



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI



**SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN MEME KARSİNOMU İLE
KEDİ VE KÖPEK MEME TÜMÖRÜ OLGULARINDA
MAST HÜCRELERİNİN VE ROLLERİNİN İNCELENMESİ**

ÖZKAN YAVAŞ

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2023





T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI



**SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN MEME KARSİNOMU İLE
KEDİ VE KÖPEK MEME TÜMÖRÜ OLGULARINDA
MAST HÜCRELERİNİN VE ROLLERİNİN İNCELENMESİ**

Özkan YAVAŞ

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Gürsel SÖNMEZ

B.U.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi

TDK-2021-354

BURSA-2023

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan meme karsinomu ile kedi ve köpek meme tümörü olgularında mast hücrelerinin ve rollerinin incelenmesi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Özkan YAVAŞ
Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

23/01/2023

Adı Soyadı: Özkan YAVAŞ

Anabilim Dalı: Veterinerlik Patolojisi

Tez Konusu: Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan meme karsinomu ile kedi ve köpek meme tümörü olgularında mast hücrelerinin ve rollerinin incelenmesi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN</u> <u>DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	☒	☐	
Dış Kapak Sayfası	☒	☐	
İç Kapak Sayfası	☒	☐	
Kabul Onay Sayfası	☒	☐	
Sayfa Düzeni	☒	☐	
İçindekiler Sayfası	☒	☐	
Yazı Karakteri	☒	☐	
Satır Aralıkları	☒	☐	
Başlıklar	☒	☐	
Sayfa Numaraları	☒	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☒	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☒	☐	
Kaynaklar	☒	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı:

Prof. Dr. Gürsel SÖNMEZ

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY SAYFASI.....	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET.....	VII
İNGİLİZCE ÖZET.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Meme Bezinin Embriyolojisi	4
2.2. Meme Bezinin Anatomisi.....	5
2.3. Meme Bezinin Histolojisi.....	7
2.4. Dişi Köpeklerde Meme Tümörü	8
2.4.1. Köpek Meme Tümörü Giriş	8
2.4.2. Köpek Meme Tümörü İnsidensi.....	8
2.4.3. Köpek Meme Tümörlerinde Risk Faktörleri	8
2.4.4. Köpek Meme Tümörlerinde Prognostik Faktörler	13
2.4.5. Köpek Meme Tümörlerinin Sınıflandırılması.....	15
2.5. Dişi Kedilerde Meme Tümörü	28
2.5.1. Dişi Kedilerde Meme Tümörü Giriş	28
2.5.2. Kedi Meme Tümörü İnsidensi	28
2.5.3. Kedi Meme Tümörlerinde Risk Faktörleri.....	29
2.5.4. Kedi Meme Tümörlerinde Prognostik Faktörler.....	30
2.5.5. Kedi Meme Tümörlerinin Sınıflandırılması.....	32
2.6. Deney Hayvanlarında Meme Tümörleri ve İnsan Modeli	37
2.7. Sıçan Meme Bezi Anatomi ve Histolojisi	38
2.8. Deneysel Yolla Meme Tümörü Oluşturma Yöntemleri.....	39
2.8.1. Kimyasal Maddeler ile İndüksüyon	39
2.8.2. Hormon ile İndüksüyon	43
2.8.3. Fiziksel Yol ve Radyoaktif Madde ile İndüksüyon.....	44
2.8.4. Kanser Hücrelerinin İmplantasyonu	45
2.8.5. Genetiği Değiştirilmiş Modeller	45
2.9. Mast Hücreleri.....	46
2.9.1. Mast Hücrelerinin Morfolojisi	46
2.9.2. Mast Hücrelerinin Kökeni, Göçü ve Olgunlaşması	47
2.9.3. Mast Hücrelerinin Boyanması.....	48
2.9.4. Mast Hücre Sınıflandırılması	49
2.9.5. Mast Hücrelerin Rol Aldığı Fizyolojik ve Patolojik Durumlar	49
2.9.6. Mast Hücreleri ve Kanser İlişkisi.....	50
2.10. Mast Hücre Mediatörleri ve Mast Hücre Aktivasyonun Kanserdeki Rollerini	52
2.10.1. Mast Hücre Aktivasyonu.....	52
2.10.2. Mast Hücre Mediyatörleri	53
2.11. Malignant Meme Tümörlerinde Mast Hücreleri	59

3. GEREÇ VE YÖNTEM	60
3.1. Sıçanlarda Deney Gruplarının Oluşturulması	60
3.2. Kedi ve Köpeklerden Doğal Meme Tümörü Olgularının Eldesi	61
3.3. Histopatolojik Değerlendirme	62
3.3.1. Doku Takibi.....	62
3.3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama.....	62
3.3.3. Toluidin Blue Boyama	63
3.3.4. Oil-Red-O Boyama.....	64
3.4. İmmunohistokimyasal Boyamalar.....	64
3.5. İmmun Reaksiyonların Değerlendirilmesi	67
3.5.1. Triptaz ve Kimaz Pozitif Hücrelerin Değerlendirilmesi	67
3.5.2. TNF-alfa Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	67
3.5.3. MMP-9 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	68
3.5.4. PCNA Pozitif Hücrelerin Değerlendirilmesi.....	68
3.6. İstatiksel Analizler.....	69
4. BULGULAR	70
4.1. Genel ve Klinik Bulgular	70
4.2. Makroskobik Bulgular.....	72
4.3. Mikroskobik Bulgular	75
4.3.1. Tümör Dokularında Histopatolojik Alt Tiplerinin Değerlendirmesi	75
4.3.2. Oil-Red-O Boyama	90
4.3.3. Toluidin Blue Boyama ile Mast Hücrelerinin Tümör Dokusundaki Değerlendirmeleri	91
4.3.4. İmmunohistokimyasal Boyamalar	103
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	173
6. KAYNAKLAR	185
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	212
8. EKLER.....	214
9. TEŞEKKÜR	215
10. ÖZGEÇMİŞ.....	216

