



T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÖPEK MEME KARSİNOMLARINDA NEKTİN-4
EKSPRESYONLARININ MALİGNİTE İLE İLİŞKİSİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Hüseyin DOLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Ahmet AYDOĞAN

BURDUR-2016

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÖPEK MEME KARSİNOMLARINDA NEKTİN-4
EKSPRESYONLARININ MALİGNİTE İLE İLİŞKİSİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Hüseyin DOLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Ahmet AYDOĞAN

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0285-YL-16 proje numarası ile desteklenmiştir.

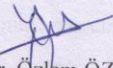
BURDUR-2016

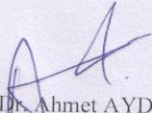
KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE


Hüseyin DOLU tarafından *Doç. Dr. Ahmet AYDOĞAN* yönetiminde hazırlanan *Köpek Meme Karsinomlarında Nektin-4 Ekspresyonlarının Malignite ile İlişkinin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi* başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Patoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi
03/03/2016


Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
MAKÜ Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

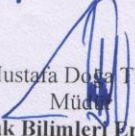

Doç. Dr. Ahmet AYDOĞAN
MAKÜ Veteriner Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi


Yrd. Doç. Dr. Cevat ŞAHİ
MAKÜ Veteriner Fakültesi
Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve
İşletmeciliği Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu **16/03/2016** Tarih ve **2016/10** sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mustafa Doğan TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecince ilgi ve uyarıları ile beni yönlendiren, tezimin oluşturulmasında ve her aşamasında bilgi birikimini, tecrübe ve görüşlerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet AYDOĞAN'a,

Yüksek lisans eğitimim ve öğretimim boyunca hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e,

Bilgi ve tecrübelerini paylaşarak yön veren Sayın Doç. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a,

Araştırma sürecinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Uzman Biyolog Dilnur DİNÇOĞLU'na,

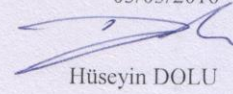
Ayrıca yüksek lisans eğitimim sürecinde sonsuz özveri ile her zaman yanımda olan sevgili aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

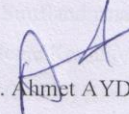
BEYAN

Köpek Meme Karsinomlarında Nektin-4 Ekspresyonlarının Malignite ile İlişkinin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

03/03/2016


Hüseyin DOLU

ONAY


Doç. Dr. Ahmet AYDOĞAN
Danışman

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	<i>i</i>
KABUL ve ONAY	<i>ii</i>
TEŞEKKÜR	<i>iii</i>
BEYAN	<i>iv</i>
İÇİNDEKİLER	<i>v</i>
ŞEKİLLER DİZİNİ	<i>vii</i>
TABLolar DİZİNİ	<i>ix</i>
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	<i>x</i>
TÜRKÇE ÖZET	<i>xi</i>
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	<i>xii</i>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Köpeklerde Meme Bezi Morfolojisi	2
2.2. Köpek Meme Tümörleri	2
2.3. Köpek Meme Tümörlerinde Prognoz	4
2.4. Köpek Meme Tümörlerinde Sınıflandırma	5
2.4.1. Bazı Önemli Köpek Meme Karsinom Tipleri	6
2.4.1.1. Non İnfiltratif (in situ) Karsinom	6
2.4.1.2. Kompleks Karsinom	6
2.4.1.3. Basit Karsinom	7
2.4.1.3.1. Tubulopapiller Karsinom	7
2.4.1.3.2. Solid Karsinom	7
2.4.1.3.3. Anaplastik Karsinom	7
2.5. Meme Tümörlerinde Kullanılan Bazı Önemli Prognostik Markırlar	8
2.5.1. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)	8
2.5.2. Ki-67	8
2.5.3. Nektin-4	9
3. GEREÇ ve YÖNTEM	10
3.1. Örneklerin Toplanması	10
3.2. Histopatolojik İnceleme	10

3.3. İmmunohistokimyasal İnceleme	11
3.4. İstatistiksel Analiz	13
4. BULGULAR	14
4.1. Histopatolojik Bulgular	14
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	16
4.3. İstatistiksel Bulgular	25
5. TARTIŞMA	26
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	31
7. KAYNAKLAR	32
8. ÖZGEÇMİŞ	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil numarası ve başlığı	Sayfa
Şekil 4.1. Tubulopapiller karsinom; atipik epitel hücrelerinden oluşan tubuler yapılar ve bu yapıların lümenlerine doğru uzanmış papiller çıkıntılar, HE, Bar=100 µm.	15
Şekil 4.2. Tubulopapiller karsinom; atipik epitel hücrelerinden oluşan tubuler yapı ve bu yapının lümenine doğru uzanmış papiller çıkıntılar (ok), HE, Bar=50 µm.	15
Şekil 4.3. Kompleks karsinom; atipik epitel hücrelerinden oluşan tubuler yapılar ve intertubuler alanda atipik iç hücreleri, HE, Bar=50 µm.	16
Şekil 4.4. Nektin-4'ün tümör tiplerine göre ekspresyon yoğunluğu.	17
Şekil 4.5. PCNA'nın tümör tiplerine göre ekspresyon yoğunluğu.	17
Şekil 4.6. Ki-67'nin tümör tiplerine göre ekspresyon yoğunluğu.	18
Şekil 4.7. Kompleks karsinom; Epitel hücrelerinde sitoplazmik Nektin-4 ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.	19
Şekil 4.8. Kompleks karsinom; Tubuler epitel hücrelerinde sitoplazmik Nektin-4 ekspresyonu (ok), ABC metot, Bar=50 µm.	19
Şekil 4.9. Tubulopapiller karsinom; Epitel hücrelerinde sitoplazmik Nektin-4 ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.	20
Şekil 4.10. Tubulopapiller karsinom; Epitel hücrelerinde sitoplazmik Nektin-4 ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.	20
Şekil 4.11. Tubulopapiller karsinom; Tubuler epitel hücrelerinde sitoplazma (oklar) ve sitoplazmik membranda (ok başları) Nektin-4 ekspresyonu, ABC metot, Bar=50 µm.	21
Şekil 4.12. Tubulopapiller karsinom; Tubuler epitel hücrelerinde sitoplazmik (oklar) Nektin-4 ekspresyonu, ABC metot, Bar=50 µm.	21
Şekil 4.13. Normal meme dokusunda Nektin-4 negatif boyanma, ABC metot, Bar=50 µm.	22
Şekil 4.14. Kompleks karsinom; epitel hücrelerinde nükleer PCNA ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.	22

- Şekil 4.15.** Kompleks karsinom; epitel hücrelerinde nükleer PCNA 23
ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.
- Şekil 4.16.** Tubulopapiller karsinom; epitel hücrelerinde nükleer PCNA 23
ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.
- Şekil 4.17.** Kompleks karsinom; tubuler epitel hücrelerinde nükleer Ki-67 24
ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.

TABLULAR DİZİNİ

Tablo numarası ve başlığı	Sayfa
Tablo 3.1. Gönderilen meme bezi tümörlerinin ait oldukları hayvanlara ilişkin ırk, yaş ve tümörlerin meme loblarına göre dağılımı	11
Tablo 3.2. Kullanılan antikolar, sulandırma oranları ve hücresel yerleşimleri	13
Tablo 4.1. Spearman korelasyon analizi verileri	25

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	oran
/	yüzde
µm	mikrometre
°C	Santigrad derece
ABC	Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks
AFIP	Armed Forces Institute of Pathology
DAB	3.3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HE	Hematoksilen Eozin
IHC	İmmunohistokimya
kDa	kilodalton
PBS	Fosfat tamponlu solüsyonu
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
pH	Asit ve alkali yoğunluğunun göstergesi
WHO	World Health Organization

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

**Köpek Meme Karsinomlarında Nektin-4 Ekspresyonlarının Malignite ile
İlişkisinin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi**

Hüseyin DOLU
Patoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı
Doç. Dr. Ahmet AYDOĞAN

BURDUR – 2016

ÖZET

Bu çalışmada, Nektin-4'ün köpek meme karsinomlarında malignite ile ilişkisinin ortaya konulması amacıyla daha önce tubulopapiller karsinom ve kompleks karsinom teşhisi konmuş toplam 30 adet köpek meme tümör dokusu materyal olarak kullanıldı. Bu dokulara avidin-biotin peroksidaz kompleks metot uygulanarak Nektin-4, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Ki-67 immunoreaksiyonları karşılaştırılmalı olarak incelendi ve sonuçlar semikantitatif olarak değerlendirildi. İmmunohistokimyasal olarak Nektin-4 ile 19 olguda kuvvetli ve 8 olguda orta derecede kuvvetli sitoplazmik ekspresyon dikkati çekti. Bununla birlikte, PCNA ile 18 olguda kuvvetli, 6 olguda orta derecede kuvvetli; Ki-67 ile 1 olguda orta derecede kuvvetli nükleer boyanma belirlendi. Sonuç olarak, bu çalışmada, önceki çalışmalarla paralel bir şekilde köpek meme karsinomlarında PCNA ve Ki-67 immunoreaktivitelerinin arasında pozitif yönde yüksek bir korelasyon bulunduğu görüldü (r: 0.884). Ayrıca, köpek meme karsinomlarında Nektin-4 ile PCNA ve Ki-67 ekspresyonları arasında pozitif yönde doğrusal ve yüksek bir korelasyonun olduğu ortaya kondu. Bu nedenle Nektin-4'ün köpek meme karsinomlarında malignite ile ilişkili önemli bir prognostik değer olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: köpek meme karsinomları, immunohistokimya, nektin-4, PCNA, Ki-67.

**Mehmet Akif Ersoy University
Institute of Health Science**

Master of Science Thesis

**Immunohistochemical Evaluation of Relationship Between Nectin-4 Expression
and Malignancy in Canine Mammary Carcinomas**

**Hüseyin DOLU
Department of Pathology**

**Supervisor
Associate Prof. Dr. Ahmet AYDOĞAN**

BURDUR – 2016

ABSTRACT

In this research, 30 canine mammary tumors tissue which were previously diagnosed as tubulopapillary carcinoma and complex carcinoma were used in order to determine relationship between Nectin-4 expressions and malignancy in canine mammary carcinomas. The routine avidin-biotin peroxidase complex method was used for the detection of Nectin-4, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Ki-67 in these tissues. The results were analyzed comparatively and evaluated semiquantitatively. Immunohistochemically, positive cytoplasmic staining of Nectin-4 was revealed strong in 19 cases and moderate in 8 cases. However, nuclear immunostaining of PCNA was detected strong in 18 cases and moderate in 6 cases and Ki-67 expression was seen moderate in 1 case. In conclusion, in this research, it has been observed that a high positive correlation between PCNA ve Ki-67 expressions among canine mammary carcinomas ($r: 0.884$). In addition, positive, linear and high correlation was observed between Nectin-4, PCNA and Ki-67 expressions. For this reason, it has been concluded that Nectin-4 may be a significant prognostic value related malignancy in canine mammary carcinomas.

Key words: canine mammary carcinomas, immunohistochemistry, nectin-4, PCNA, Ki-67.

1. GİRİŞ

Tümör, organizmadaki hücrelerden herhangi birinin otonomi kazanması sonucu canlının kontrol mekanizmalarının etkisinden çıkması ile sınırsız çoğalması sonucunda oluşan, gelişmesi normal dokulara göre daha hızlı ve sebep ortadan kalktıktan sonra bile büyümesini sürdüren yeni doku (neoplazi) oluşumudur. Bu dokular biyolojik davranışlarına göre benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) karakterli olmak üzere iki gruba ayrılır ve malign gelişme gösterenler kanser olarak isimlendirilir (24, 60).

Kanser gelişimi, ölümcül olmayan hücrel DNA hataları ya da değişikliklerinin birikimini içeren çok aşamalı bir süreçtir (60). Hücrel genom hasarları neredeyse tüm tümörler için ortak nedendir. Bu hasarların başlıca kaynakları ise radyasyon, virüsler ve çeşitli kimyasal maddelerdir (57).

Kanser, gerek beşeri gerekse veteriner hekimlikte güncelliğini uzun yıllardan beri kaybetmeyen bir araştırma konusudur. Bu konudaki çalışmalar tüm dünyada tıp bilimi çevrelerinde en fazla desteklenen ve ilgi çeken çalışmalar arasındadır. Meme kanserleri kadınlarda ölüm sebeplerinin ilk üçü arasında sürekli yer alır (41). Dişi köpekler başta olmak üzere hayvanlarda da benzeri bir sıralama mümkün görülmektedir. Meme kanserleri dişi köpeklerde en sık görülen malign tümör tipidir (57). İnsanlarda hayvan sevgisinin artması ile iyi bakım ve beslenme koşullarında yaşam ömrü uzayan köpeklerde, meme tümörleri yüksek oranda görülmeye başlamıştır (44). Bununla birlikte meme kanseri tiplerinin birbirinden farklı prognozlara ve tedavi yanıtlarına sahip olması, teşhis ve tedavi uygulamalarında zorlukların yaşanmasına neden olmuştur (52, 68). Bu zorlukların giderilmesinde immunohistokimyasal tekniklerin kullanılması, objektif olarak diagnostik ve prognostik açıdan büyük rol oynamıştır (4, 25, 45, 59).

Bu çalışmada, köpek meme karsinomlarında immunohistokimyasal olarak Nektin-4 ekspresyonları ile Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ve Ki-67 ekspresyonlarının karşılaştırılması olarak incelenmesi ve Nektin-4'ün köpek meme karsinomlarında malignite ile ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Köpeklerde Meme Bezi Morfolojisi

Meme bezleri, süt üretimi amacıyla abdominal hattın orta çizgisinde birbirlerine paralel olarak gelişirler. Dişi köpekler genellikle 5 çift meme bezine sahiptirler. Bunlar, kranial ve kaudal torasik meme bezi olmak üzere 2 çift kranialde; kranial ve kaudal abdominal meme bezi olmak üzere 2 çift ortada; 1 çift inguinal olmak üzere kaudalde yerleşim gösterirler (30).

Meme bezleri, ter bezlerinden modifiye olmuş ve interlobuler bağ doku ile lobullere ayrılmış tubuloalveoler yapılardır. Parankim (alveol), stroma (bağ doku), akıtıcı kanallar, damarlar ve sinirlerden meydana gelmektedir (7,18). Parankimi oluşturan alveol, basit prizmatik ya da kübik yapıda bir epitele sahiptir ve bu epitel miyoepitel hücreleri ile kaplanarak bazal membranı oluşturur (18). Miyoepitel hücrelerin 4 farklı tipi vardır. Bunlar, hipertrofik, fusiform (iğ), yıldız ve yuvarlak şekilli miyoepitel hücreleridir (59).

Meme bezlerindeki kan dolaşımı farklı arter ve venalar tarafından sağlanır. Arter sistemi içinde kranial ve kaudal torasik meme bezleri ile kranial abdominal meme bezinde kranial süperfisiyal epigastrik arter; kaudal abdominal ve inguinal meme bezlerinde ise kaudal süperfisiyal epigastrik arter bulunur (77).

