.4.2 MCK IF Bulgular

Multisitokeratin için uygulanan indirekt IF boyamalarda klasik OPA'lı akciğerlerde parankime yayılmış asiner neoplastik odaklarda tüm tümör hücrelerinde şiddetli MCK pozitif reaksiyon görüldü (Resim 60). IF reaksiyon neoplastik odaklarda değişmekle beraber tüm tümör hücrelerinde pozitif reaksiyon saptandı. Alveollerde asiner tipteki proliferasyonların yanı sıra yer yer bronş ve bronşiyoller lümende papiller tarzda çoğalan tümör hücrelerinde de şiddetli MCK bağlanması gözlemlendi (Resim 61). Klasik OPA olgularında olduğu gibi atipik OPA'lı tümöral nodüllerde de şiddetli MCK IF pozitif reaksiyon tespit edildi (Resim 62). Reaksiyon şiddetinin tümör hücreleri arasında değişmesi ile birlikte, IF bağlanmasının yaygın olduğu saptandı. Neoplastik hücrelerin yanı sıra, başta hava yolu epitelleri olmak üzere hem normal tip II pnömositler hem de alveoler çeperde tip I hücrelerin sitoplazmik uzantılarında IF pozitif reaksiyon açık olarak tespit edildi (Resim 63). SP-B boyamalarda IF reaksiyonun genellikle apikal sitoplazmada oluşmasına rağmen, MCK IF pozitif reaksiyonun hem neoplastik hücreler hem de normal akciğer epitel hücrelerinde tüm sitoplazmada olduğu ancak sitoplazmik membran yakın alanlarda daha şiddetli olduğu dikkati çekti. Yine mediastinal lenf düğümlerinde tümöral odaklarda tüm neoplastik hücrelerin sitoplazmasında MCK IF pozitif reaksiyon olduğu (Resim 64) ve lenfoid hücreler arasında H&E boyamada zor görülen az sayıdaki tümör hücre odakları MCK reaksiyonu ile rahatlıkla saptanabildi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Birçok ülkede ekonomik kayıplara neden olan OPA'nın insan akciğer kanserleri için bir model olmasının yanı sıra, non-invaziv lepidik adenokarsinomların aydınlatılmasında da önemli katkı sağladığı açıklanmıştır (Mornex ve ark. 2003). Son zamanlarda bazı insan akciğer tümörlerinde JSRV ile immünolojik ilişkili bir proteinin, insanlardaki bronşialveoler karsinom ile endojen bir retrovirüs arasında benzerlik olduğu öne sürülmüştür. (De las Heras ve ark. 2000). Zira hayvanlarda tümör oluşturan onkovirüsler ile insanlarda tümöre neden olan virüsler arasında epidemiyolojik bağlantıya işaret eden çalışmalar mevcut olup, insan akciğer tümörlerinin araştırılmasında OPA'nın uygun model olduğu açıklanmıştır (Luttringer-Magnin ve ark. 2012). İnsan ve koyun akciğer kanserleri distal havayollarının salgı epitel hücreleri, tip II pnömositler ve daha az sıklıkla da Clara hücrelerinden kaynaklanmaktadır (De Martini 2003). OPA'ya benzer şekilde, insanlardaki bronşialveoler karsinomlar nadiren metastaz yapan ve yavaş büyüyen bir tümör olup özellikle OPA'nın bu tümör tipi için uygun bir model olduğu belirtilmiştir (Mornex ve ark. 2003). Zira bugüne kadar insan akciğer kanserleri çeşitli hayvan modelleri üzerinde çalışılmış ve kanserin immünohistokimyasal ve moleküler temelleri açısından önemli bilgiler elde edilmiştir. Özellikle koyun akciğerinin anatomik olarak boyut ve yapı bakımından insan akciğerine benzemesi nedeniyle model hayvan olarak kullanılmasının birçok avantaj sağladığı açıklanmıştır (Scheerlinck ve ark. 2008).

Koyun pulmoner adenokarsinomu JSRV'nin neden olduğu yetişkin koyunlarda görülen bulaşıcı bir hastalık olup, akciğerlerde tümöral lezyonlar ile karakterizedir. JSRV'nin koyunlarda yüksek oranda enfeksiyon ve ölüme neden olması nedeniyle koyun sağlığı ve ekonomik bakımdan önemli kayıplara yol açmaktadır (Mansour ve ark. 2019). Zira, koyun pulmoner adenokarsinomlarında herhangi bir tedavi protokolü ve aşı bulunmaması nedeniyle klinik olarak etkilenen hayvanların ölümü ile sonuçlanmaktadır. Bugüne kadar hastalığın yayılmasını engellemek için kontamine alanların ve ekipmanın dezenfeksiyonu ile etkilenen hayvanların tespit edilerek sürüden ayrılmasının en iyi strateji olduğu açıklanmıştır. Ayrıca süt ve kolostrum aracılığı ile enfeksiyon taşındığı için yeni doğan yavruların

sürüden ayrılarak yeni bir sürü oluşturulmasının da eradikasyon programı içinde yer alması gerektiği belirtilmiştir (Voigt ve ark. 2007).

Bu çalışmada 20 OPA'lı koyuna ait akciğer kesitleri ve lenf düğümleri incelenmiş ve tümörün kranial, medial ve kaudal akciğer loplarında olduğu ve hava yollarında köpüklü sıvı olduğu gözlenmiştir. Çalışmamıza paralel olarak, literatürde (Mingujon ve ark. 2013) akciğerlerde tümöral lezyonların sıklıkla diyafragmatik loblarda ya da kranio-ventral bölgelerde gri renkte, farklı boyutlarda, geniş ya da daha küçük konsolidasyon alanları şeklinde ortaya çıktığı bildirilmiştir. Yine aynı yazarlar Mingujon ve ark. (2013) hava yollarında köpüklü sıvı biriktiği ayrıca intratorasik metastazların beyaz renkli nodüller halinde bölgesel lenf düğümlerinde olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda tümöral kitlelerin akciğerlerde sert ve gri renkte olduğu görülürken, Toma ve ark. (2020) özellikle klasik OPA tespit edilen vakalarda akciğerde değişen boyut ve büyüklükte nodüllerin beyaz ya da açık yeşilden pembeye kadar değişen renklerden olduğu bildirmiştir. Toma ve ark. (2020) klasik OPA'da kitlelerin kesit yüzeyinin genellikle nemli; atipik OPA'da ise birleşik lezyonlar halinde kuru görünümlü ve beyaz renkte olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca çalışmamızda metastazlı mediastinal lenf düğümlerinde hafif nodüler büyüme izlenmiştir. Literatürde de (Kıran ve ark. 2000, Beytut ve ark. 2009, Mingujon ve ark. 2013) mediastinal lenf düğümlerinde boyutları 0.5 ile 2 mm arasında değişen beyaz renkli metastatik odaklar bildirilmiştir. OPA vakalarında intratorasik ve ekstratorasik metastazların görüldüğü, makroskopik olarak birbirine benzedikleri ve yaklaşık olarak tümörün % 0.3-25 oranında bölgesel lenf düğümlerine metastaz yaptığı bildirilmiştir (Griffiths ve ark. 2010, Mingujon ve ark. 2013).

Histolojik olarak, OPA lezyonlarının akciğerlerde tüm parankime yayılmış oval görünümde ve değişen büyüklüklerde tümöral hücre odaklarından oluştuğu, bazı olgularda ise proliferasyonların asiner tipte geliştiği gözlenmiştir. OPA'lı olgularda neoplastik proliferasyonların literatürde tanımlanan kriterlere uygun olarak; 9 vakada klasik, 11 vakada ise atipik formda olduğu saptanmıştır. Klasik OPA olgularında neoplastik proliferasyonların 'lepidik pattern' olarak adlandırılan ve bronşio-alveoler lümende küboidal veya kolumnar epitel hücrelerinden oluşan asiner tipte olduğu gözlenmiştir. Atipik OPA'da ise üreme paterninin küçük ve nodüler proliferasyonlar şeklinde geliştiği ve neoplastik alanlar ile normal akciğer parankimi arasında belirgin

bir sınır olduğu görülmüştür. Zira literatürde (Griffiths ve ark. 2010, Garcia-Goti ve ark. 2000) de hem klasik hem de atipik OPA'da histopatolojik özelliklerin birbirine çok benzediği sadece atipik form da stromanın mononükleer hücre ve bağ doku yönünden daha zengin olduğu açıklanmıştır. Atipik ve klasik OPA ayrımı yapılmaksızın gelişen sekonder enfeksiyonlar ve bunun sonucu olarak artan yangısal infiltrasyonlar ile fibrozis göz önüne alındığında, literatürde (Garcia-Goti ve ark. 2000, De las Heras ve ark. 2003, Griffiths ve ark. 2010, Summer ve ark. 2012, Minguignon ve ark. 2013, Azizi ve ark. 2014, Quintas ve ark. 2021, Mishra ve ark. 2021) açıklandığı üzere, stromal yangısal infiltrasyon ve bağ doku artışının OPA tiplerinin ayrımı için yeterli olmayacağı kanaatindeyiz. Çalışmamızda tümör hücre sitoplazmalarının genellikle apikal lümene doğru genişlediği ve bazı olgularda lamellar cisimcikler olabileceği düşünülen veziküler oval yapıların bulunduğu saptanmıştır. Tümör hücre çekirdeklerinin hiperkromatik veya yer yer veziküler oldukları, bazılarında çekirdek membranının kalınlaştığı ve adeta histiyositik hücre benzeri bir görünüm kazandıkları tespit edilmiştir. Literatürde (De las Heras ve ark. 2003) neoplastik hücrelerin sitoplazmasının homojen görünümde ya da ince vakuollü oldukları, çekirdeklerinin ise yuvarlak ya da oval yapıda ve kromatinin membrana doğru kaydığı, ayrıca merkezi veya parasentral yerleşimli bir çekidekçiğe sahip oldukları bildirilmiştir.

Salvatori (2004) OPA tanısı konulmuş tüm koyunlarda, hayvanın yaşına bakılmaksızın, histolojik olarak asiner proliferasyon paterni olsa bile tümörlerin baskın olarak alveollerde papiller tipte proliferasyonlar olduğunu bildirmiştir. Ayrıca aynı yazar bronşiyollerin lümenine doğru olan papiller üremeler ile nodüllerin asiner ve bronko-alveoler görünümünün sabit bir bulgu olarak kabul edilemeyeceğini ve bunun yaşla ilgili olmadığını açıklamıştır. Çalışmamızda klasik OPA vakalarında asiner üreme paterni baskın iken atipik OPA vakalarında nodüler tarzda üremelerin olduğu gözlenmiştir. Literatürde (De Martini ve ark. 1997, Summers ve ark. 2006) klasik OPA'da bronşiyollerin çevresinde yer alan lezyonlarda fibröz stromanın minimal olduğu, tümörlerin çevresinde nötrofilik eksudasyon ve alveoler makrofajların yoğun olduğu belirtilmiştir. Bunun aksine atipik OPA'da (De las Heras ve ark. 1992) neoplastik odaklar ile parankim arasında belirgin bir farklılık olduğu ve daha az fibroblast ile makrofaj ve nötrofil bulunduğu ifade edilmiştir. Toma ve ark.

(2020) ise atipik OPA’da epitelyal neoplazilerin yanı sıra stromada belirgin fibroblast proliferasyonu, kollagen oluşumu ve mononükleer hücre infiltrasyonu olduğunu bildirmişlerdir. Garcia-Goti ve ark. (2000) da atipik OPA’da stromanın lenfosit ve plazma hücreleri ile infiltre olduğunu, bağ dokusu liflerinin arttığını ve neoplastik alanlarda peribronşiyal lenfoid proliferasyonların arttığını açıklamıştır.

Çalışmamızda bazı olgularda OPA lezyonları ile birlikte nodüler tipte miksomatöz proliferasyonlar izlenmiş, literatürde (Beytut ve ark. 2009, İlhan ve ark. 2016, Ortin ve ark. 2019) miksoid nodüllerin neoplastik epitelyal komponentlerle karışık ve değişen boyutlarda gözlendiği bildirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda tümoral proliferasyonlar ile beraber az sayıdaki vakada verminöz ve mikotik pnömoni ve fibrotik doku artışları görülürken, Toma ve ark. (2020) çalışmalarında bazı vakalarda bağ doku artışları ve atelaktazi ile karakterize kronik süperatif bakteriyel ve verminöz pnömoni ve bu lezyonların histolojik olarak OPA’dan kolayca ayırt edilebildiğini bildirmişlerdir. Yine bulgularımıza paralel olarak Ortin ve ark. (2019) da bazı OPA vakalarında nötrofillerin bulunmasının sekonder bakteriyel enfeksiyonlara ilgili olduğunu açıklamıştır. Bu çalışmada tümöral odaklarda sabit olarak alveoler makrofajların bol bulunduğu ve genişlemiş sitoplazmalarının fagositik materyalle dolduğu tespit edilmiştir. Tümör odaklarında ve çevresinde alveoler makrofajların yanı sıra, alveoler ödem, tümör parankiminde nötrofilik infiltrasyonlar ve fokal lenfoid hücre infiltrasyonları dikkati çekmiştir. Bulgularımıza paralel olarak, birçok araştırmada (Salvatori ve ark. 2004, Beytut ve ark. 2009, Minguijon ve ark. 2013, Toma ve ark. 2020) makrofaj ve olgun lenfositlerin neoplastik hücrelerle birlikte bulunduğunu, ayrıca stromada ağırlıklı olarak makrofajlar ve lenfositler ile birkaç plazma hücresinden oluşan yangısal infiltrasyonların olduğu açıklanmıştır.

Çalışmamızda metastaz varlığı 20 OPA’lı akciğerden 3’ünde tespit edilmiş ve mediastinal lenf düğümlerinde subkapsüler, kortikal ve medullar yerleşimli değişen büyüklüklerde tümoral nodüllerin bulunduğu izlenmiştir. Bu neoplastik kitlelerin lenfoid dokuyu istila ettiği ve kortekste germinal merkezli lenfoid folliküllerin tamamen ortadan kalktığı gözlenmiş, Kıran ve ark. (2000) da çalışmalarında metastazlar ile mediastinal lenf düğümlerinde lenfoid dokunun tamamen ortadan kalktığını bildirmişlerdir. Yine Minguijon ve ark. (2013) tarafından metastazlı lenf

düğümlelerinde neoplastik hücrelerin subkapsüler ve paratrabeküler sinusları işgal ettiği ve normal korteksin yerini aldığı açıklanmıştır.

Sürfaktan protein A gen bölgesi, akciğerlerde tip II pnömositler ve silyumsuz Clara hücreler ile bu hücrelerden kaynaklanan tümöral proliferasyonlarda eksprese edilmektedir (De Martini ve ark. 2001). İmmün sistemde önemli rol oynadığı ileri sürülen SP-A, birçok mikroorganizmanın yüzeyine bağlanarak alveolar makrofaj ve nötrofil lökosit gibi savunma hücrelerinin patojenleri fagosite etme yeteneğini arttırmaktadır (Wright ve ark. 2001). Çalışmamızda OPA'lı tüm akciğerler ve metastazlı lenf düğümlerinde SP-A ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiş hem asinar hem de papiller üreme paternli tümör nodüllerinde neoplastik hücrelerin sitoplazmasında immün pozitif reaksiyon görülmüştür. Bu immün pozitif reaksiyonun papiller tarzda prolifer olmuş hücrelerin özellikle apikal sitoplazmik yüzeylerinde daha şiddetli olduğu dikkati çekmiştir. Çalışmamızla benzer olarak, literatürde (Platt ve ark. 2002, Beytut ve ark. 2009) tip II pnömositler ve Clara hücreler için fenotipik bir belirteç olan SP-A, OPA'lı koyun akciğerlerinde neoplastik proliferasyonları göstermek için kullanılmış ve incelenen tümöral dokularda spesifik sitoplazmik bağlanma bildirilmiştir. SP-A ekspresyonunu göstermek için yapılan başka bir çalışmada (İlhan ve ark. 2016) ise neoplastik hücrelerin sitoplazmasında orta veya yüksek yoğunlukta bağlanma nedeni ile tip II hücrelere spesifik olduğu açıklanmıştır. Ancak çalışmamızda SP-A immün reaksiyonların tümör hücrelerinin yanı sıra hem normal tip II pnömositler hem de Clara hücrelerinde pozitif olduğu ve dolayısıyla sadece tip II hücrelere özgü bir protein olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca Paananen ve ark. (2001) sürfaktan proteinlerin ekspresyonuna yönelik yaptıkları çalışmalarında, koyun akciğer dokularından elde edilen kesitlerin yanı sıra, doku kültür ortamında da bu markırı immünohistokimyasal olarak karakterize etmişlerdir. Ayrıca diğer yazarlar (Suau ve ark. 2006) OPA tümörlerinden üretilen hücrelerden oluşan kültürlerde % 95 oranında SP-A ve SP-C ekspresyonunun gözlenmesine dayanılarak tümör hücre kültürlerinin saflığını doğruladığını bildirilmişlerdir.

Çalışmamızda SP-B ekspresyonunu incelemek için OPA'lı akciğerler ve metastazlı mediastinal lenf düğümlerinde yapılan immünohistokimyasal boyamalarda tümör hücrelerinin sitoplazmasında immün pozitif reaksiyon

saptanmıştır. Literatürde (Hermans ve Bernard 1999, Paananen ve ark. 2001) matür SP-B'nin sadece tip II pnömositlerin sitoplazmasında ozmofilik lameller cisimciklerde bulunduğu, burada depolandığı ve alveoler lümene salgılandığı bildirilmiştir. Benzer biçimde bu çalışmada da akciğer ve lenf düğümlerinde tümör kitlelerinde neoplastik hücrelerde SP-B immünpozitif reaksiyonun baskın şekilde apikal sitoplazmada ince granüler olduğu gözlenmiştir. Her ne kadar akciğer sürfaktan proteinleri arasında SP-A'nın en fazla bulunan protein olduğu bildirilmekle beraber (Johansson ve ark. 1994, Hermans ve Bernard 1999, Mason ve ark. 2000) lamellar cisimciklerin esasen SP-B ve SP-C içermesi bu çalışmada matür SP-B immün reaksiyonun apikal sitoplazmada şiddetli oluşmasının nedenini doğrular niteliktedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara paralel olarak, literatürde (Platt ve ark. 2002, Beytut ve ark. 2009) SP-B reaksiyonun neoplastik hücreler ve normal tip II pnömositlerin apikal sitoplazmasında granüler tarzda görüldüğü ve primer akciğer kitlelerinde SP-B reaksiyonun lenf düğümü metastazlarına kıyasla daha kuvvetli olduğu bildirilmiştir. Atrıca atipik OPA olgularında SP-B reaksiyonun özellikle nodülün periferindeki neoplastik hücrelerde oluşmasının muhtemelen tümör hücrelerinin maturasyonu ile ilişkili olabileceğini akla getirmektedir. Yine, literatürde (Paananen ve ark. 2001, Platt ve ark. 2002, Beytut ve ark. 2009) bildirildiği gibi, terminal bronşiyollerde silyumsuz Clara hücrelerinin de SP-B sitoplazmik pozitif olduğu bu çalışmada görülmüştür. Zira, sürfaktan proteinlerin bronşiyal luminal yüzey aktivitesinin ve salgıların düzenlenmesinde önemli olabileceği ileri sürülmüştür (Hermans ve Bernards 1999, Paananen ve ark. 2001). Çalışmamızda neoplastik ve normal tip II pnömositlere ilaveten, tümör mikro çevresinde bulunan makrofajlarda da sitoplazmik SP-B pozitif reaksiyon gözlenmiştir. Alveoler makrofajlarda normal olarak SP üretilmemesine rağmen bu hücrelerde SP-A ve SP-B immün reaksiyon görülmesinin muhtemelen ekstarsellüler sürfaktan proteinlerin makrofajlar tarafından fagosite edilmiş olmasına bağlı olabileceği ve makrofajların fagositik aktivitesine katkı sağlayabileceği ileri sürülmüştür (Phelps and Harding 1987, Hawgood 1989, Platt ve ark. 2002). Çalışmamızda mediastinal lenf düğümlerinde tümöral dokularda SP markırlarına karşı immün reaksiyon tespit edilmesi metastazların tip II alveoler epitelyal hücre kökenli olduğunu doğrulamıştır. Çalışmamıza paralel olarak diğer araştırmalarda

(Beytut ve ark. 2009, Minguijon ve ark. 2013) tümörün nadiren bölgesel lenf düğümlerine metastaz yaptığı ve tümöral hücrelerin akciğer sürfaktan apoproteinlerine karşı pozitif reaksiyon gösterdiği bildirilmiştir. IHC boyamalara ilaveten, OPA'lı akciğerlerde SP-B ekspresyonu için indirekt IF tekniği uygulanmış hem neoplastik hem de normal tip II hücrelerde IF pozitif bağlanma ile IHC boyamada elde edilen sonuçlar doğrulanmıştır. Literatürde (Martineau ve ark. 2011, Murgia ve ark. 2011) OPA'lı akciğerlerde IF tekniği SP-C antikoru için uygulanmış ve neoplastik hücrelerde pozitif reaksiyon saptanmıştır.

SP-A ve SP-B'nin hem tip II alveoler epitelyal hücreler hem de Clara hücreleri tarafından üretildiği bildirilmesine karşın (Kalina ve ark.1992, Brasch ve ark. 2004, Martineau ve ark. 2011), SP-C'nin sadece tip II hücreler tarafından salındığı ve tip II pnömositler için spesifik bir marker olduğu (Wootton ve ark. 2005, Martineau ve ark. 2011) açıklanmıştır. Ancak hava yolu epitellerinin SP-C için negatif olduğu ve bu nedenle koyun akciğerlerinde tip II pnömosit orijinli tümörlerin identifikasyonunda SP-C'nin oldukça faydalı olduğu bildirilmiştir (Platt ve ark. 2002, Martineau ve ark. 2011, Cousens ve ark. 2015). Çalışmamızda hem klasik hem de atipik OPA'lı akciğerlerde tümöral proliferasyonlarda SP-C için şiddetli sitoplazmik reaksiyon görülmüş ve reaksiyonun daha çok perinükleer bölgede olduğu tespit edilmiştir. Wootton ve ark. (2005) ise ratlarda deneysel JSRV enfeksiyonunda akciğer tümörlerinde neoplastik hücrelerde sitoplazmik pozitif reaksiyonun apikal membrana yakın olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda her ne kadar farklı tümör tiplerinde neoplastik hücreler sitoplazmik SP-C pozitif olsa da klasik OPA vakalarında daha fazla tümör hücresinde kuvvetli reaksiyon gözlenmiştir. Ancak Martineau ve ark. (2011) tarafında da açıklandığı gibi, SP-C immün boyamalarda bronşiyal mukoza epitelleri ve diğer hücrelerde bir reaksiyon saptanmamıştır. Çalışmamızda SP-C için elde edilen sonuçlara paralel olarak, literatürde (Platt ve ark. 2002, Beytut ve ark. 2009, Martineau ve ark. 2011, Minguijon ve ark. 2013, Cousens ve ark. 2015) OPA'lı koyun akciğerlerinde tümörlerin hangi hücreden kaynaklandığının belirlenmesi için neoplastik dokular SP-C antikoru ile immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiş ve tümör hücrelerinin büyük bir kısmının SP-C immün pozitif olması nedeniyle tip II epitellerin baskın hücre tipi olduğu ve tümörlerin çoğunun tip II hücrelerden kaynaklandığı

açıklanmıştır. Aynı yazarlar (Platt ve ark. 2002, Martineau ve ark. 2011, Minguignon ve ark. 2013, Cousens ve ark. 2015) az sayıda vakada ise Clara hücre sekretorik protein (CCSP) pozitifliği saptamışlardır. Çalışmamızda özellikle atipik OPA olgularında aynı tümör nodülünde baskın olarak periferik neoplastik hücrelerin SP-C pozitif olmasının muhtemelen, Martineau ve ark. (2011) tarafından açıklandığı üzere, tümörün olgunlaşması ile ilişkili olabileceği kaanatindeyiz. Yine bu çalışmada mediastinal lenf düğümlerinde neoplastik proliferasyonlarda SP-A ve SP-B markırlara ilaveten, SP-C immün pozitif reaksiyon tümöral proliferasyonların tip II pnömosit kökenli olduğunu ve dolayısıyla primer akciğer kitlelerinden kaynaklanan metastazlar olduğunu göstermiştir. SP-C antikorunun tip II pnömositler için spesifik olması nedeniyle Murgia ve ark. (2011) hem JSRV hem de SP-C immün pozitif hücrelerin tip II pnömositler olduğunu açıklamışlardır. Koyunlarda olduğu gibi, keçilerde de JSRV ve SP-C antikorları kullanılarak JSRV kaynaklı geç dönem tümörlerin SP-C pozitif tip II hücrelerden oluştuğu bildirilmiştir (Caporale ve ark. 2013).

Sonuçlarımız ile uyumlu olarak, bazı çalışmalarda tümörün az sayıdaki vakada bölgesel lenf düğümleri (Beytut ve ark. 2009, Minguignon ve ark. 2013), kalp ve diyafram gibi intratorasik dokular ile karaciğer, böbrek ve iskelet kasları gibi ekstratorasik organlara metastaz yaptığı (Minguignon ve ark. 2013) saptanmıştır. Bu metastazlarda, OPA'nın her iki formundaki akciğer lezyonları ile uyumlu olarak neoplastik hücrelerin sürfaktan proteinlere karşı immün pozitif reaksiyon verdiği bildirilmiştir. İn vivo çalışmaların yanı sıra, Johnson ve ark. (2011) tarafından doku kültür ortamında ratların tip II pnömositleri kullanılarak retrovirüsün onkogenik etki gösteren envelop proteinin transforme edildiği çalışmada, proSP-C pozitif reaksiyon bildirilmiştir. Ayrıca literatürde (Platt ve ark. 2002, Beytut ve ark. 2009) belirtildiği gibi, çalışmamızda bronşiyal Clara hücrelerinin SP-C negatif olduğu belirlenmiştir.

Sitokeratinler epitelyal kökenli hücreler tarafından üretilen arafilementlerdir. Geniş spektrumlu sitokeratin antikorları solunum yollarının normal ve tümörlü dokularında bazal, silyumlu, goblet ve alveoler epitelyal hücrelerin belirlenmesi için sıkça kullanılmaktadır. MCK, bir sitokeratin kokteyli olup yapısında asidik (tip I) ve bazik (tip II) keratinleri bulundurmaktadır (Nelson ve Ordonez 2013). Çalışmamızda hem OPA'lı hem de kontrol akciğerlerde sitokeratin salınımı için, birer epitelyal

hücre markırları olan MCK ve PCK-26 antikorları kullanılarak immünohistokimyasal ve indirekt immüno floresan teknikleri ile değerlendirilmiştir. Her ne kadar neoplastik ve normal akciğer epitellerinin her iki CK için sitoplazmik pozitif reaksiyon verdiği görülmekle beraber, MCK reaksiyonların normal ve neoplastik hücrelerde daha yoğun olduğu dikkati çekmiştir. MCK antikoru ile IHC boyamalarda başta OPA'lı neoplastik hücreler olmak üzere, akciğer parankiminde tüm bronş ve bronşiyol mukoza epitel epitelleri ile birlikte alveollerde normal tip II pnömositler ve alveoler lümeni çevreleyen tip I epitel hücrelerin sitoplazmik uzantılarında şiddetli MCK immün pozitif reaksiyon tespit edilmiştir. Özellikle alveoler lumende makrofajlar ve diğer yangısal infiltrasyonlar veya bağ doku artışları ile maskelenmiş iki-üç tümör hücresi ya da epitel hücresinin MCK reaksiyonu sayesinde kolayca ortaya konulabildiği gözlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer biçimde, bazı çalışmalarda (Cousens ve ark. 2015, Manasa ve ark. 2018, Toma ve ark. 2020) OPA'lı akciğerlerde MCK (clone AE1/AE3) kullanılmış ve her iki tip OPA lezyonunda neoplastik hücrelerin normal tip II pnömositlere kıyasla yoğun ve diffuz immün pozitif reaksiyon verdiği ancak mezenkimal orjinli miksoid proliferasyonların MCK negatif olduğu bildirilmiştir. Yine sonuçlarımız ile uyumlu olarak, literatürde (Kycko ve ark. 2012, Cousens ve ark. 2015, Manasa ve ark. 2018, Toma ve ark. 2020) OPA'lı koyun akciğerlerinde immünohistokimyasal olarak pansitokeratin uygulanmış ve gerek deneysel gerekse doğal OPA lezyonlarında kuvvetli sitoplazmik pozitif reaksiyon görüldüğü ve tümörün epitelyal kökenli olduğu doğrulanmıştır. Kycko ve ark. (2012) ise OPA'lı olgularda solunum yolu epitellerinde sitokereatin salınımı için CK19 kullanmış ve neoplastik hücrelerin yanı sıra özellikle bronşiyal mukoza epitelleri ile non-neoplastik alveoler epitellerin de sitoplazmik CK pozitif olduğunu açıklamıştır.