TÜRKÇE ÖZET

Dünya genelinde ve ülkemizde insanlarda ve hayvanlarda en yaygın ve en önemli kanser türlerinden biri olan meme kanserleri maddi ve manevi olarak ciddi kayıplara yol açmaktadır. Hastalığın erken teşhis edilememesine ve tedavi süreçlerinin zorlu, pahalı ve kesin sonuç vermemesine bağlı olarak prognostik faktörler ve erken teşhis oldukça önemli bir hal almaktadır. Bağışıklık sisteminin en önemli hücrelerinden biri olarak gösterilen mast hücreleri kanser dokularında önemli derecede arttıkları bilinse de olası rolleri ve fenotipleri henüz kesin olarak bilinmemektedir. Tez çalışmasında deneysel yolla sıçanlarda oluşturulan meme karsinomu ve kedi, köpek doğal olarak meydana gelen meme tümörü olgularında mast hücrelerinin bu bölgedeki olası yerleşim yerleri, varlıklarının tespiti, olası rolleri ve immunofenotipik özellikleri incelenmiştir. Çalışmada ayrıca TNF-alfa, MMP-9 ve PCNA ekspresyonları incelenerek mast hücreleri ile olası ilişkileri sorgulanmıştır. Deneysel olarak oluşturulan sıçan ve kedi köpek meme tümörü olgularında mast hücrelerinin sayısı normal meme dokusuna göre artış gösterdiği ve özellikle intratümöral alanda çok fazla arttıkları, PCNA ekspresyonu ile negatif korelasyon göstererek mast hücrelerinin bölgede artmasının muhtemelen canlı için iyi yönde bir etki gösterdiğini düşündürmüştür. Bu bulgular ışığında mast hücrelerinin tümör dokusunda önemli roller üstlenebileceği, prognostik açıdan yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Meme karsinomu, mast hücreleri, 7-12 DMBA, triptaz, kimaz

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of mast cells and their roles in experimentally induced mammary carcinoma in rats and mammary tumors in cats and dogs

Breast cancer, which is one of the most common and important types of cancer in humans and animals worldwide and in our country, causes material and spiritual severe losses. Prognostic factors and early diagnosis become crucial since the disease cannot be diagnosed early, and the treatment processes are difficult, expensive, and inconclusive. Although mast cells are considered one of the most important cells of the immune system and are known to increase significantly in cancer tissues, their possible roles and phenotypes are not yet precise. In the thesis study, the possible localization, presence, possible roles, and immunophenotypic characteristics of mast cells in this region were investigated experimentally for both conditions; mammary tumors in rats and naturally occurring mammary carcinomas in cats and dogs. In the study, TNF-alpha, MMP-9, and PCNA expressions were also examined, and their possible relations with mast cells were questioned. The number of mast cells increased in experimental rat and cat dog mammary carcinomas cases compared to healthy mammary tissues, and the increase was drastic especially in the intratumoral area; having a negative correlation with PCNA expression suggested that the increasing number of mast cells in the region probably showed a good effect on the living being. In light of these findings, it was concluded that mast cells can play an essential role in tumor tissue and can be beneficial in terms of prognostic.

Keywords: Mammary carcinoma, mast cells, 7-12 DMBA, tryptase, chymase

1. GİRİŞ

Meme tümörleri, kedi, köpek ve insanlarda yaygın olarak gözlenir ve meme bezinden köken alırlar (Meuten, 2016). Köpeklerde rastlanan tümörler arasında en yaygın tümördür ve tüm tümörlerin yaklaşık %50'sini oluşturur (Canadas ve ark., 2019). Kedi meme tümörleri kedilerde gözlenen en yaygın 3.tümördür ve tüm tümörlerin %17'sini oluşturur (Dagher, Abadie, Loussouarn, Campone & Nguyen, 2019). İnsanlardaki meme kanseri, dünya çapındaki ülkelerin büyük çoğunluğunda (154/185) kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanserdir ve kadınlarda teşhis edilen tüm kanserlerin dörtte birini temsil etmektedir (Bray ve ark., 2018). Mast hücresi, konak savunmasında ve homeostatik yanıtta önemli bir rol oynayan, aynı zamanda alerjik reaksiyonlar, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi çeşitli immün aracılı bozukluklara katkıda bulunan, dokuda yerleşik, doğuştan gelen bir bağışıklık hücresidir. Mast hücreleri, farklı insan kanser türlerinin tümör stromasında birikir ve artan mast hücre yoğunluğu, tümör tipine ve evresine bağlı olarak iyi veya kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Aponte-López, Fuentes-Panana, Cortes-Munoz & Munoz-Cruz, 2018). Tümör bölgelerinde mast hücre birikimi uzun yıllardır bildirilmesine rağmen, bu hücrenin tümör gelişimine katkısı hakkında hala tartışmalar vardır (Aponte-Lopez ve ark., 2018). Meme tümörleri ile mast hücre arasındaki ilişki hala belirsizliğini korumaktadır (Aponte-Lopez ve ark., 2018). Bir kısım araştırmacı, meme kanserinde mast hücre infiltrasyonunun anti-tümöral etkisinden dolayı olumlu bir prognostik faktör olarak kabul etmişlerdir (Amini ve ark., 2007; Dabiri ve ark., 2004; della Rovere ve ark., 2007; Glajcar ve ark., 2017; Rajput ve ark., 2008; Sang, Yi, Tang, Zhang & Huang, 2016). Diğer bir kısım araştırmacı ise, meme kanserlerinde mast hücrelerinin bulunmasının pro-tümöral etkiye neden olduğunu ve olumsuz bir prognostik faktör olduğunu belirtmişlerdir (Aponte-Lopez ve ark., 2018; Carpenço ve ark., 2019; Fakhrjou ve ark., 2016; Keser ve ark., 2017; Marech ve ark., 2014; Reddy ve ark., 2019). Bu enzim mast hücreleri için spesifik bir belirteç (marker) olarak kullanılmaktadır (Kannunken ve ark., 1997). Mast hücre triptazlarının malignite gösteren tümörlerde damar çevresinde bulunduğu ve bu yüzden anjiyogenezi sorumlu olduğu düşünülmektedir (de Souza Junior ve ark., 2015).

Mast hücre kimazı serin proteaz ailesine ait bir mast hücre spesifik enzimdir (Urata ve ark., 1990). Kimaz, birçok tümörde anjiyogenezi indüklemek için dolaylı

olarak hareket eder (de Souza Junior ve ark., 2015). Kimaz enziminin ayrıca tümörlerde MMP-9'u aktive ettiği düşünülmektedir (de Souza Junior, Santana, da Silva, Oliver & Jamur, 2015).

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- alfa), birçok proinflamatuvar ve immün düzenleyici aktiviteye sahip çok işlevli bir sitokindir (Bazzani & Beutler 1996). Nötrofiller ve monositler için kemoatraktandır, mikrovasküler geçirgenliği artırır ve derinin T hücrelerini, eozinofilleri ve mast hücrelerini aktive eder (Paleolog, Delasalle, Buurman & Feldman, 1994).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), hücre dışı matriks proteinlerinin ve hücre yüzey moleküllerinin yıkılmasından sorumlu çinko bağımlı endopeptidazlardır (Woessner, 1991). Tümör bölgesinde bulunmalarının tümör hücrelerinin invazyon ve metastazına neden olduğu bilinmektedir (Köhrmann, Kammerer, Kapp, Dietl & Anacker, 2009). MMP'lerin yaklaşık 26 alt tipi bulunmaktadır ve MMP-9 tümör bölgesinde en çok bulunanlardan biridir ve tip IV kollajenlerin yıkılmasına neden olarak tümör metastazını arttırdığı düşünülmektedir (Hawkes, Li & Taniguchi, 2010).