Meme bezlerinin venöz drenajı arter sistemi ile paralellik gösterir. Ayrıca venalar arterlerle karşılaştırıldığında, daha yüksek hacimli ve anastomoz yönünden daha zengindir (77, 80).

Lenf drenajları, kranial bölgede aksillar lenf düğümleri, kaudal bölgede ise süperfisiyal inguinal lenf düğümleri tarafından yapılmaktadır (26, 65).

2.2. Köpek Meme Tümörleri

Memeli hayvan türleri içinde meme tümörü insidensi en yüksek hayvanların köpekler olduğu bildirilmiştir (12,32). Köpeklerde meme tümörleri, deri tümörlerinden sonra en sık karşılaşılan, dişi köpeklerde ise en yaygın görülen tümörlerdir (57, 60, 62). Köpek meme tümörlerinin dünyanın her yerinde görüldüğü rapor edilmiş, görülme sıklığının coğrafik alanlara göre herhangi bir değişiklik göstermediği bildirilmiştir (61). Ayrıca insan ve köpeklerde, yaşa bağlı olarak meme

tümörlerindeki insidens oranının köpeklerde kadınlara göre 3 kez daha fazla olduğu bilinmektedir (15).

Dişi köpeklerde meme tümörü insidensi, görülen tüm tümörlerin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Meme tümörlerin ortalama %60'ı benign ve %40'ı malign karakterlidir (6). Yıllık insidens oranı ise 198/100 000'dir (57).

Türkiye'de, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1973-1998 yılları arasında 236 köpek meme tümörü incelenmiş olup bunların %71'inin malign, %29'unun ise benign karakterli olduğu tespit edilmiştir (92).

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1985-1992 yılları arasında yapılan bir araştırmada 27 köpekte saptanan 34 tümör olgusundan 11'inin meme tümörü olduğu görülmüş, toplam tümörler içinde oranının ise %32.4 olduğu kaydedilmiştir (23).

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1988-1996 yılları arasında 89 adet köpekte tümör tespit edilmiş, bu tümörlerin %47.2'sinin dişi genital sistemde ve memede görüldüğü rapor edilmiştir (83).

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1995-2000 yılları arasında 182 köpekte görülen tümörlerin %40.1'inin dişi genital sistemde olduğu, dişi genital sistem içinde de %71.23 oranında meme tümörüne rastlandığı bildirilmiştir (35).

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2003-2010 yılları arasında yapılan bir çalışmada, tespit edilen 43 adet meme kanseri olgusu in situ karsinom, kompleks karsinom, tubulopapiller karsinom, solid karsinom, iç hücreli karsinom ve karsinosarkom olarak sınıflandırılmıştır (4).

Köpek meme tümörleri oluşumunun yaşlara göre dağılımı köpeklerde görülen diğer tümörlere benzerlik göstermektedir (62). Tümörlerin oluşumu ile gelişiminde genel olarak yaş önemli bir faktördür ve hayvanın yaşının artması ile birlikte tümörlerin görülme sıklığı da artmaktadır (11). Köpek meme tümörleri insidensi 2 yaşından küçük köpeklerde düşük iken 6-7 yaşlı köpeklerde ciddi bir artış göstermektedir (62, 94, 96). İnsidens oranlarının 3-4 yaşlı köpeklerde % 4.4, 8 yaşlı köpeklerde %29, 8 yaş üstü köpeklerde ise %67 olduğu saptanmıştır (95). Köpek meme tümörlerinin yaş ile ilişkisini inceleyen ve 214 meme tümörlü köpeğin

kullanıldığı bir çalışmada, 10 yaşından sonra tümör görülme riskinin arttığı dikkati çekmiştir (96). Bunun yanı sıra, 90 dişi köpekte bulunan 236 meme tümörü olgusunun yaşla ilişkisini araştıran başka bir çalışmada ise benign meme tümörleri için ortalama ideal yaşın 8.5, malign meme tümörleri için de 9.5 olduğu rapor edilmiştir (82).

Köpeklerde meme tümörlerinin görülme oranı ile kısırlaştırma operasyonu arasında da ilişki bulunmaktadır. Dişi köpeklerde, erken ovarrektomi (2.5 yaşından önce) meme bezi tümörlerine karşı koruyucu bir önlem olarak önerilmektedir (2, 81).

Köpeklerde meme tümörlerinin görülme riski ırklar arasında da farklılıklar göstermektedir. En yüksek risk grubunu Dachshund ve Pointer ırkı köpekler; yüksek risk grubunu English setter, German shorthaired pointer, Irish setter, Brittany spaniel, English springer spaniel, Labrador retriever, Great pyrenees, Samoyed, Airedale terrier, Miniature poodle ve Keeshond ırkı köpekler; düşük risk grubunu ise Boxer, Collie, Beagle ve Chihuahua gibi köpek ırkları oluşturmaktadır (57, 62, 96).

2.3. Köpek Meme Tümörlerinde Prognoz

Meme tümörlerinin gelişim hızının yüksek olması, tümörün boyutu, ülserleşmesi gibi bazı bulgular kötü huyluluğun belirtileri olmasına rağmen, özellikle köpeklerde sadece bu bulgulara bakarak postoperatif olarak benign ve malign meme tümörlerinin ayrımını yapmakta ve prognozu belirlemede büyük güçlükler bulunmaktadır (1, 67). Son dönemlerde beşeri hekimlikte yaygın olarak kullanılan ve özellikle tümörlerin tanısı ile prognozunu belirlemede diğer yöntemlerden daha güvenli olarak kabul edilen immunohistokimyasal yöntemler veteriner hekimliğinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (4, 13, 43, 70, 74). Ayrıca, meme tümörlerin prognozunu tayin etmede TNM sistemi de kabul görmektedir. Bu sistem tümörün büyüklüğünü (T), metastaza uğrayan lenf düğümünü (N) ve uzak organ metastazlarını (M) ortaya koymaktadır (24, 94).

Meme tümörlerinde prognoz ilk mastektomiden sonra 1 ya da 2 yıl hayatta kalan hayvanların yüzdesi olarak ifade edilir (57). Köpeklerde ilk mastektomiden sonra 2 yıl hayatta kalma oranının %25-40 arasında değişkenlik gösterdiği dikkati çekmiştir (39).

Tanı sırasında görülen metastazların kötü prognozun bir göstergesi olduğu ve mastektomi sonrası ölümlerin temel sebebinin meydana gelen metastazlar olduğu bildirilmiştir. Köpek meme tümörlerinde metastazların en çok akciğer ve torasik bölgede meydana geldiği dikkati çekmiş ve bunların en önemli klinik bulgusunun da dispne olduğu rapor edilmiştir (57, 79).

2.4. Köpek Meme Tümörlerinde Sınıflandırma

Köpek meme tümörlerinde birden farklı sınıflandırma yöntemi mevcut olmakla birlikte sunulan çalışmada World Health Organization–Armed Forces Institute of Pathology (WHO-AFIP) tarafından yapılan sınıflandırma tercih edilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre köpek meme tümörleri:

I. Malign meme tümörleri:

- 1.1 Non infiltratif (in situ) karsinom
- 1.2 Kompleks karsinom
- 1.3 Basit karsinom
 - 1.3.1 Tubulopapiller karsinom
 - 1.3.2 Solid karsinom
 - 1.3.3 Anaplastik karsinom
- 1.4 Karsinomların özel tipleri
 - 1.4.1 İğ Hücreli karsinom
 - 1.4.2 Yassı Hücreli karsinom
 - 1.4.3 Musinöz karsinom
 - 1.4.4 Lipidden zengin karsinom
- 1.5 Sarkomlar
 - 1.5.1 Fibrosarkom
 - 1.5.2 Osteosarkom
 - 1.5.3 Diğer sarkomlar
- 1.6 Karsinosarkom
- 1.7 Benign tümörde köken alan karsinom ya da sarkomlar

II. Bening meme tümörleri

1. Adenom

1.1 Basit adenom

1.2 Kompleks adenom

1.3 Bazaloid adenom

2. Fibroadeom

2.1 Az hücreli fibroadenom

2.2 Bol hücreli fibroadenom

3. Benign miks tümör

4. Duktal papillom şeklinde sınıflandırılırlar.

2.4.1. Bazı Önemli Köpek Meme Karsinom Tipleri

2.4.1.1. Non İnfiltratif (in situ) Karsinom

Bu lezyonlarda, histolojik olarak hücreler kanser hücreleri gibi görünmesine rağmen epitel tabakasında sınırlı kalırlar, bazal membran invazyonu yapmazlar. Sıklıkla multisentrik yerleşim gösterirken makroskopik olarak görülmezler (57, 93). Bu tümörlerde uzak organ metastazları görülmez (78).

2.4.1.2. Kompleks Karsinom

Köpeklerde sıklıkla görülen bu tümör tipinde, tümöre hem epitel hem de miyoepitel yapılar birlikte katılır (6, 50, 59). Epitel hücreleri tubulopapillar ya da solid örnekler oluştururlar. Kompleks karsinomlarda bulunan intertubuler iç şekilli hücreler hemen daima miyoepitel kökenlidirler. Bu hücreler immunohistokimyasal olarak düz kas aktin ve kalponin ile pozitif reaksiyon verirler (4, 54, 57, 59). Bir çalışmada, kalponinle pozitif immunoreaksiyon gösteren 4 farklı miyoepitel hücre tipi bildirilmiştir. Bunlar, hipertrofik, iç, yıldız ve yuvarlak şekilli miyoepitel hücreleridir (59). Bazı kompleks karsinom olgularında merkezi nekrozlar ve mitotik figürler bulunabilir (69, 71). Ekspansif gelişme kompleks karsinomlarda yaygın olarak görülür, lenfatiklerle yayılma ise ender olarak dikkati çeker (yaklaşık %10) (59, 69, 75, 71). Bu kanser tipinde ortalama sağ kalım süresi ise 10 ay olarak bildirilmiştir (57).

2.4.1.3. Basit Karsinom

Basit karsinomlar tek tip hücrelerden oluşan tümörlerdir (55). Tümöre miyoepitel hücreler katılmazlar, sadece epitel hücrelerinde atipik proliferasyon görülür. Bu tümörler yüksek oranda çevre dokulara ve damarlara infiltrasyon eğilimi gösterirler (9, 50, 57, 69). İnvazyon sonrası bölgesel lenf düğümleri, uzak lenf düğümleri ve akciğere metastaz riski yüksektir (94). Basit karsinom tiplerinde ortalama sağ kalım süresi ise 10-12 ay olarak bildirilmiştir (57). Bu karsinom tipi malignitenin artışına göre tubulopapiller karsinom, solid karsinom ve anaplastik karsinom olarak 3'e ayrılır (57, 71).

2.4.1.3.1. Tubulopapiller Karsinom

Meme bezi kanallarından köken alır, papillar çıkıntılar olsun ya da olmasın, tubulus oluşumları ile karakterizedir (36, 51, 56, 69, 71). Değişik lümen çaplarına sahip bu tubuluslar tek ya da çok katlı, kübik, kolumnar, silindirik ya da düzensiz şekilli lümen epitel hücreleri ile döşenmişlerdir (31, 86, 90). Bazı olgularda tubuluslarda genişlemeler dikkati çeker ve bunlar tubuler kistik adenokarsinom olarak isimlendirilirler. Papiller tip karsinomlarda, asiner ve tubuler yapılardan oluşan lümeneye doğru çok sayıda papiller çıkıntılar bulunur. Tubulusları örten atipik tümör hücrelerinin papiller çıkıntılar şeklinde proliferasyon oldukları dikkati çeker (37, 90).

2.4.1.3.2. Solid Karsinom

Solid karsinoma köpeklerde oldukça sık rastlanır. Bu tümör, atipik epitel hücrelerinin tubulus formasyonu ya da lümen oluşturmaksızın, solid örnekler şeklinde üremesi ile karakterizedir (31, 69, 71, 86). Tümör hücreleri genellikle uniform yapıdadır, bununla birlikte pleomorfizm yaygındır ve mitotik indeks yüksektir (6, 37).

2.4.1.3.3. Anaplastik Karsinom

Bu tümör tipinde oldukça pleomorfik epitel hücreleri dikkati çeker. Bunlar acayip şekilli nükleus ve nükleoluslara sahiptir. Bazı hücreler çok çekirdeklidir,

mitotik indeks oldukça yüksektir (54, 57, 69). Genellikle neoplastik hücreler interlobüler bağ dokusuna ve lenf damarlarına invazyon gösterir (34). Anaplastik dev hücreli meme karsinomu sık olmamakla birlikte sadece dişi köpeklerde görülmüştür (6).

2.5. Meme Tümörlerinde Kullanılan Bazı Önemli Prognostik Markırlar

Proliferasyon indeksi, hücre siklusu ilişkili PCNA ve Ki-67 gibi markırlar tarafından belirlenir ve bunlar insan ve köpek meme karsinomlarında önemli prognostik faktörlerdir (17, 66, 97).

2.5.1. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

PCNA, 36 kDa ağırlığında, hücre siklusunun G₁ ve S fazında hücre çekirdeğinde bulunan, DNA polimeraz delta ko-faktör olarak görev yapan, nükleer bir proteindir (47, 72). Hücre siklusunun geç G₁ fazında artar, S fazında en yüksek seviyede sentezlenir ve uzun yarılanma ömrü olduğundan dolayı G₂ ile M fazında da yüksek oranda bulunur (10, 66). Siklin olarak da bilinen PCNA'nın asıl görevi hücre proliferasyonunu ve DNA replikasyonunu düzenlemektir (40). İnsan ve hayvan meme tümörlerinde yapılan farklı çalışmalarda, PCNA'nın güvenilir bir proliferasyon markırı olarak kullanıldığı bildirilmiş ve meme karsinomlarında olumsuz prognozun iyi bir göstergesi olabileceği ortaya konmuştur (29, 66, 97).

2.5.2. Ki-67

Ki-67, G₀ fazında ekprese olmayan, hücresel siklusun G₁, S, G₂ ve mitoz gibi aktif fazlarında ortaya konabilen, 345-395 kDa ağırlığında, nonhiston bir proteindir (14, 33). Ki-67'nin köpek meme kanserlerinde prognozun belirlenmesi ile cerrahi tedavi sonrası kanserin davranışının ortaya konmasında objektif bir prognostik parametre olduğu bildirilmiştir (66, 97). İnsan meme kanserlerinde yapılan çalışmalarda Ki-67 ekspresyonu ile mitotik indeks, tümör boyutu, histolojik grade ve lenf yumrularına ilgi gibi prognostik faktörler arasında direkt korelasyon olduğu dikkati çekmiştir (8, 46, 91).