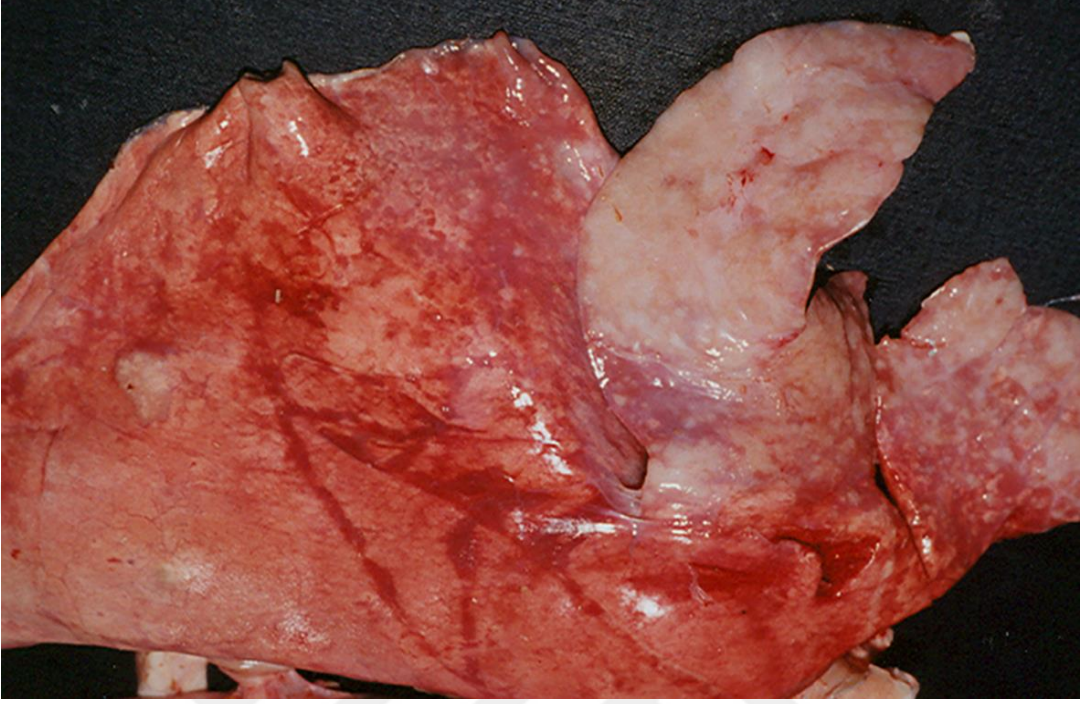
Çalışmamızda, OPA'lı akciğerlerde olduğu gibi, IHC boyamalarda mediastinal lenf düğümlerinde metastatik nodüllerde MCK şiddetli pozitif reaksiyon saptanmıştır. Özellikle lenf düğümlerinde kortekste yoğun lenfoid doku arasında veya neoplastik odaklarda gelişen nekroz ve fibröz bağdoku ile maskelenen ve H&E boyamalarda fark edilemeyen az sayıdaki neoplastik hücreler MCK reaksiyon ile kolayca ayırt edilebilmiştir. Literatürde (Manasa ve ark. 2018, Toma ve ark. 2020) metastazlı lenf düğümlerinde MCK antikoru kullanılan IHC boyama sayesinde küçük

OPA lezyonlarının saptanabileceği ve primer ve metastatik kitlelerin ayırımında önemli rol oynayabileceği ifade edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda MCK antikoru, indirekt IF tekniği kullanılarak, tümörlü ve normal akciğerler ile metastazlı lenf düğümü kesitlerinde uygulanmış, IHC sonuçlarına paralel olarak neoplastik ve normal akciğer epitelleri ile lenf düğümlerinde tümör metastazlarında sitoplazmik IF pozitif reaksiyon tespit edilmiştir. Benzer biçimde, Johnson ve ark (2011) JSRV ile enfekte rat doku kültüründe ve Martineau ve ark. (2011) ise doğal ve deneysel OPA'lı akciğerlerde tip II pnömositlerde sitoplazmik IF pozitif bağlanmayı göstermişlerdir. Ayrıca, MCK boyamalarında tip I alveoler epitellerinin rahatlıkla belirlenmesinin bu hücrelere yönelik yapılan araştırmalarda oldukça faydalı olabileceği çalışmamız ile ortaya konulmuştur. OPA şüpheli vakalarda MCK ve sürfaktan antikorlarının diyagnostik önemi karşılaştırıldığında, MCK'nın tip II pnömositler için spesifik olmamasına rağmen, neoplastik akciğer epitelleri için oldukça duyarlı olduğu ve literatürde (Martineau ve ark. 2011) açıklandığı gibi, tümörün epitelyal kökenli olup olmaması açısından MCK'nın oldukça faydalı olduğu gözlenmiştir. Özellikle tümörün metastaz yaptığı durumlarda, H&E boyamalarında identifiye edilmesi güç olan ve epitel kökenli çok az sayıda neoplastik hücrenin tespit edilmesinde oldukça duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla, intratorasik veya ekstratorasik metastazlarda sitokeratin ekspresyonlarının incelendiği çalışma sayısının çok sınırlı olması nedeniyle çalışmamızda elde edilen bulguların bilimsel literatüre oldukça katkı sağlayacağı kanaatindeyiz. Ayrıca, çalışmada PCK-26 antikoru kullanılarak yapılan IHC boyamalarda hem akciğer hem de metastazlı lenf düğümlerinde tümöral kitlelerde MCK antikor kokteyline benzer reaksiyonlar gözlenmiş ancak iki antikorun karşılaştırılmasında MCK ile yapılan boyamalarda reaksiyonların daha şiddetli olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada OPA'lı akciğerlerde yangısal reaksiyona bağlı olarak gelişen lenfositik fenotipler karakterize edilmiştir. T lenfosit infiltrasyonu için CD3 antikoru kullanılmış, OPA'lı akciğerler ve metastatik kitlelerde tümör mikro çevresinde, önceden bildirildiği (Beytut ve ark. 2009, Hudachek ve ark. 2010) gibi, baskın infiltratif hücre tipinin CD3⁺ T lenfositler olduğu saptanmıştır. Yine çalışmamızda B lenfositler için CD79 α cy antikoru kullanılarak yapılan boyamalarda hem akciğerler hem de lenf düğümlerinde neoplastik dokularda sınırlı sayıda CD79 α cy immün

pozitif reaksiyon belirlenmiştir. Summers ve ark. (2012) tarafından atipik ve klasik pulmoner adenokarsinomlarda intratümöral ve peritümöral alanlarda $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre alt grupları incelenmiş, klasik OPA nodüllerinde T hücre alt gruplarının intratümöral ekspresyonunun olmadığı buna karşın peritümöral alanlarda ise yoğun ekspresyon olduğunu bildirmişlerdir. Hudachek ve ark. (2010) hem JSRV hem de sheep lentivirus ile enfekte koyunlarda akciğer parankiminde $CD3^+$ T lenfosit zengin alanlarda nodül oluşmadığı ve tümörün spontan regresyonunda bu hücrelerin önemli rol oynadığını açıklamışlardır. Ayrıca, Ortin ve ark. (1998) ise JSRV enfeksiyonlarına karşı immün yanıtın zayıf olduğunu ve bu enfeksiyona dair spesifik bir immün yanıtın gelişmediğini açıklamışlardır. Her ne kadar JSRV enfeksiyonun başlangıç aşamalarında çok az hücrenin virusla enfekte olduğu bildirilmekle birlikte (Palmarini ve ark. 1996, Holland ve ark. 1999), en fazla provirüs yükünün monosit/makrofajlarda bulunduğu ve daha sonra proviral yükün T ve B lenfositlerle devam ettiği bildirilmiştir. Bu değişiklikler sonucunda OPA'lı akciğerlerde aktif olan lokal immün modülatör mekanizmaların JSRV'ye karşı immün yanıtı baskılayabileceği de düşünülmektedir. Zira OPA gelişimi süresince virusa karşı tespit edilebilir bir immün yanıtın oluşmaması nedeni ile eksojen JSRV'ye karşı genel bir immün tolerans mekanizmasının olduğu açıklanmıştır (Summers ve ark. 2006). Ayrıca, klasik OPA'da tümör mikro çevresinde SP ekspresyonunun artmasının tümöre karşı lokal bir yanıtın oluşmamasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Summers ve ark. 2012). Nitekim JSRV ile enfekte koyunlarda viral proteinlere karşı spesifik hücresel ve humoral bir immün yanıtın oluşmadığı literatürde yeterince dokumente edilmiştir. Her ne kadar JSRV'e karşı spesifik nötralizan antikorlar enfekte koyunların az bir kısmında bulunması ile beraber, güçlü edinsel bir immün yanıtın oluşmamasının, muhtemelen T lenfosit gelişimi sırasında fetal timusta enJSRV proteinlerinin salınımının bir sonucu olarak, koyunların JSRV'ye karşı immünolojik olarak toleranslı olmasına bağlı olduğu açıklanmıştır (Hudachek ve ark. 2010, Caporale ve ark. 2013). Çalışmamızda metastatik kitlelerin stromasında $CD3$ immün reaksiyonunun zayıf olmasına rağmen, nodüller çevresindeki normal lenfoid dokuda şiddetli immün pozitif reaksiyon dikkati çekmiştir. Yine $CD79\alpha$ boyamalarında hem tümör stroması hem de çevre lenfoid dokuda daha az sayıda $CD79\alpha$ pozitif B lenfosit olduğu görülmüştür.

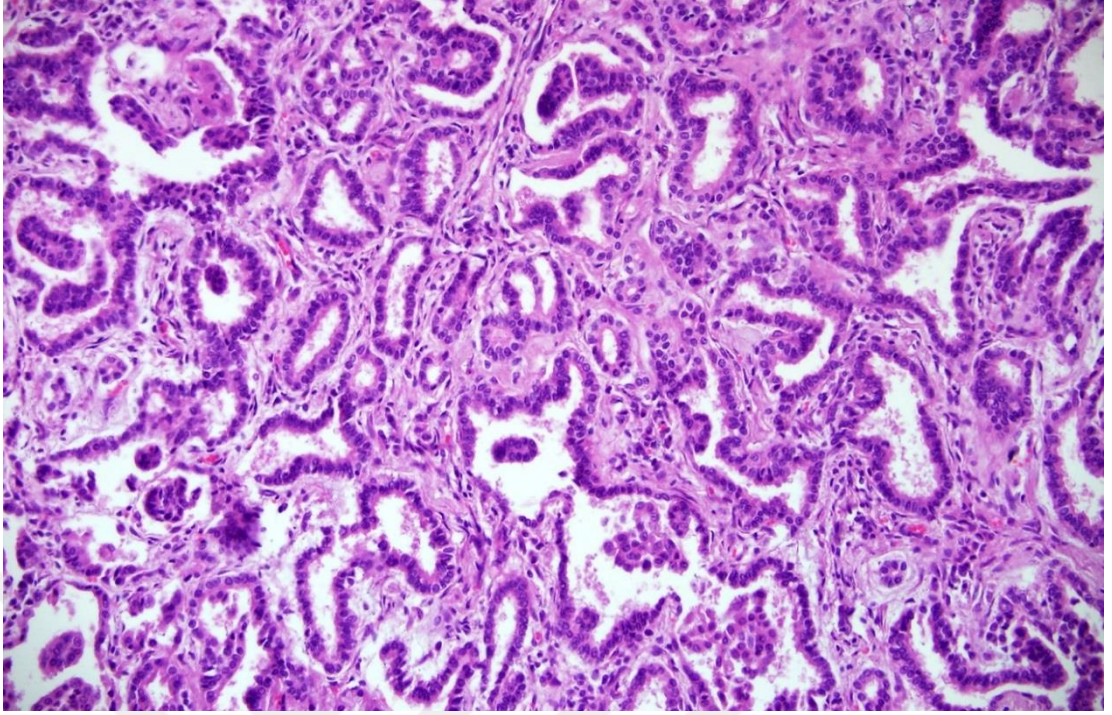
Sonuç olarak, bu çalışmada koyun akciğerlerinde primer OPA lezyonları ve metastatik kitleler H&E, sürfaktan proteinler ve sitokeratin markırları kullanılarak immünohistokimya ve indirekt immünofloresan tekniklerle ortaya konulmuştur. Toplam 20 OPA vakasından sadece üç olguda tümörün mediastinal lenf düğümlerine metastaz yaptığı saptanmıştır. Zira DSÖ tümörün çok yavaş gelişen bir tümör tipi olduğunu ve bölge lenf düğümlerine metastaz yapma potansiyeli nedeniyle kanser olarak tanımlanabileceğine karar vermiştir. OPA'nın özellikle tip II pnömositler ve nadiren silyumsuz Clara hücrelerinden köken alması nedeni ile neoplastik hücre kökenlerinin tespit edilmesinde SP ve Clara hücre proteinin IHC veya IF teknikleri ile tespit edilmesinin diyagnostik açıdan oldukça önemli olduğu saptanmıştır. Bu tez çalışmasında hem primer akciğer tümörleri hem de mediastinal lenf düğümü metastazlarında neoplastik hücrelerin SP için IHC ve indirekt IF boyamalarda pozitif reaksiyon vermesi tümörün tip II pnömositlerin transformasyonu sonucu meydana geldiğini göstermiştir. Ancak ticari olarak koyunlarda reaksiyon veren bir CCSP antikor bulunmaması ve bu antikor için IHC'nin kullanılamaması tümörün Clara hücre orjinini ekarte etmemiştir. Ayrıca tümörün tip II alveol epiteli ve Clara hücre kökenli olması nedeniyle primer ve metastatik kitleler MCK ve PCK-26 antikorları ile boyanmıştır. Kullanılan CK markırlarının herhangi bir epitel hücre tipine özgü olmaması ile birlikte, primer akciğer ve metastatik kitlelerde sürfaktan proteinlere kıyasla daha kuvvetli reaksiyon verdikleri tespit edilmiştir. Dolayısıyla sitokeratin markırlarının OPA tümörleri açısından spesifik olmamaları ile birlikte hem tümör hücreleri hem de diğer akciğer epitellerinin saptanması açısından sensitivitesinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle ticari olarak akciğer epitelleri için spesifik olup olmadığı bilinmeyen çok sayıda sitokeratin antikorunun varlığı ve bunların akciğer dokularında denenmesinin maliyeti göz önüne alındığında, özellikle AE1 ve AE3 klonlarından oluşmuş MCK antikorunun epitelyal kökenli akciğer tümörlerinin identifikasyonunda oldukça faydalı olduğu gözlenmiştir.

RESİMLER

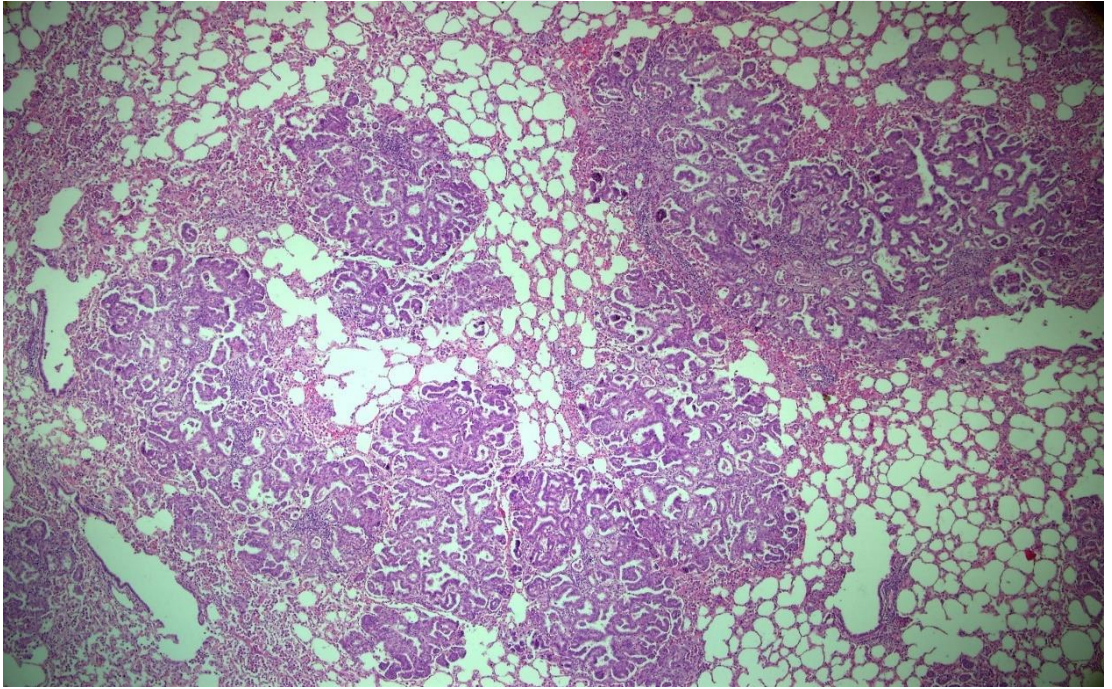
Resim 1: Klasik olduğu varsayılan vakada kranial loplara yayılmış grimsi görünümde düzensiz tümöral lezyonlar.



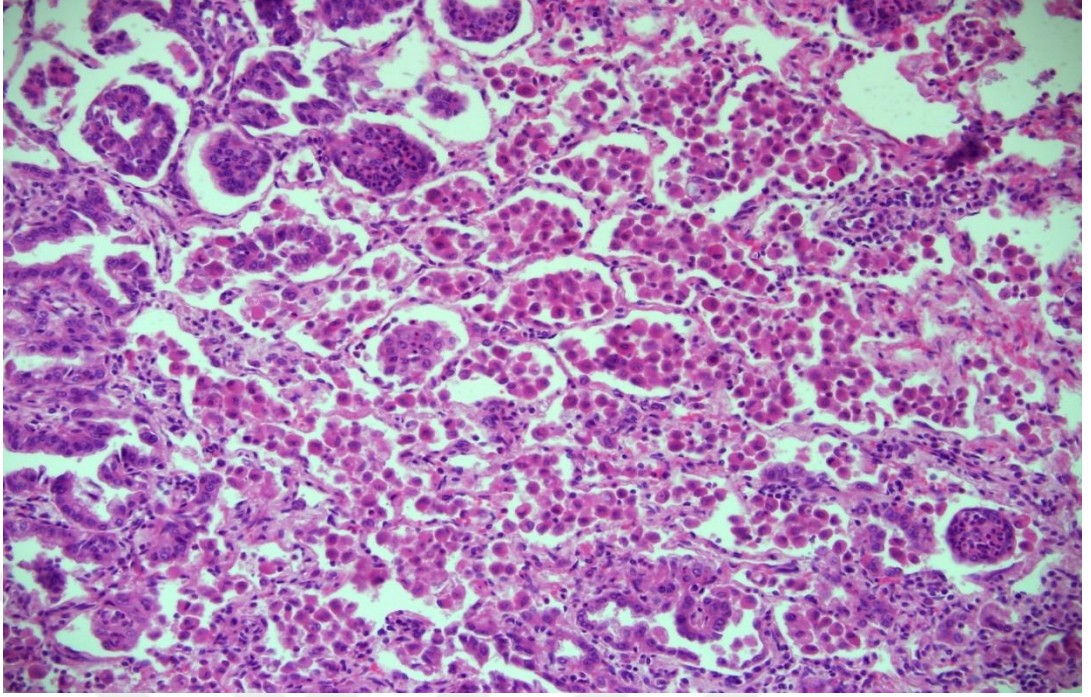
Resim 2: Atipik OPA olduğu düşünülen olguda kaudal akciğer lobunda grimsi renkte ve düzensiz tümöral lezyonlar.



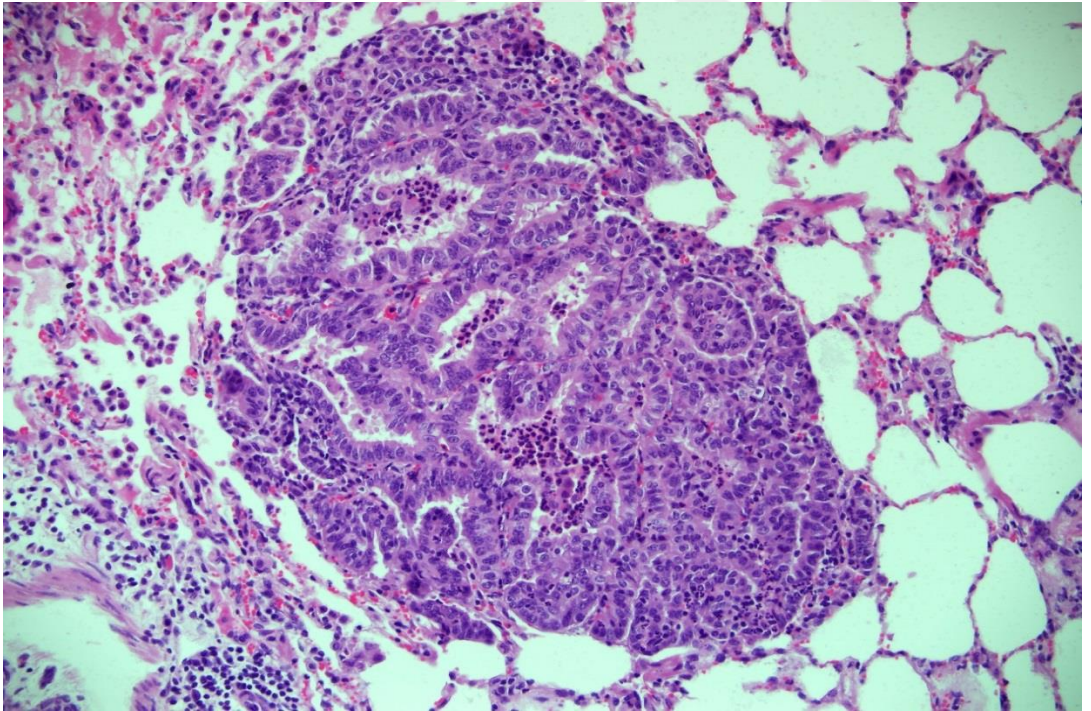
Resim 3: Klasik OPA'lı akciğerde parankime yayılmış tümöral hücre proliferasyonları (H&E x 10).



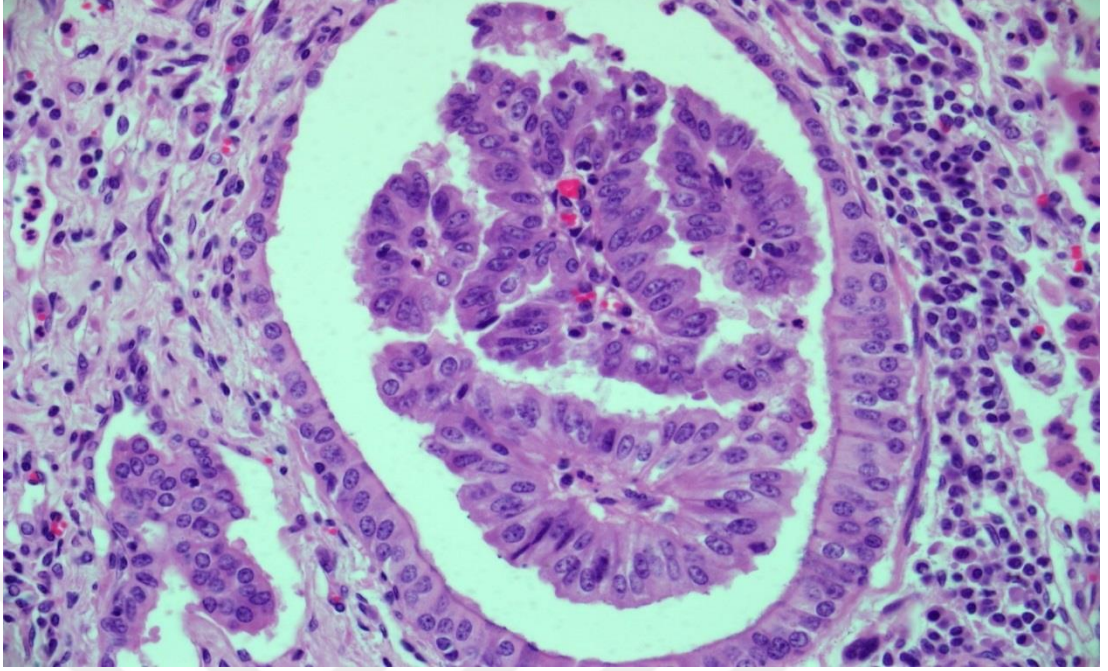
Resim 4: Atipik OPA'lı akciğer parankiminde nodüler tipte yaygın proliferasyonlar (H&E x 4).



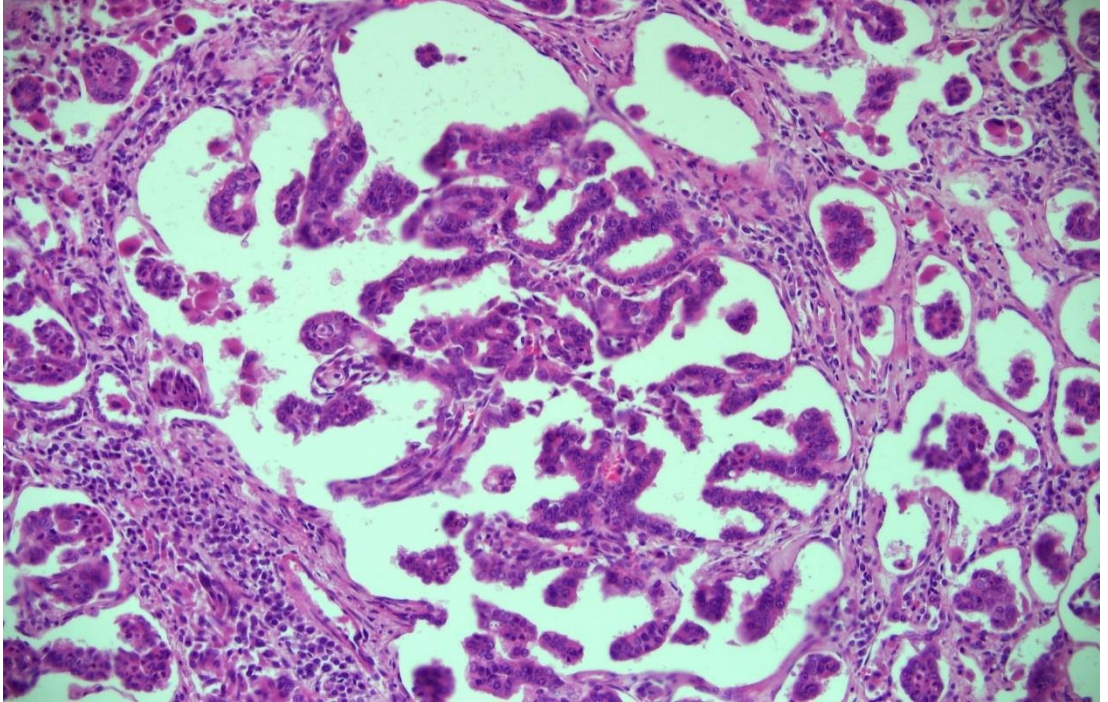
Resim 5: Tumor mikro çevresinde alveoler lümenlerde çok sayıda alveoler makrofaj (H&E x 20).