Proliferasyon indeksinde çok kullanılan bir belirteç (marker) olan Proliferasyon hücre nükleer antijen (PCNA), son yıllarda meme tümörlerinde prognostik bir faktör olarak değerlendirilmektedir ve meme tümörlerinde malignite (kötü huy) kriteri olarak immünohistokimyasal boyamalarda kullanılmaktadır (Pena, Nieto, Perez-Alenza, Cuesta & Castano, 1998; Santos ve ark., 2013; Carvalho, Pires, Prada, Lobo & Queiroga, 2016).

Bu çalışmada, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi ve özel veteriner kliniklerine getirilen köpek ve kedi meme tümörü şüphesi ile teşhis amaçlı olarak alınmış olan meme dokuları ile Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden alınan 6 haftalık dişi sıçanlarda deneysel olarak 7-12 Dimetilbenzantrasen (DMBA) ile oluşturulan meme tümörü dokuları kullanılmıştır. Materyal olarak boyut, çap, dış bakı gibi morfolojik özellikleri kaydedildikten sonra, deneysel olarak oluşturulan meme tümörleri %4 paraformaldehit solüsyonu, doğal yollarla oluşmuş ve uygun anestezi ve operasyon teknikleri ile kedi ve köpeklerden alınmış meme dokuları % 10 formalin solüsyonu içerisinde tespit edilmiş ve kontrol

olarak kullanılan sağlıklı meme dokuları ile birlikte toplam 60 örnek üzerinde çalışılmıştır.

Söz konusu örneklerde işaretilenmiş horseradish-peroksidaz (HRP) polimer tekniği ile yapılan immunohistokimya boyama yöntemi ile boyanan tümöral dokuları oluşturan hücrelerde triptaz, kimaz, TNF- α , MMP-9 ve PCNA belirteçlerinin, ekspresyon (salınım) oranları ve bunlara ek olarak mitotik indeks ve kimaz triptaz sayıları belirlenerek hem birbirleri ile mast hücre arasındaki ilişki hem de türler arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda elde edilen bulguların;

- Sıçan, kedi ve köpek meme tümörlerinde, mast hücre sayılarının ve immun fenotiplerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması, granüle-degranüle mast hücre sayılarının meme tümörlerinde belirlenmesi ve karşılaştırılması ve peritümöral-intratümöral mast hücrelerinin sıçan, kedi ve köpek meme tümörlerinde sayılarının karşılaştırılması,
- MMP-9, TNF- α ekspresyonlarının sıçan, kedi ve köpek meme tümörlerinde ekspresyonunun belirlenmesi ve mast hücre ile ilişkilendirilmesi,
- PCNA ekspresyonu ile mitotik indeksi değerlendirerek meme tümörlerinde prognoz ile malignitenin belirlenmesi ve mast hücre sayısı ile ilişkilendirilmesi,
- Meme tümörlü hastalarda mast hücrelerinin anti-tümöral veya pro-tümöral etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Bezinin Embriyolojisi

Meme bezleri, deri altı apokrin ter bezlerinin yaklaşık 300 milyon yıl önce evrimleşmesiyle şekillenen epidermal uzantılardır ve yalnızca memeli hayvanlarda bulunurlar (Benavente, Bianchi, & Aba 2016; Meuten, 2016; Oftedal, 2002; Sorenmo, Rasotto, Zapulli, & Goldschmidt, 2011). Bu bezler benzersiz anatomik yapısı ile yeni doğanlar için süt salgırlar ve yeni doğanların beslenmesi ile pasif immünitesinde önemli rol oynarlar (Meuten, 2016; Oftedal, 2002; Sorenmo ve ark., 2011). Meme gelişiminin insan ve hayvanlarda embriyonik, pubertal ve reproduktif dönem olmak üzere 3 ana aşaması bulunur (Macias & Hinck, 2012). Meme bezleri, fibrovasküler ve yağdan zengin stroma ile çevrili bir kanallar sistemidir. (Sorenmo ve ark., 2011).

Kedi ve köpeklerde embriyonik dönemde meme bezleri, iki hücreli bileşenden oluşmaktadır ve bunlar sırasıyla ektoderm ve mezodermdir (Macias & Hinck, 2012). Erken embriyonik dönemde meme bezleri ventrolateral ektoderimde gözlenebilen ve mezoderm tarafından desteklenen iki lineer kalınlaşma veya çıkıntı (süt veya meme çizgileri olarak da adlandırılır) olarak görünür (Meuten, 2016; Sorenmo ve ark., 2011). Bu ektodermal hücreler, aksiller bölgeden inguinal bölgeye uzanan meme çizgileri boyunca göç ederler ve sonradan her birinin bireysel birer meme bezine dönüşeceği plakodlara birleşirler (Macias & Hinck, 2012; Meuten, 2016; Sorenmo ve ark., 2011). Plakod oluşumu, ektodermin epitel hücreleri ile mezodermin mezenkimal hücreleri arasındaki birkaç sinyal yolunu içeren karmaşık bir etkileşimdir (Sorenmo ve ark., 2011). Daha sonra buradaki epitel hücreleri meme tomurcuğunu oluşturmak için alttaki mezenkime doğru büyüyen katı bir hücre kordonu oluşturur (Meuten, 2016; Sorenmo ve ark., 2011).

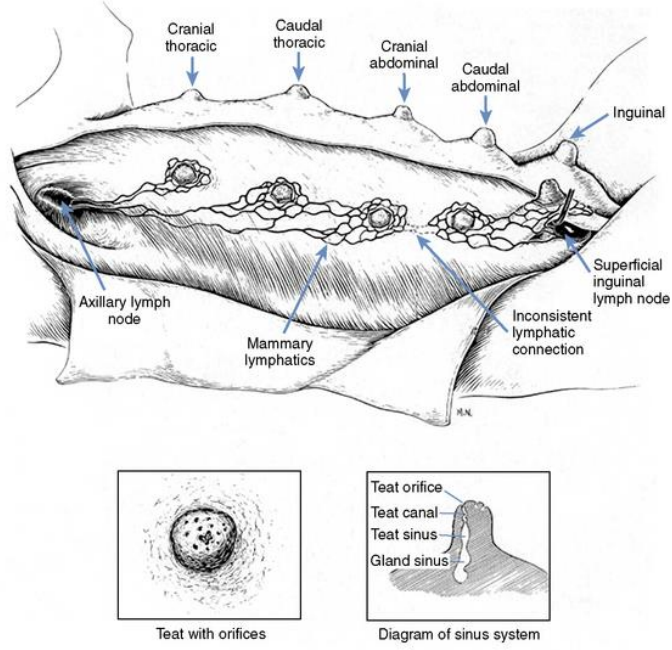
Doğum sırasında meme bezleri ilkel bir kanal sistemidir ve tam olarak gelişmemişlerdir (Macias & Hinck, 2012; Meuten, 2016). Pubertada, meme gelişimi ovaryumdan östrojen salınımı ile başlamaktadır (Navarrete ve ark., 2005; Potten ve ark., 1988; Sorenmo ve ark., 2011). Östrojen, kanalların terminal uçlarında, terminal uç tomurcuklarının oluşumu ile hücre çoğalması meydana getirir.