2.5.3. Nektin-4

Nektin ailesi, kalsiyuma bağımlı olmayan immunoglobulin-benzeri bir hücre adhezyon molekül ailesidir ve Nektin-1, -2, -3, -4 olmak üzere 4 üyesi bulunmaktadır. Bu moleküllerden Nektin-1, -2 ve -3'ün erişkin dokularında yüksek miktarda ekspresyonuna rastlanırken, Nektin-4'ün özellikle embriyo ve plasentada ekspresyonlarına rastlandığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, son yapılan çalışmalarda Nektin-4'ün insanda hem tümör hücre hatlarında hem de insan meme karsinomlarında yüksek ekspresyon gösterdiği ortaya konmuştur. Ancak normal insan meme dokusunda ekspresyonuna rastlanmamıştır. Bu nedenle Nektin-4, özellikle insan meme karsinomlarında spesifik tümör ilişkili bir antijen olarak kabul edilmektedir (16, 27, 63, 85). Nektin-4'ün aynı zamanda kızamık virüsü (Morbillivirüs) için epitel hücre reseptörü olduğu da ortaya koymuştur. Bu keşif, Morbillivirüsün meme karsinomlarında Nektin-4'ü hedef alan onkolitik tedavi edici bir ajan olarak kullanılması konusunda gelecekte yapılacak kanser araştırmalarına ışık tutmaktadır (27, 64).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada materyal olarak, 2008-2015 yılları arasında Burdur, Antalya, Isparta illerindeki özel veteriner kliniklerinden %10'luk formalin solüsyonu içinde rutin teşhis amacıyla Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilen, WHO-AFIP tarafından kullanılan sınıflandırma göz önünde bulundurularak incelenmiş ve değişik tipte karsinom teşhisi konmuş toplam 30 adet köpeğe ait bloklanmış meme dokusu örneği (13 adet tubulopapiller karsinom ve 17 adet kompleks karsinom) kullanıldı. Kontrol olarak rutin nekropsilerde meme tümörü bulunmayan 5 adet köpekten alınan normal meme dokusu örnekleri değerlendirildi. Materyallerin ait oldukları hayvanlara ilişkin ırk, yaş ve tümörlerin meme loblarına göre dağılımı Tablo 3.1.'de verilmiştir.

3.2. Histopatolojik İnceleme

Bloklanmış tümör dokusu örneklerinden 5 µm kalınlığında normal ve Poly-L-lysin'li (Thermo Scientifica Menzel-Glaser) lamlara seri kesitler alındı (mikrotom, Leica RM 2155). Normal lamlara alınan kesitler, hematoksilin ve eozin (HE) ile boyandı (48). Poly-L-lysin'li lamlara alınan kesitler ise immunohistokimyasal incelemeler için kullanıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus CX 21) incelendi ve mikroskopik dijital fotoğraflar (Olympus DP26) çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

Tablo 3.1. Gönderilen meme tümörlerinin ait oldukları hayvanlara ilişkin ırk, yaş ve tümörlerin meme loblarına göre dağılımı.

Olgu	İrk	Yaş	Tümörlerin meme loblarına dağılımı
1	Bilgi kaydı yok	7	Bilgi kaydı yok
2	Bilgi kaydı yok	3	Bilgi kaydı yok
3	Bulldog	14	Sol/sağ inguinal
4	Bilgi kaydı yok	17	Sağ meme lobları
5	Terrier	14	Sağ kraniyal abdominal
6	Terrier	Bilgi kaydı yok	Sağ kaudal abdominal
7	Golden retriever	9	Bilgi kaydı yok
8	Terrier	15	Bilgi kaydı yok
9	Kırma	6	Bilgi kaydı yok
10	Alman kurt	13	İnguinal
11	Bilgi kaydı yok	Bilgi kaydı yok	Bilgi kaydı yok
12	Bilgi kaydı yok	12	Bilgi kaydı yok
13	Bilgi kaydı yok	Bilgi kaydı yok	Bilgi kaydı yok
14	Setter	8	Sağ meme lobları
15	Bilgi kaydı yok	10	Bilgi kaydı yok
16	Kırma	10	Bilgi kaydı yok
17	Alman kurt	Bilgi kaydı yok	Bilgi kaydı yok
18	Golden retriever	9	Torakal meme lobları
19	Kırma	6	Bilgi kaydı yok
20	Volpino	12	Bilgi kaydı yok
21	Terrier	12	Kaudal abdominal
22	Alman kurt	12	Bilgi kaydı yok
23	Terrier	8	Sağ kaudal abdominal
24	Cocker	12	Sağ inguinal
25	Bilgi kaydı yok	Bilgi kaydı yok	Bilgi kaydı yok
26	Terrier	11	Bilgi kaydı yok
27	Kırma	16	Bilgi kaydı yok
28	Bilgi kaydı yok	Bilgi kaydı yok	Kraniyal abdominal
29	Kafkas çoban	11	Bilgi kaydı yok
30	Bilgi kaydı yok	11	Bilgi kaydı yok

3.3. İmmunohistokimyasal İnceleme

İmmunohistokimyasal incelemeler için Poly-L-lysin'li lamlara alınan kesitlere Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) metot [avidin-biotin peroxidase complex, Abcam Rabbit Specific HRP/DAB detection IHC Kit, ab64261, UK] ilgili firmanın önerdiği şekilde dokulara uygulandı. Parafin kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinize ve rehidre edildi. Testin her aşaması nemli

kamarada gerçekleştirildi ve takipler arasında kesitler 3x5 dakika süreyle fosfat tamponlu solüsyonu (PBS, pH 7,2) ile yıkandı. Lamlar metanolde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 30 dakika süreyle inkübe edilerek dokuların endojen peroksidaz aktivitesi engellendi. Kesitler, spesifik olmayan antijenik bağlanmaları engellemek için, ticari %10'luk normal keçi serumunda, oda ısısında 10 dakika süreyle inkübe edildi. Sonraki adımda, lamlar Nektin-4, PCNA ve Ki-67 primer antikoları ile kaplandı ve +4 °C'de bir gece süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra lamlar, kullanıma hazır biyotinlenmiş sekonder antikor ile kaplandı ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Bunu takiben kesitler Streptavidin Peroksidaz konjugatı ile oda ısısında 15 dakika süreyle inkübe edildi ve 15 dakika DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) substratı uygulandıktan sonra işlem sonlandırıldı. Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra dokular alkol serilerinden geçirilip dehidre edildi. Ksilolde şeffaflandırılan kesitler yapıştırıcı (Entellan-Merck) ile kapatıldı. Tüm kesitlerin aynı şartlarda ve prosedürde boyanmasından sonra sonuçlar ve dokulardaki ekspresyon yoğunlukları ışık mikroskopunda (Olympus CX 21) semikantitatif olarak değerlendirildi. Bulgular, neoplastik hücrelerde Nektin-4'ün sitoplazmik ekspresyonuna bağlı olarak; ekspresyon yok (-); % 1-25 zayıf ekspresyon (+); % 26-50 orta derecede ekspresyon (++); % 51 ve üzeri kuvvetli ekspresyon (+++) şeklinde gruplandırıldı. PCNA ve Ki-67 için hücre çekirdeklerinde kahverengi boyanmalar pozitif kabul edildi ve her bir olguda X40'luk objektifte randomize seçilen 1000 tümör hücresi içindeki pozitif nükleer boyanma gösteren hücrelerin sayısı belirlendi. PCNA ve Ki-67 için; ≤ %5 pozitif hücre negatif (-); > %5 ile ≤ %25 arası pozitif hücre zayıf ekspresyon (+); > %25 ile ≤ %50 arası pozitif hücre orta derecede ekspresyon (++); ≥ %50 pozitif hücre ise kuvvetli ekspresyon (+++) olarak gruplandırıldı.

Kullanılan antikolar, bunların boyadığı dokular, sulandırma oranları ve hücresel yerleşimleri Tablo 3.2'de sunulmuştur.

Tablo 3.2. Kullanılan antikolar, sulandırma oranları ve hücresel yerleşimleri.

Antikor	Sulandırma oranları (PBS'de)	Hücresel yerleşim
Rabbit polyclonal Anti-Nectin-4 (Biorbyt/orb5809)	1/100-1/500	Sitoplazmik membran ve sitoplazma
Rabbit polyclonal Anti-PCNA (Abcam/ab2426)	1/500-1/1000	Nükleus
Rabbit polyclonal Anti-Ki67 (Abcam/ab15580)	1/200	Nükleus

3.4. İstatistiksel Analiz

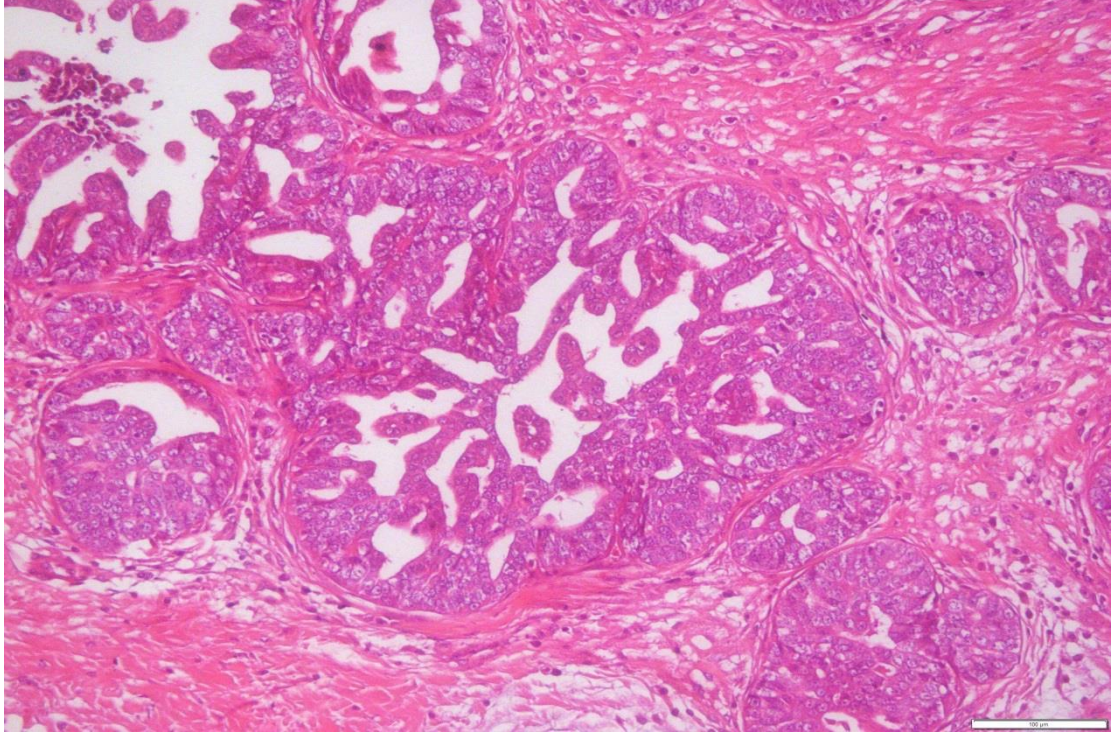
Araştırmada istatistiksel analizler Statistical Package for Social Science 22.0 yazılım paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu analizlerde 30 adet köpek meme karsinom olgusu kullanıldı. Bu tümör tiplerinde Nectin-4, Ki-67 ve PCNA'nın ekspresyon yoğunlukları karşılaştırıldı. Örneklem sayısının güvenilirliği Cronbach's alpha testi ile ortaya kondu. Kolmogorov-smirnov testi ile grupların parametrik test varsayımına uygun olup olmadığı belirlendi. Kullanılan markırlar arasındaki ilişkisinin korelasyonu Spearman korelasyon analizi ile tespit edildi.

4. BULGULAR

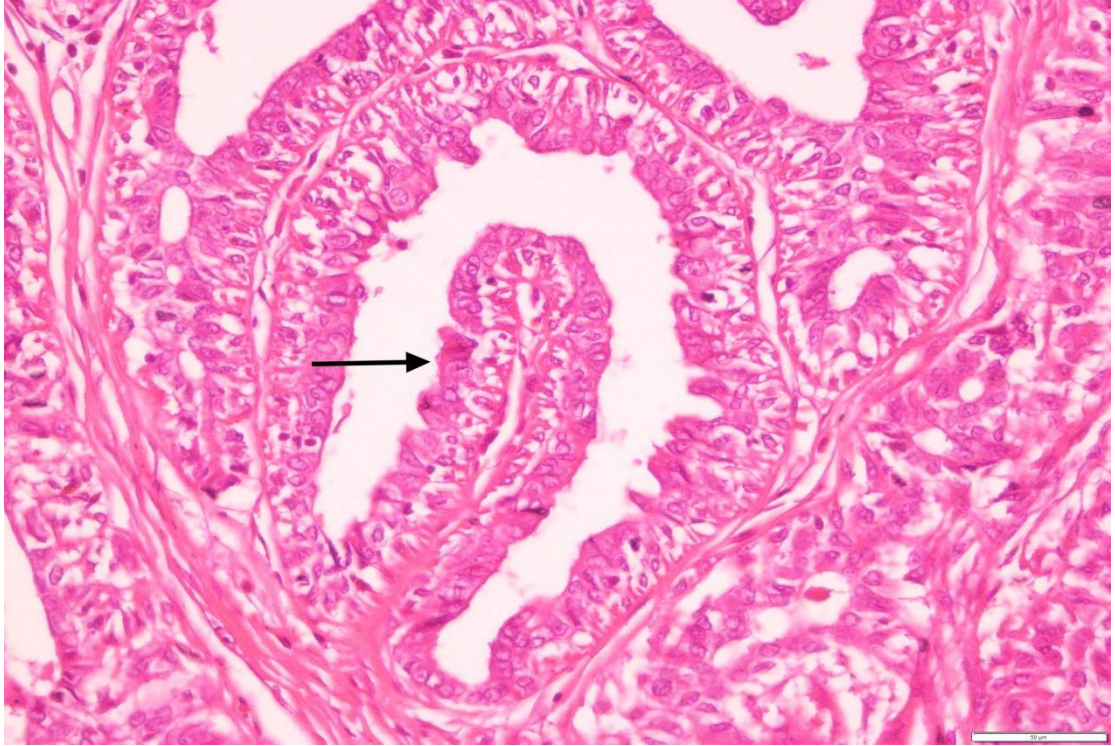
4.1. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik olarak 13 olgu tubulopapiller karsinom olarak teşhis edildi. Bu olgularda, meme bezi kanallarından köken alan epitel hücrelerinin değişik büyüklüklerde lümenleri bulunan tubuler yapılar oluşturdukları ve bu yapıların lümenlerine doğru atipik epitel hücrelerinden oluşan, geniş ya da dar tabanlı, papiller çıkıntılarının bulunduğu dikkati çekti. Bazı alanlardaki tubuluslarda ise papiller çıkıntılara rastlanmadı. Tubulusları döşeyen anaplastik epitel hücreleri farklı büyüklüklerde ve yuvarlaktan silindiriğe kadar değişen şekillerdeydi. Bu hücrelerde anizonükleozis, anizositosiz ve bazılarında hiperkromazi belirlendi. Tümörden tümöre farklılık göstermekle birlikte mitotik aktivite genelde orta derece yüksekti. Olguların genelinde bağ dokudan zengin geniş bir stroma bulunmaktaydı. Bazı olgularda stroma ve intertubuler alanlarda tümör hücreleriyle birlikte belirgin bir mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü.