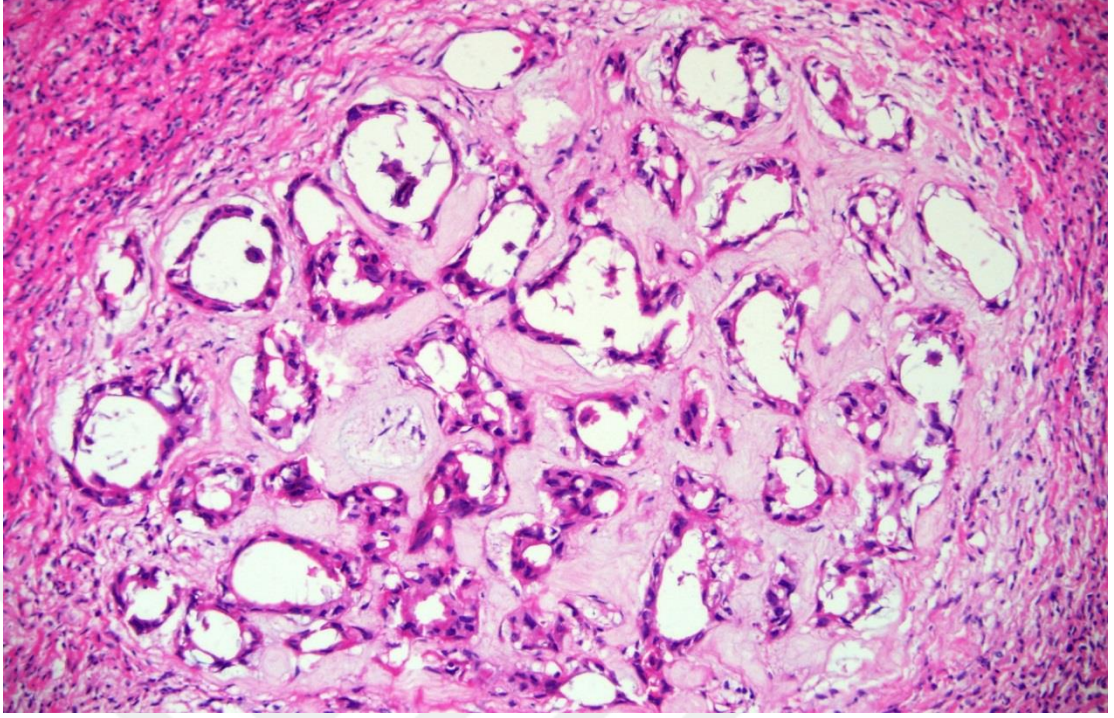
Resim 6: Atipik OPA'da nodül merkezinde nötrofil lökosit infiltrasyonları (H&E x 20).



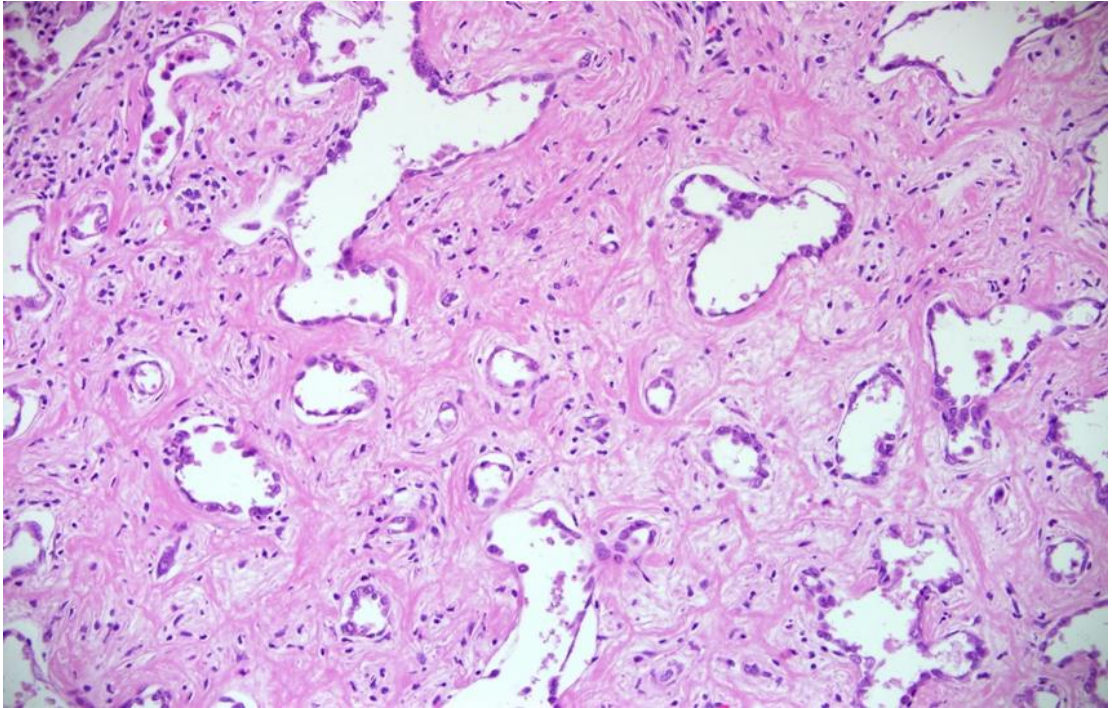
Resim 7: OPA'lı akciğerde bronşiol lümeninde papiller tümör hücre proliferasyonu (H&E x 40).



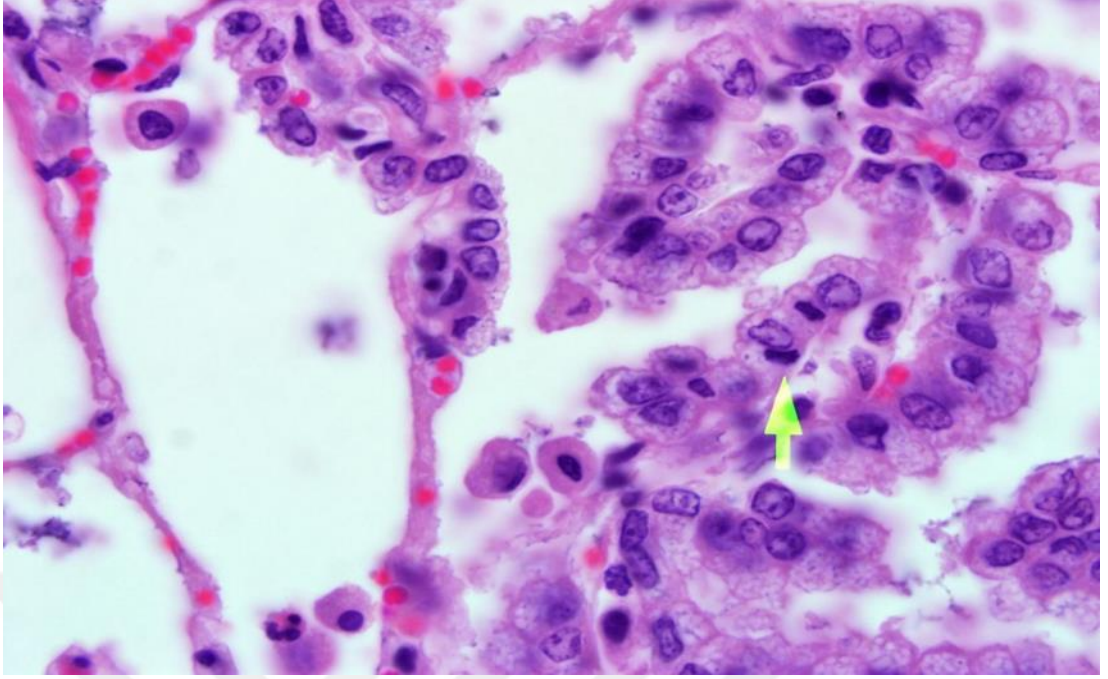
Resim 8: OPA'lı akciğerde papiller tipte tümöral proliferasyonlar (H&E x 10).



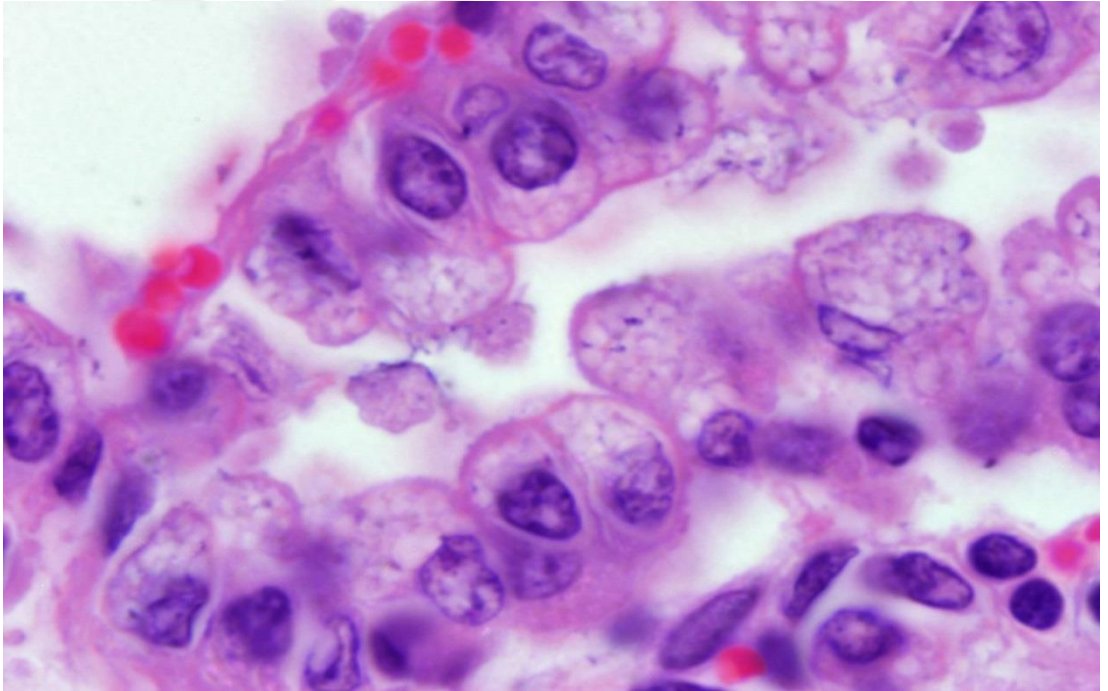
Resim 9: Atipik OPA'da yaygın hyalinize kollagen ile desteklenmiş tümöral kitle (H&E x 20).



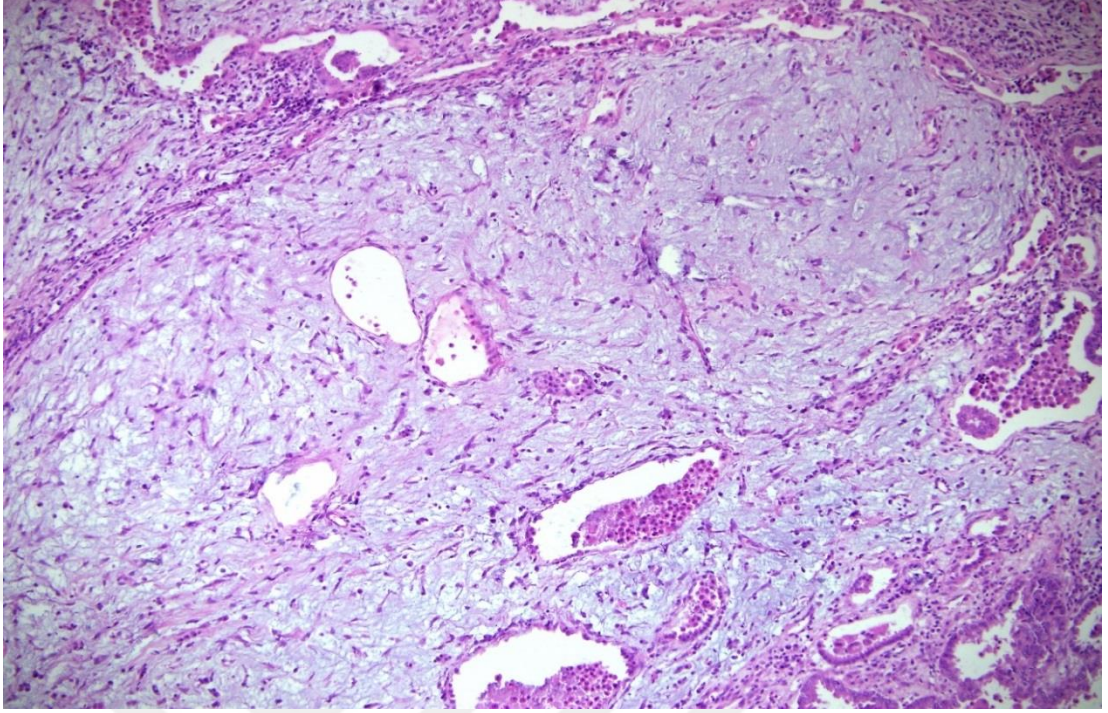
Resim 10: Klasik OPA'da tümöral parankimde aşırı stromal doku ile neoplastik hücrelerde hafif deskuamasyon (H&E x 20).



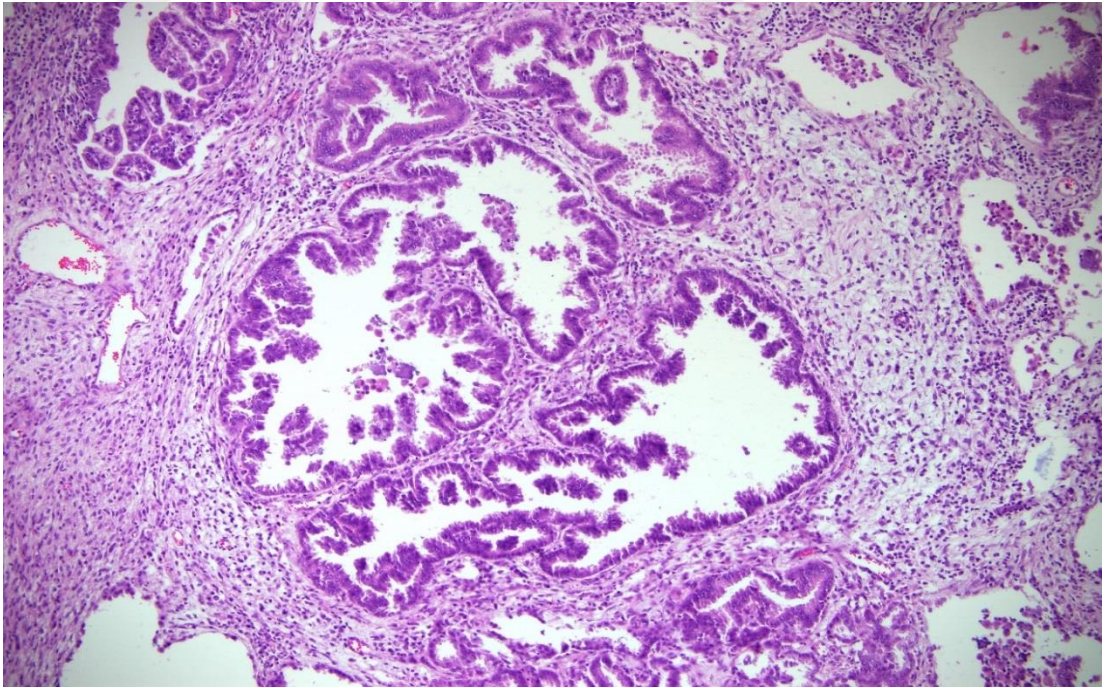
Resim 11: Tümöral odakta neoplastik hücrelerde telefaz evresinde mitotik figür (ok) (H&E x 100).



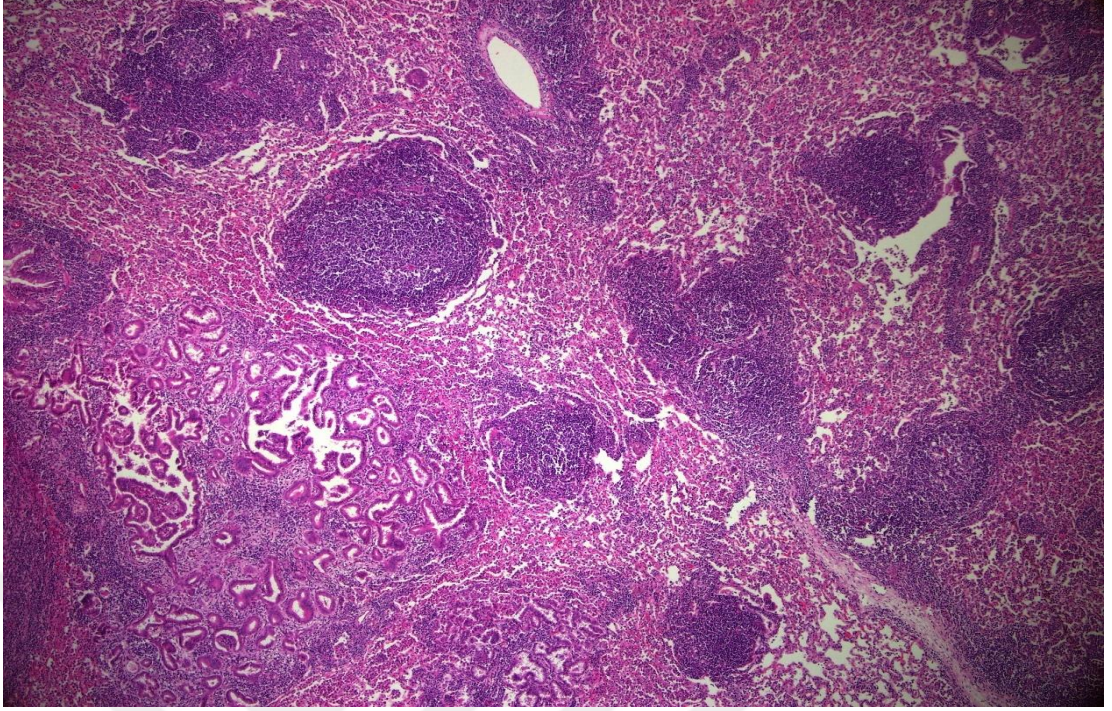
Resim 12: Neoplastik hücrelerin apikal sitoplazmasında lamellar cisimcikler olduğu düşünülen veziküler ovoid yapılar (H&E x 200).



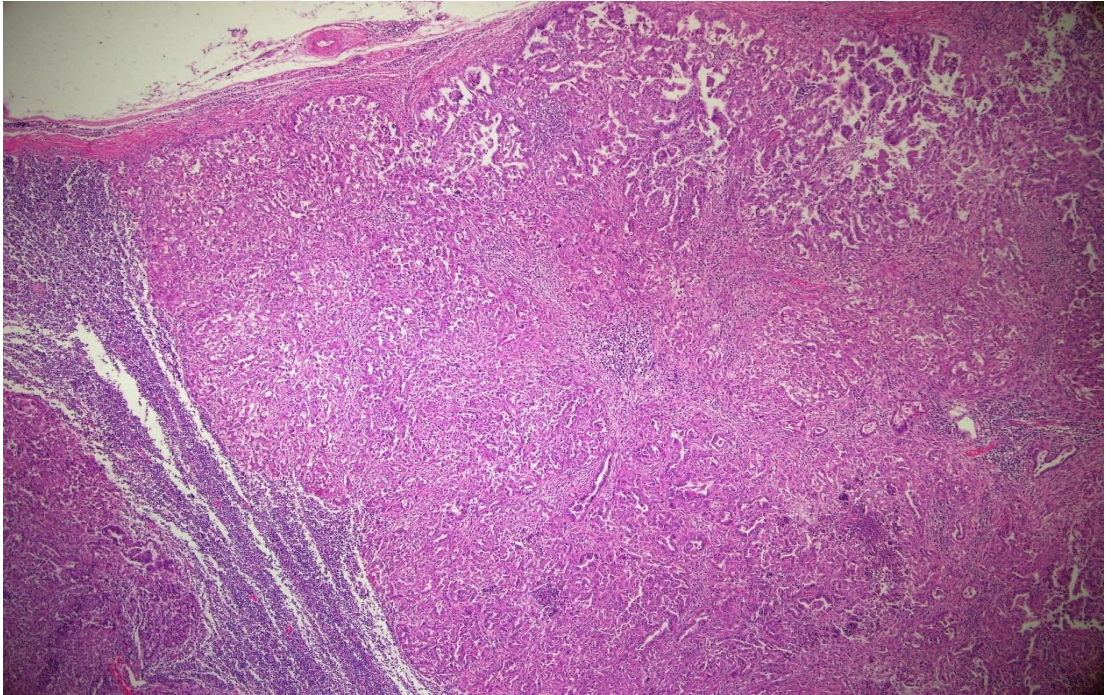
Resim 13: Pulmoner adenokarsinomlu akciğerde yaygın miksomatöz proliferasyon (H&E x 10).



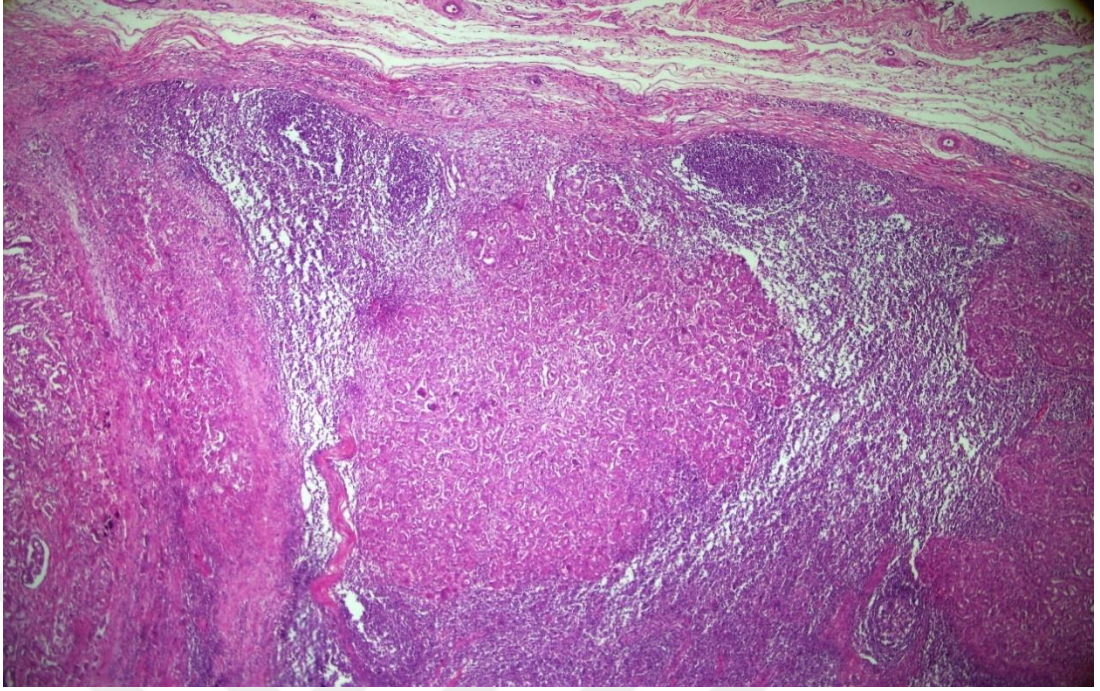
Resim 14: Akciğerde miksomatöz proliferasyon ile çevrili papiller tipte tümöral lezyonlar (H&E x 10).



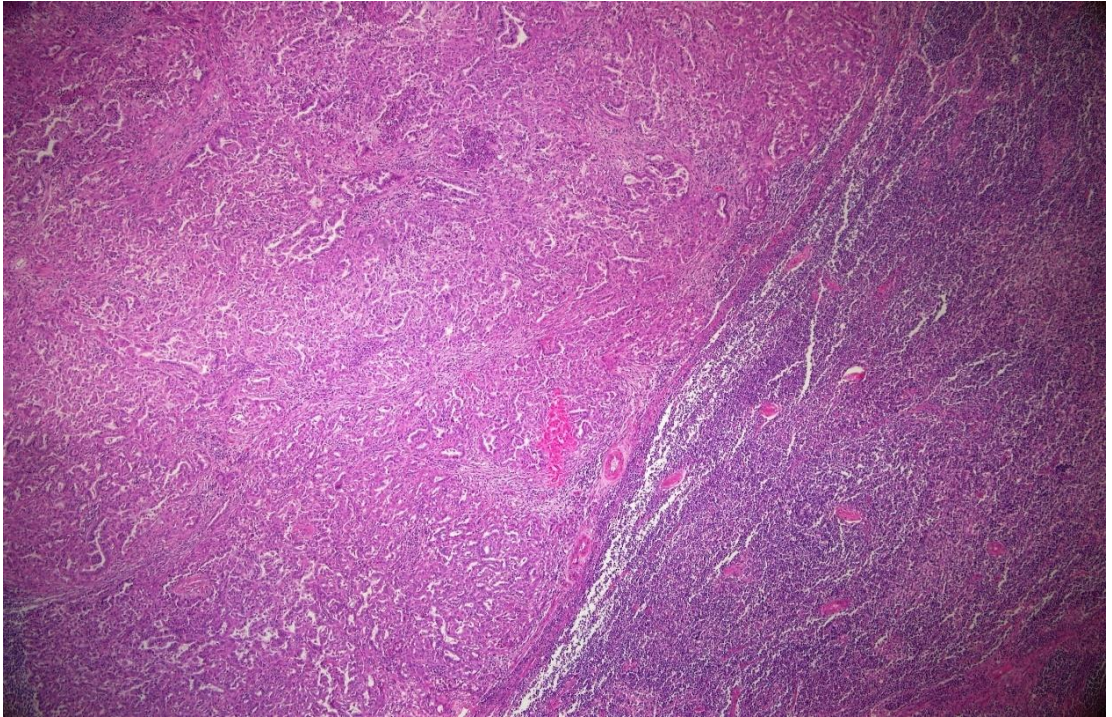
Resim 15: Akciğerde tümöral doku çevresinde yaygın lenfoid infiltrasyonlar (H&E x 4).



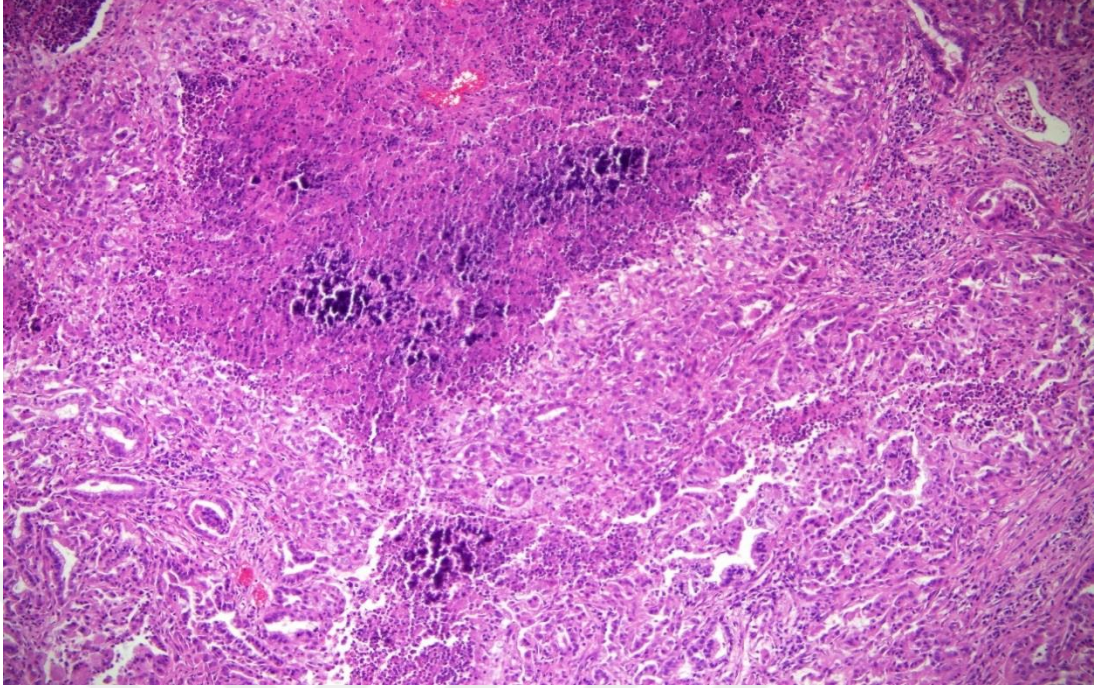
Resim 16: Lenf düğümünde subkapsüler bölgeden medullaya doğru yayılan tümöral nodül (H&E x 4).