Gebeliğin başlaması ve progesteron düzeylerinin yükselmesi ile lobların kanal sistemi uzar ve dallanır böylece büyüme gerçekleşir. Kanallar, meme bezinin salgı birimleri olan (lobuloalveolar birim) alveolleri geliştirerek çoklu lobüllere yol açar. Memelilerde, alveollerde laktasyon için süt sentezleme ve salgılama yeteneğine sahip karmaşık lobüller ve özel epitel hücreleri oluşturmak için hamilelik sırasında tam meme epitel olgunlaşması meydana gelir. Prolaktinin etkisi altında, presekratuvar alveolar hücreler sekratuvar alveolar hücrelere dönüşürler. Bu nedenle, doğumda, meme bezi bir kanal-lobül-alveolar yapıdan oluşur, bu sayede tubuloalveolar ünitenin ürünleri, kanalcıklar yolu ile kanallara buradan da meme sinüslerine taşınır (Jindal ve ark., 2014; Sorenmo ve ark., 2011).

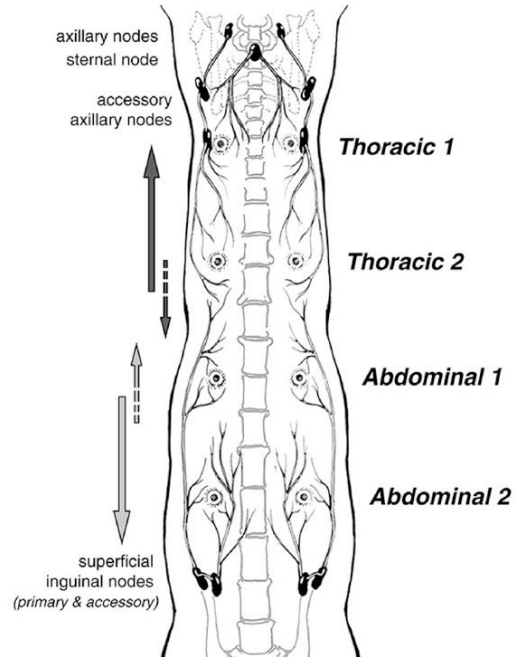
Gebelik ve laktasyon sonrası ise meme epitelleri kollabe olurlar meme ağı gebelikten önceki dönemdekine benzer şekilde gözlenir. Bu genişleme ve gerileme özelliği insan ve hayvanlarda çoklu gebeliklerde ortaya çıkar bu da memenin epitel hücrelerinin önemli ölçüde yenilenme yetenekleri olduğunu gösterir (Arendt & Kuperwasser, 2015; Jindal ve ark., 2014).

2.2. Meme Bezinin Anatomisi

Bazen 4 veya 6 çift meme lobu görülmesine rağmen çoğu köpekte, iki çift torasik (M1 ve M2), iki çift abdominal (M3 ve M4) ve bir çift inguinal (M5) olmak üzere 5 çift meme lobu bulunmaktadır (Silver 1966). Kedilerde ise genellikle 4 çift meme lobu bulunmaktadır. Bunlar; kraniyal ve kaudal torasik meme çifti (T1-T2) ile kraniyal ve kaudal abdominal meme çiftleridir (A1-A2). Bazen kedilerde 5. çift meme lobu bulunabilir (Meuten, 2016; Silver 1966; Sorenmo ve ark., 2011). Kedi ve köpek meme bezinin anatomik ve lenfatik drenajının şematize edilmiş hali Şekil 2-1 ve Şekil 2-2' de verilmiştir.



Şekil 2-1: Köpeklerde meme bezlerinin anatomisi ve bu bezlerin lenfatik drenajının şematize edilmiş gösterimi (Ewans & Christensen, 1993)



Şekil 2-2: Kedilerde meme bezlerinin anatomisi ve bu bezlerin lenfatik drenajının şematize edilmiş gösterimi (Gimenez, Hecht, Craig & Legendre, 2010)

2.3. Meme Bezinin Histolojisi

Histolojik olarak meme başını hem kedi hem köpekte epidermis örter (Banks, 1986; Meuten, 2016; Sorenmo ve ark., 2011). Köpeklerde dermiste, adneksiyal yapının çoğu bulunmamasına rağmen kedilerde kıl folikülleri ve geniş yağ bezlerine ve apokrin bezlere rastlanır (Meuten, 2016). Meme başı yüzeyine açılanlar, stratifiye skuamöz epitel ile kaplanmış ve genellikle lümenleri içinde bir keratin tıkaçı bulunan meme kanallarıdır. Bunların etrafını da düz kas sfinkterleri sarmıştır (Sorenmo ve diğerleri, 2011). Meme kanalı, dışta fusiform miyoepitelyal hücreler bulunan çift katlı kolumnar epitel ile döşeli meme başı sinüsüne açılır. Meme başı sinüsüne boşalan kanallar; daha büyük kanallar çift katlı küboidal epitel ile kaplanır ve fusiform miyoepitelyal hücrelerle çevriliyken, daha küçük kanallar tek katmanlı küboidal epitel ve fusiform miyoepitelyal hücrelere sahiptir (Pena ve ark., 2014; Rehm, Stanislaus & Williams 2007; Santos, Marcos & Faustino, 2010; Sorenmo ve ark., 2011). Sekratuvar olmayan alveoller küçük kanallar ile aynı yapıya sahiptir. Sekratuvar alveoler hücreler küboidalden kolumnara değişen ve alveoler lümende değişken miktarlarda hücreler arası yağ damlacıklarına sahiptirler. Alveollerin etrafı sepet benzeri bir yapıda yıldız şeklindeki miyoepitelyal hücreler ile çevrelenmiştir. Köpek meme bezleri hormon bağımlı bir organ olduğu için histolojik görünüm siklik aktivite boyunca farklılıklar gösterebilir (Pena ve ark., 2014). Meme bezi epiteli, esas olarak tip 4 kollajen, laminin, nidojen ve heparin sülfat proteoglikandan oluşan sürekli bir bazal membran ile çevrilidir. Normal luminal epitel ve miyoepitelyal hücreler bazal membranı, özellikle laminin 1'in alfa 3 ve alfa 5 zincirlerini biriktirir, ancak sadece miyoepitelyal hücreler alfa laminin 1 zincirlerini biriktirir. Meme bezlerinin epitel bileşenleri embriyonik mezodermden köken alan mezenkimal hücreler ile desteklenir. Bunlar bağ doku, kan damarları, sinirler ve lenfatiklerdir. Stromal dokuda histiyositler, mast hücreleri ve lenfoid hücreler bulunurlar. Bağ doku iki alt bileşenden oluşmaktadır; intralobüler kanalları çevreleyen intralobüler bileşen, daha geniş bir hücre dışı matriks ile çevrili daha ince kollajen liflerinden oluşurken, lobülleri ayıran interlobüler bileşen, daha az hücre dışı matriks ile daha büyük kollajen liflerine sahiptir (Meuten, 2016; Sorenmo ve ark., 2011).