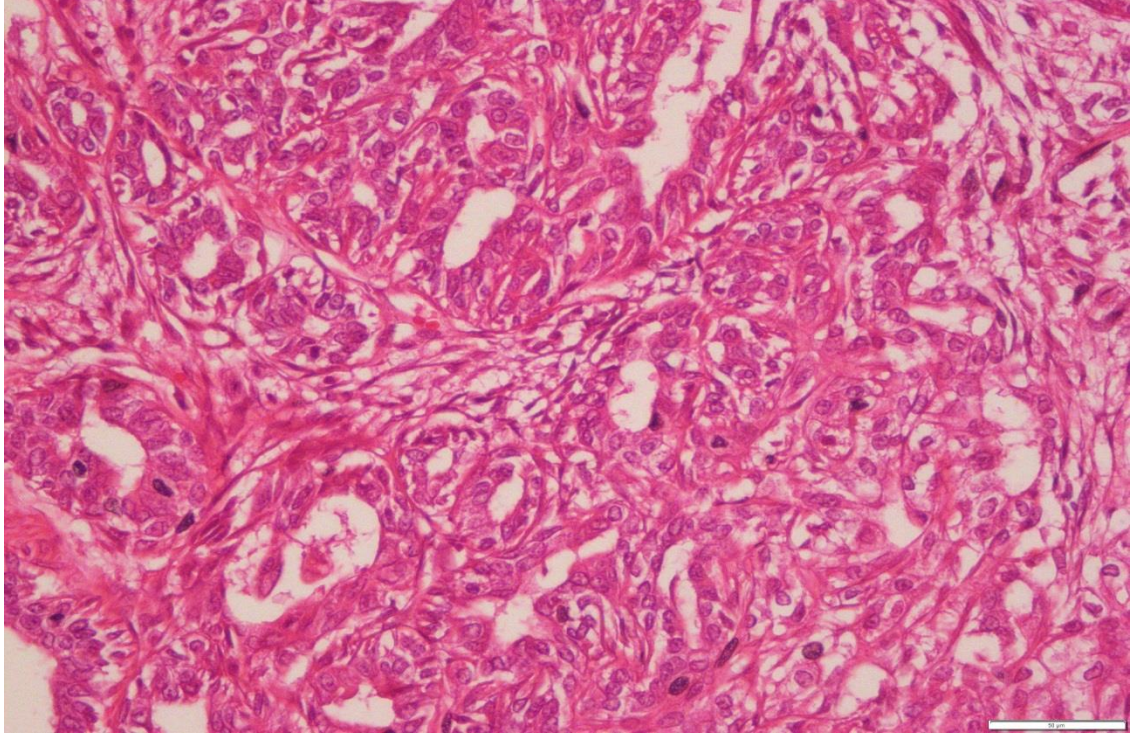
Histopatolojik olarak 17 olgu kompleks karsinom olarak değerlendirildi. Kompleks karsinom olgularında, epitel hücrelerinin tüm olgularda aynı zamanda tubulopapiller yapılar oluşturdukları görüldü. Tubulopapiller yapıları oluşturan lümen epitel hücrelerinde pleomorfizm oldukça belirgindi. Bu olguların hepsinde intertubuler alanlarda atipik, iğ şeklinde, myoepitel hücrelerin proliferasyonları dikkati çekti. Bazı olgularda yüksek, diğer olgularda ise orta derecede yüksek mitotik aktivite saptandı. On olguda embriyonal bağ dokunun oldukça arttığı alanlar belirlendi.



Şekil 4.1. Tubulopapiller karsinom; atipik epitel hücrelerinden oluşan tubuler yapılar ve bu yapıların lümenlerine doğru uzanmış papiller çıkıntılar, HE, Bar=100 µm.



Şekil 4.2. Tubulopapiller karsinom; atipik epitel hücrelerinden oluşan tubuler yapı ve bu yapının lümenine doğru uzanmış papiller çıkıntı (ok), HE, Bar=50 µm.



Şekil 4.3. Kompleks karsinom; atipik epitel hücrelerinden oluşan tubuler yapılar ve intertubuler alanda atipik iç hücreleri, HE, Bar=50 µm.

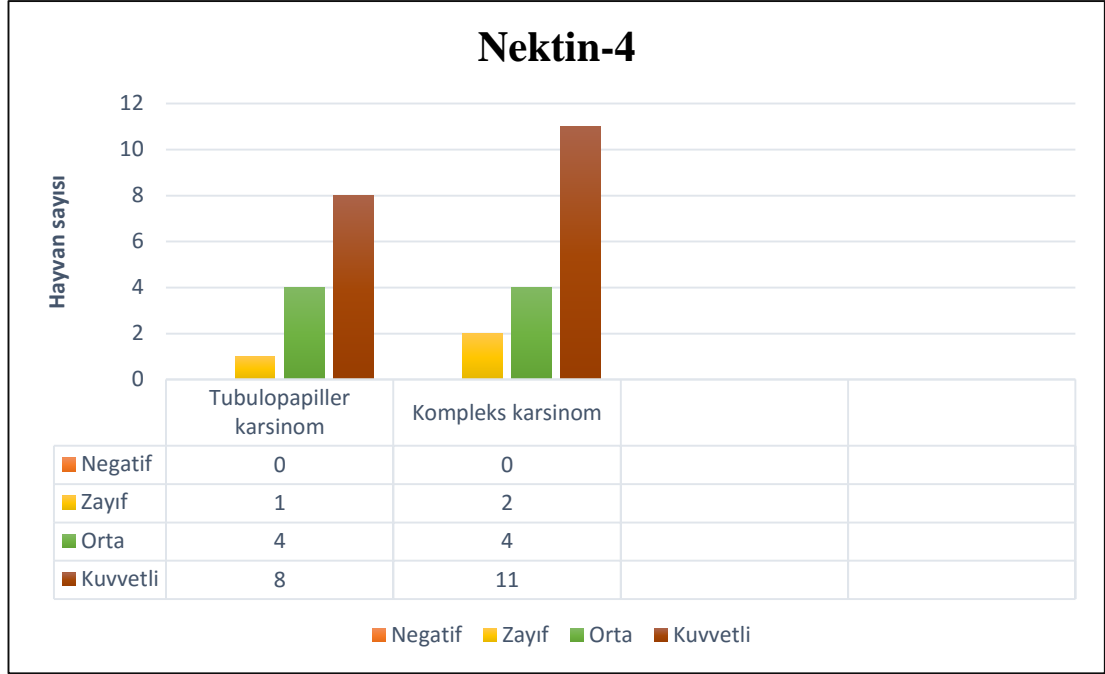
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol olarak meme tümörü bulunmayan 5 köpekten alınan normal meme dokusu örneklerinde Nektin-4 ile negatif; PCNA ve Ki-67 açısından ise negatif ya da zayıf immunoreaksiyon görüldü.

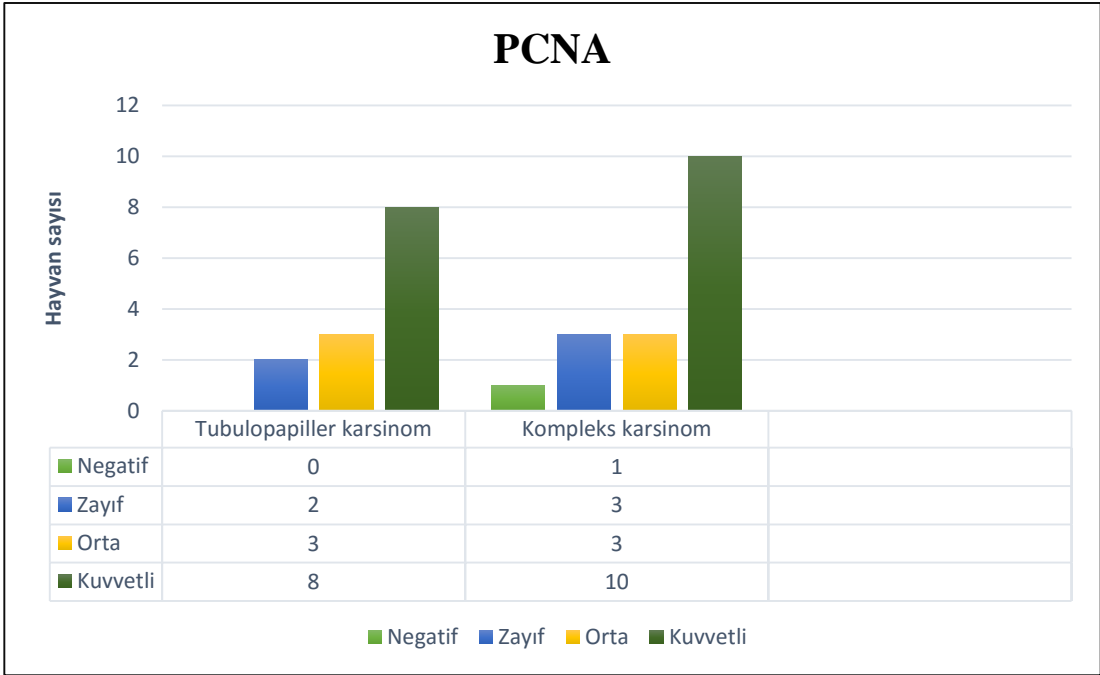
Tubulopapiller karsinom olgularında, tümör yapısına katılan epitel hücrelerinin sitoplazmalarında Nektin-4 ile 1 olguda zayıf, 4 olguda orta, 8 olguda kuvvetli ekspresyon; PCNA ile nükleer olarak 2 olguda zayıf, 3 olguda orta, 8 olguda kuvvetli; Ki-67 ile nükleer olarak 6 olguda negatif ve 7 olguda zayıf immunopozitiflik saptandı.

Kompleks karsinom olgularında, epitel hücrelerinin sitoplazmalarında ve sitoplazmik membranlarında Nektin-4 ile 2 olguda zayıf, 4 olguda orta, 11 olguda kuvvetli; PCNA ile nükleer olarak 1 olguda negatif, 3 olguda zayıf, 3 olguda orta, 10 olguda kuvvetli; Ki-67 ile nükleer olarak 7 olguda negatif, 9 olguda zayıf, 1 olguda orta derecede ekspresyon görüldü.

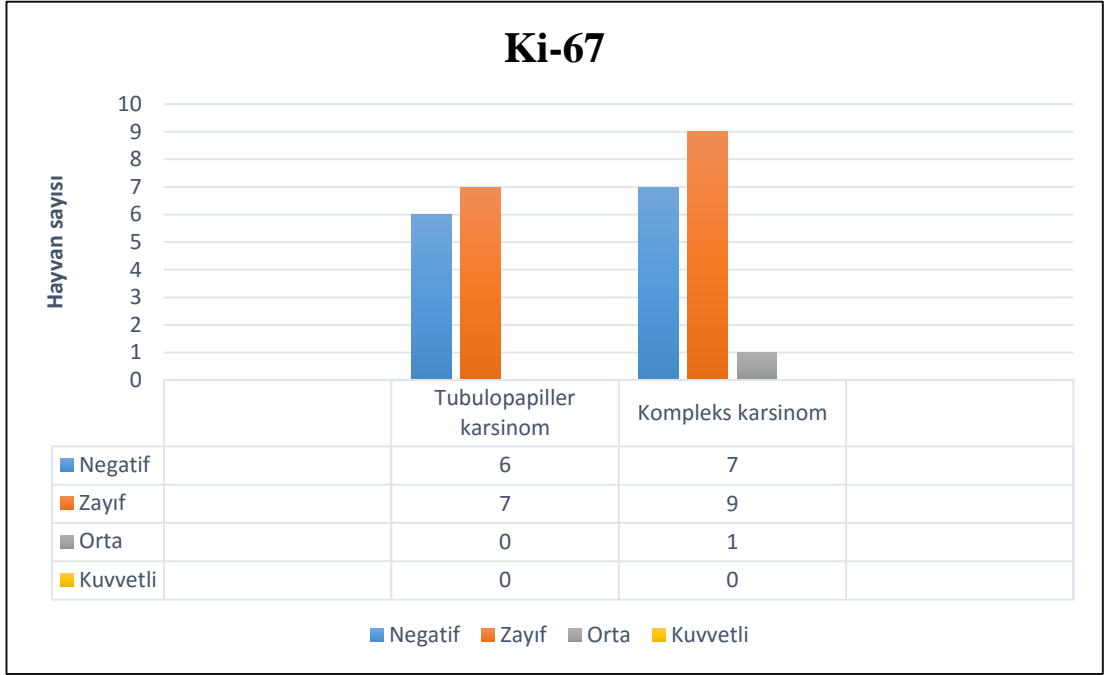
Nektin-4, PCNA ve Ki-67'nin tümör tiplerine göre ekspresyon yoğunlukları Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6'de belirtilmiştir.



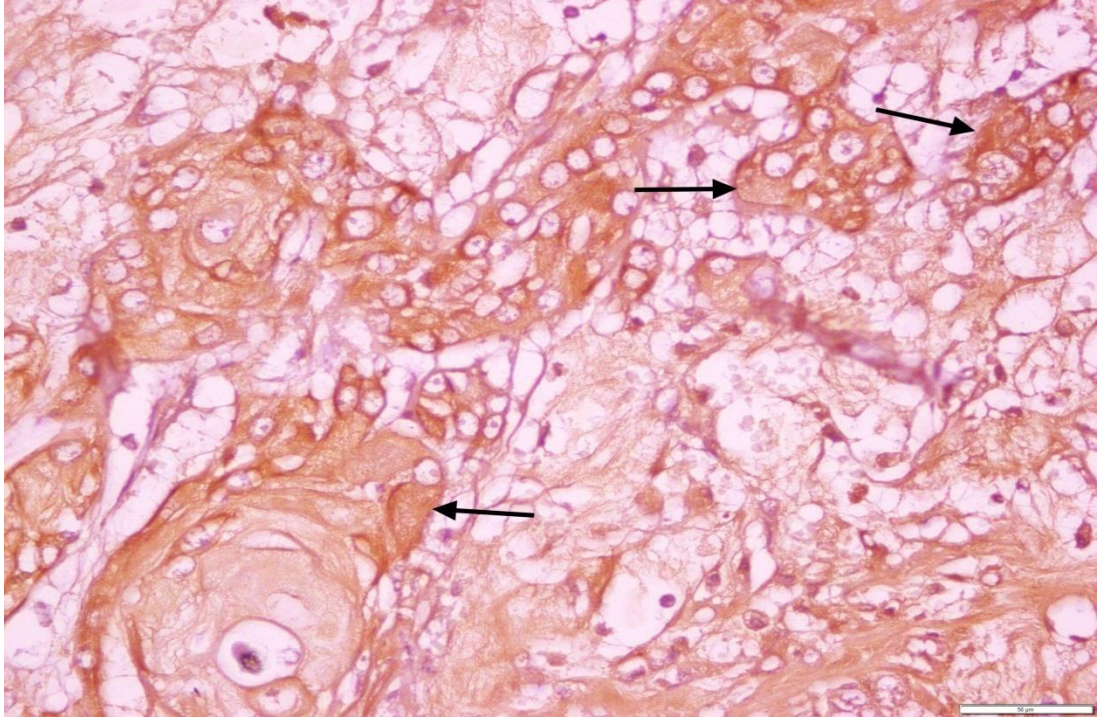
Şekil 4.4. Nektin-4'ün tümör tiplerine göre ekspresyon yoğunluğu