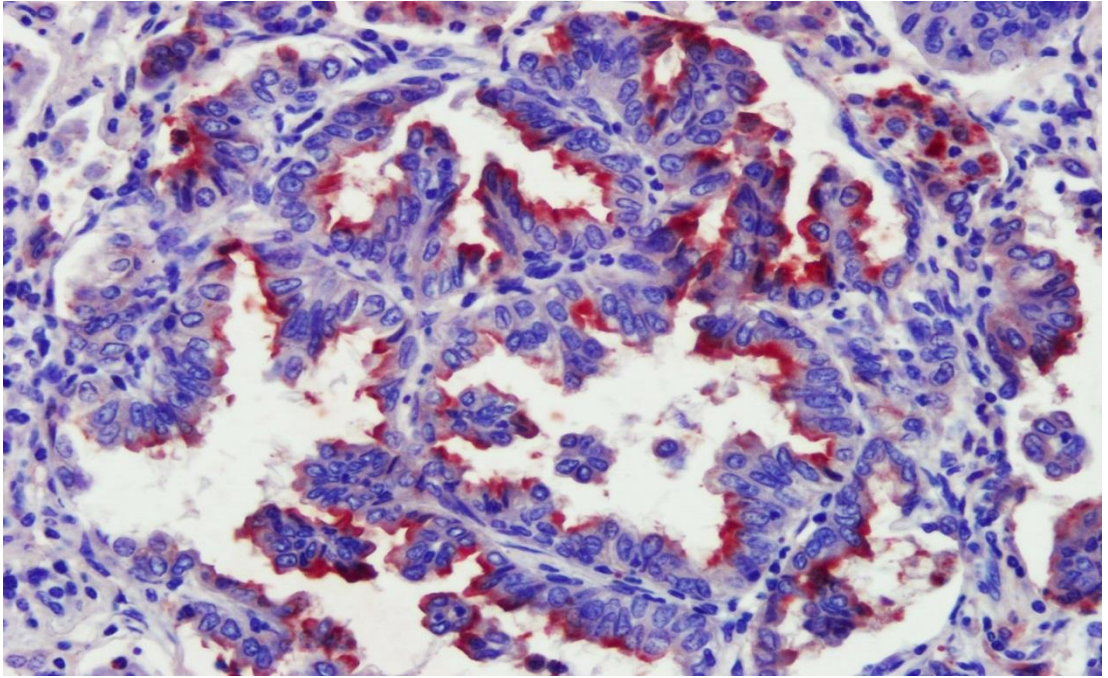
Resim 17: Mediastinal lenf düğümünde kortekste lokalize metastatik kitle (H&E x 4).



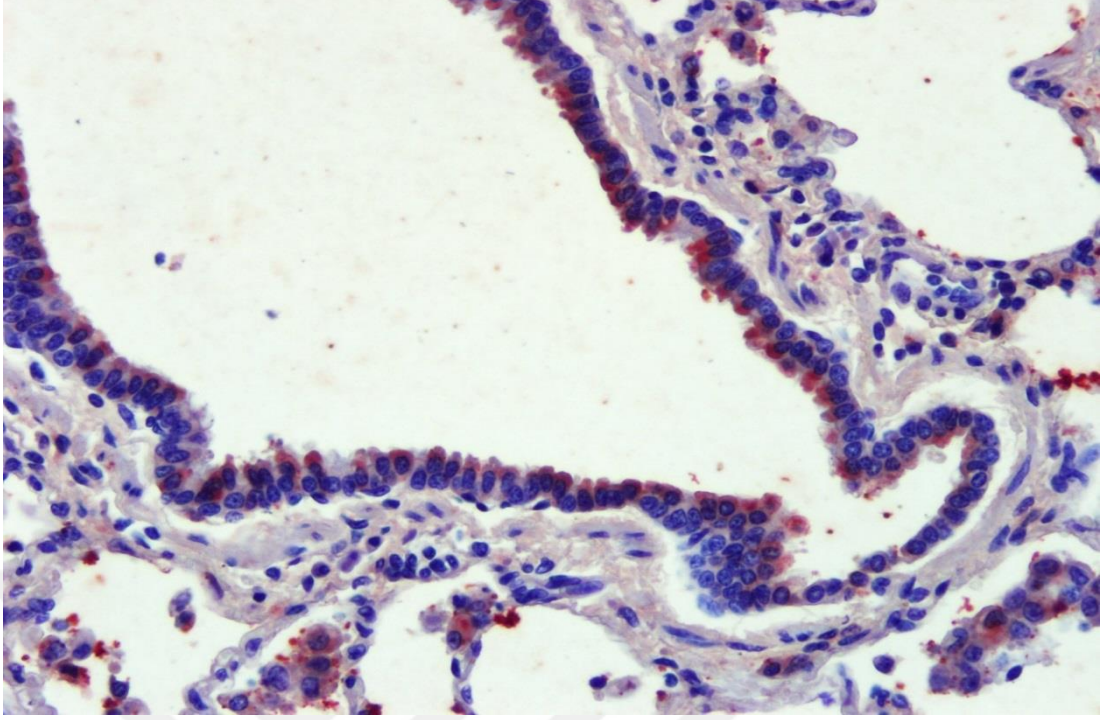
Resim 18: Mediastinal lenf düğümünde iri tümöral kitle ile lenfoid dokunun silinmesi (H&E x 4).



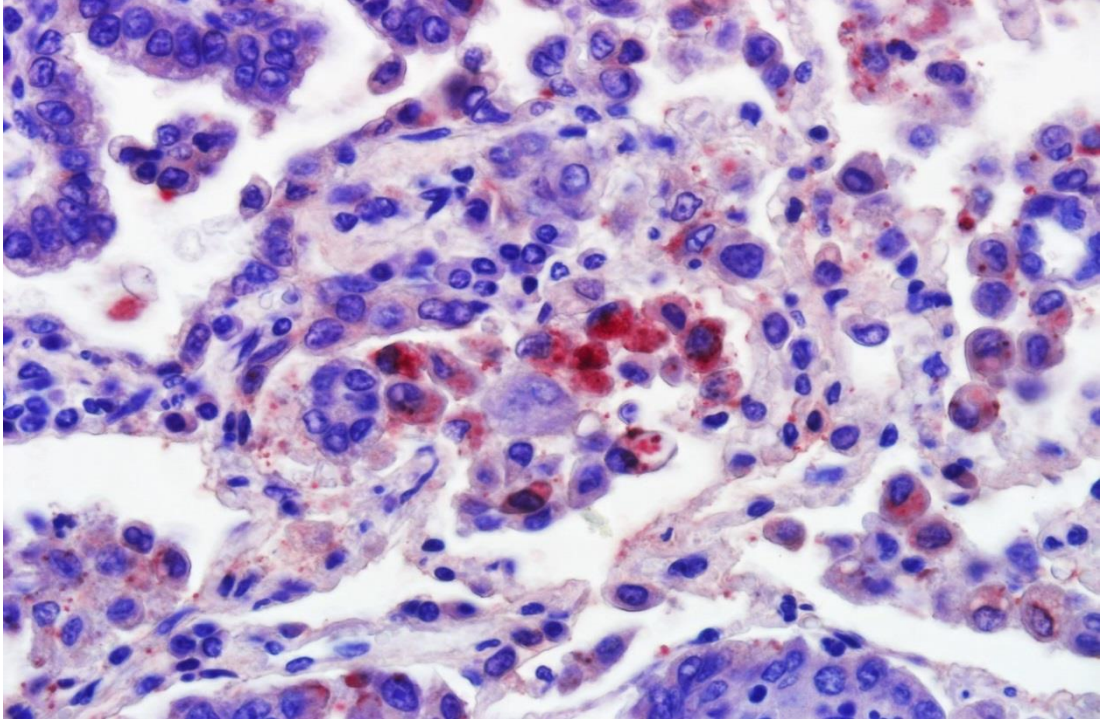
Resim 19: Mediastinal lenf düğümünde metastatik kitle merkezinde nekroz (H&E x 10).



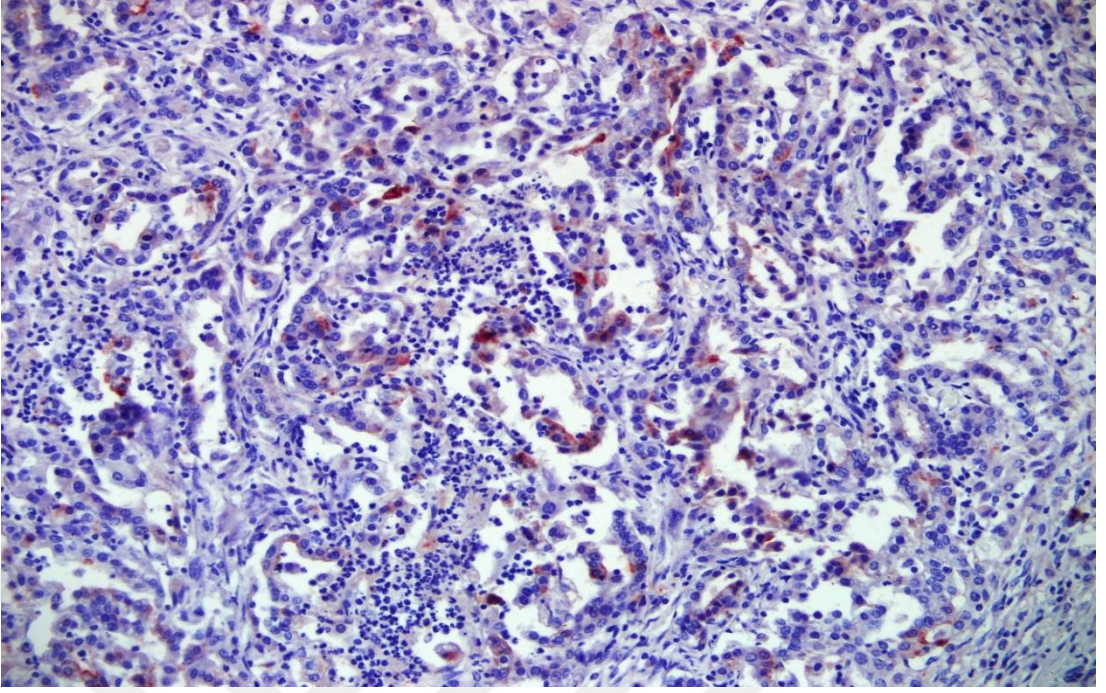
Resim 20: Atipik OPA'lı akciğerde papiller proliferasyon gösteren neoplastik hücrelerde SP-A sitoplazmik immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 20).



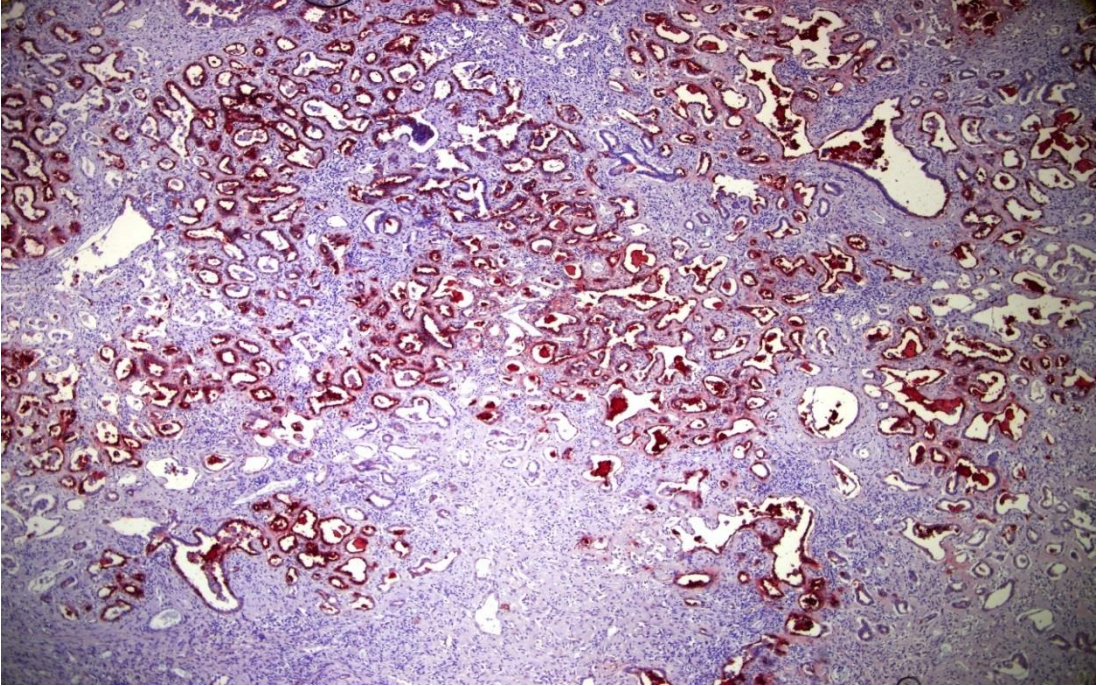
Resim 21: OPA'lı akciğerde terminal bronşiyolde silyumsuz Clara hücrelerinde sitoplazmik SP-A immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).



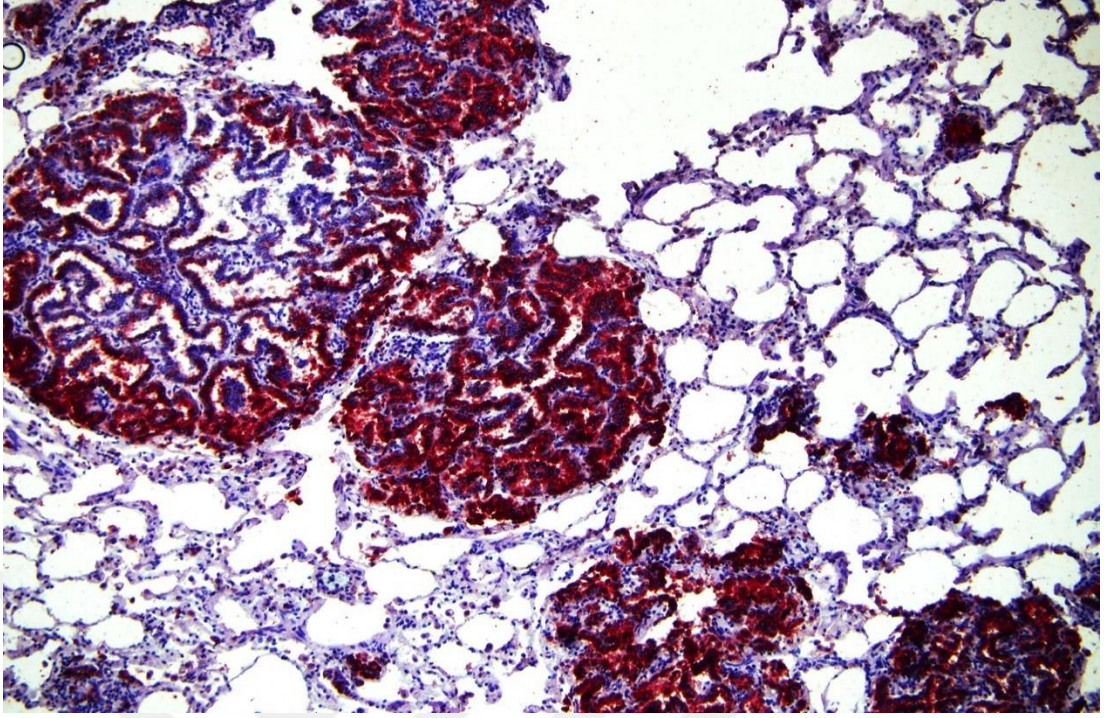
Resim 22: Tümör mikro çevresinde alveoler makrofajların sitoplazmasında SP-A immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 60).



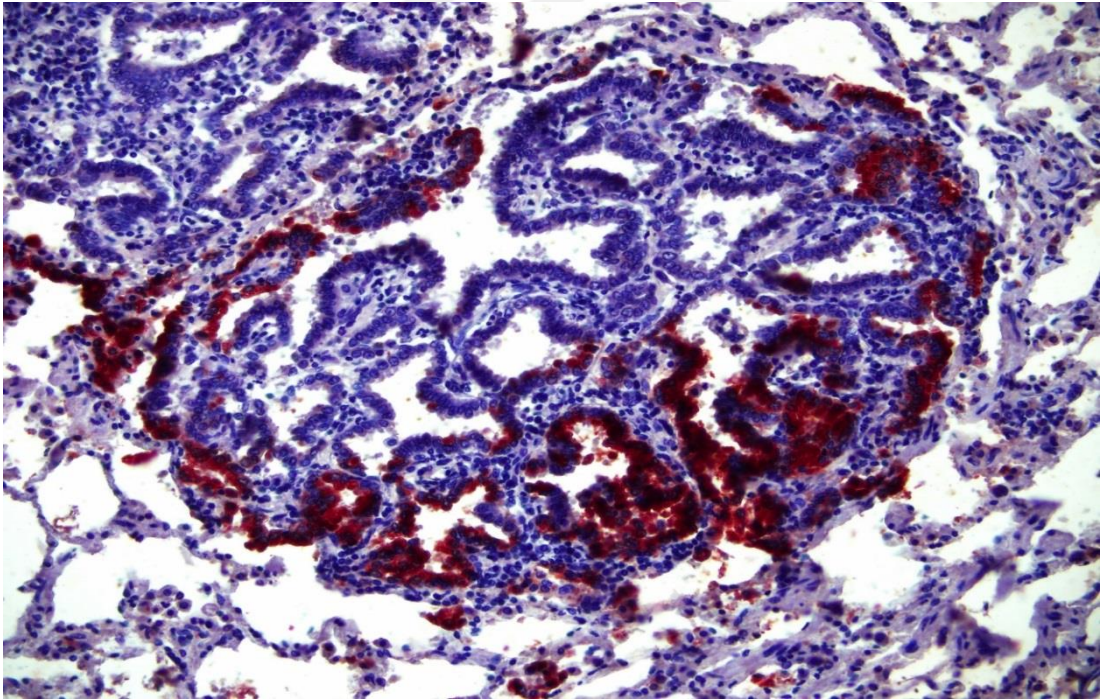
Resim 23: Metastazlı mediastinal lenf düğümünde tümöral nodülde neoplastik hücrelerin sitoplazmasında SP-A immün pozitif reaksiyon (ABC-Px 20).



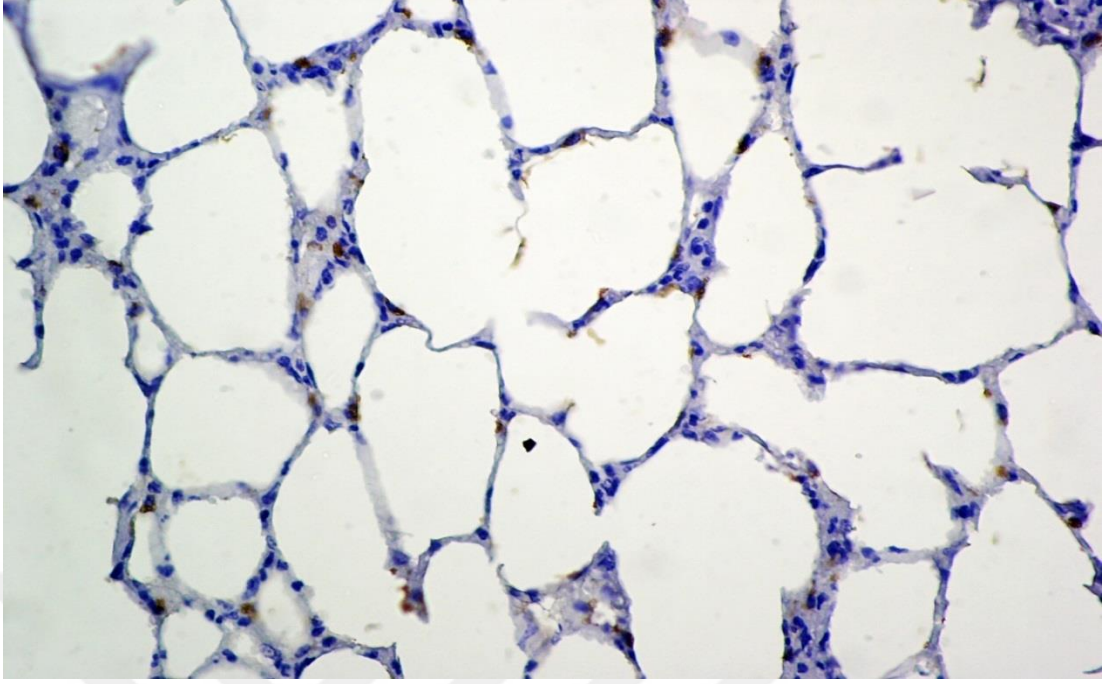
Resim 24: Klasik OPA'lı akciğerde tüm parankime yayılmış neoplastik proliferasyonlarda şiddetli SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 4).



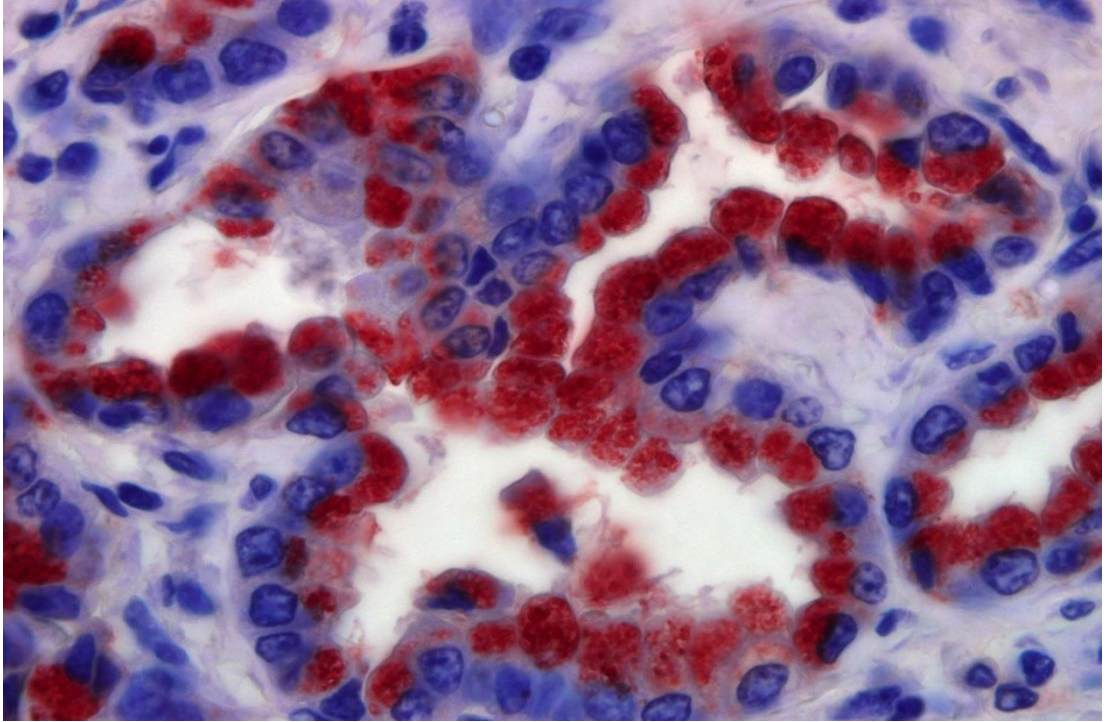
Resim 25: Akciğerde atipik OPA'da proliferen tümör hücrelerinde SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 10).



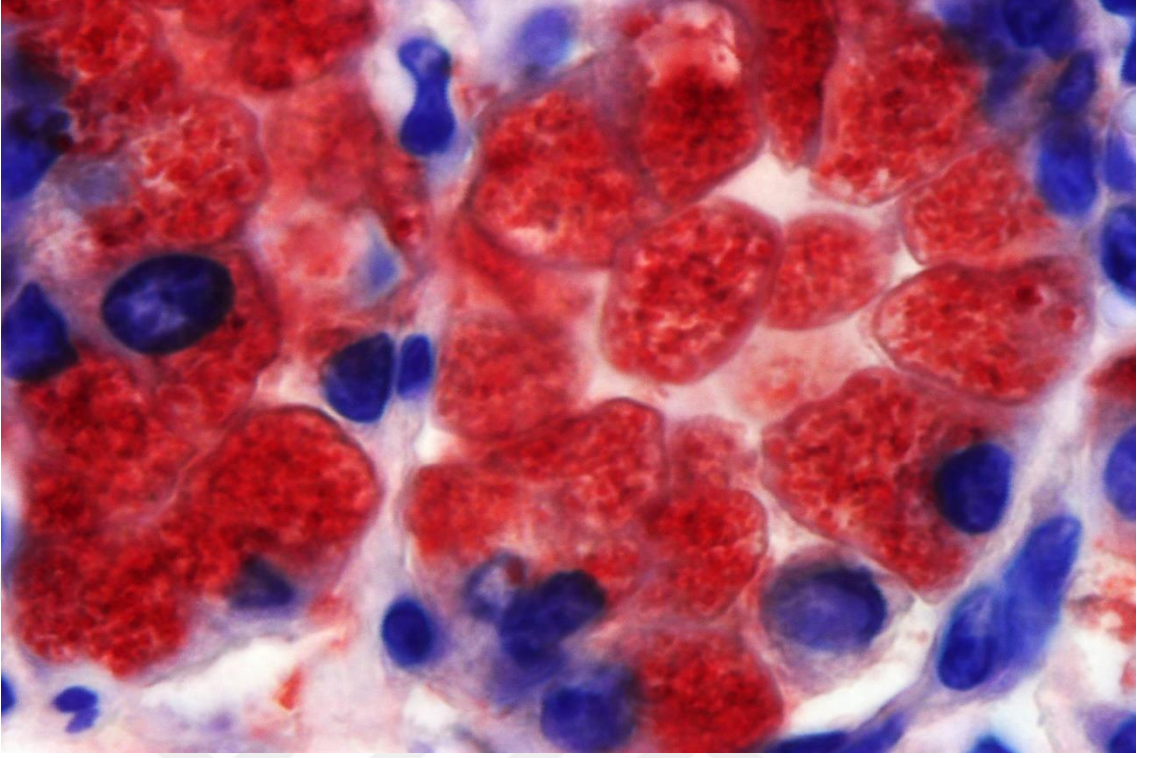
Resim 26: Atipik OPA'da nodülde özellikle periferik neoplastik hücrelerde SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 20).