2.4. Dişı Köpeklerde Meme Tümörü

2.4.1. Köpek Meme Tümörü Giriş

Meme tümörleri dişı köpeklerde en sık gözlenen tümördür ve köpeklerde gözlenen tüm tümörlerin %13,4'ünü dişı köpeklerde gözlenen tüm tümörlerin ise %41,7'sini oluşturmaktadır (Dorn, Taylor, Schneider, Hibbard & Klauber 1968; Meuten, 2016; Sorenmo 2003). Köpek meme tümörlerinin % 41-53'ünün malignant karakterdedir (Brodey, Goldschmidt & Roszel, 1983). Vascellari ve arkadaşlarının (2016) 2359 meme tümörü dokusu ile yaptığı bir çalışmada bu dokuların %60'ı malignant karakterde bulunmuştur (Vascellari ve ark., 2016). Burrai ve arkadaşları (2020) 1866 köpek meme dokusunu incelemiş ve bunların 867 tanesinin (%46.5) benign, 999 tanesinin ise (%53.5) malignant karakterde olduğunu belirtmişlerdir (Burrai ve ark., 2020).

2.4.2. Köpek Meme Tümörü İnsidensi

Köpeklerde meme tümörlerinin insidensi, yıllık 100.000 köpekte 198-622,6 arasında değiştiği bildirilmiştir (Bostock 1986). Dorn ve arkadaşları (1968), Amerikada insidensin yıllık 100.000 köpekte 257.7 olduğunu söylerken (Dorn ve ark., 1968), İsveçte yapılan bir çalışmaya göre, bu ülkedeki oran 10.000 köpekte 111'dir (Egenvall ve ark., 2005). Yine İngiltere'de yapılan bir çalışmaya göre dişı köpeklerde meme tümörünün yıllık insidensinin 100.000 köpekte 255 olduğu gözlenmiştir (Dobson, Samuel, Milstein, Rogers & Wood, 2002). Vascellari ve arkadaşları (2016) İtalyada yıllık insidansın 100.000 köpekte 250 olduğunu bildirmişlerdir (Vascellari ve ark., 2016).

2.4.3. Köpek Meme Tümörlerinde Risk Faktörleri

Köpek meme tümörlerinin etiyolojisi tam olarak bilinmesede epidemiyolojik, klinik, histolojik ve moleküler faktörler çoğu meme tümörü için önemli risk faktörleridir. (Benaventere ve ark., 2016; Burrai ve ark., 2020; Meuten, 2016; Sleenckx, de Rooster, Kroeze, Van Ginneken & Van Brantegem, 2011; Sorenmo 2003, Sorenmo

ve ark., 2011; Vascellari ve ark., 2016). Başlıca epidemiyolojik risk faktörleri de yaş, ırk, hormonal ve gebelik durumu, genetik ve nutrisyonel faktörler olmak üzere sınıflandırılabilir (Benaventere ve ark., 2016; Burrai ve ark., 2020; Meuten 2016; Sleenckx ve ark., 2011; Sorenmo 2003; Sorenmo ve ark., 2011; Vascellari ve ark., 2016).

2.4.3.1. Yaş

Köpeklerde genellikle 6 yaş itibari ile meme tümörü gözlense de en çok görülen yaştan 9-11 yaşlar arasında olduğu bildirilmiştir (Meuten, 2016; Pastor ve ark., 2018; Sorenmo ve ark., 2009; Zatloukal ve ark., 2005). 2020 yılında Burrai ve arkadaşları tarafından 1866 köpekte yapılan bir çalışmada köpeklerde en çok meme tümörü gözlenme yaşı 9.20 ± 2.63 yaş olduğu bulunmuştur (Burrai ve ark., 2020). Genelde 7 yaşından küçük köpeklerde kötü huylu meme tümörü nadiren gözlenmektedir. (Perez Alenza, Pena, del Castillo & Nieto, 2000) 7 yaşın altındaki köpeklerde iyi huylu, 7 yaşından büyük köpeklerde ise kötü huylu meme tümörleri gözlenmesine rağmen yapılan çalışmalarda ırk, dışardan hormon kullanımı gibi nedenlerden dolayı 7 yaşından küçük köpeklerde de kötü huylu meme tümörleri gözlenebildiği anlaşılmıştır (Meuten, 2016; Perez Alenza, 2000). Salas ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı bir çalışmada en yaygın yaş grubu 9-12 yaş çıkarken bunu 5-8 yaş arası takip etmiştir ve bu iki yaş grubu tüm grubun %70'ini oluşturmaktadır (Salas, Marquez, Diaz & Romero, 2015). Burrai ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise köpek meme tümörü vakalarının %85'inde oluşum yaşının 5-12 yaşlar arasında olduğu bildirilmiştir (Burrai ve ark., 2020).

2.4.3.2. Irk

Köpek meme tümörlerinde yüksek riskli ırklar, yapılan çalışmalara ve coğrafik bölgelere göre değişkenlik göstermektedir (Egenvall ve ark., 2005). Büyük ırk köpeklerde küçük ırk köpeklere göre daha fazla gözleendiği bildirilmiştir (Itoh ve ark., 2005). Dorn ve ark. yaptığı bir çalışmada (1968) saf ırk köpeklerde melez ırk köpeklere oranla daha çok meme tümörü gözleendiği saptanmıştır (Dorn ve ark., 1968).

Zatloukal ve arkadaşlarının (2005) meme tümörleri ile ilgili yaptığı bir çalışmada 134 hayvandan 29 tanesi Poodle ırkı, 26 tanesi Dachshunds ırkı ve 14 tanesi Cocker Spaniel, ırkı köpekler olduğu belirtilmiştir (Zatloukal ve ark., 2005). Yine İsveçte yapılan bir çalışmaya göre Leonberger, Irish wolfhund, Doberman, Welsh Terrier ve İngiliz Springer Spaniel ırkı köpeklerde riskin arttığı bildirilmiştir (Jitpean ve ark., 2012). Arjantinde yapılan çalışmada ise English Cocker Spaniel, Pekinez ve Alman çoban ırkı köpeklerde riskin arttığı gözlenmiştir (Benavente ve ark., 2016). Pastor ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı bir çalışmada 858 meme tümörü teşhisi koyulan dişi köpeğin %64,32'sinin saf ırk olduğu bildirilmiştir (Pastor ve ark., 2018). Aynı çalışmada meme tümörü gözlenen köpeklerde %14,1 oranla en riskli ırk Golden retriever iken bunu %11.4 ile av köpekleri ve %10.1 ile Pinscher ırkı köpekler takip etmektedir (Pastor ve diğerleri, 2018). Salas ve arkadaşlarının (2015) 1917 köpek meme tümörü dokusu üzerinde yaptıkları bir çalışmaya göre, meme tümörlerinin en sık küçük ırk köpeklerde (%48.4) küçük ırk köpekler arasında da en sık Poodle (% 18.1), Cocker (% 15.5) ve Maltese ırkı köpeklerde (%4.1) olduğunu göstermiştir (Salas ve ark., 2015). Küçük ırk köpekleri % 29.1 ile orta boy köpek ırkları takip ederken en az gözlenen ırk ise büyük ırk köpek grubu olmuştur (Salas ve ark., 2015). Burrai ve arkadaşlarının son yıllarda yaptığı bir çalışmada ise (2020) 1866 meme tümörü dokusundan 1142 tanesinin (%61) saf ırklarda, 724 tanesinin ise (%39) melez ırklarda olduğu ve en yaygın gözlenen ırkın ise %7.91 ile Alman Çoban köpeği ırkı olduğu bildirilmiştir (Burrai ve ark., 2020).