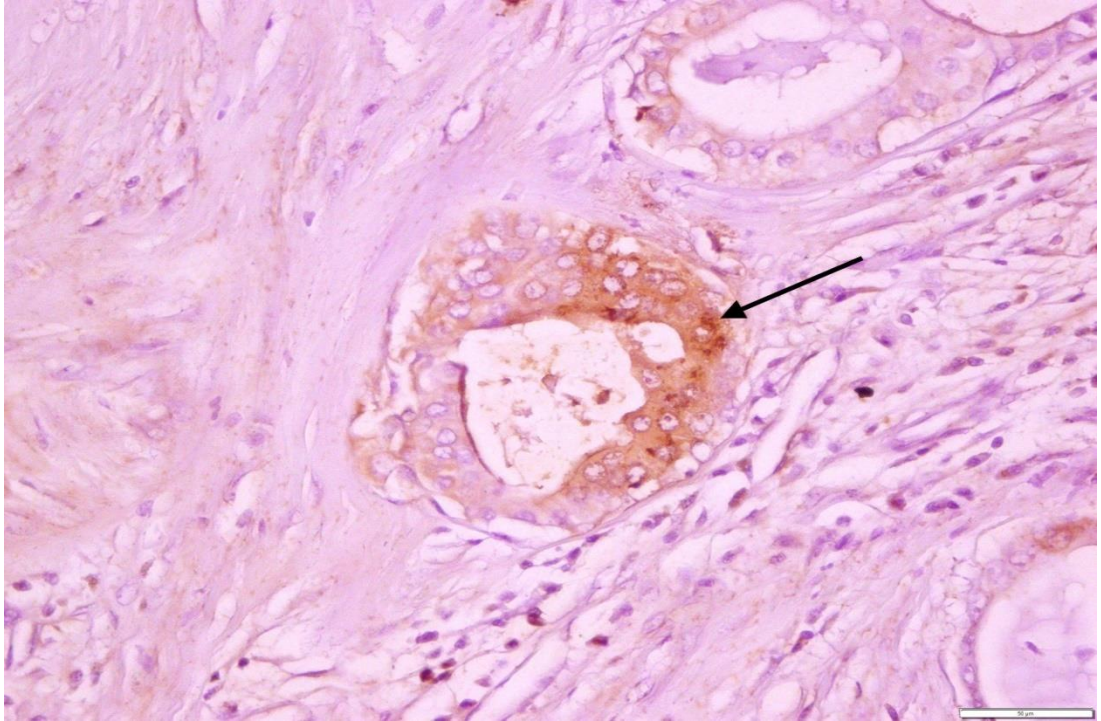
Şekil 4.5. PCNA'nın tümör tiplerine göre ekspresyon yoğunluğu.



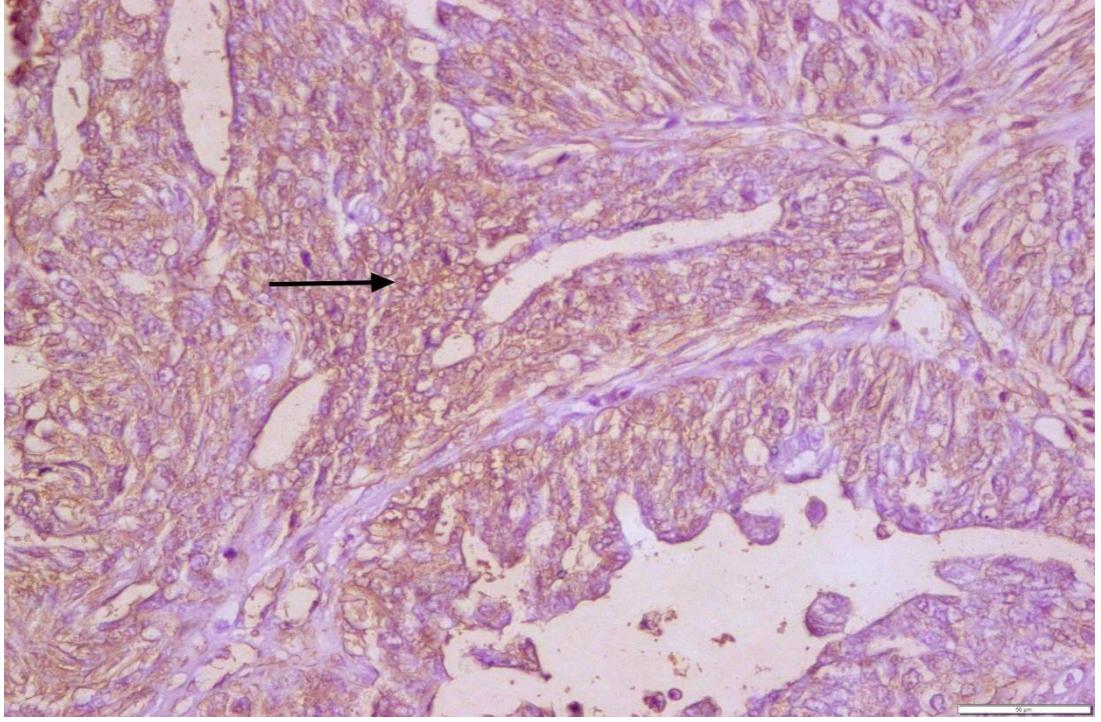
Şekil 4.6. Ki -67'nin tümör tiplerine göre ekspresyon yoğunluğu.



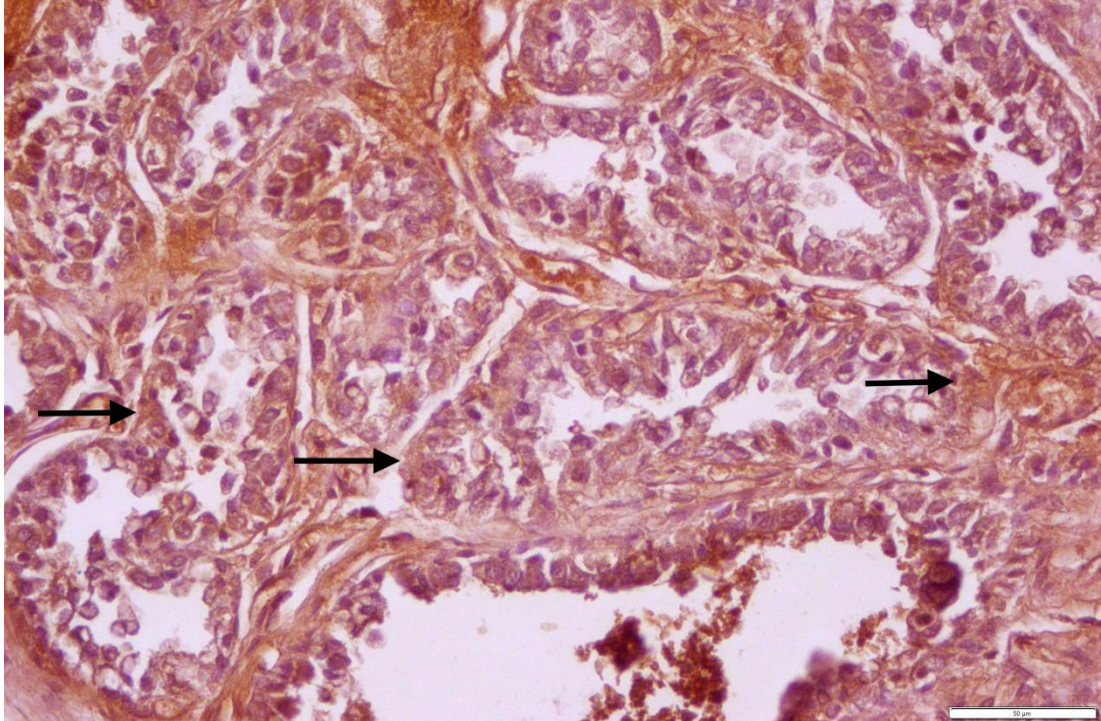
Şekil 4.7. Kompleks karsinom; Epitel hücrelerinde sitoplazmik Nektin-4 ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.



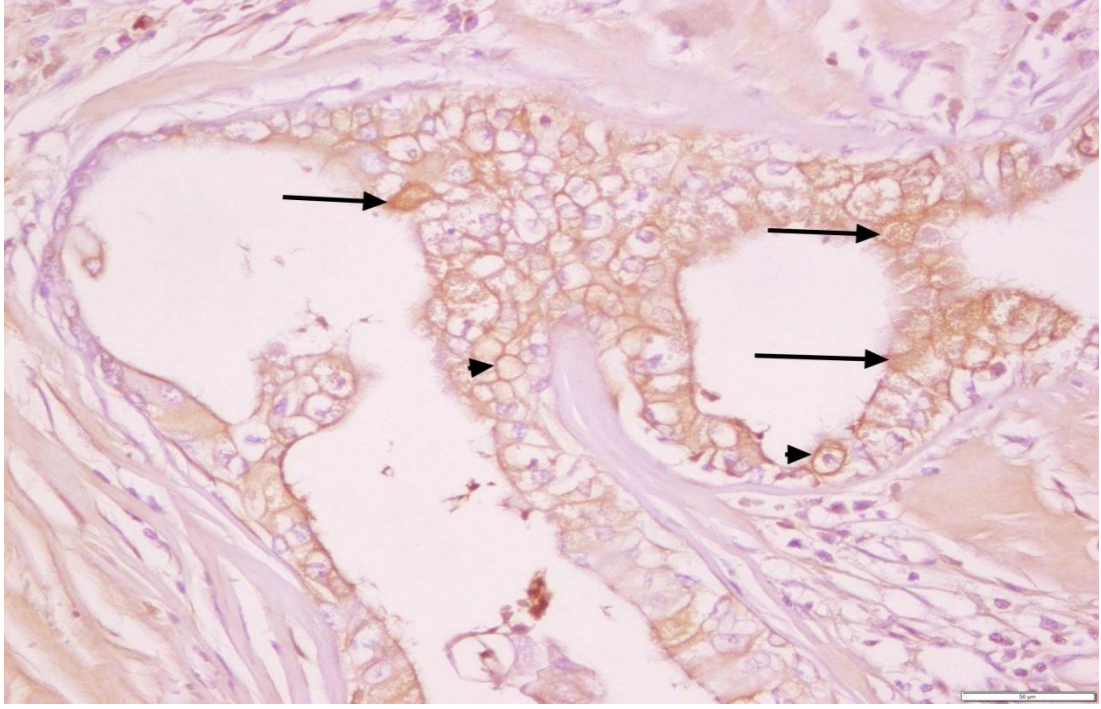
Şekil 4.8. Kompleks karsinom; Tubuler epitel hücrelerinde sitoplazmik Nektin-4 ekspresyonu (ok), ABC metot, Bar=50 µm.



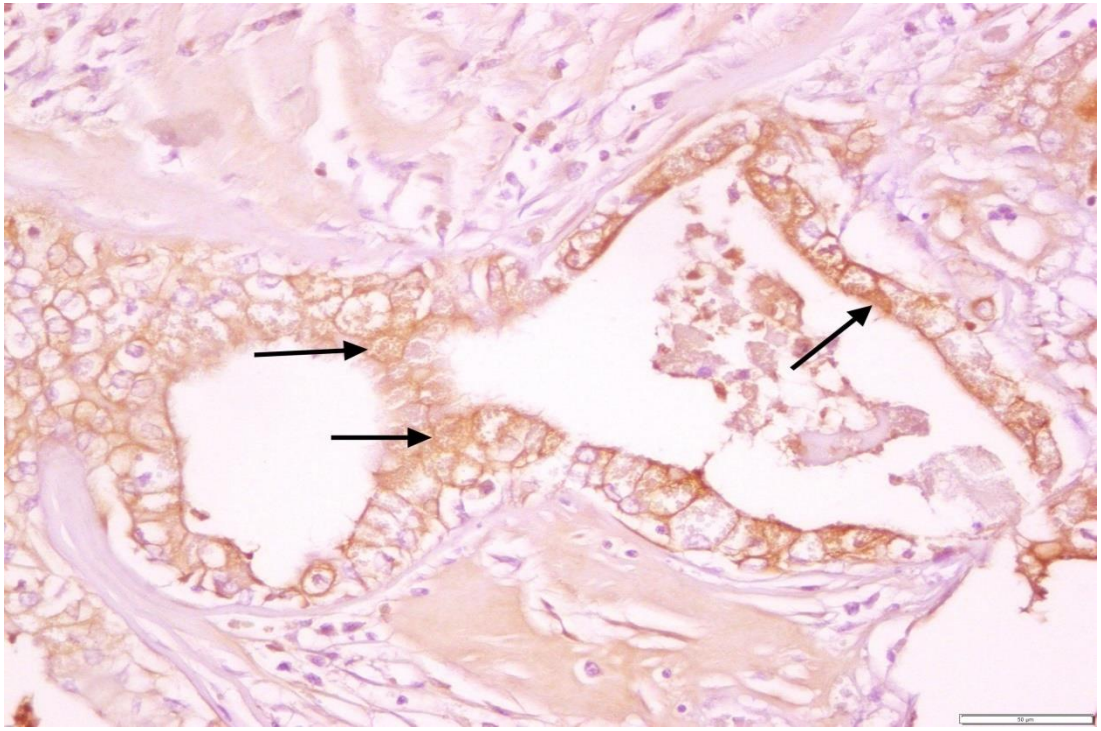
Şekil 4.9. Tubulopapiller karsinom; Epitel hücrelerinde sitoplazmik Nektin-4 ekspresyonu (ok), ABC metot, Bar=50 µm.



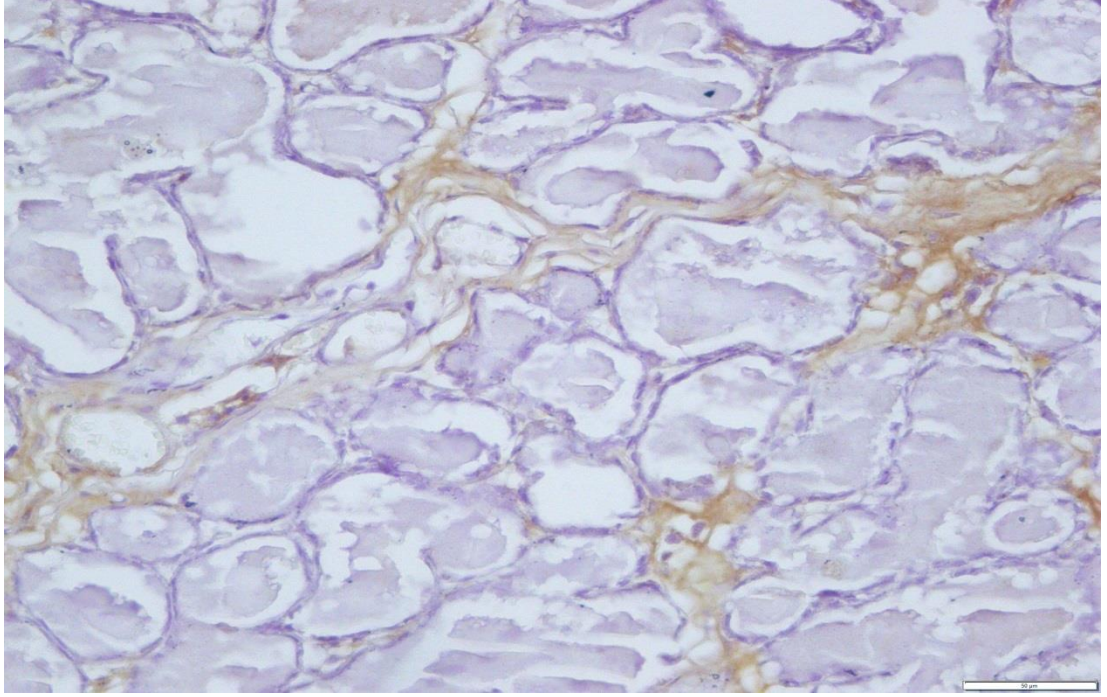
Şekil 4.10. Tubulopapiller karsinom; Epitel hücrelerinde sitoplazmik Nektin-4 ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.