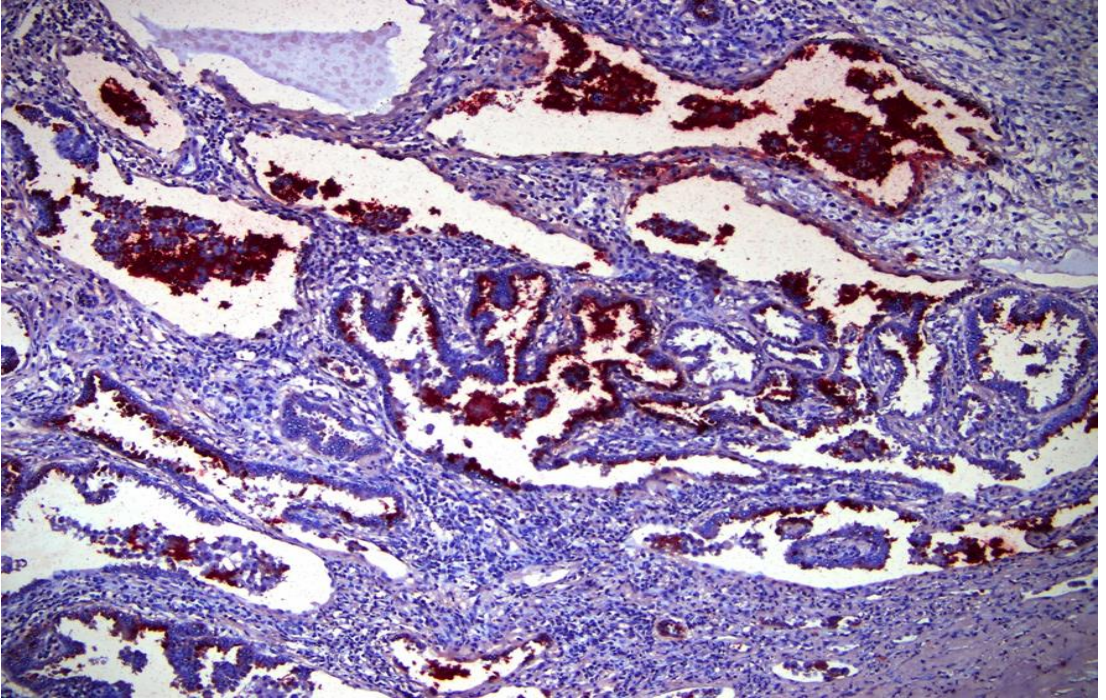
Resim 27: Kontrol akciğerde alveoller çevresinde az sayıda normal tip II hücrelerde SP-B sitoplazmik pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).



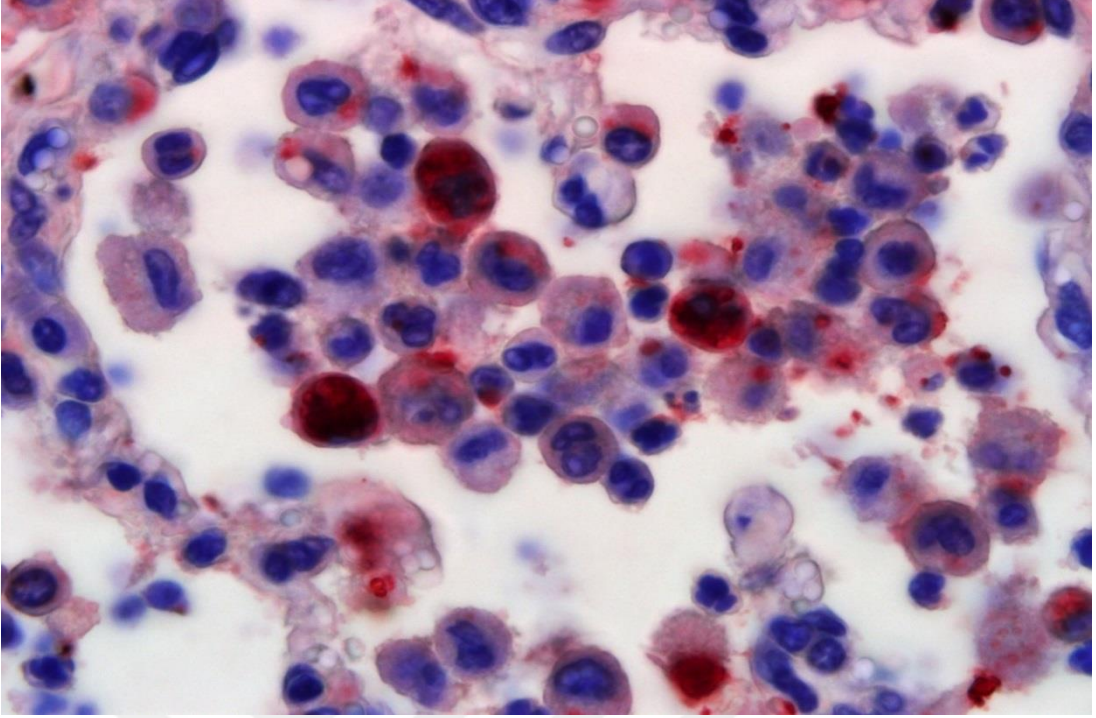
Resim 28: Akciğerde tümör hücrelerinin apikal sitoplazmasında kaba granüler SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 100).



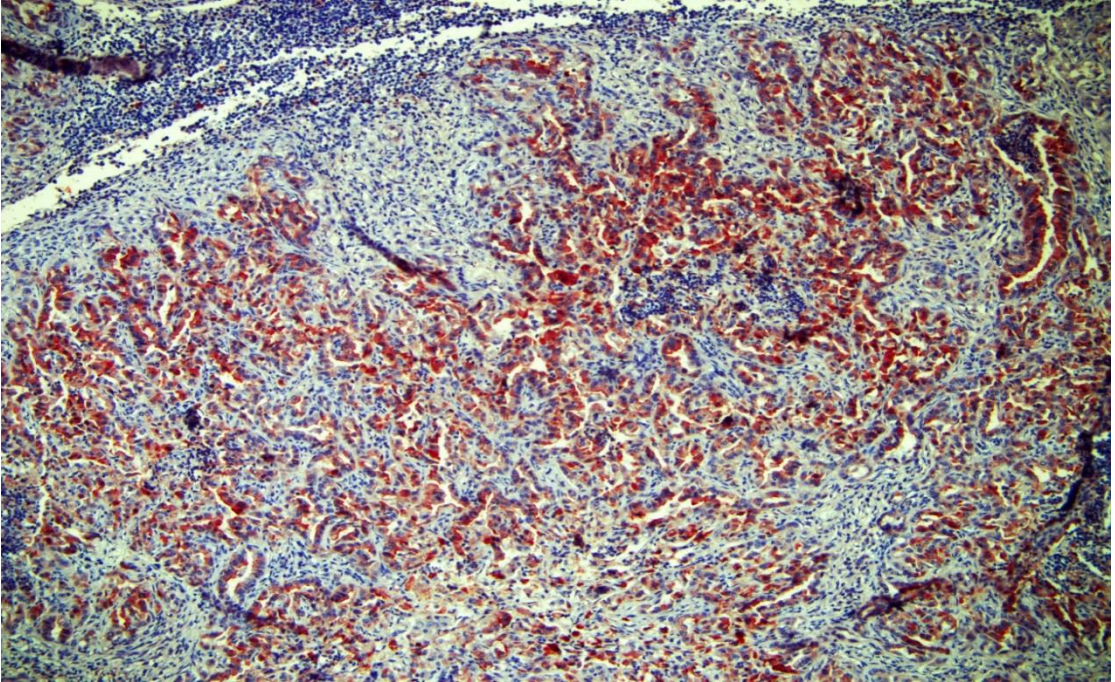
Resim 29: Akciğerde tümöral hücrelerde lamellar cisimcikler olduğu kabul edilen yapılarda SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 200).



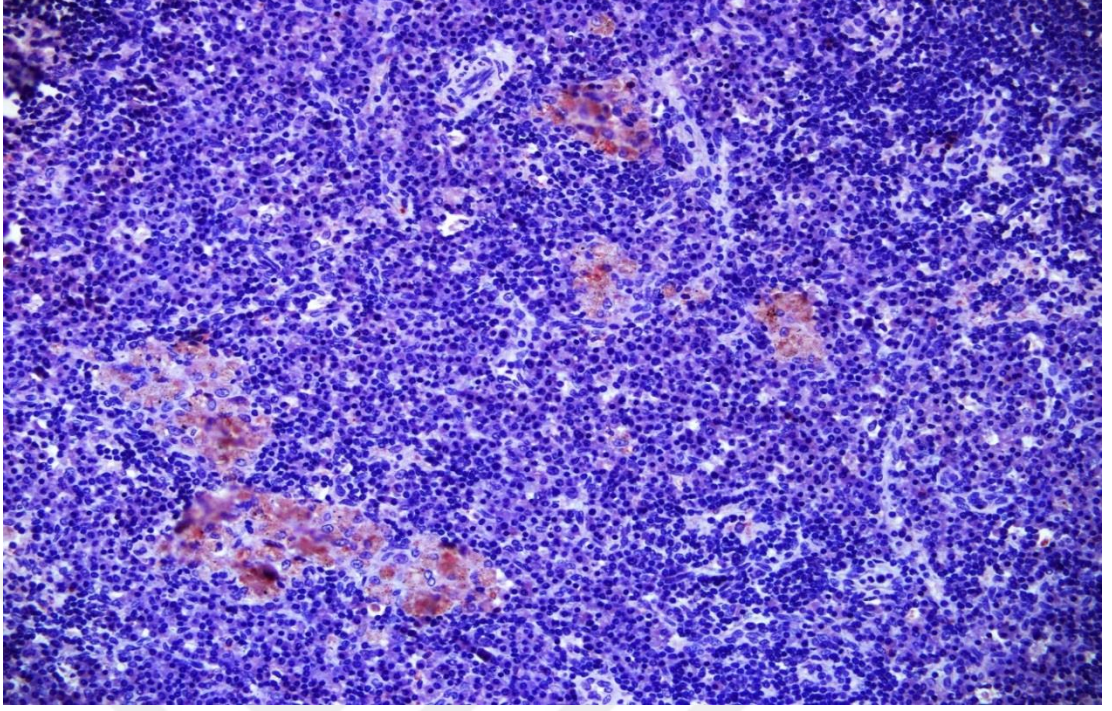
Resim 30: Klasik OPA'lı akciğerde bağ doku ile sınırlı tümöral alanda papiller proliferasyonlarda şiddetli sitoplazmik SP-B pozitif reaksiyon (ABC-P x 10).



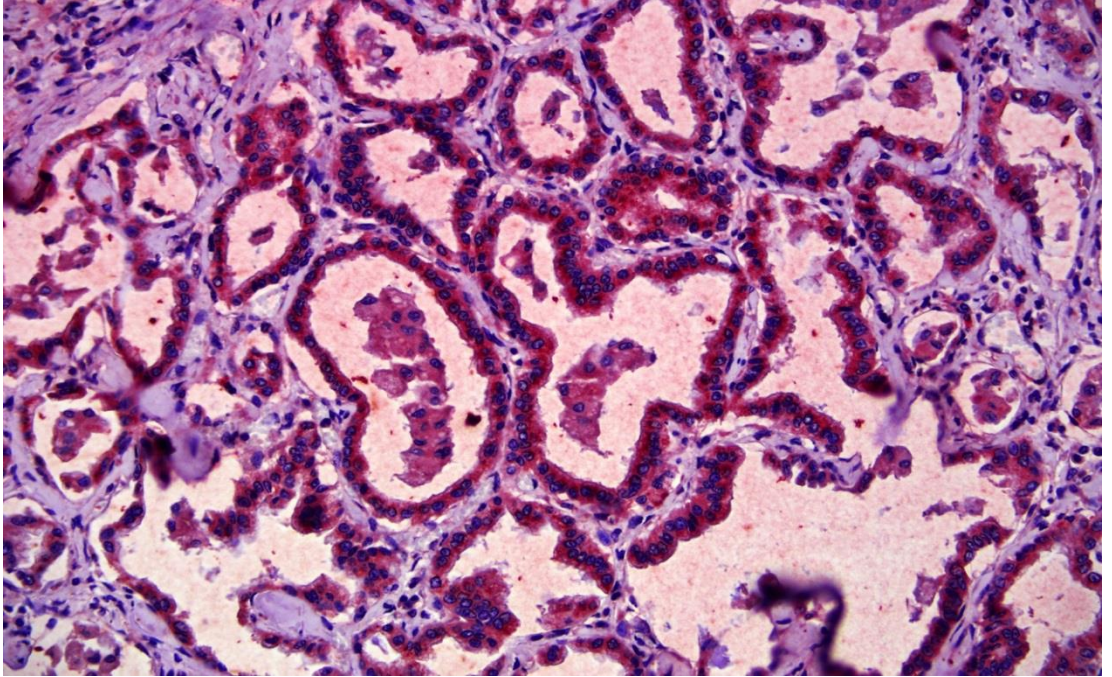
Resim 31: Alveoler makrofajların sitoplazmasında SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 100).



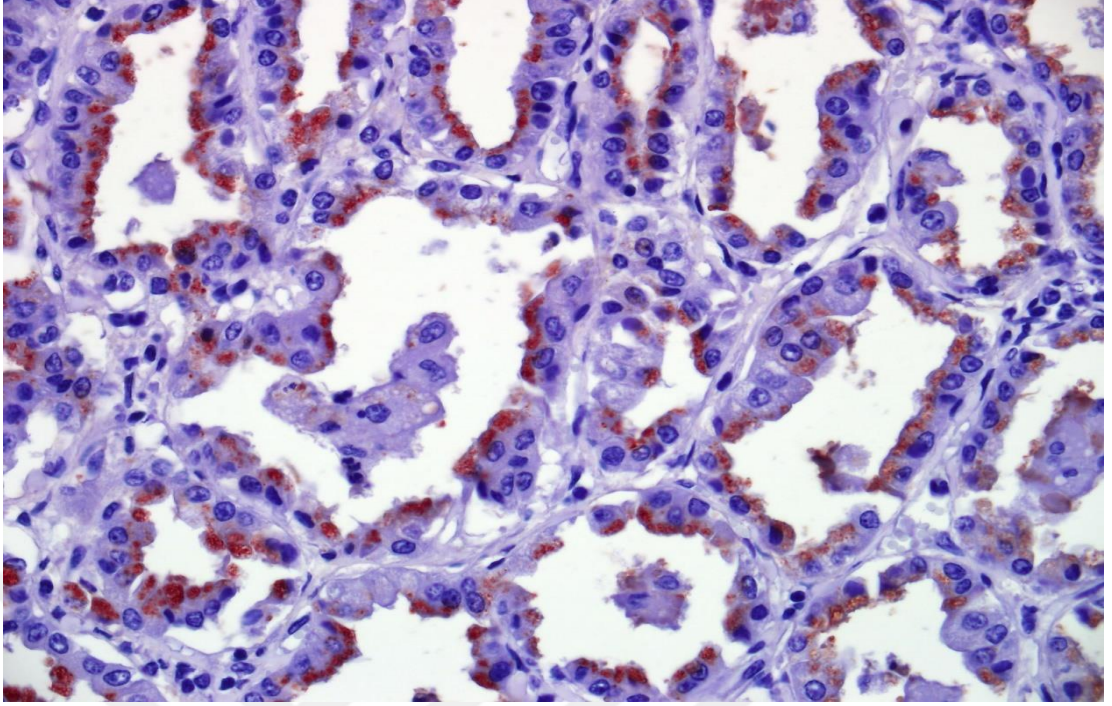
Resim 32: Mediastinal lenf düğümünde tümör metastazında yaygın sitoplazmik immün pozitif SP-B reaksiyon (ABC-P x 10).



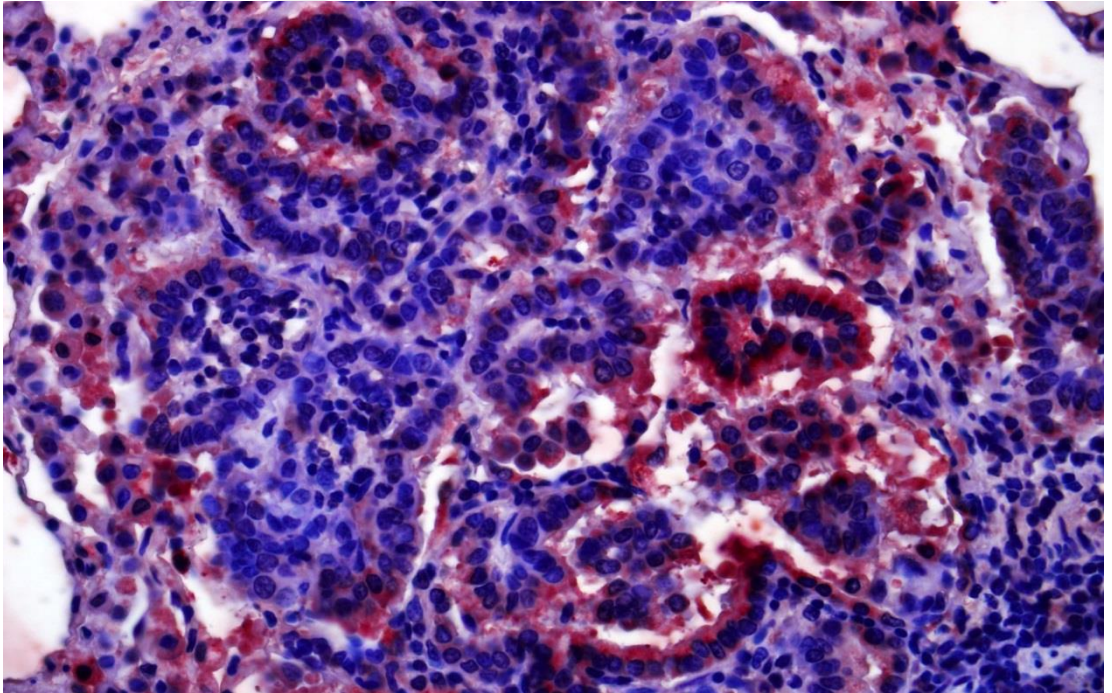
Resim 33: Mediastinal lenf düğümünde kortikal folliküllerde az sayıda tümör hücresinde SP-B immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).



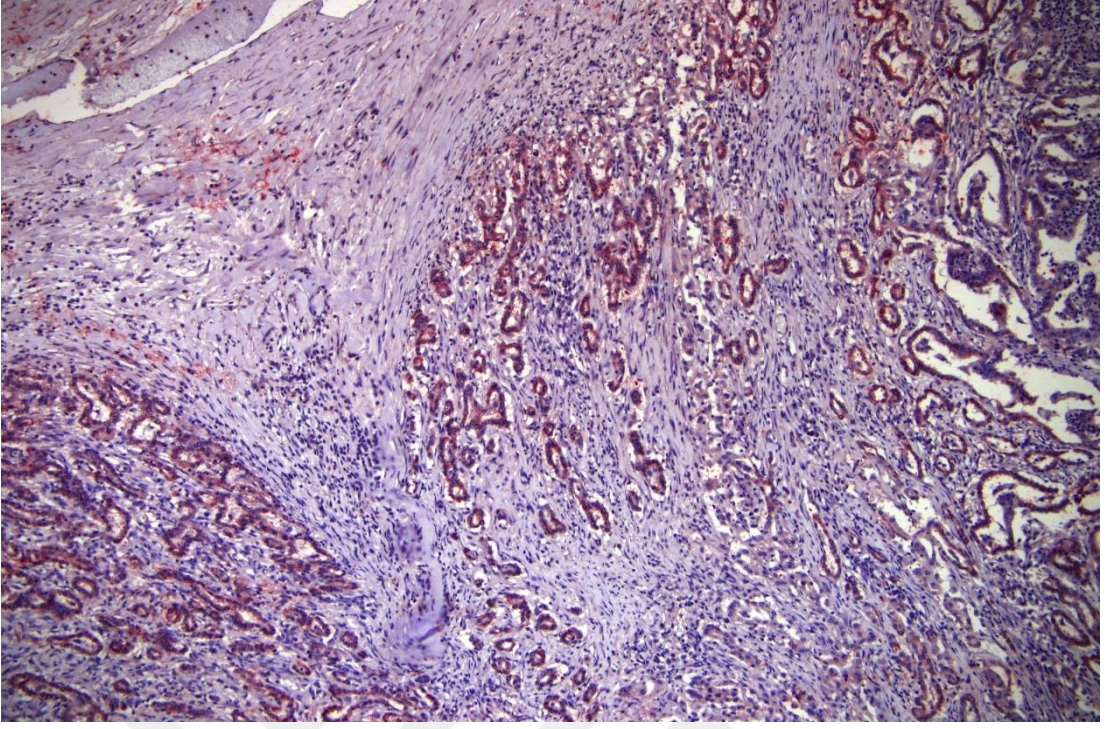
Resim 34: Klasik OPA'da asiner tipte proliferen tümör hücrelerinin sitoplazmasında ProSP-C immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 20)



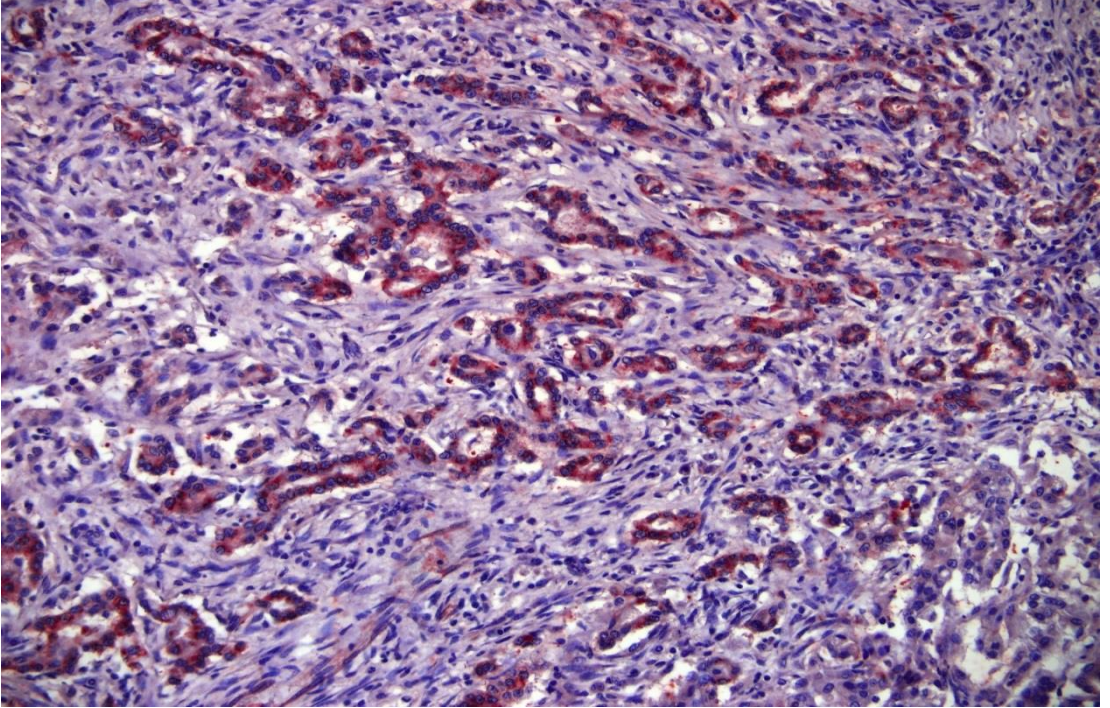
Resim 35: Klasik koyun pulmoner adenokarsinomunda tümör hücrelerinin apikal sitoplazmasında ProSP-C immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).



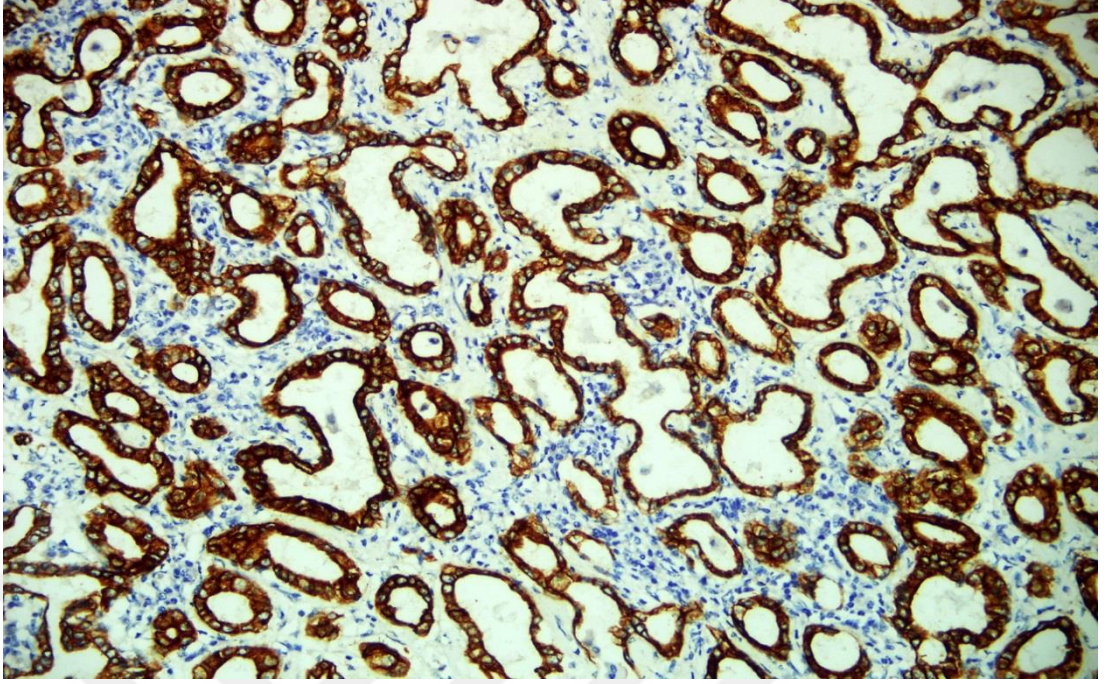
Resim 36: Atipik OPA nodülünde özellikle periferel tümör hücre sitoplazmalarında baskın ProSP-C immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).



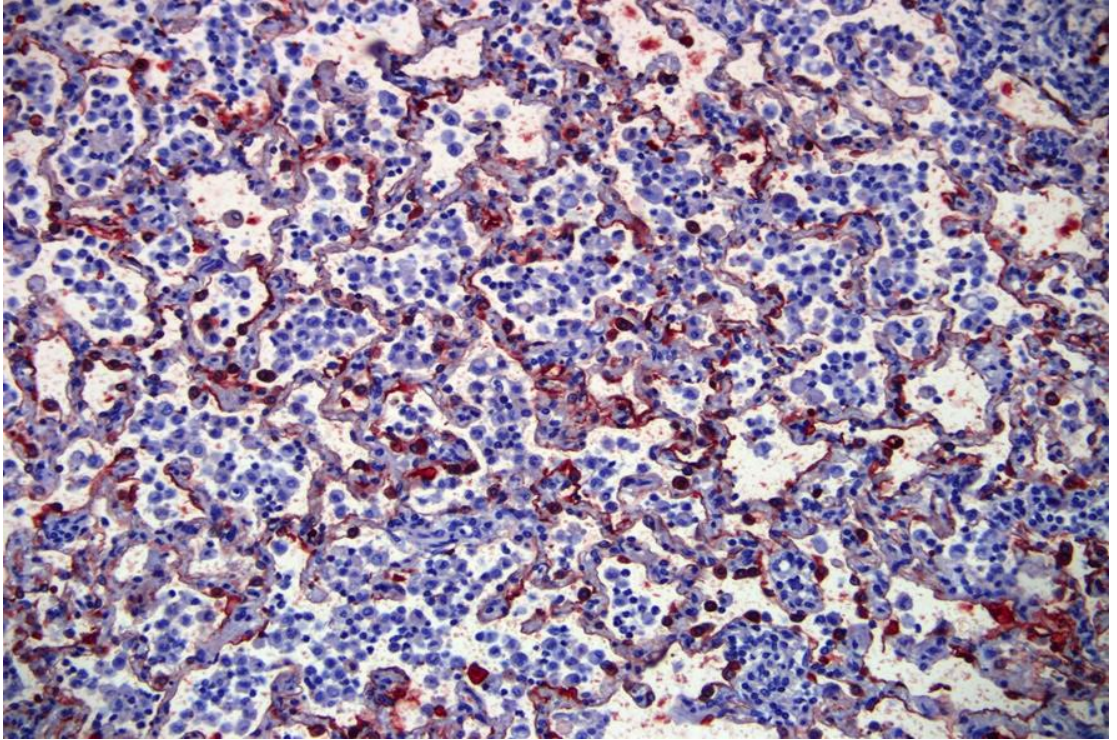
Resim 37: Mediastinal lenf düğümünde metastatik tümöral proliferasyonlarda sitoplazmik ProSP-C immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 10).