2.4.3.3. Hormonal Faktörler

Köpek meme tümörlerinin gelişiminde risk faktörleri arasında en yaygın ve ana rol hormonal faktördür (Perez Alenza ve ark, 2000). Hormonal faktörler arasında özellikle östrojen ve progesteron olmak üzere ovaryan hormonlar anahtar rol oynamaktadır (Benavente ve ark., 2016). Östrojen ve progesteron reseptörleri meme tümörlü dokularda identifiye edilmesine rağmen normal meme bezi ve benign karakterdeki tümörlerde malignant karakterdeki tümörlere göre daha fazla bulunur (Donnay, Rauis, Devleeschower, Wouters-Ballman, Leclercq & Verstegen, 1995; Mialot, Sndre, Martin, Cotard & Raynaud, 1982) Bu hormonlar meme

karsinogenezisin erken safhalarında hedef hücreler üzerinde etki gösterirler, fakat sonraki evrelerde uyarıcı etkilerini kaybederler (Perez Alenza ve ark., 2000). Bu hormonların yanısıra epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF), diğer büyüme faktörleri ve paratiroid ilişkili protein (Okada ve ark., 1997) normal ve neoplastik meme dokularının gelişiminde rol oynayabilir (Alenza ve ark., 2000; Benavente ve ark., 2016; Nerurkar ve ark., 1987; Rutteman, Foekens, Blankstein, Vos & Misdorp, 1990;). EGF ve TGF'ler köpek meme tümörlerinde östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığı ile ilişkilidir ve malignant karakterdeki tümörlerde EGF ve östrojen reseptör ekspresyonu arasında doğrudan bir korelasyon bulunmuştur (Alenza ve ark., 2000; Donnay ve ark., 1996). Endojen progesteron ve sentetik progestinler, köpeklerde tümöral ve normal meme bezlerinde büyüme hormonunun (GH) lokal üretimini artırmaktadırlar (Selman, Mol, Rutteman, Van Garderen & Rijnberk, 1994; van Garderen ve ark., 1997). Büyüme hormonu (GH) İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-1) konsantrasyonunu artırır bu büyüme faktörü de meme hücre proliferasyonunu ve lokal büyüme faktörlerinin üretilmesine neden olarak tümör gelişimine katkıda bulunur (Benavente ve ark., 2016; Queiroga ve ark., 2008). Son çalışmalarda prolaktin hormonunun da köpek meme tümörü gelişiminden sorumlu olduğunu ve prolaktin reseptörlerinin bazı meme tümörlerinde bulunmasına rağmen rolü henüz tam olarak bilinmediğini ortaya koymuştur (Benavente ve ark., 2016; Rutteman, 1990). Yapılan bir çalışma, meme tümörlü dişi köpeklerin sağlıklı olanlardan daha yüksek serum prolaktin seviyelerine sahip olduğunu ve meme dokusundaki prolaktin seviyelerinin benign (iyi huylu) karakterli meme tümörleri ve normal meme bezine göre daha yüksek olduğunu, bunda neoplastik meme dokusunun bir prolaktin kaynağı olabileceğini göstermiştir (Queiroga ve ark., 2005). Michel ve arkadaşları tarafından (2012) yapılan bir çalışmada ise malignant karakterdeki meme tümörlerinde benign karakterde olanlara göre daha az prolaktin reseptörü olduğu bunda tümör diferansiyasyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir (Michel ve ark., 2012). Schneider ve arkadaşlarının 1969 yılında yaptığı bir çalışmaya göre dişi köpeklerin kızgınlığa gelmeden önce kısırlaştırılması sonrası meme tümörü oluşma ihtimali %0.5 iken bir östrus siklusu gösterdikten sonra kısırlaştırılması sonucu bu oran %8'e, iki östrus siklusu gösterdikten sonrası kısırlaştırılması sonucu bu oran %26'ya yükselmektedir

(Schneider, Dorn & Taylor, 1969). Son yıllarda yapılan bir çalışmada 1866 meme tümörü dokusunun 1556 tanesinin (%83.39) hiç kısırlaştırılmamış köpeklerde olduğu bildirilmiştir (Burrai ve diğerleri, 2020). Hormonal olarak bir diğer risk faktöründe dışardan kullanılan sentetik hormonlardır (Perez Alenza ve ark., 2000). Kızgınlığı baskılamak ve yalancı gebelik tedavileri için kullanılan östrojen ve progestin (Medroksiprogesteron asetat) kombinasyonları meme tümörü olma olasılığını arttırdığı bilinmektedir (Rutteman 1990; Zanninovic & Simcic 1994)

2.4.3.4. Gebelik

Bir diğer önemli risk faktörü olan gebelik, ilk gebelik yaşının önemli olduğu (Meier-Abt & Bentires-Alj, 2014) ve östrus siklusundaki düzensizliklere neden olduğundan bahsedilse de (Schneider ve ark., 1969) bazı yazarlar bunların önemli bir risk faktörü olmadığı görüşündedirler (Theilen & Madewell 1987). Fakat, insanlar ve deney hayvanları üzerinde yapılan son çalışmalarda 25 yaş ve üzeri kadınlarda doğumdan hemen sonra meme kanseri riski geçici olarak artsa da gebeliğin uzun vadede güçlü bir şekilde veya ömür boyu meme kanseri üzerinde koruyucu bir etkisi vardır (Abt & Bentires-Alj, 2014; Albreksten, Heuch, Hansen & Kvale, 2005; McMahon 1970). Yine aynı şekilde yalancı gebeliğin meme tümörü üzerinde risk faktörü olup olmadığı tartışmalıdır (Brodey, Fidler & Howson, 1966).