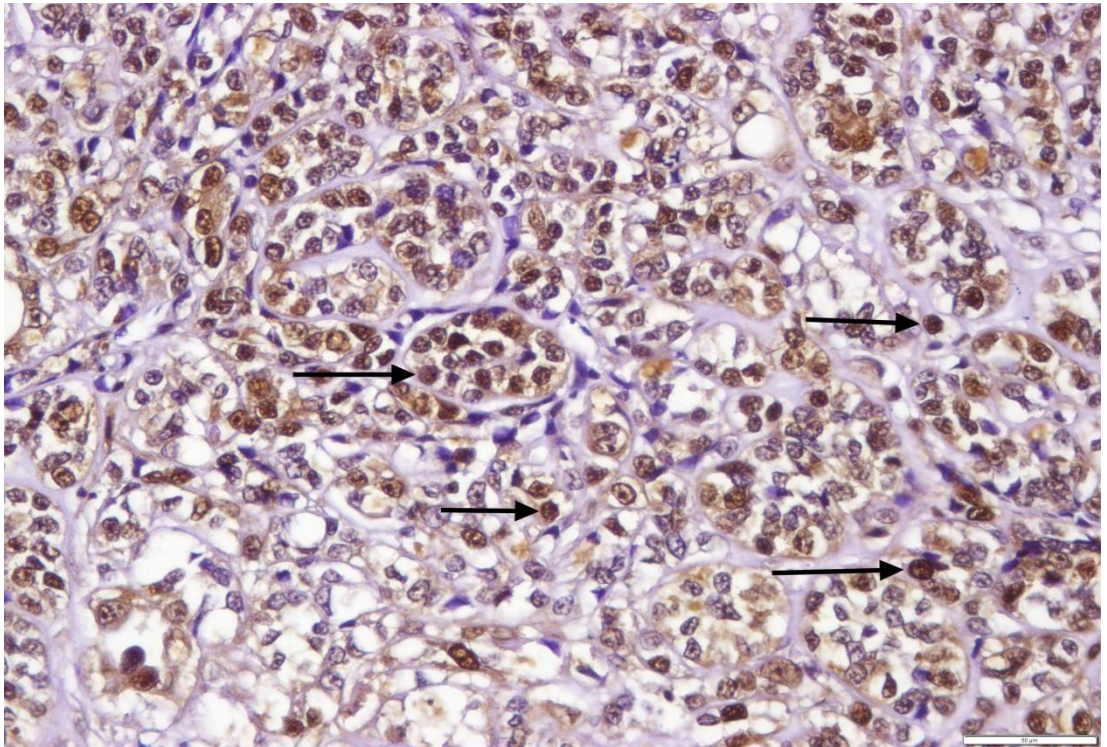
Şekil 4.11. Tubulopapiller karsinom; Tubuler epitel hücrelerinde sitoplazma (oklar) ve sitoplazmik membranda (ok başları) Nektin-4 ekspresyonu, ABC metot, Bar=50 µm.



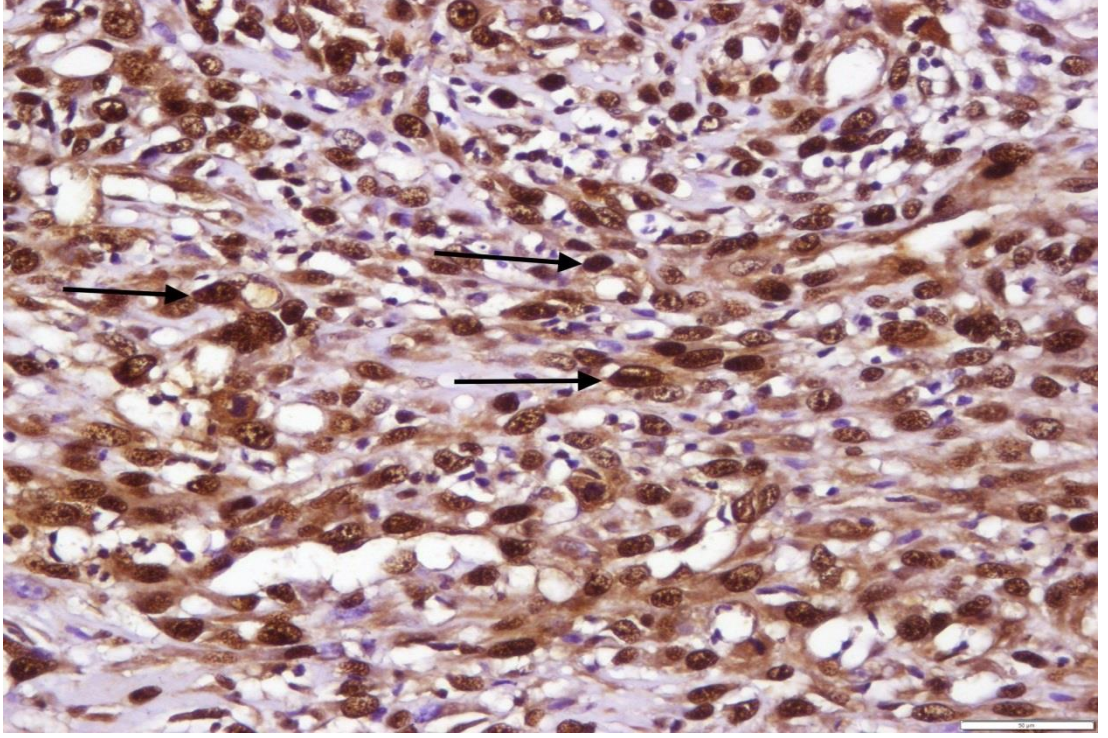
Şekil 4.12. Tubulopapiller karsinom; Tubuler epitel hücrelerinde sitoplazmik (oklar) Nektin-4 ekspresyonu, ABC metot, Bar=50 µm.



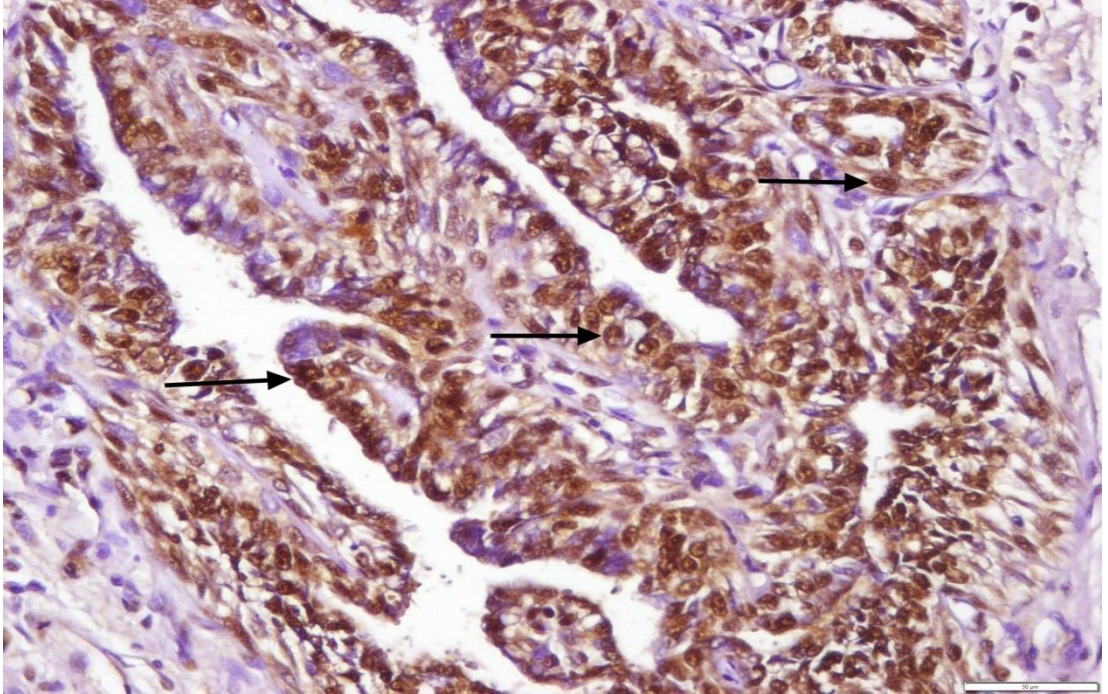
Şekil 4.13. Normal meme dokusunda Nektin-4 negatif boyanma, ABC metot, Bar=50 μ m.



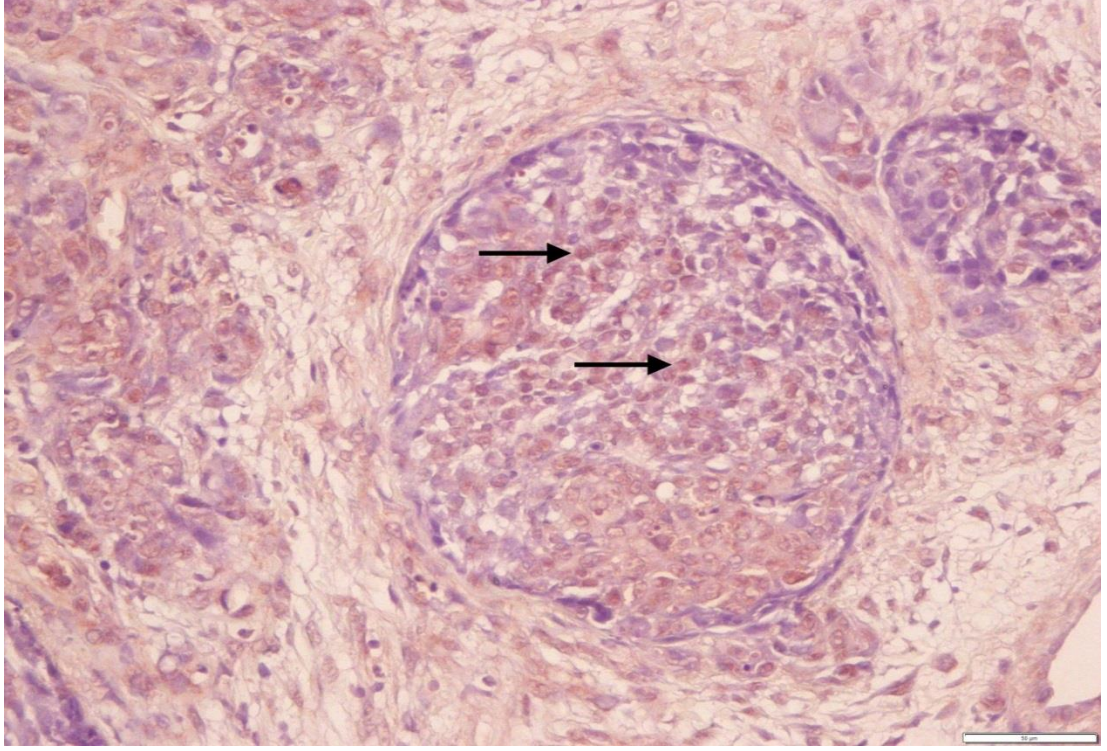
Şekil 4.14. Kompleks karsinom; epitel hücrelerinde nükleer PCNA ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 μ m.



Şekil 4.15. Kompleks karsinom; epitel hücrelerinde nükleer PCNA ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.



Şekil 4.16. Tubulopapiller karsinom; epitel hücrelerinde nükleer PCNA ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.



Şekil 4.17. Kompleks karsinom; tubuler epitel hücrelerinde nükleer Ki-67 ekspresyonu (oklar), ABC metot, Bar=50 µm.

4.3. İstatistiksel bulgular

Her olgu için 0-3 arasında değişen “ekspresyon yoğunluk” skoru hesaplandı. Ölçeğin güvenilirlik analizi Cronbach’s alpha testine göre 0.85 olarak belirlendi. Bu değer 0.8-1 aralığında olup çok yüksek güvenilir olarak değerlendirildi. Kolmogorov-smirnov testi sonucunda grupların non parametrik özellikte olduğu görüldü. Spearman korelasyon analizinden elde edilen sonuçlar tablo 4.1’de sunuldu. Spearman korelasyon analizi katsayısının yorumuna göre markırlar arasında korelasyon katsayıları 0.70-0.89 aralığında yer aldığı için pozitif yönde doğrusal ve yüksek bir korelasyon tespit edildi.

Tablo 4.1. Spearman korelasyon analizi verileri

	Nektin-4	PCNA	Ki-67
Nektin-4 Korelasyon katsayısı (r)	1.000	0.722**	0.719**
p katsayısı	-	0	0
N	30	30	30
PCNA Korelasyon katsayısı (r)	0.722**	1.000	0.884**
p katsayısı	0	.	0
N	30	30	30
Ki-67 Korelasyon katsayısı (r)	0.719**	0.884**	1.000
p katsayısı	0	0	.
N	30	30	30

** . Korelasyon $p=0.01$ düzeyinde anlamlıdır.

5. TARTIŞMA

Kanser, yüzyıllar boyunca varlığı ile önemini kaybetmemiş ve tıp dünyasında araştırmaları en çok desteklenen konu olmuştur (3, 41). Köpeklerin insanlarla bir arada yaşarken, modern yaşam içinde karşı karşıya kaldıkları kanserojen etkenlerin artması ile iyi bakım ve beslenme gibi hayat standartlarının yükselmesine paralel olarak yaşam sürelerinin uzaması birlikte genel olarak tümörlerin, özel olarak da meme tümörlerinin görülme oranını arttırmıştır (24, 44, 92). Köpek meme tümörleri, dişi köpeklerin en yaygın görülen tümörleri olmakla birlikte, köpeklerde görülen tümörlerin ortalama %24-42'sini oluşturmaktadır (28). Sunulan çalışmada kompleks karsinom ve tubulopapiller karsinom teşhisi konan toplam 30 köpeğe ait bloklanmış meme dokusu örneklerinde histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler yapılarak elde edilen bulgular istatistiksel bulgularla birlikte değerlendirildi.