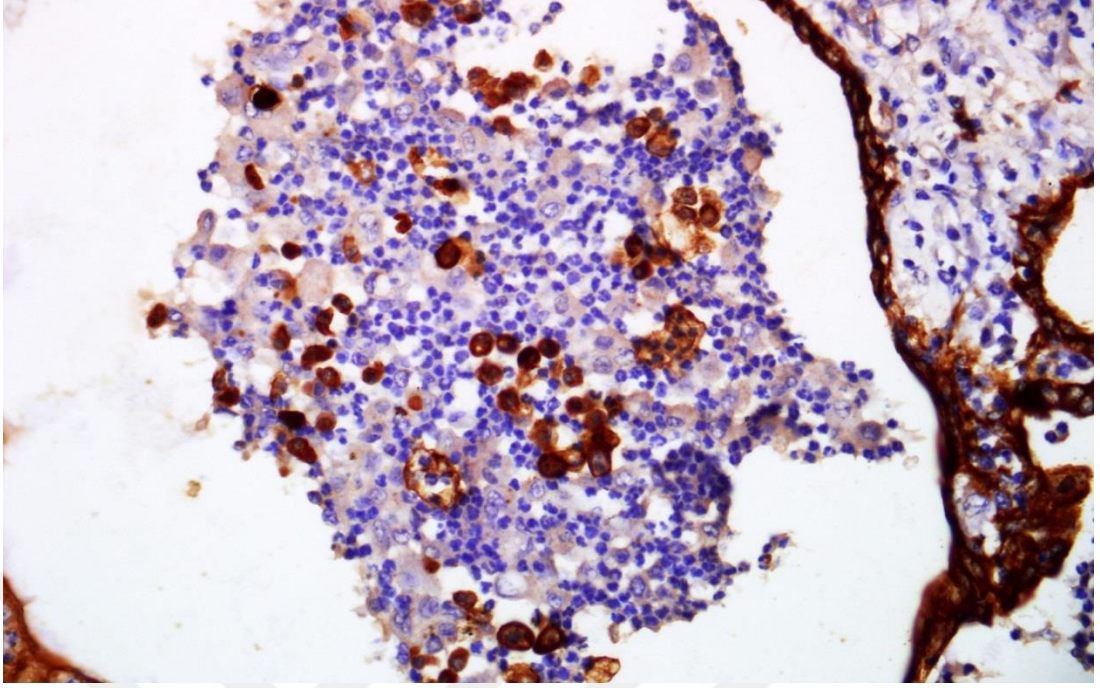
Resim 38: Metastazlı lenf düğümünde geniş stromaya sahip tümör nodülünde neoplastik hücrelerde sitoplazmik ProSP-C immün pozitif reaksiyon (ABC-P x20).



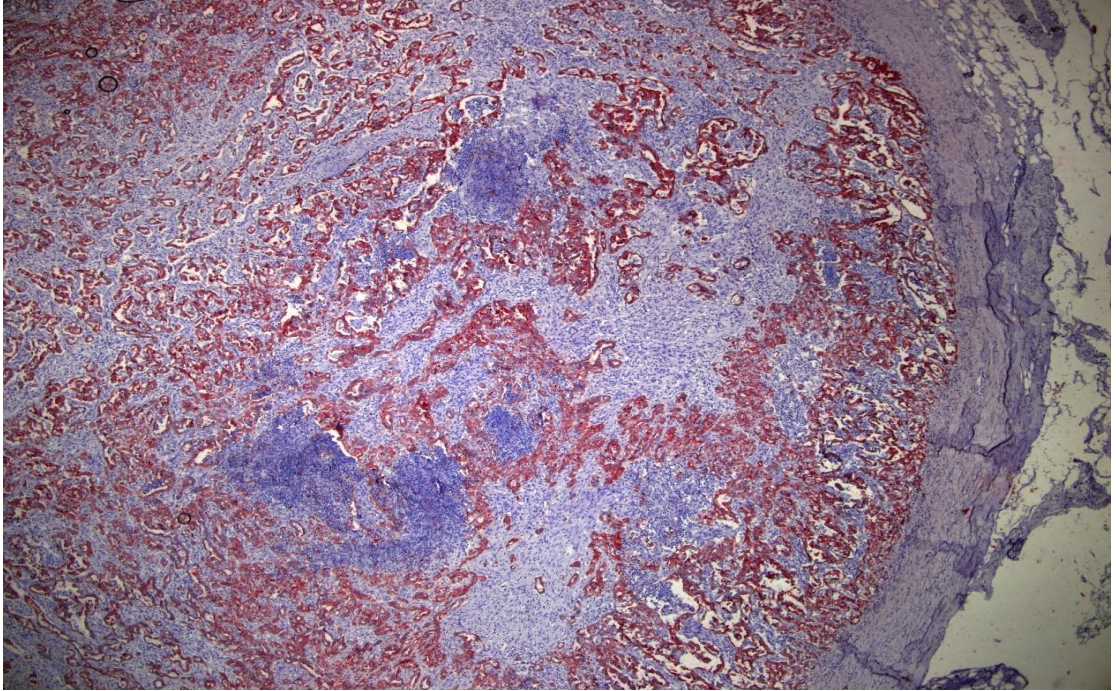
Resim 39: Klasik OPA'lı akciğerde asiner tipte prolifer neoplastik hücrelerin sitoplazmalarında şiddetli MCK immün pozitif reaksiyon (ABC-P x20).



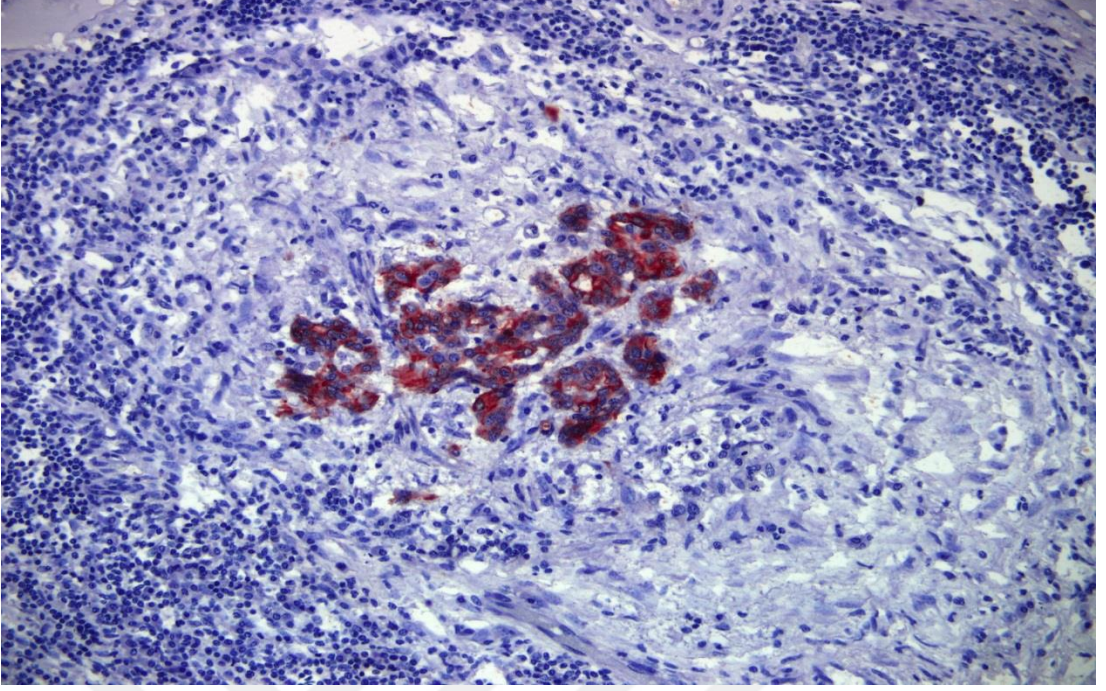
Resim 40: Tip I ve tip II akciğer epitel hücrelerinde sitoplazmik MCK immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 20).



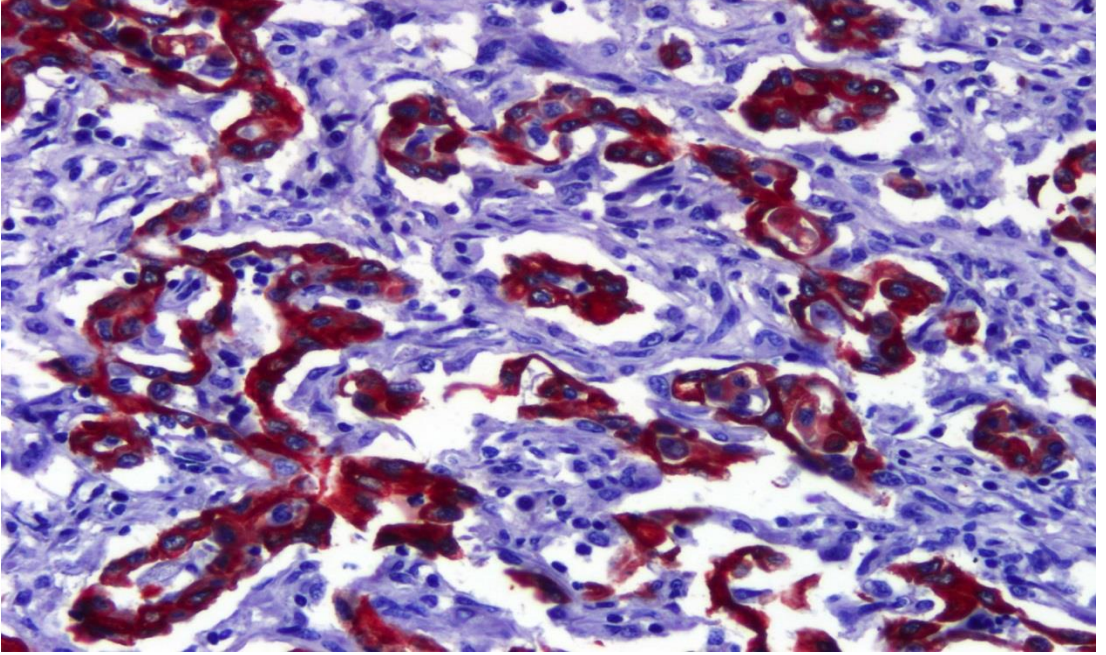
Resim 41: Bronşiyal mukoza epiteli ile birlikte, lümende alveoler makrofajlar arasında dökülmüş epitel hücrelerinde MCK immün pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).



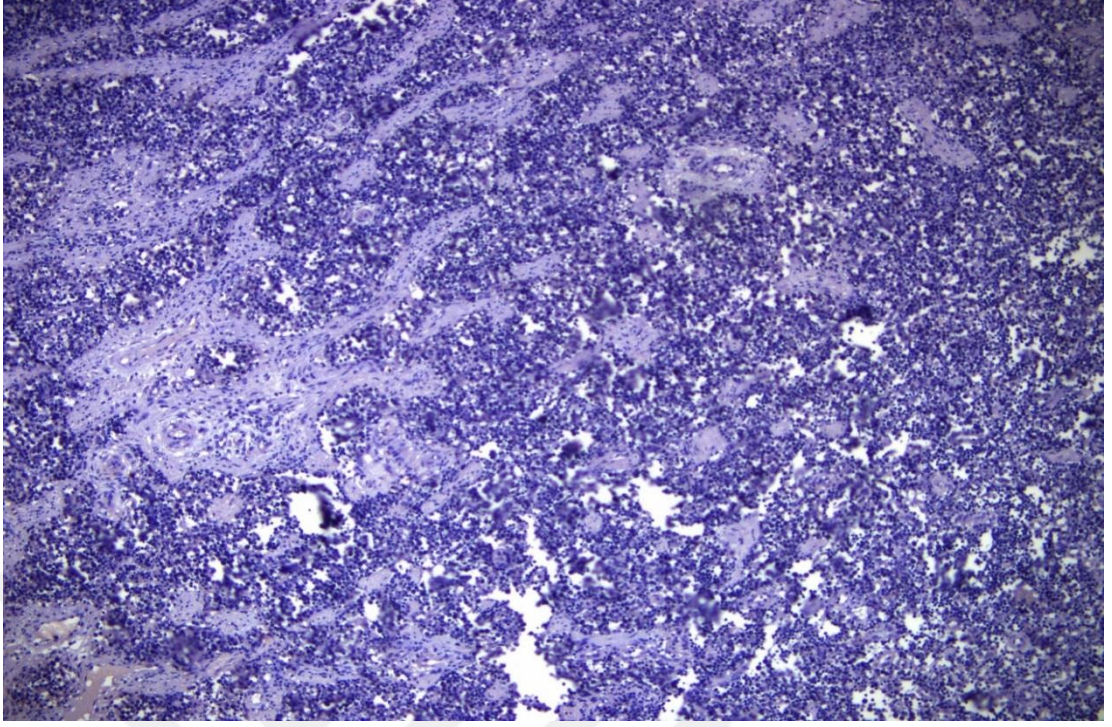
Resim 42: Metastazlı lenf düğümünde tüm neoplastik hücrelerin sitoplazmalarında şiddetli MCK reaksiyonu (ABC-P x 4).



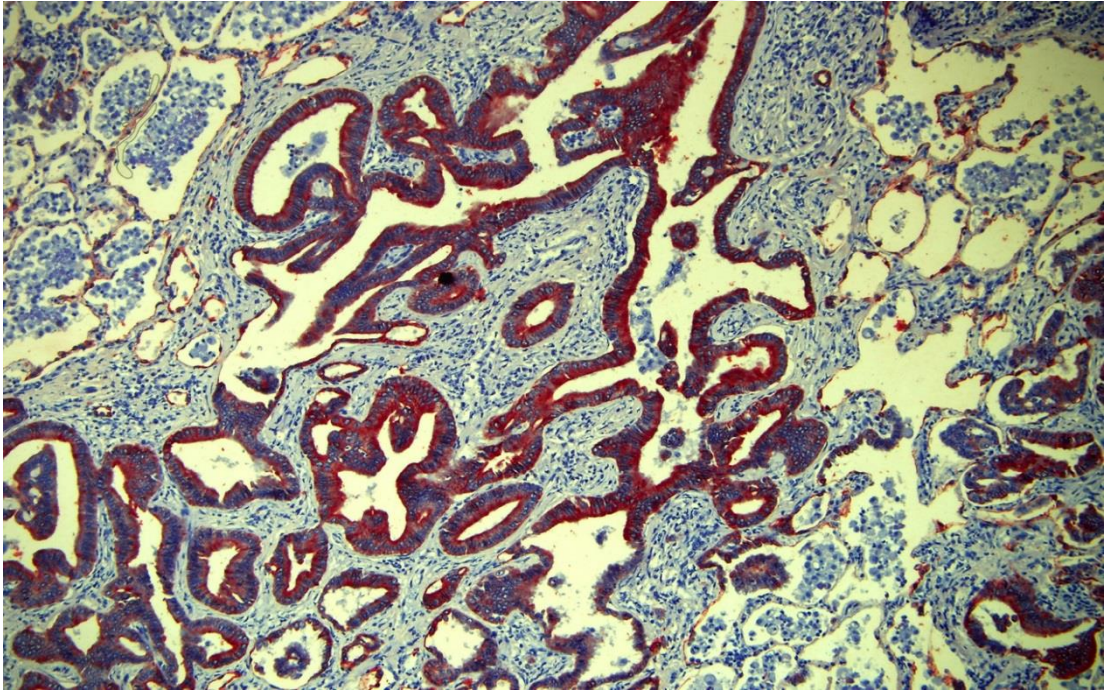
Resim 43: Lenf düğümünde kortikal bölgede az sayıdaki metastatik tümör hücrelerinde şiddetli MCK reaksiyonu (ABC-P x 20).



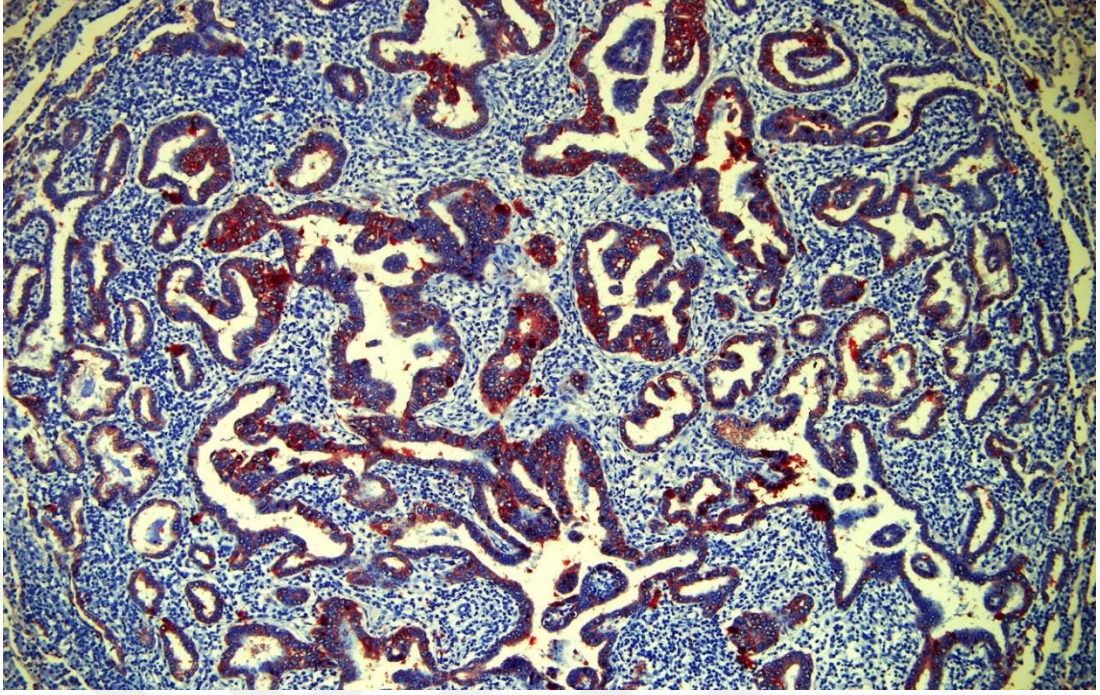
Resim 44: Lenf düğümünde bağ doku proliferasyonları arasındaki soliter tümör hücre sitoplazmalarında MCK reaksiyonu (ABC-P x 40).



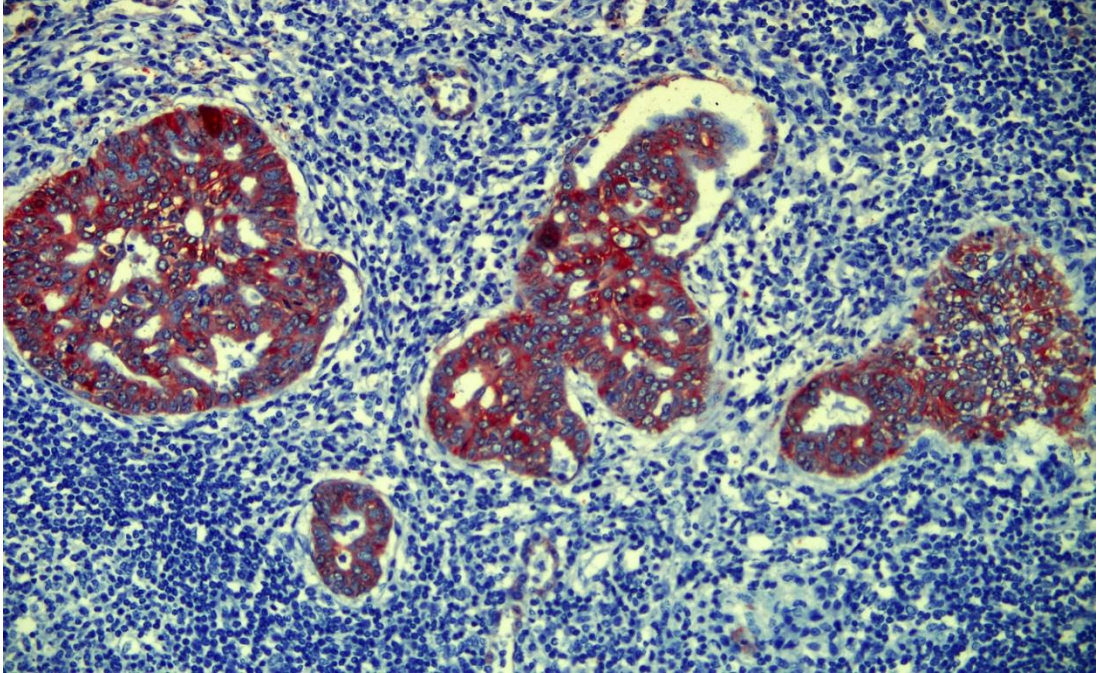
Resim 45: Tümör hücre proliferasyonu olmayan kontrol lenf düğümünde negatif MCK reaksiyonu (ABC-P x 10).



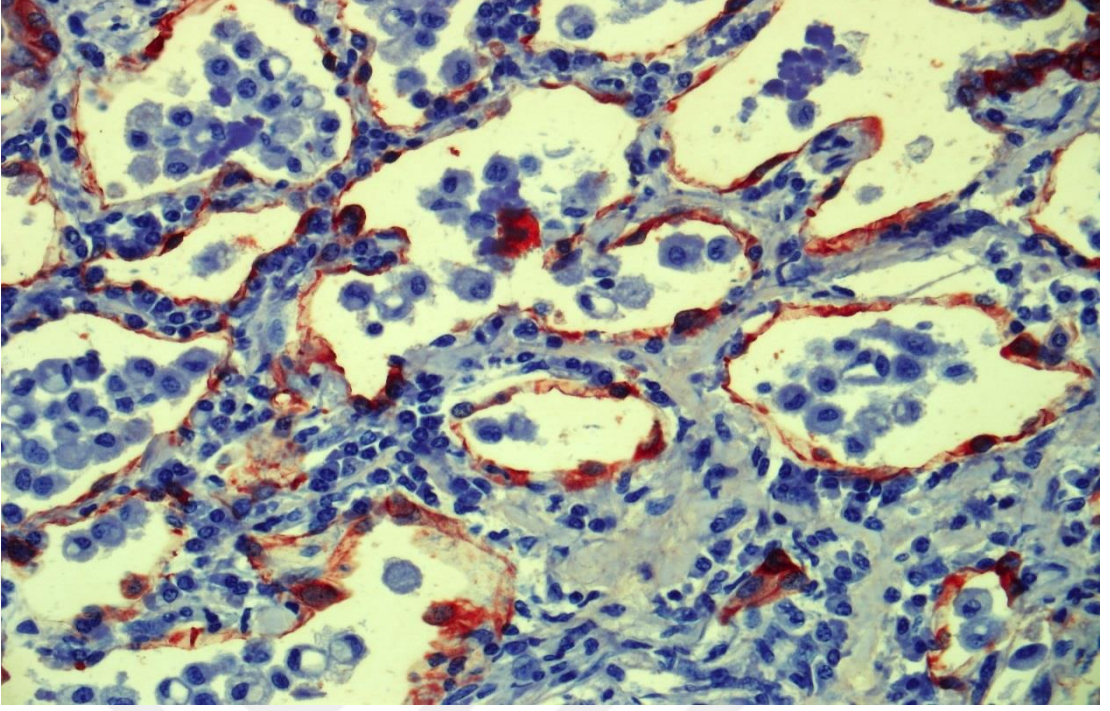
Resim 46: Klasik OPA'da asiner tipte proliferatif kübik tümör hücrelerinde sitoplazmik PCK-26 pozitif reaksiyon (ABC-P x10).



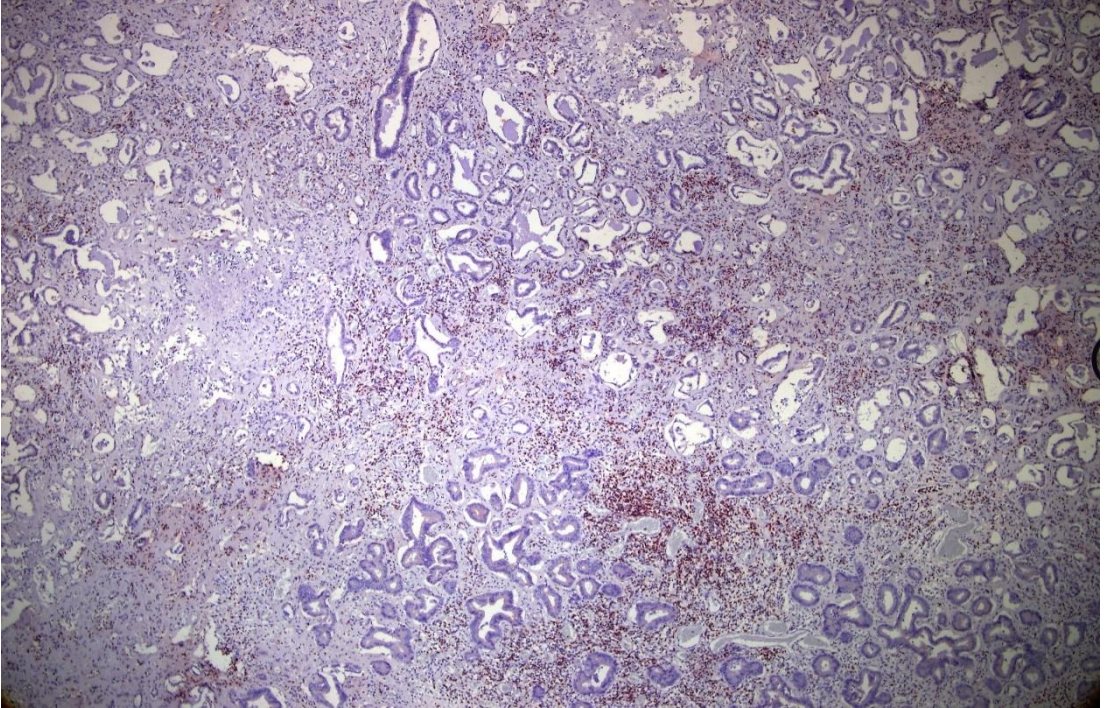
Resim 47: Atipik OPA nodülünde stromal doku ve yangısal infiltrasyon ile çevrili neoplastik hücrelerin sitoplazmasında PCK-26 reaksiyonu (ABC-P x 10).