2.4.3.5. Diyet

İnsanlarda olduğu gibi dişi köpeklerde de meme tümörüne diyet ve vücut kitlesinin neden olması son derece olasıdır (Alenza ve ark., 2000; Salas ve ark., 2015). Sonnenschein ve arkadaşları tarafından (1991) yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada diyet, vücut yapısı ve meme tümörü arasındaki risk araştırılmış ve kontrol köpeklerine kıyasla 9-12 aylık iken zayıf köpeklerde meme tümörü geliştirme riskinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Sonnenschein, Guckman, Goldschmidt & McKee, 1991). Perez-Alenza ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptığı bir çalışmada obezitesi olan köpeklerde meme tümörü riskinin arttığı bildirilmiştir (Perez Alenza, Rutteman, Pena, Beynen & Cuesta, 1998).Yine Lim ve arkadaşları tarafından (2022) obez

köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada ise obez köpeklerin meme tümörü açısından hem daha riskli olduğu hem de gözlenen meme tümörünün daha yüksek histolojik dereceye (grade), daha yüksek Ki67 ekspresyonuna sahip olduğu ve daha malignant olduğu gözlenmiştir (Lim ve ark., 2022). Yine insanlarda yapılan çalışmalara göre obez kadınların obez olmayan kadınlara göre meme tümörü açısından daha riskli olduğu bulunmuştur (Carmicheal 2006; Cleary & Grossmann 2009; Trentham-Dietz ve ark., 2000). Diyet, yağ ve hormonlar bir araya geldiğinde bu faktörler genomik hasar yoluyla meme kanserini indükler veya teşvik eder. Steroid reseptörlerine bağlanan belirli yağ metabolitleri, DNA transkripsiyon fonksiyonlarını yükseltip azaltabildiğinden, diyetteki yağ ve kanser arasındaki ilişki çok karmaşıktır. Adipositler önemli testosteron kaynakları ve dolayısıyla östrojen sentezi olduğundan, vücut yağ birikintileri hormonal dengeyi de değiştirebilir. Androjenin östrojene dönüşümü vücut kütlesi ve vücut yağ derecesi ile orantılı olabilir (Cleary & Grossmann 2009; Salas ve ark., 2015).

2.4.4. Köpek Meme Tümörlerinde Prognostik Faktörler

Köpek meme tümörlerinde prognozu ve ortalama yaşam süresini etkileyen birçok faktör bulunur. Tümörlerin 3 cm çapından büyük olması, hızlı ve invazif büyümesi, deride ülserasyonların şekillenmesi, lenf nodu tutulumu ve uzak metastazların varlığı hastalarda kötü prognozdan sorumlu olduğu bilinmektedir (Hellmen ve ark., 1993; Yamagami, Kobayashi, Takahashi & Sugiyama, 1996; Perez Alenza, Pena, Nieto & Castano, 1997; Ferreira, Bertagnolli, Cavalcanti, Schmitt & Cassali, 2009). Malignant tümörlerde, sarkomalar kötü huylu iken; karsinomlar arasında anaplastik ve solid karsinomların, papillar, tübüler veya in situ karsinomlara göre daha düşük ortalama yaşam süresine sahip oldukları bilinmektedir (Hellmen ve ark., 1993; Misdorp, Else, Hellmen & Lipscomb, 1999). Köpek meme tümörlerinde histolojik grade sistemi kullanılmaktadır ve prognostik olarak bir öneme sahiptir. Bu sistem tübül yapısı, mitotik aktivite ve çekirdek şekillerinin farklılaşmasına göre 3 kriteri bulunur (Goldschmidt, Pena, Rasotto & Zappulli, 2011; Karayannopoulou, Kaldrymidou, Constantinidis & Dessiris, 2005). Grade I tümörler iyi diferensiye olarak isimlendirilir ve prognoz daha iyi olduğu bilinmektedir. Grade II tümörler orta

diferensiye ve grade III tümörler kötü diferensiye olarak isimlendirilmekte ve kötü prognoz olduğu düşünülmektedir (Goldschmidt ve ark., 2011; Karayannopoulou ve ark., 2005). Ki-67 ve PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) hücre proliferasyon belirteci olarak bilinir, hücre bölünme siklusu ile ilişkilidir ve yüksek oranda bölünmesi köpek meme tümörlerinde metastaz şekillenme olasılığının arttırdığını ve ortalama yaşam süresini azalttığı bildirilmiştir (Pena ve ark., 1998; Santos ve ark., 2013). Köpeklerde kedilerden farklı olarak siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunun Human Epidermal Growth Factor 2 (HER2) ekspresyonunu arttırdığı ve bu yüzden prognozu kötüleştirdiği belirtilmiştir (Millanta ve ark., 2006). COX-2 ile ilgili yapılan son çalışmalar, COX-2 ekspresyonunun lenf nodu metastazları, uzak doku metastazları ve düşük ortalama yaşam süresi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Lavalle, Bertagnolli, Tavares & Cassali, 2009; Queiroga, Pires, Lobo & Lopes, 2010). İnsanlarda son yıllarda yapılan çalışmalar, östrojen alfa reseptör ekspresyonu gözlenen meme tümörlerinin gözlenmeyenlere göre daha iyi bir prognoza sahip olduğu bulunmuştur (Platet, Cathiard, Gleizes & Garcia, 2004). Köpek meme tümörlerinde de son yıllarda yapılan çalışmalar düşük östrojen alfa reseptörüne sahip tümörlerde deri ülserasyonlarının, lenf noduna yayılımının ve uzak doku metastazını arttırdığını bu yüzden östrojen alfa reseptör ekspresyonunun varlığının iyi prognoza neden olduğu bildirilmiştir (de las Mulas, Millan & Dios 2005; Nieto ve ark., 2000). Köpek meme tümörlerinde kullanılan bir diğer prognostik belirteç progesteron ekspresyonudur ve progesteron ekspresyonu olan köpeklerde ortalama yaşam süresinin uzadığı bildirilmiştir (Chang ve ark., 2009). HER2 aşırı ekspresyonu, bazı araştırmacılar tarafından köpek meme tümörlerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (de las Mulas, Ordas, Millan, Fernandez-Soria & Cajal, 2003; Dutra, Granja, Schmitt & Cassali, 2004). Fakat Ressel ve arkadaşlarının (2013) yılında yaptığı bir çalışmada HER-2 aşırı eksprese eden karsinomlu köpeklerin, HER2'yi aşırı eksprese etmeyen karsinomlu köpeklere oranla daha kötü bir prognoza sahip olmadığını belirtmiştir (Ressel ve ark., 2013). Köpek meme tümörlerinde p53 gen mutasyonunun belirgin bir şekilde ortalama yaşam süresini kısalttığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2004; Wakui ve ark., 2001).