Veteriner hekimliğinde meme tümörlerinin tanısı genellikle histopatolojik bulgulara göre yapılmaktadır (38). Bu tanı yöntemi ile lezyonun tanımlanması, çevre dokulara infiltrasyonun varlığı, pleomorfizm, nekroz, yangı, mitotik indeks ve diferansiyasyon derecesi gibi histomorfolojik ayrıntılar da belirlenmektedir (94). Histopatolojik tanı yapılırken, köpek meme tümörlerinde değişik çalışmalarda farklı sınıflandırmalar kullanılmaktadır. Bununla birlikte, genel olarak WHO-AFIP tarafından kullanılan sınıflandırma tercih edilmektedir (57). Bu sınıflandırmaya göre köpeklerde malign meme tümörleri çoğunlukla karsinom veya karsinosarkomlar olarak teşhis edilmektedir (49). Bu çalışmada da WHO-AFIP tarafından kullanılan sınıflandırma göz önünde bulundurularak 13 olgu tubulopapiller karsinom, 17 olgu kompleks karsinom olarak teşhis edildi ve bunlarda immunohistokimyasal olarak Nektin-4, PCNA ve Ki-67 ekspresyonları karşılaştırmalı olarak incelendi.

Köpek meme tümörleri oluşumu ve gelişiminde yaşın önemli bir role sahip olduğu ve hayvanın yaşının artması ile birlikte tümörlerin görülme sıklığının da arttığı dikkati çekmiştir (11, 57). Genellikle orta yaşlı ve yaşlı köpeklerde meme tümörlerinin daha sık meydana geldiği bildirilmiştir (80). Meme tümörleri, 2 yaşından küçük köpeklerde daha ender görülmesine rağmen 6 ve 7 yaşlı köpeklerde ciddi artış göstermektedir (62, 94, 96). Ayrıca 10 yaş üstü köpeklerde meme tümörü görülme riskinin arttığı, meme tümörü görülme yaş ortalamasının ise 10-11 olduğu rapor edilmiştir (2, 96). Sunulan çalışmada ise olguları oluşturan ve bilgi kaydı

mevcut olan köpeklerin yaş ortalamasının 10.75 olduğu ve bunun daha önceki çalışmalarda bildirilen bulgularla uyumlu olduğu dikkati çekti.

Köpeklerde meme tümörlerinin görülme oranı ırklara göre farklılık göstermektedir. Meme tümörleri açısından en yüksek risk grubunda Dachshund ve Pointer ırkı köpekler yer alırken, English setter, German shorthaired pointer, Irish setter, Brittany spaniel, English springer spaniel, Labrador retriever, Great pyrenees, Samoyed, Airedale terrier, Miniature poodle ve Keeshond ırkı köpekler yüksek risk grubunda bulunmaktadır. Bununla birlikte, Boxer, Collie, Beagle ve Chihuahua ırkı köpekler düşük risk grubunu oluşturmaktadır (2, 57, 58, 96). Sunulan çalışmada, bilgi kaydı bulunan olguların %20'sini Terrier, %13.3'ünü Kıрма, %10'unu Alman kurt, %6.6'sını Golden retriever, %3.3'ünü Bulldog, %3.3'ünü Setter, %3.3'ünü Volpino, %3.3'ünü Cocker ve %3.3'ünü Kafkas çoban ırkları oluşturmuştur.

Tubulopapiller karsinom histopatolojik olarak meme bezi kanallarından köken alır, papiller çıkıntılar olsun ya da olmasın, tubulus formasyonları ile karakterizedir (36, 51, 56, 69, 71). Çalışmada tubulopapiller karsinom olarak teşhis edilen 13 olguda literatürlere uyumlu olarak bazı tubullerde papiller çıkıntılar olmasa da tümörü oluşturan alanlarda genel olarak atipik epitel hücreleri ile döşenmiş tubulopapiller oluşumlar dikkati çekti. Bu olgularda miyoepitel benzeri intertubuler iç hücre proliferasyonlarına ise rastlanmadı.

Kompleks karsinom, histopatolojik olarak atipik epitel ve miyoepitel yapıların bir arada proliferasyonu olduğu kompleks yapıda bir tümör tipidir (6, 50, 59). Bu tümör tipinde lümen epitel hücrelerinin hem tubulopapillar, hem de solid yapılar oluşturabildiği bildirilmiştir (19, 50, 59, 75). Sunulan çalışmada, teşhis edilen 17 olguda literatürlere uyumlu bir şekilde atipik epitel ve intertubuler yerleşimli iç şeklinde miyoepitel hücrelerin birlikte proliferasyonları görüldü. Bununla birlikte tüm olgularda epitel hücrelerinin aynı zamanda tubulopapiller yapılar oluşturdukları dikkati çekti.

Histopatolojik olarak tümörlerin diağnozunda malignitenin sitolojik kriterleri, anizositozis, anizonükleozis, nükleus/sitoplazma oranının nükleus lehine artması, nükleolusların sayısı, büyüklük ve şekillerindeki farklılıklar, düzensiz kromatin şekilleri, hücrelerde nükleer ve sitoplazmik membran bozulmaları, dev çekirdekli hücreler, mitotik aktivitede artış ve sellülarite gibi özellikler göz önünde

bulundurulmaktadır (4, 20, 21, 57). Bu çalışmada histopatolojik olarak tubulopapiller karsinom ve kompleks karsinom teşhisi konan olgularda literatürlere uyumlu bir şekilde anizositozis, anizonükleozis, hiperkromazi, yüksek veya orta derecede yüksek mitotik aktivite gibi malign sitolojik kriterler belirlendi.

Tümörlerin histopatolojik tanısında ve prognozunun belirlenmesinde kullanılan malignitenin sitolojik kriterlerinin yanında daha kesin ve güvenilir sonuçlar alabilmek için değişik markırlarla gerçekleştirilen immunohistokimyasal teknik de kullanılmaktadır (4, 87, 88). Bu markırlardan proliferasyon indeksini belirlemek amacıyla kullanılan PCNA ve Ki-67'nin insan ve köpek meme tümörlerinde prognostik açıdan önemli markırlar oldukları bildirilmiştir (47, 76, 97).

Asit nükleer bir protein olan PCNA, normal hücre siklusunun S fazında sentezlenen, miktarı G₁ fazında DNA sentezi başlangıcından önce en üst düzeye ulaşan, aynı zamanda DNA replikasyonu ve tamiri ile de ilişkili, immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilebilen prognostik bir faktördür (22, 53, 73). Siklin adıyla da bilinen PCNA'nın meme kanserlerindeki düzeyinin memedeki hücre proliferasyonuna eş değer bir şekilde yükseldiği tespit edilmiştir (22). Bir çalışmada, yüksek grade olduğu tespit edilen insan intrakistik papiller karsinom olgularında PCNA immunoreaktivitesiyle kendini gösteren hızlı bir proliferasyon aktivitesinin bulunduğu belirlenmiştir (42). Başka bir çalışmada ise köpeklerin malign meme tümörlerinde PCNA indeksinin histolojik malign grade ile pozitif korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (66). Sunulan çalışmada tubulopapiller karsinom olgularında PCNA ile nükleer olarak 2 olguda zayıf, 3 olguda orta, 8 olguda kuvvetli; kompleks karsinom olgularında ise 1 olguda negatif, 3 olguda zayıf, 3 olguda orta ve 10 olguda kuvvetli ekspresyonlar görüldü. Literatürlere uyumlu bir şekilde tümü malign olan çalışma olgularında yüksek oranda PCNA ekspresyonları dikkati çekti.

Ki-67, siklusun geç G₁, G₂, S ve M fazında eksprese olan non histon bir proteindir. Mitozdan sonra ekspresyonu hızlı olarak azalır ve ortadan kalkar (33). Özellikle insan meme karsinomlarında, diğer malignite parametreleriyle birlikte hücre siklusunun belli fazlarındaki hücrelerde Ki-67 ekspresyonlarının grade sisteminde başarıyla kullanıldığı belirtilmiştir (89). Köpek meme tümörlerinde PCNA ve Ki-67 ekspresyonlarının karşılaştırmalı olarak araştırıldığı bir çalışmada,

insan meme kanserlerinde olduğu gibi PCNA ekspresyonları daha yüksek oranda bildirilmiştir. Bu durum Ki-67 ekspresyonlarının hücre siklusunun belli fazlarında ortaya çıkmasına ve bununla birlikte PCNA'nın böyle bir kısıtlamaya tabii olmadan hem hücre siklusu hem de siklus dışı hücrelerde eksprese olmasına yorumlanmıştır (66). Köpek meme tümörlerinde Ki-67'nin metastaz oranı, tümöre bağlı ölüm oranı ve düşük hayatta kalım oranıyla pozitif korelasyon gösteren, PCNA gibi önemli bir diagnostik ve prognostik faktör olduğu rapor edilmiştir (66, 97). Bu çalışmada kullanılan olguların tümü malign tümör tipleri olmakla birlikte tubulopapiller karsinom olgularında nükleer olarak 6 olguda negatif, 7 olguda zayıf Ki-67 immunpozitifliği; kompleks karsinom olgularında ise 7 olguda negatif, 9 olguda zayıf ve 1 olguda orta derecede Ki-67 immunpozitifliği tespit edildi. İstatistiksel olarak, literatürlere uygun bir şekilde, çalışmanın tümü malign olan olgularında Spearman korelasyon analizine göre PCNA ve Ki-67 arasında $r: 0.884$ olarak pozitif yönde doğrusal ve yüksek bir korelasyon tespit edildi.

Nektin ailesi içinde bulunan moleküller, hücre-hücre adezyonlarında temel rol oynarlar ve epitel hücrelerinde adherent hücre junction komponentleri olarak görev alırlar. Bu moleküllerden Nektin-1, -2 ve -3'ün erişkin dokularında yüksek miktarda ekspresyonuna rastlanırken, Nektin-4'ün normal olarak sadece embriyo ve plasentada ekspresyonlarına rastlandığı bildirilmiştir (27, 84). Bununla birlikte, normalde sadece plasenta dokusunda ekspresyonlarına rastlanan Nektin-4'ün insanlarda akciğer, over ve meme duktal karsinomları gibi değişik kanser tiplerinde yüksek ekspresyonlarının görülmesi, normal insan meme dokusunda ise ekspresyonuna rastlanmaması, bu molekülün özellikle insan meme karsinomlarında malignite ile ilişkili, spesifik bir prognostik değer olduğunu ortaya koymaktadır (16, 27, 63, 85). İnsan tümörlerinde yapılan çalışmalarla birlikte veteriner hekimliği alanında yapılan bir çalışmada, Nektin-4'ün keçilerin enzootik nazal adenokarsinomlarının diaagnozunda ve prognozunun belirlenmesinde potansiyel ve değerli bir biyomarkır olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (5). Sunulan çalışmada, tubulopapiller karsinom olgularında sitoplazmik olarak 1 olguda zayıf, 4 olguda orta, 8 olguda kuvvetli Nektin-4 ekspresyonu; kompleks karsinom olgularında 2 olguda zayıf, 4 olguda orta ve 11 olguda kuvvetli Nektin-4 ekspresyonu dikkati çekti. Normal meme dokularında ise Nektin-4 ekspresyonuna rastlanmadı. Literatürlere

uygun bir şekilde, sunulan çalışmanın materyalini oluşturan ve malign karakterli olan tüm olgularda değişik yoğunluklarda Nektin-4 ekspresyonlarına rastlandı. İstatistiksel olarak da ekspresyon yoğunlukları açısından Spearman korelasyon analizine göre Nektin-4 ile PCNA arasında $r: 0.722$ ve Ki-67 arasında $r: 0.719$ olmak üzere pozitif yönde doğrusal ve yüksek bir korelasyon saptandı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada önceki çalışmalarla paralel olarak, köpek meme karsinomlarında prognozun belirlenmesinde PCNA ve Ki-67 immunoreaktivitelerinin önemli rolü olduğu ve bunların arasında pozitif yönde yüksek bir korelasyon bulunduğu teyit edildi. Ayrıca, köpek meme karsinomlarında Nektin-4 ile PCNA ve Ki-67 arasında ekspresyon yoğunlukları açısından pozitif yönde doğrusal ve yüksek bir korelasyonun ortaya konması nedeniyle Nektin-4'ün köpek meme karsinomlarında malignite ile ilişkili önemli bir prognostik değer olabileceği sonucuna varıldı.

Bu sonuçlar, köpek meme karsinomlarının anti tümör tedavisinde potansiyel hedef molekülü olarak Nektin-4 kullanımı konusunda daha ileri çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

1. **Allen SW, Prasse KW, Mahaffey EA** (1986): Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Vet Pathol.*, **23 (6)**, 649-655.
2. **Argyle DJ, Turek MM, Mac Donald V** (2008): *Canine and Feline Mammary Tumors*. Eds: Argyle DJ, Brearley MJ, Turek MM, Decision Making in Small Animal Oncology, 1st Edition, Wiley-Blackwell, Iowa p: 327.
3. **Atıcı E** (2007): Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onk Derg.*, **22 (4)**, 197-204.
4. **Aydoğan A, Metin N** (2013): Detection of cell origin by immunohistochemistry in canine mammary tumors. *Rev Med. Vet.*, **164(7)**, 395-399.
5. **Aydoğan A, Özmen Ö** (2016): Expression of Nectin-4 as a Potential Biomarker in Enzootic Nasal Adenocarcinoma of Goats. *Acta Vet Hung.*, **64 (1)**, 71-77.
6. **Baba AI, Catoi C** (2007): *Comparative Oncology*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9542/>, (Eriřim tarihi: 20.01.2016)
7. **Bacha W, Bacha L** (2000): *12. Integument*. Ed: Balado D, Color Atlas of Veterinary Histology, 2nd edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Philadelphia, p: 86-87.
8. **Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Kadar N** (1987): Prolifetative index in breast carcinoma determined in situ by Ki67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol.*, **152**, 287-295.
9. **Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ** (1999): Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasm based on life-span observations in beagles. *Vet Pathol.*, **36**, 423-436.
10. **Bravo R, Frank R, Blundell PA, Mac Donald-Bravo H** (1987): Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-d. *Nature*, **336 (6112)**, 515-517.
11. **Brearley MJ** (1989): Mammary gland tumours in the dog. *In practice*, **23**, 248-253.
12. **Brodey RS, Goldschmidt MH, Rozsel JR** (1983): Canine mammary gland neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc.*, **19**, 61-90.
13. **Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Leprotti S, Benazzi C** (2003): E-cadherin expression in canine mammary carcinomas with regional lymph node metastases. *J Vet Med A*, **50**, 496-500.