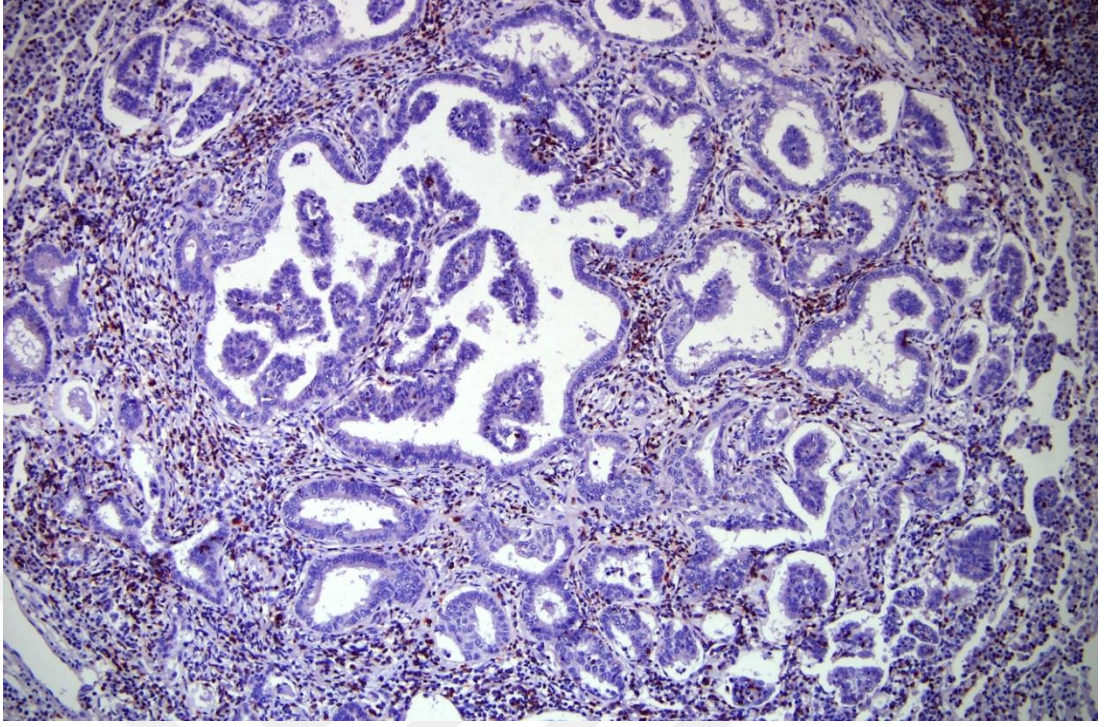
Resim 48: Akciğerde yoğun lenfoid infiltrasyonlar arasında bulunan neoplastik proliferasyonlarda PCK-26 sitoplazmik pozitif reaksiyon (ABC-P x 20).



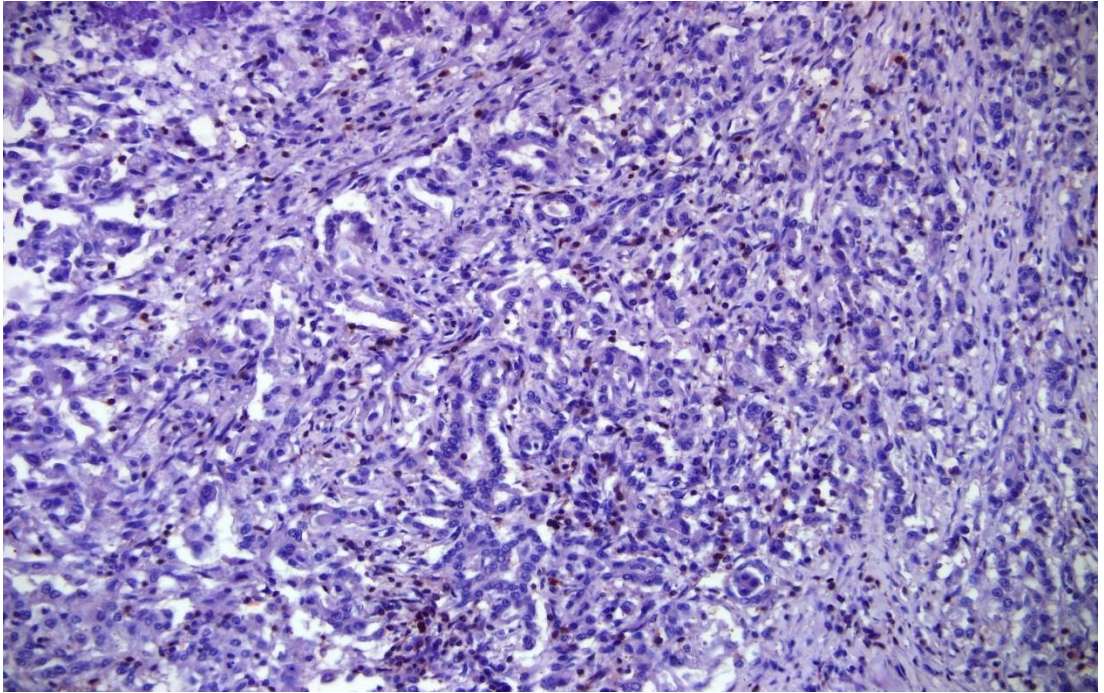
Resim 49: Atipik OPA'da non-neoplastik alanda tip I ve II pnömositlerin sitoplazmasında PCK-26 pozitif reaksiyon (ABC-P x 40).



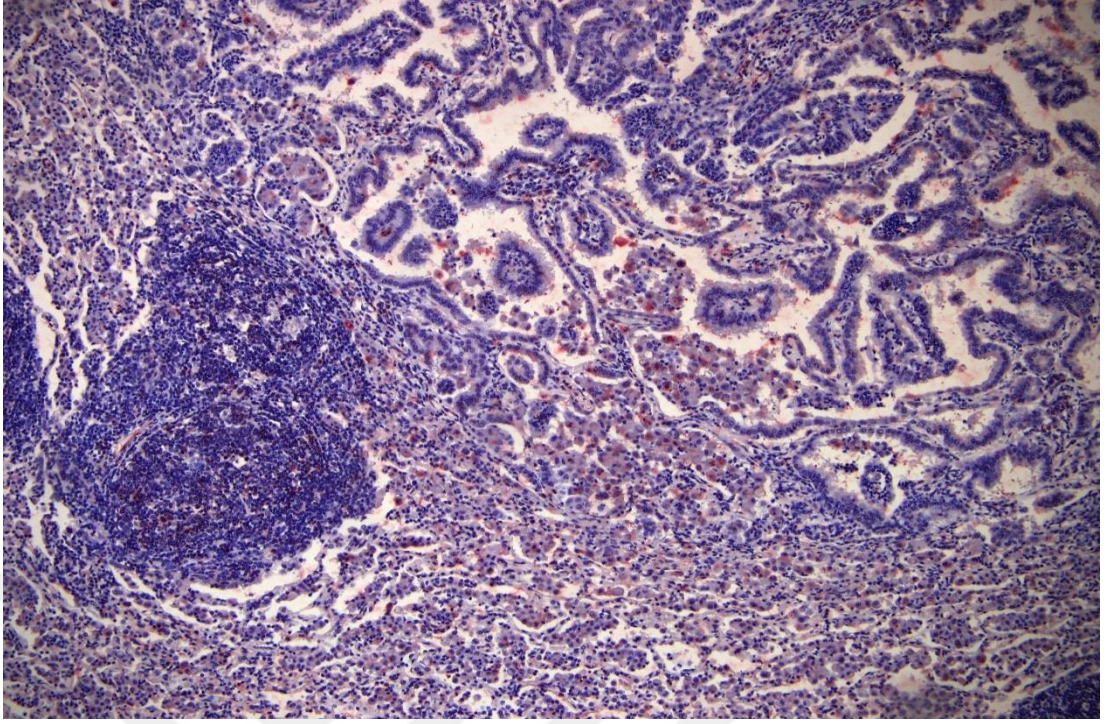
Resim 50: Klasik OPA'da tümöral stroma ve peritümöral alanda CD3⁺ T lenfosit infiltrasyonu (ABC-P x 4).



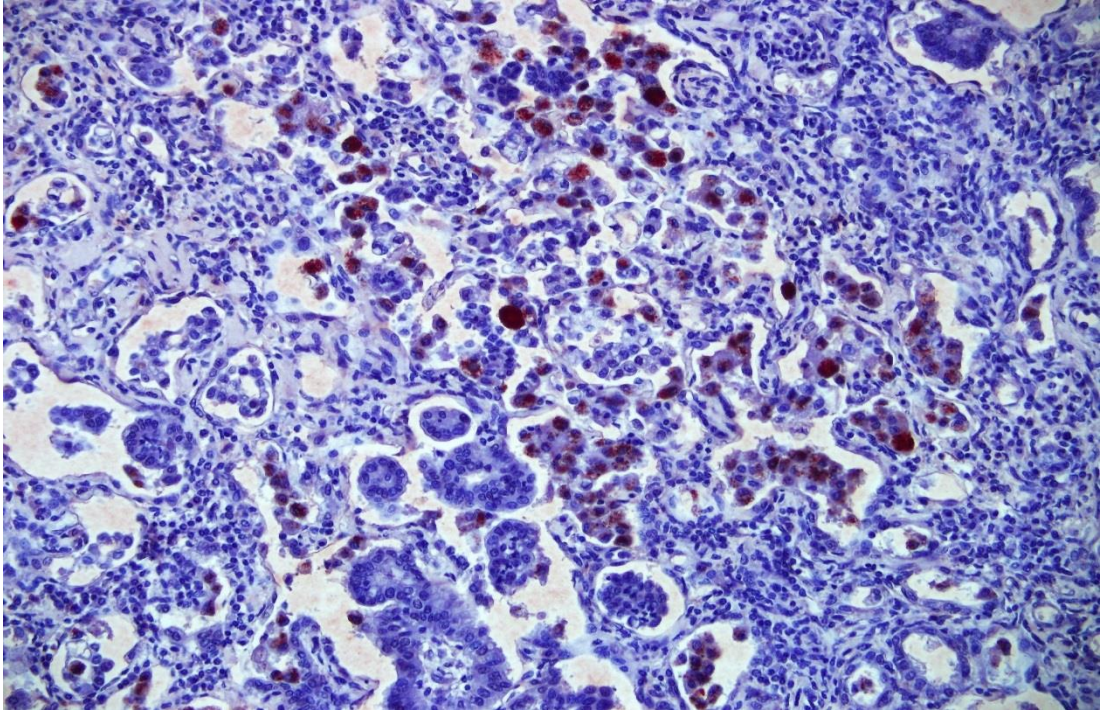
Resim 51: Bronşiyal lümende papiller tümör proliferasyonunda stromal CD3⁺ T hücre infiltrasyonu (ABC-P x 20).



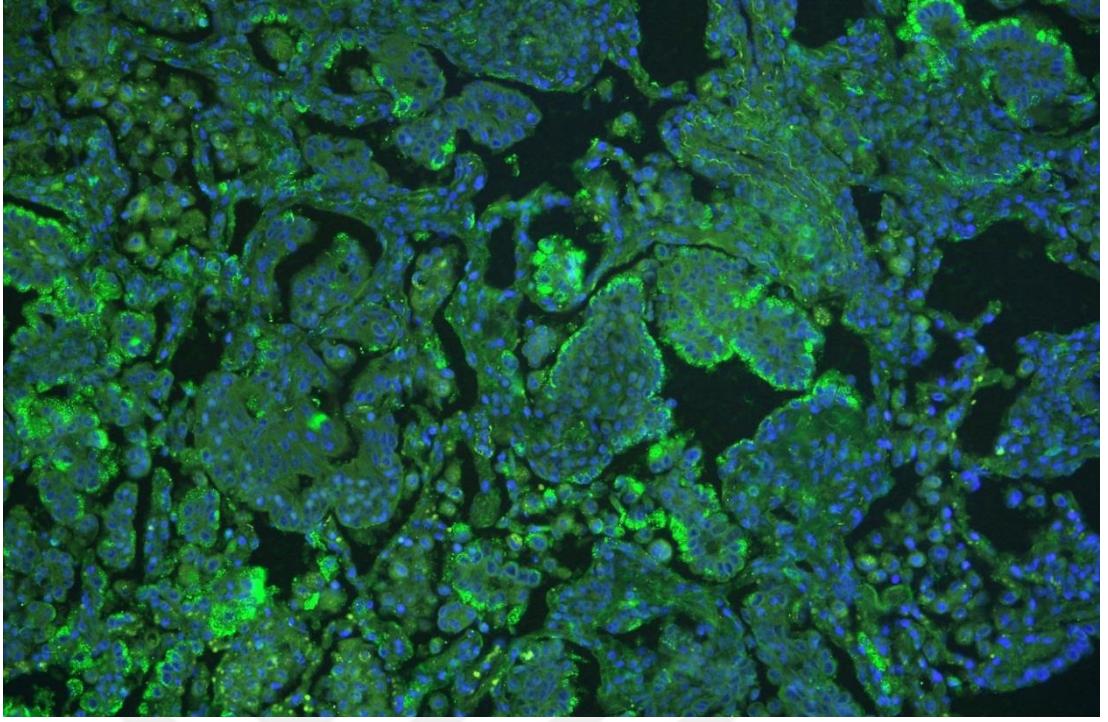
Resim 52: Metastazlı lenf düğümünde tümör hücreleri arasında CD3⁺ T hücreler (ABC-P x20).



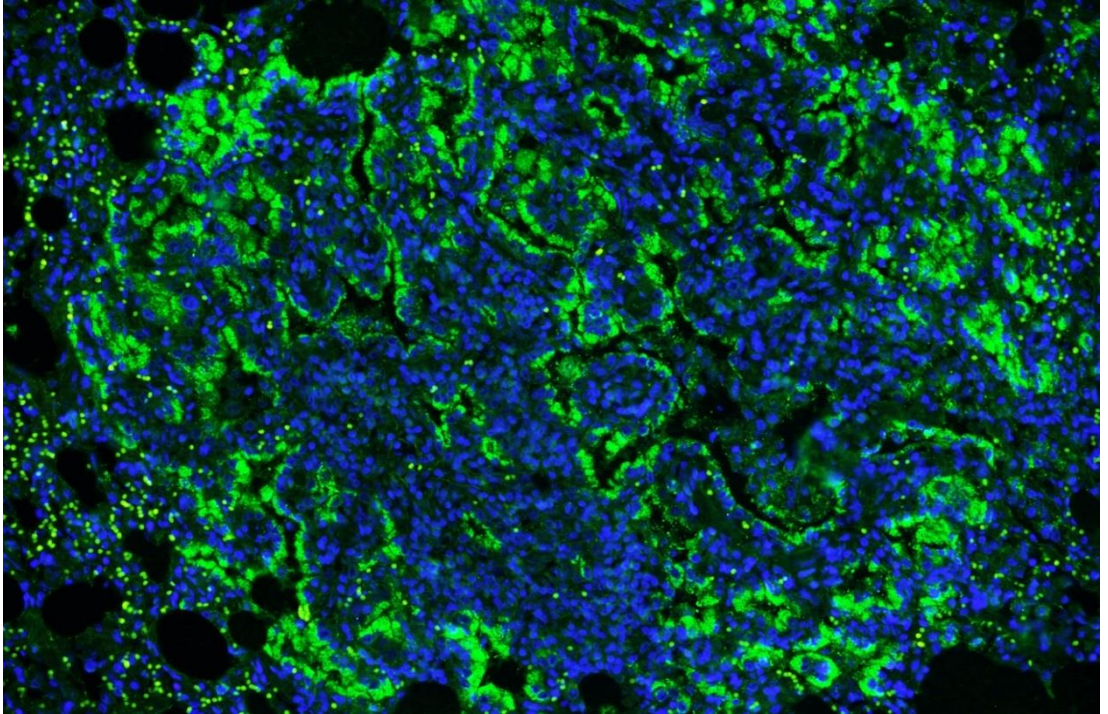
Resim 53: Akciğerde atipik OPA'da stromal doku ve çevresindeki lenfoid dokuda CD79 α cy⁺ B hücre artışları. (ABC-P x 10).



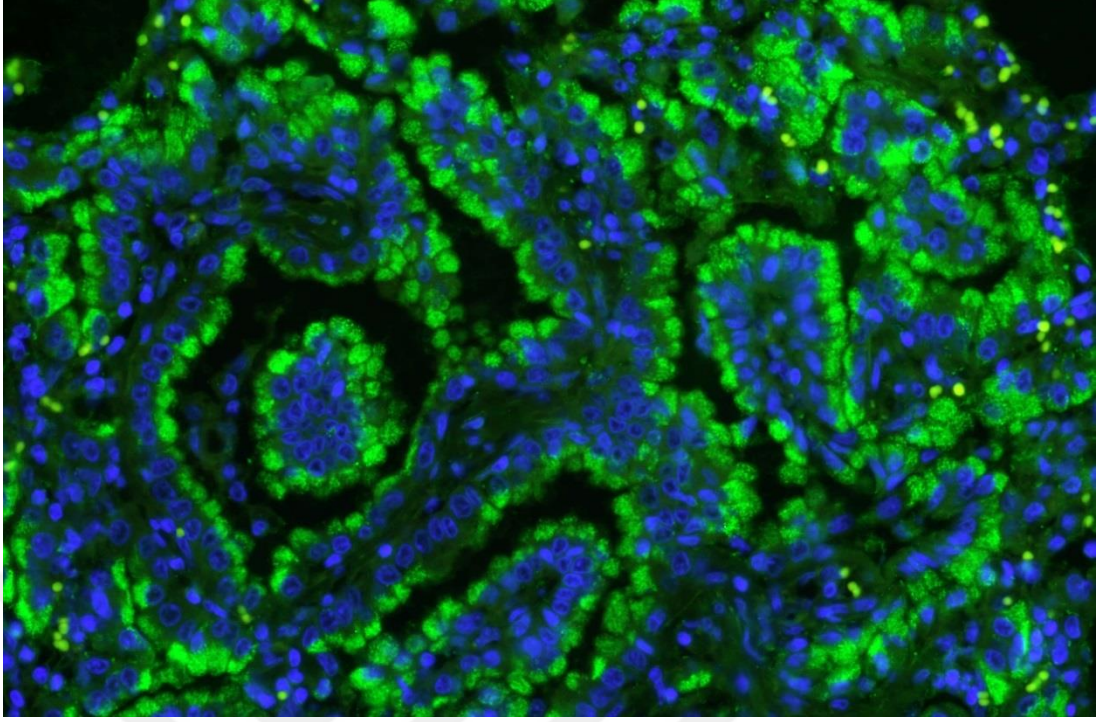
Resim 54: Klasik OPA'lı akciğerde plazmosit ve CD79 α cy⁺ B lenfosit artışları (ABC-P x 20).



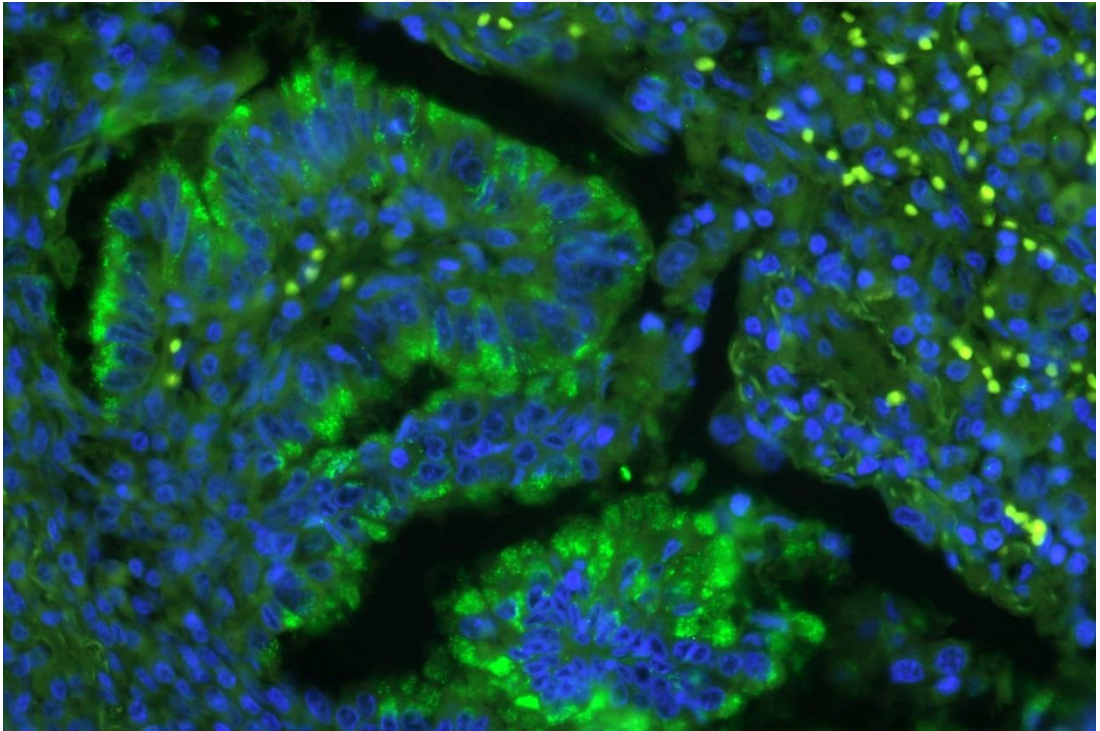
Resim 55: Klasik OPA'lı akciğerde neoplastik hücrelerde SP-B sitoplazmik reaksiyon, (IFx20).



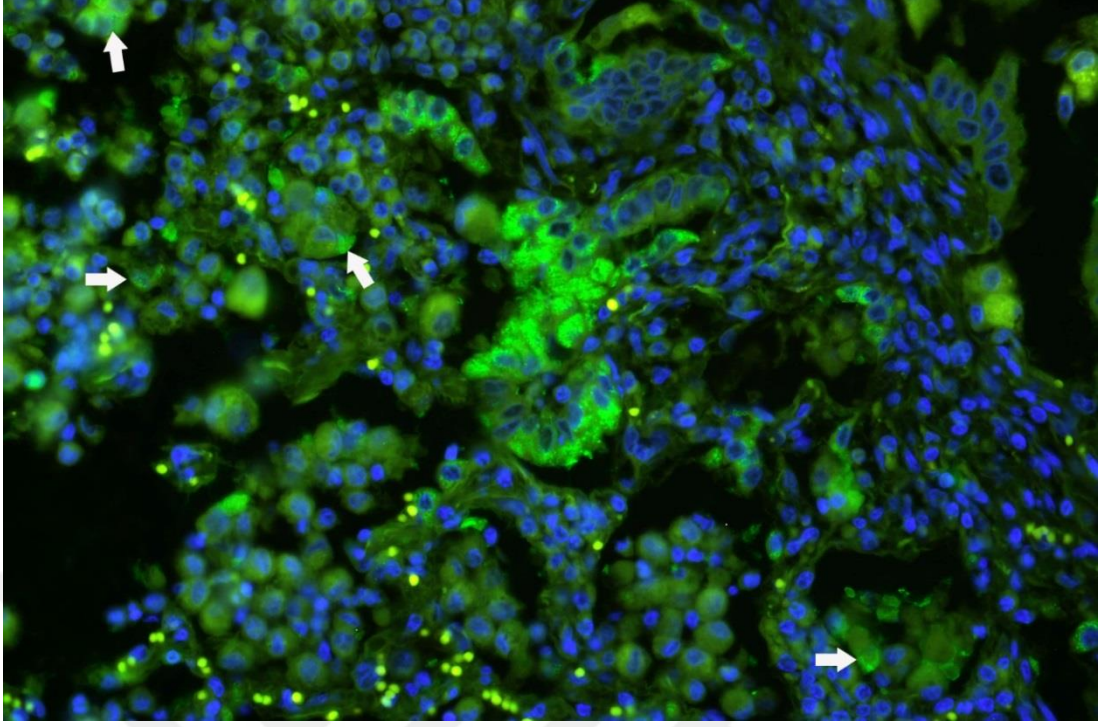
Resim 56: Atipik OPA'lı akciğerde tümöral nodülde neoplastik hücrelerin sitoplazmasında SP-B pozitif reaksiyon (IFx20).



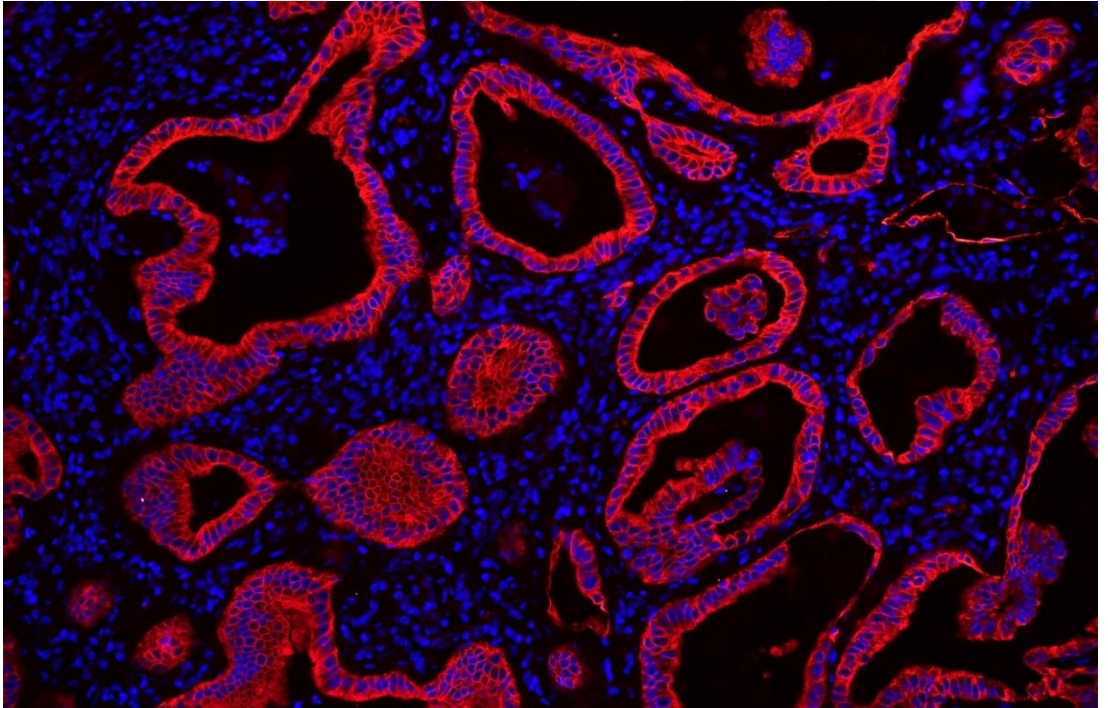
Resim 57: Atipik OPA'lı akciğerde yüksek büyütmede neoplastik hücrelerde şiddetli MCK pozitif reaksiyon (IFx40).



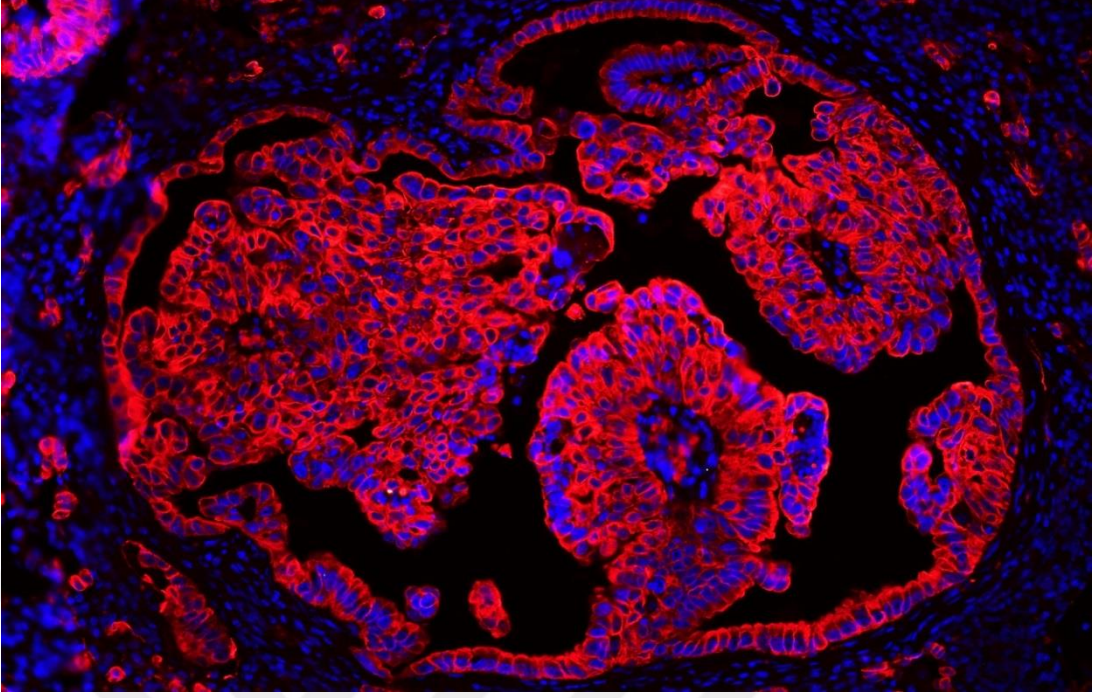
Resim 58: OPA'lı akciğerde papiller proliferasyonlarda neoplastik hücrelerin sitoplazmasında SP-B pozitif reaksiyon (IFx40).



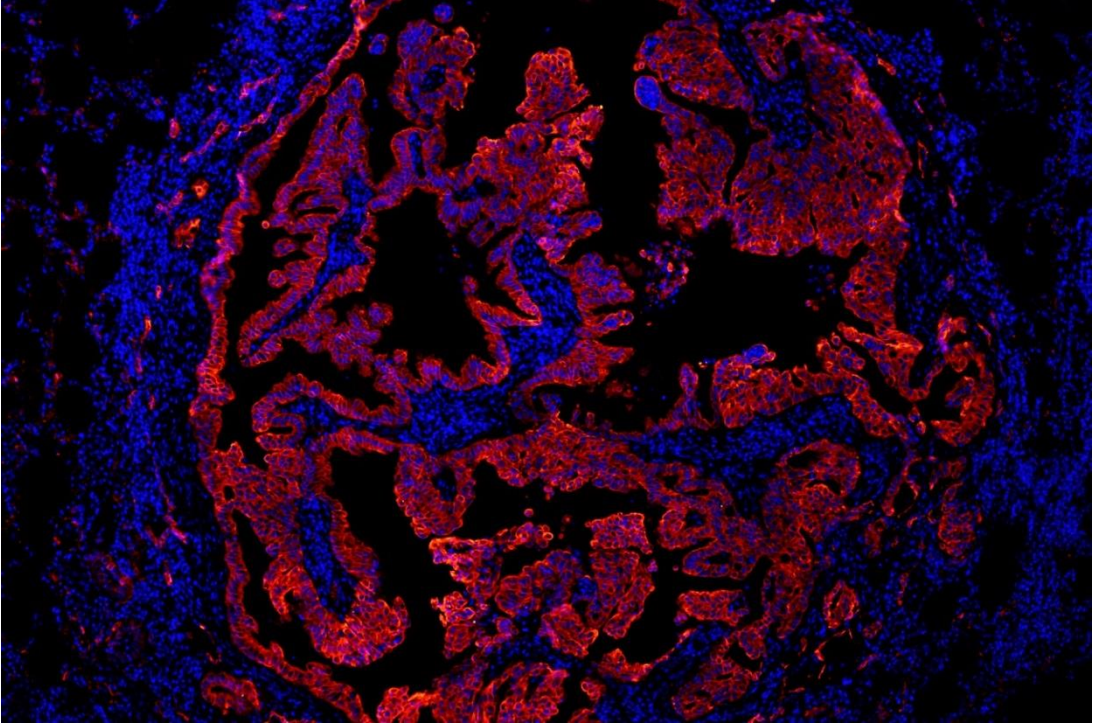
Resim 59: Klasik OPA'lı akciğerde neoplastik odaklar çevresinde alveoler makrofajların (oklar) sitoplazmasında SP-B pozitif reaksiyon (IFx40).



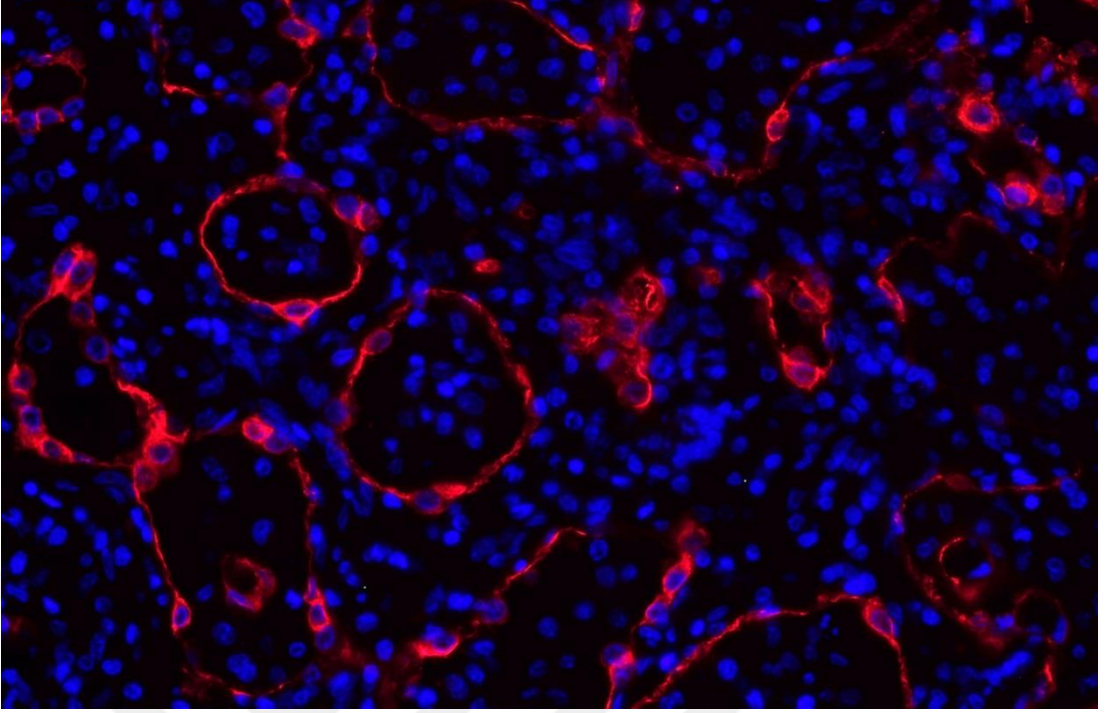
Resim 60: Klasik OPA'lı akciğerde asiner neoplastik hücrelerde şiddetli sitoplazmik MCK reaksiyonu (IFx40).



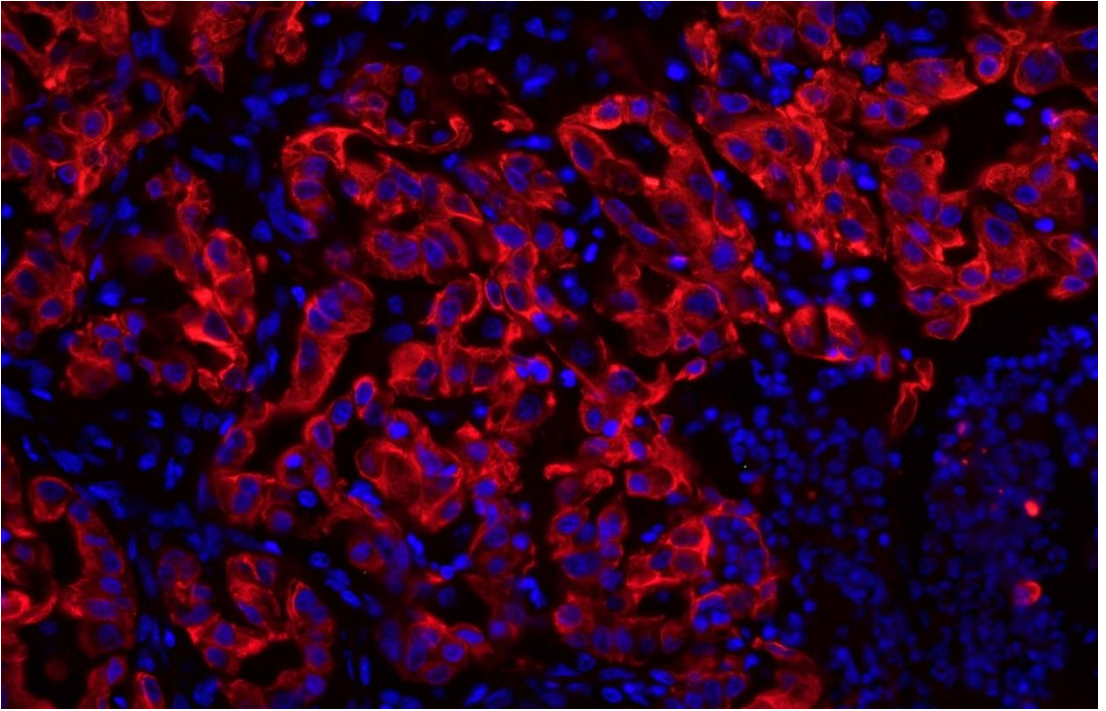
Resim 61: Klasik OPA'lı akciğerde bronşiyal lümende papiller proliferasyonlarda şiddetli MCK sitoplazmik pozitif reaksiyon (IFx40).



Resim 62: Atipik OPA'lı akciğerde tümör nodülünde şiddetli sitoplazmik MCK pozitif reaksiyon (IFx10).



Resim 63: OPA'lı akciğerde tip I pnömositlerin sitoplazmik uzantıları ile alveoler lümende tümör hücrelerinde MCK pozitif reaksiyon (IFx40).



Resim 64: Metastazlı lenf düğümünde neoplastik hücrelerde MCK sitoplazmik pozitif reaksiyon, (IFx40).

TABLÖLAR

Tablo 1. Çalışmada immünohistokimyasal boyamalarda kullanılan primer antikorların klon numaraları, inkübasyon süreleri ve dilüsyon oranları.

Sıra No	Antikor Adı	Clon /Katalog Numarası	İnkübasyon Süresi	Dilüsyon Oranları
1.	SPA	Chemicon (AB3424)	Overnight /4°C	1/200
2.	SPB	Chemicon (AB3780)	Overnight /4°C	1/200
3.	SPC	GeneTex (GTX 15012)	Overnight/4°C	1/100
4	Sitokeratin (MCK-AE1/AE3)	MA1-82041	Overnight/4°C	1/200
5	Pansitokeratin (PCK-26)	NB120-6401	Overnight/4°C	1/300
6.	CD3	Dako (N1580)	Overnight/4°C	Kullanıma hazır
7.	CD79 α cy	Dako (M 7051)	Overnight/4°C	1/150

Tablo 2: Çalışmada olgulara ait tümörlerin tiplendirilmesi ile kullanılan markırlara (SP-A, SP-B, SP-C, CD3 ve CD79 α cy, Multisitokeratin (AE1-AE3), Pansitokeratin (PCK-26) karşı IHC sonuçları. Negatif (-), hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++).

Olgu / Tümör Tipi	SP-A	SP-B	SP-C	CD3	CD79 α cy	MCK (AE1/AE3)	PCK (26)
Olgu 1 Klasik	++	+++	+	++	++	+++	++
Olgu 2 Klasik	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Olgu 3 Atipik	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Olgu 4 Klasik	++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Olgu 5 Klasik	+	++	+++	++	++	+++	++
Olgu 6 Atipik	++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Olgu 7 Atipik	++	++	+++	++	++	+++	+++
Olgu 8 Atipik	++	++	+++	++	+++	+++	++
Olgu 9 Klasik	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Olgu 10 Atipik	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Olgu 11 Atipik	+	++	+++	+++	+++	+++	++
Olgu 12 Atipik	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Olgu 13 Atipik	++	++	++	++	++	+++	++
Olgu 14 Atipik	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Olgu 15 Atipik	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
Olgu 16 Atipik	++	+++	+++	+++	++	+++	++
Olgu 17 Klasik	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Olgu 18 Klasik	+	+++	+++	++	++	+++	++
Olgu 19 Klasik	++	+++	++	+++	+++	++	++
Olgu 20 Klasik	++	++	+++	+++	++	+++	++
Lenf düğümü	++	+++	++	+++	+++	+++	++
Lenf düğümü	+	+++	++	+++	+++	+++	++
Lenf düğümü	++	++	++	++	++	+++	++
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-

KAYNAKLAR

- Aras YŞ, Sarı KE: İmmun sistem hücrelerinde CD molekülleri. Kafkas Üniv Fen Bil Ens Derg, 10(2): 206-214, 2017.
- Azizi S, Tajbakhsh E, Fathi F: Ovine pulmonary adenocarcinoma in slaughtered sheep: A pathological and polymerase chain reaction study. J S Afr Vet Assoc, 85(1): 2014.
- Bediz CŞ, Kılıçarslan H, Gergerlioğlu HS: Akciğer sürfaktanı ve fizyolojik önemi. Selçuk Üniv Genel Tıp Derg 8(4) :165-71, 1998.
- Bhargava P, Kadin ME: Immunohistology of Hodgkin Lymphoma. Diagnostic Immunohistochemistry E-Book: Theranostic and Genomic Applications, 130, 2013.
- Beytut E, Sözmen M, Erginsoy S: İmmünohistochemical detection of pulmonary surfactant proteins and retroviral antigens in the lungs of sheep with pulmonary adenomatosis. J Comp Path, 140(1): 43-53, 2009.
- Brasch F, Birzele J, Ochs M, Guttentag SH, Schoch OD, Boehler A, Beers MF, Muler KM, Hawgood S, Johnen G: Surfactant proteins in pulmonary alveolar proteinosis in adults. Eur Respir J, 24(3): 426-435, 2004.
- Caporale M, Martineau H, De las Heras M, Murgia C, Huang R, Centorame P: Host species barriers to Jaagsiekte sheep retrovirus replication and carcinogenesis. J Virol, 87(19):10752–62, 2013.
- Cousens C, Alleaume C, Bijsmans E, Martineau HM, Finlayson J, Daglish MP, Griffiths DJ: Jaagsiekte sheep retrovirus infection of lung slice cultures. Retrovirology, 12:31, 2015.
- Çabalar M, Akça Y: Viral hastalıkların teşhisinde immünperoksidaz. Ankara Üni Vet Fak Derg, 40 (4): 497-510,1993.
- De Martini JC, York DF: Retrovirus-associated neoplasms of the respiratory system of sheep and goats. Vet Clin North Am Food Anim Prac, 13(1):55-70, 1997.
- Demartini JC, Bishop JV, Thomas E.A, Jassim FA, Sharp JM, De las Heras M, Voelker DR, Jonathan OC: Jaagsiekte sheep retrovirus proviral clone JSRVJS7, derived from the JS7 lung tumor cell line, induces ovine pulmonary carcinoma and is integrated into the surfactant protein A gene. J Virol, 75(9): 4239–4246, 2001.
- De Martini JC, Carlson JO, Leroux C, Spencer T, Palmarini M: Endogenous retroviruses related to Jaagsiekte sheep retrovirus. Curr Top Microbiol Immunol, 275: 117-37, 2003.
- De las Heras M, Calafat JJ, Jaime JM, García de Jalon JA, Ferrer LM, García-Goti M, Minguijon E: Sheep pulmonary adenomatosis (Jaagsiekte) in slaughtered sheep. Med Vet, 9, 52–52, 1992.

De las Heras M, González L, Sharp JM: Pathology of ovine pulmonary adenocarcinoma. *Curr Top Microbiol Immünol*, 275: 25-54, 2003.

De las Heras M, Garcia Goti M, Ortin A, Pascual Z, Minguijon E, Ferrer L.M, Garcia de Jalon J.A, Dewar P, Sharp J.M, Gonzalez L: Presencia del retrovirus asociado a la adenomatosis pulmonar ovina en fetos neoplasia pulmonar de un cordero de tres dias. *Pequehos Rumiantes I*, 36-37, 2000.

Durgun Z, Keskin E: Akciğer surfaktan sistemi. *Selçuk Üniv Vet Bil Derg.* 13(2): 43-52, 1997.

Dursun N: Veteriner Anatomi, VII. Baskı. Medisan Yayınevi, Ankara. s. 113-118, 2008.

Garcia-Goti M, Gonzalez L, Cousens C, Cortabarría N, Extramiana AB, Minguijon EA, Ortin M, De las Heras and Sharp JM: Sheep Pulmonary Adenomatosis: Characterization of two pathological forms associated with Jaagsiekte retrovirus. *J Comp Path.* 122(1):55–65, 2000.

Gray ME, Meehan J, Sullivan P, Marland J.R.K, Greenhalgh SN, Gregson R, Clutton RE, Ward C: Ovine pulmonary adenocarcinoma: A unique model to improve lung cancer research. *Front Oncol*, 19(335): 2019.

Griffiths DJ, Martineau HM, Cousens C: Pathology and pathogenesis of ovine pulmonary adenocarcinoma. *Comp Path*, 142(4):260-83, 2010.

Hawgood S: Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure. *Am J Resp Cell Mol*, 257(2 Pt 1): L13-22, 1989.

Hermans C, Bernard A: Lung epithelium specific proteins characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med*, 159, pp 646–678, 1999.

Hofacre A, Fan H: Jaagsiekte sheep retrovirus biology and oncogenesis. *Viruses*, 2(12): 2618–48, 2010.

Holland MJ, Palmarini M, Garcia-Goti M, Gonzalez L, McKendrick I, De las Heras M, Sharp JM: Jaagsiekte retrovirus is widely distributed both in T and B lymphocytes and in mononuclear phagocytes of sheep with naturally and experimentally acquired pulmonary adenomatosis. *J Virol*, 73(5):4004-8, 1999.

Hudachek SF, Kraft SL, Thamm DH, Bielefeldt- Ohmann H, DeMartini JC, Miller AD, Dernell WS: Lung tumor development and spontaneous regression in lambs coinfectd with Jaagsiekte sheep retrovirus and ovine lentivirus. *Vet Pathol*, 47(1): 148-162, 2010.

Im K, Mareninov S, Fernando Palma Diaz M, Yong WH: An introduction to performing immunofluorescence staining. *Methods Mol Biol*, 1987:299-311, 2019.

İlhan F, Sevil AV, Yıldırım S, Sözdutalmaz İ, Alcigir ME: Expression of p53 protein, Jaagsiekte sheep retrovirus matrix protein, and surfactant protein in the lungs of sheep with pulmonary adenomatosis. *J Vet Diagn Invest*, 28(3):249-56, 2016.

- Lee AM, Wolfe A, Cassidy JP, Messam McV LL, Moriarty JP, O'Neill R, Fahy C, Connaghan E, Cousens C, Dagleish MP, McElroy MC: First confirmation by PCR of Jaagsiekte sheep retrovirus in Ireland and prevalence of ovine pulmonary adenocarcinoma in adult sheep at slaughter. *Ir Vet J*, 19;70:33, 2017.
- Lee OJ, Kang HW, Yun SJ: Urine cytology and urinary biomarkers. Section II, Diagnosis, 2018.
- Leroux C, Girard N, Cottin V, Greenland T, Mornex J.F, Archer F: Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. *Vet Res*, 38 (2), pp.211-228, 2007.
- Luttringer DM, Girard N, Cadranell J, Leroux C, Quoix E, Cottin V, Signore CD, Lebitasy MP, Cordier G, Vanhems P, Mornex JF: Professional exposure to goats increases the risk of pneumonic type lung adenocarcinoma. Results of the IFCT-0504-epidemiology study. *PLoS One*, 7(5): 2012.
- Kalina M, Mason R, Shannon JM: Surfactant protein C is expressed in alveolar type II cells but not in Clara cells of rat lung. *Am J Pathol*, 156:175-182, 1992.
- Karagianni EA, Vasoya D, Finlayson J, Martineau HM, Wood AR, Cousens C: Dagleish MP, Watson M, Griffiths DJ: Transcriptional response of ovine lung to infection with Jaagsiekte sheep retrovirus. *J Virol*, 93(21), 2019.
- Kennerman E: Koyunlarda solunum sistemi hastalıklarına klinik yaklaşım. *J Vet Sci Intern Med-Special Topics*, 3(1):38-46, 2017.
- Kıran MM, Çiftçi MK, Erer H, Ortatlı M, Hatipoğlu F, Tuzcu M: Koyun pulmoner adenomatozisinin eksfoliyatif sitoloji ve bronkoalveoler lavaj yöntemleri ile tanısı ve sonuçların histopatolojik bulgularla karşılaştırılması. *Vet Bil Der*, 16(1): 59-611, 2000.
- Kürtül İ, Türkmenoğlu İ: Veteriner Anatomi. Evcil ve Memeli Hayvanlar, VI. Baskı. Medipress Yayınları, Malatya. s. 393- 398, 2018.
- Kycko A, Reichert M: Overexpression of aldolase A and cytokeratin 19 in ovine pulmonary adenocarcinoma. *Pol J Vet Sci*, 15(4): 703-709, 2012.
- Martineau HM, Cousens C, Imlach S, Dagleish MP, Griffiths DJ: Jaagsiekte sheep retrovirus infects multiple cell types in the ovine lung. *J Virol*, 85(7), 2011.
- Manasa BB, Devi VR, Satheesh K, Kavitha KL: Determination of proliferative activity of neoplastic cells by Ki67 and Agnor staining in ovine pulmonary adenocarcinoma affected lungs. *Int J Lives R*, 8(01): 240-250, 2018.
- Mansour AK, Al-Husseiny SH, Kshash QH, Jassim A: Clinical-histopathological and molecular study of ovine pulmonary adenocarcinoma in Awassi sheep in Al-Qadisiyah. *Vet World*, 12(3): 454-458, 2019.

- Guliyev M: İnsan Endojen Retrovirus H (Herv-H)'In Genomik Analizi. İstanbul Üniv, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, İstanbul, 2012.
- Minguijon E, Gonzalez L, De las Heras M, Gomez N, Garcia-Goti M, Juste R.A, Moreno M: Pathological and aetiological studies in sheep exhibiting extrathoracic metastasis of ovine pulmonary adenocarcinoma (Jaagsiekte). *J Comp Path*, 148(2-3):139-47, 2013.
- Mishraa S, Kumara P, Dara JA, Georgea N, Singhb V, Singh R: Differential immunohistochemical expression of JSRV capsid antigen and tumour biomarkers in classical and atypical OPA: A comparative study. *Biol Rhythm Res*, 52(6): 946–956, 2021.
- Monot M, Archera F, Gomesa M, Mornexa JF, Leroux C: Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. *Vet Microbiol*, 14:181(1-2):170-7, 2015.
- Murgia C, Caporale M, Ceesay O, Di Francesco G, Ferri N, Varasano V, De las Heras M, Palmarini M: Lung adenocarcinoma originates from retrovirus infection of proliferating type 2 pneumocytes during pulmonary post-natal development or tissue repair. *PLoS Pathog*, 7(3): 2011.
- Mornex JF, Thivolet F, De las Heras M, Leroux C: Pathology of human bronchioloalveolar carcinoma and its relationship to the ovine disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 275:225–48, 2003.
- Nelson G, Ordonez MD: Broad spectrum immunohistochemical epithelial markers. *Hum Pathol*, 44(7):1195-215, 2013.
- Ortin A, De las Heras M, Borobiaa M, Ramoa MA, Ortega M, de Arcautea RM: Ovine pulmonary adenocarcinoma: A transmissible lung cancer of sheep, difficult to control. *Small Rumin Res*, 176: 37-41, 2019.
- Paananen R, Glumoff V, Sormunen R, Voorhout W, Hallman M: Expression and localization of lung surfactant protein B in eustachian tube epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280(2): L214-20, 2001.
- Palmarini M, Holland MJ, Cousens C, Dalziel RG, Sharp JM: Jaagsiekte retrovirus establishes a disseminated infection of the lymphoid tissues of sheep affected by pulmonary adenomatosis. *J Gen Virol*, 77(Pt 12): 2991–8, 1996.
- Pazarbaşı A, Kasap M, Kasap H: Kanser yolakları. *Çukurova Tıp Derg*, 20: 187, 2011.
- Peioguo C, Daniel A: CD79: A Review. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol*, 9(2): 97-106, 2001.
- Platt JA, Kraipowich N, Villafane AF, Demartini JC: Alveolar type II cells expressing Jaagsiekte sheep retrovirus capsid protein and surfactant proteins are the predominant neoplastic cell type in ovine pulmonary adenocarcinoma. *Vet Pathol*, 39(3):341–352, 2002.
- Phelps DS, Harding HP: Immunohistochemical localization of a low molecular weight surfactant-associated protein in human lung. *J Histochem Cytochem*, 35(11):1339-42, 1987.

Perry A, Brat DJ: Practical Surgical Neuropathology: A diagnostic approach. Epithelial Markers. 2010.

Quintas H, Pires I, Garces A, Prada J, Silva F, Alegria N: The diagnostic challenges of ovine pulmonary adenocarcinoma. Ruminants, 1(1): 58–71, 2021.

Rooney SA, Young SL, Mendelson CR: Molecular and cellular processing of lung surfactant. FASEB J, 8(12):957-67, 1994.

Sakai K, Kweon MN, Kohri T, Kishino Y: Effects of pulmonary surfactant and surfactant protein A on phagocytosis of fractionated alveolar macrophages: relationship to starvation. Cell Mol Biol, 38(2):123-30, 1992.

Salvatori D: Studies on the Pathogenesis and Epidemiology of Ovine Pulmonary Adenocarcinoma (OPA). University of Edinburgh, Doctor of Philosophy Thesis, 2004.

Singh R, Singh S, Singh R, Varshney R, Dhama K, Kumari S, Singh KP, Dar JA, Kashyap G, Kamdi B, Kumar P, Singh V: Patho-Epidemiological study of Jaagsiekte sheep retrovirus infection in the sheep and goats population India. Biol Rhythm Res, 51(8): 2018.

Semerci A, Çelik AD: Türkiyede Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliğinin Genel Durumu. MKU Tar Bil Derg, 21(2):182-196, 2016.

Scheerlinck JP, Snibson KJ, Bowles VM, Sutton P: Biomedical applications of sheep models: from asthma to vaccines. Trends Biotechnol. 26:259–66, 2008.

Suau F, Cottin V, Archer F, Croze S, Chastang J, Cordier G, Thivolet-Bejui F, Mornex JF, Leroux C: Telomerase activation in a model of lung adenocarcinoma. Eur Respir J, 27: 1175–1182, 2006.

Summers C, Benitoa A, Ortina A, Garcia de Jalona JA, González L, Norval M, Sharp JM, De las Heras M: The distribution of immune cells in the lungs of classical and atypical ovine pulmonary adenocarcinoma. Vet İmmünol İmmünopathol, 146(1): 1-7, 2012.

Summers C: Jaagsiekte sheep retrovirus-specific immune responses induced by vaccination: A comparison of immunisation strategies. Vaccine, 24(11): 1821-9, 2006.

Şevik M: Onkojenik retroviruslar. Selçuk Tıp Derg, 29 Onkoloji Ek Sayı-1: 1-4, 2013.

Temizkan G: Moleküler Genetik, III. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. s.85-87, 2013.

Toma C, Baltenau V, Tripon S, Trifa A, Rema A, Amorim İ, Pop MR, Popa R, Catoi C, Taulescu M: Exogenous Jaagsiekte Sheep Retrovirus type 2 related to ovine pulmonary adenocarcinoma in Romania: prevalence, anatomical forms, pathological description, immunophenotyping and virus identification. BMC Vet Res, 16(1):296, 2020.

Usta M: Koyun Pnömonilerinin Patolojik ve Bakteriyolojik Olarak Araştırılması. Balıkesir Üniv, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, 2019.

Voigt K, Krämer U, Brüggemann M, Dewar P, Sharp JM, Ganter M: Eradication of ovine pulmonary adenocarcinoma by motherless rearing of lambs. *Vet Record*, 161(4):129-132, 2007.

Walsh SR, Linnerth-Petrik NM, Yu DL, Foster RA, Menzies PI, Diaz-Méndez A, Chalmers HJ, Wootton SK: Experimental transmission of enzootic nasal adenocarcinoma in sheep. *Vet Res*, 44(1):66, 2013.

Wright JR, Borron P, Brinker KG, Folz RJ: Surfactant protein A: regulation of innate and adaptive immune responses in lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24(5):513–7, 2001.

Wootton SK, Halbert CL, Miller AD: Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. *Nature*, 14; 434(7035): 904–7, 2005.

Yener Z, Uyar A, Yaman T, Keleş ÖF: Veteriner Özel Patoloji, I. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. s.134,135, 2016.

EKLER**EK:1 Etik Kurul Raporu**