14. **Bruno S, Darzynkiewicz Z** (1992): Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL- 60 cell. *Cell Prolif.*, **25** (1), 31-40.
15. **D'arville CN, Evans BAJ, Borthwick G, Pierrepoint CG** (1980): Aspects of steroid metabolism in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch. *J Steroid Biochem.*, **13**, 1407-1411.
16. **De Rycke MS, Pambuccian SE, Gilks CB, Kalloger SE, Ghidouche A, Lopez M, Bliss RL, Geller MA, Argenta PA, Harrington KM, Skubitz AP** (2010): Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. *Am J Clin Pathol.*, **134** (5), 835-845.
17. **Delahunt B, Betwaite PB, Thornton A, Ribas JL** (1995): Proliferation of renal cell carcinoma assessed by fixation-resistant polyclonal Ki-67 antibody labeling: correlation with clinical outcome. *Cancer*, **75**, 2714-2719.
18. **Dellman HD, Carithers JR** (1996): *Special epidermal structures*. Ed: Goldner B, Cytology and Microscopic Anatomy, Williams & Wilkins Media, USA, p: 338-340.
19. **Dore M, Lanthier I, Sirois J** (2003): Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol.*, **40**, 207-212.
20. **Dutra AP, Granja NVM, Schmitt FC, Cassali GD** (2004): c-erb-B-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res.*, **37**, 1673-1681.
21. **Dutra AP, Azeveda Junior GM, Schmit FC, Cassali GD** (2008): Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. *Arq Bras Med Vet Zootec.*, **60** (6), 1403-1412.
22. **Dutta A, Chandra R, Leiter LM, Lester S** (1995): Cyclins as markers of tumour proliferation: Immunohistochemical studies in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci.*, **92**, 5386–5390.
23. **Erer H, Kıran MM** (1993): Konya'da 1985-1992 yılları arasında köpeklerde görülen tümörler. *SÜ Vet Fak Derg.*, **9** (2), 87-89.
24. **Erer H, Kıran MM** (2009): *Veteriner Onkoloji*. 4. Basım, Damla Ofset A.Ş., Konya.
25. **Esteva FJ, Hortobagyi G** (2004): Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **6**, 109-118.

26. **Evans HE** (1993): *Miller's Anatomy of the Dog*. 3rd edition, Saunders Philadelphia, p: 549-553.
27. **Fabre-Lafay S, Monville F, Garrido-Urbani S, Berruyer-Pouyet C, Ginestier C, Reymon N, Finetti P, Sauvan R, Adelaide J, Geneix J, Lecocq E, Popovici C, Dubreuil P, Viens P, Gonçalves A, Charafe-Jauffret E, Jacquemier J, Birnbaum D, Lopez M** (2007): Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. *BMC Cancer*, **7**, 73.
28. **Ferguson H** (1985): Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **15**, 501-511.
29. **Filizel F, Ertek S, İlvan Ş, Oruç N, Bakır S** (1996): Meme Karsinomlarında Proliferating Cell Nuclear Antigen'in (PCNA) Prognostik Önemi. *Türk Patol Derg.*, **12 (1)**, 50-52.
30. **Frandsen RD, Spurgeon TI** (1992): *Anatomy of the mammary glands*. Ed: Cann CC, *Anatomy and Physiology of Farm Animals*, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p: 446-473.
31. **Gama A, Alves A, Gartner F, Schmitt F** (2003): p63: A novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Vet Pathol.*, **40**, 412-420.
32. **Gartner F, Geraldles M, Gassali G, Rema A, Schmitt F**(1999): DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cell in canine mixed mammary tumours: Putative evidence for common histogenesis. *Vet J.*, **158**, 39-47.
33. **Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H** (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.*, **133**, 1710-1715.
34. **Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V** (2011): Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol.*, **48 (1)**, 117-131.
35. **Gülçubuk A, Gürel A** (2003): 1995-2000 yılları arasında İstanbul'da saptanan köpek tümörleri. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **29 (1)**, 83-91.
36. **Hampe JF, Misdorp W** (1974): Tumours and dysplasia of the mammary gland. *Bull World Health Org.*, **50**, 111-133.
37. **Jones TC, Hunt RD, King NV** (1997): *Veterinary Pathology*. 6th edition Williams & Wilkins, Baltimore, p: 1193-1197.

38. **Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A** (2001): Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med A*, **48**, 85-96.
39. **Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A** (2005): Histological Grading and Prognosis in Dogs with Mammary Carcinomas: Application of a Human Grading Method. *J Comp Pathol.*, **133**, 246-252.
40. **Kobayashi I, Matsua K, Ishibashi Y, Kanda S, Sakai H** (1994): The proliferative activity in dysplasia and carcinoma in situ of the uterine cervix analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and silver-binding argyrophilic nucleolar organizer region staining. *Hum Pathol*, **25**, 198-202.
41. **Kumar V, Abbas AK, Aster JC** (2014): *Robbins Basic Pathology (Robbins Temel Patoloji)*. Çevirenler: Sıtkı T, Mine G, Uğur Ç, 9. Baskı, Nobel Yayınevi, İstanbul, s:
42. **Lanzafame S, Emmanuele C, Torissi A, Magro G** (1998): Correlated Expression of BCL-2 Protein, Estrogen Receptor, Cathepsin D and Low Growth Fraction (PCNA) in Intracystic Papillary Breast Carcinoma. *Pathol Res Pract.*, **194**, 541-547.
43. **Las Mulas JM, Millian Y, Dios R** (2005): A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol.*, **42**, 200-212.
44. **Las Mulas JM, Reymundo C** (2008): Animal models of human breast carcinoma: canine and feline neoplasms. *Clin Transl Oncol.*, **2(6)**, 274-281.
45. **Laundanski P, Swiatecka J, Kozlowski L, Lesniewska M, Wojtukiewicz M, Wolczynski S** (2010): Increased serum level of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) in patients with breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol.*, **48**, 101-103.
46. **Lelle RJ, Heindenreich W, Stauch G, Gerdes J** (1987): The correlation of growth fractions with histologic grading and lymph node status in human mammary carcinoma. *Cancer*, **59**, 83-88.
47. **Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, Dalla Palma P, Barbareschi M** (1992): PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: Correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol.*, **45**, 416-419.

48. **Luna GL** (1968): *Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. 3th Edition, McGraw Hill Book Company, U.S.
49. **Mac Ewen EG, Patnaik AK, Harvey HT, Panko WB** (1982): Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Res.*, **42**, 2255-2259.
50. **Martins AMCRPF, Tamaso E, Guerra JL** (2002): Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Braz J Vet Res Anim Sci.*, **39** (1), 38–42.
51. **Matsuda K, Kobayashi S, Yamashita M, Hirayama K, Kadosawa T, Taniyama H** (2008): Tubulopapillary carcinoma with spindle cell metaplasia of the mammary gland in a cat. *J Vet Med Sci.*, **70** (5), 479-481.
52. **Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, Fedele V, Ginzinger D, Getts R, Haqq C** (2006): Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer*, **5**, 24.
53. **McCormick D, Hall PA** (1992): The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, **21** (6), 591-594.
54. **Milli ÜH, Hazıroğlu R, Aydın Y, Gülbahar MY** (2000): Köpek meme tümörlerinde sitokeratin, vimentin ve alfa-düz kas aktin intermedier ve mikro filamentlerinin immunohistokimyasal lokalizasyonu. *Turk J Vet Anim Sci.*, **24**, 81-92.
55. **Misdorp W, Cotchin E, Hampe JF, Jabara AG, von Sandersleben J** (1973): Canine malignant mammary tumours: III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumours. *Vet Pathol.*, **10**, 241-256.
56. **Misdorp W, Weijer K** (1980): Animal model of human disease: Feline mammary carcinoma. *Am J Pathol.*, **98** (1), 573-576.
57. **Misdorp W** (2002): *Tumors of the Mammary Gland*. Ed: Meuten DJ, Tumors in Domestic Animals, 4th edition, Iowa State Press, Iowa, p: 575-599.
58. **Moe L** (2001): Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl.*, **57**, 439-443.
59. **Monteros AEL, Millian MY, Ordas J, Carrasco L, Reymundo C, Las Mulas JM** (2002): Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: Assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium. *Vet Pathol.*, **39**, 247-256.

60. **Morris J, Dabson J** (2001): *Small Animal Oncology*. 1st Blackwell Science Ltd Iowa p: 184-191.
61. **Moulton JE, Taylor DON, Dorn CR, Andersen AC** (1970): Canine Mammary Tumors. *Path Vet.*, **7**, 289-320.
62. **Moulton JE** (1990): *Tumors of the Mammary Gland*. Ed: Jack M, Tumors in Domestic Animals, 3th edition, University of California Press, Los Angeles, p:518-552.
63. **Nishiwada S, Sho M, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, Kinoshita S, Nagai M, Konishi N, Nakajima Y** (2015): Nectin-4 expression contributes to tumor proliferation, angiogenesis and patient prognosis in human pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res.*, **34**, 30.
64. **Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS, Richardson CD** (2011): Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLOS Pathog.*, **7** (8).
65. **Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidoy E, Papazoglou LG, Papadopoulou PL, Tzegas I, Tziris NE, Kaitzis DG, Dimitriadis AS, Dessiris AK** (2006): The Lymph Drainage of the Neoplastic Mammary Gland in the Bitch: A Lymphographic Study. *Anat Histol Embryol.*, **35**, 228-234.
66. **Pena LL, Nieto AI, Perez-Alenza D, Cuesto P, Castano M** (1998): Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest.*, **10** (3), 237-246.
67. **Perez Alenza MD, Pena L, Nieto AI, Castano M** (1997): Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann Ist Super Sanita*, **33** (4), 581-585.
68. **Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D** (2000): Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **406**, 747-752.
69. **Polton G** (2009): Mammary tumours in dogs. *Irish Vet J.*, **62** (1), 50-56.
70. **Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G** (2002): Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol.*, **39**, 488-493.
71. **Rezaie A, Tavasoli A, Bahonar A, Mehrzma M** (2009): Grading in canine mammary gland carcinoma. *J Biol Sci.*, **9**, 333-338.

72. **Rosa C, Mendes R, Filipe MI, Morris RW** (1992): Measurement of cell proliferation in gastric carcinoma: comparative analysis of Ki-67 and proliferative cell nuclear antigen (PCNA). *Histochemical J.*, **24**, 93-101.
73. **Sanchez Y, Elledge SJ** (1995): Stopped for repairs. *Bioessays*, **17**, 545-548
74. **Sassi F, Sarli G, Brunetti B, Morandi F, Benazzi C** (2008): Immunohistochemical characterization of mammary squamous cell carcinoma of the dog. *J Vet Diagn Invest.*, **20**, 766-773.
75. **Seixas F, Pires MA, Lopes CA** (2008): Complex carcinomas of the mammary gland in cats: Pathological and immunohistochemical features. *Vet J.*, **176**, 210-215.
76. **Shrestha P, Yamada K, Wada T, Maeda S, Watatani M, Yasutomi M, Takaqi H, Mori M** (1992): Proliferating cell nuclear antigen in breast lesions: correlation of c-erbB-2 oncoprotein and EGF receptor and its clinicopathological significance in breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.*, **421** (3), 193-202.
77. **Silver IA** (1966): The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. *J Small Anim Pract.*, **7**, 689-696.
78. **Silver SA, Tavassoli FA** (1998): Mammary Ductal Carcinoma In Situ with Microinvasion. *Cancer*, **82** (12), 2382-2390.
79. **Simon D, Schoenrock D, Baumgartner W, Nolte I** (2006): Postoperative Adjuvant Treatment of Invasive Malignant Mammary Gland Tumors in Dogs with Doxorubicin and Docetaxel. *J Vet Intern Med.*, **20**, 1184-1190.
80. **Sleekx N, de Rooster H, Veldhuis EJB, Van Ginneken C, Van Brantegem L** (2011): Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reprod Dom Anim.*, **46**, 1112-1131.
81. **Sonnenschien EG, Glickman LT, Goldschmidt MH, Mc Kee LJ** (1991): Body conformation, diet and risk of breast cancer in pet dogs: A case-control study. *Am J Epidemiol.*, **133** (7), 694-703.
82. **Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Langeland M, Mongil CM, Grondahl AM, Teige J, Goldschmidt MH** (2009): Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol.*, **7** (3), 162-172.
83. **Sönmez G, Özmen Ö** (1996): Bursa'da 1988-1996 yılları arasında incelenen köpek tümörleri. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg.*, **15**, 69-76.

84. **Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H** (2008): Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **9**, 603-615.
85. **Takano A, Ishikawa N, Nishino R, Masuda K, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Ito H, Nakayama H, Miyagi Y, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y** (2009): Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.*, **69 (16)**, 6694-6703.
86. **Taniyama H, Kitamura A, Kagawa Y, Hirayama K, Yoshino T, Kamiya S** (2000): Localized amyloidosis in canine mammary tumors. *Vet Pathol.*, **37**, 104-107.
87. **Tosun M, Tosun E, Avunduk MC** (2001): Hücre Çoğalma Belirliyecilerin Önemi ve Kullanım Alanları. *Türkiye Klinikleri*, **21 (3)**, 235-244.
88. **Tosun E, Tosun M, Avunduk MC** (2006): Hücre Çoğalma Belirliyecilerinin Meme İnfiltratif Duktal Karsinomlarında Prognostik Amaçlı Olarak Kullanımı. *Optimal Tıp Dergisi*, **19 (2)**, 27-40.
89. **Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A, Coates AS, Collins J, Castiglione-Gertsch M, Gusterson BA** (2003): Ki-67 Expression in Breast Carcinoma. *Cancer*, **97 (5)**, 1321-1331.
90. **Ünal EF, Mısırlıoğlu D, Nak Y, Nak D, Kahraman MM, Özmen Ö** (1994): Doğum kliniğinde sık rastlanan tümör olguları, II. Meme Tümörleri. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg.*, **13**, 94-103.
91. **Veronese SM, Gambacorta M** (1991): Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer: correlation with clinical and pathologic features. *Am J Clin Pathol.*, **95**, 30-34.
92. **Vural SA, Aydın Y** (2001): Ankara'da 1973-1998 Yılları Arasında İncelenen Köpek Meme Tümörleri. *Turk J Vet Anim Sci.*, **25**, 233-239.
93. **Withrow SJ, Vail DM** (2007): *Withrow and Macewen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th Edition Saunders Elsevier, Missouri, p: 619-639.
94. **Yamagami T, Koyabashi T, Takahashi K, Sugiyama M** (1996): Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *J Vet Med Sci.*, **58 (11)**, 1079-1083.
95. **Zaninovic P, Simcic V** (1991): Epidemiology of mammary tumours in dogs. *Z B Vet Fak Univ Ljubljana*, **1**, 57-72.

96. **Zatloukal J, Lorenzova J, Tichy F, Necas A, Kecova H, Kohout P** (2005): Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours. *Acta Vet Brno.*, **74**, 103-109.
97. **Zuccari DAPC, Pavam MV, Terzian ACB, Pereira RS, Ruiz CM, Andrade JC** (2008): Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome. *Pesqui Vet Bras.*, **28 (4)**, 207-215.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Hüseyin DOLU
Doğum Yeri ve Yılı : Merkez/BURDUR, 1988
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Uyruđu : Türkiye Cumhuriyeti
Telefon No : 0543 518 20 21
Elektronik Posta : vet.dolu@gmail.com
İletişim Adresi : Bağlar Mah. 22. Sokak Gül APT. No:11/9 Merkez/Burdur
Eğitim Durumu
Lisans : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 2013
Yüksek Lisans : MAKÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014-Devam Ediyor