2.4.5. Köpek Meme Tümörlerinin Sınıflandırılması

Bazı klinik bulgular (hızlı büyüme, tümörün boyutu, ülserasyon veya deriye veya daha alt dokulara yayılım gibi) meme tümörlerinin iyi veya kötü olduğunun anlaşılması için bize yol gösterebilir fakat bunlar yeterli değildir, bu yüzden kedi ve köpek meme tümörleri için Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde bir sınıflandırılma yapılmıştır (Meuten, 2016). Köpeklerde 1974 ve 1999 yılında yapılan iki adet histolojik sınıflandırma bulunmaktadır (Goldschmidt ve ark., 2011). Fakat bu iki sistem baz alınarak 2011 yılında yeni bir histolojik sınıflandırma yapılmıştır (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.1. Hiperplazi/Displazi

2.4.5.1.1. Kanal Ektazisi (Duct Ectasia)

Makroskobik olarak mavimsi bir görünüme sahip geniş ektazik kanallar ile birlikte mikroskobik olarak majör (ekstralobüler) kanalların dilatasyonu ve bu kanalların etrafında meydana gelen yangı hücre infiltrasyonları karakterize bir meme hiperplazisidir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.1.2 Lobüler Hiperplazi (Adenosis)

Adenosis olarakta isimlendirilen lobüler hiperplaziler, kanalcık sayılarının artması veya lobül başına artan asinüsler nedeniyle lobüllerin mikroskobik genişlemesi olarak bilinirler (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.1.2.1. Düzenli Lobüler Hiperplazi

Meme bezindeki kanalcıklar ve lobül başına düşen asinüslerin artması sonucu intralobüler kanalların, epitel ve miyoepitel hücrelerin neoplastik olmayan proliferasyonudur. Fibrosis yoktur ve normal meme bezi yapısı korunmuştur (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.1.2.2. Laktasyonal Lobüler Hiperplazi

Gebe olmayan dişi köpeklerde bez sayısındaki artış ve kanalların genişlemesi nedeniyle intralobüler kanalların ve asinüslerin neoplastik olmayan proliferasyonudur. Asinüsler vakuollü sitoplazmaya sahip, atipik sitoplazmik kabarcıklar içeren aktif olarak sekresyon yapan hücrelerle döşenmiştir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.1.2.3. Fibrosisli Lobüler Hiperplazi

Lobül başına artan kanal sayısı ve artan miktarda interlobüler fibröz bağ dokusu ile karakterize intralobüler kanallar ve asinüs artışı ile sonuçlanan neoplastik olmayan bir proliferasyondur (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.1.2.4. Atipik Lobüler Hiperplazi

Atipili lobüler hiperplazi, intralobüler kanal/kanalların ve lobül başına kanalların/kanalların ve lobül başına asinüslerin sayısının artmasıyla birlikte, neoplastik olmayan bir proliferasyondur. Epitel hücreleri, değişken sayıda mitotik figürle epitelyal hiperplazi, nükleer hiperkromazi, anizokaryoz ve anizositoz dahil olmak üzere atipik değişiklikler gösterir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.1.3. Epiteliyozis

Kanal lümenlerinde epitel hücrelerin düzenli proliferasyonunu gösteren bir lezyondur. Hücre kümeleri genellikle kanal lümenlerini doldurur (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.1.4. Papillomatozis

İntraduktal papillomatoziste lezyon, fibrovasküler stroma ile desteklenmeyen fokal ve multifokal intraduktal papiller epitel proliferasyonları ile karakterizedir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.1.5 Fibroadenomatöz Değişiklikler

Fibroadenomatöz değişiklikler, köpeklerde interlobüler kanalların ve periduktal stromal hücrelerin proliferasyonunu gösteren nadir bir lezyondur (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.1.6 Jinekomasti

Jinekomasti, histopatolojide saptanan kanal ektazisi ve lobüler hiperplazisi olan bir erkekte meme bezlerinin genişlemesini ifade eder (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016; Swerdloff & Chiu Ming, 2019).

2.4.5.2. Benign Meme Tümörleri

2.4.5.2.1. Adenom

Adenomalar, bazen amorf amfofilik sekresyon içeren tübüller içinde düzenlenmiş hücrelerden oluşan, iyi sınırlı, infiltratif olmayan nodüler lezyonlardır (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.2.2. İntraduktal Papiller Adenom (Duktal Papillom)

İntraduktal papiller adenom, bir fibrovasküler sap ile desteklenen papiller bir büyüme modeline sahip bir tümördür (Misdorp, Else, Hellmen & Lipscomb, 1999). Papilla tek bir odakta veya birden fazla kanalda birden fazla odakta gelişebilir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.2.3. Duktal Adenom (Bazaloid Adenom)

Duktal adenomda neoplastik kitle sıklıkla ektazik bir kanalın (veya kanalların) lümeni (veya lümenleri) içinde bulunur. İki ayrı sıra (luminal ve bazal) ile tek tip çift katmanlı kordonlar halinde düzenlenmiş hücrelerden oluşur (de las Mulas, Ordas, Millan, de los Monteros & Reymundo, 2002; Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.2.3.1. Skuamöz Diferensiyasyon ile birlikte Duktal Adenom (keratohyalin granülleri)

Bu adenomlar, intrasitoplazmik keratohyalin granülleri ve duktal lümen içinde bir miktar keratinli debris birikimi ile çok sayıda skuamöz farklılaşma odaklarına sahiptir ve proksimal kanalların ve meme başı sinüsünün birleştiği yerde normal olarak görülen değişikliği taklit eder (Meuten, 2016).

2.4.5.2.4. Fibroadenom

Fibroadenom, küboidal veya kolumnar hücrelerle döşeli tübüllerden oluşan, çekirdekleri yuvarlak ve üniform olan neoplastik bir kitledir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.2.5. Miyoepiteliyom

Miyoepiteliyom, hücre dışı bir fibriler bazofilik materyal (miksoid matriks) ile karıştırılmış kısa demetler halinde düzenlenmiş iğ şeklindeki hücrelerden oluşan nadir gözlenen bir tümör tipidir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.2.6. Kompleks adenom (adenomiyoepiteliyoma)

Kompleks adenom, hem epitelyal (tübüler) hem de miyoepitelyal çoğalma ile karakterize, iki hücre popülasyonundan ve değişken miktarlarda fibröz stromadan

oluşan bir tümördür (Bauchet ve ark., 2008). İlk popülasyon, küboidalden kolumnar epitele doğru değişen ve orta derecede eozinofilik sitoplazmaya sahip hücrelerle döşeli tübüllerden oluşur. İkinci popülasyon, zayıf sınırlı hücre sınırlarına ve orta miktarda sitoplazmaya sahip iç-yıldız şekilli hücrelerden oluşur (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.2.7. Benign Mikst Tümör

İyi huylu mikst tümör, kıkırdak ve/veya kemik odaklarıyla hem epitelyal (tübüler) hem de miyoepitelyal proliferasyona sahiptir. Bu neoplazi ikiden fazla hücre popülasyonundan ve değişken miktarlarda fibröz stromadan oluşur. İlk popülasyon küboidalden kolumnara kadar olan ve orta derecede eozinofilik sitoplazmaya sahip hücrelerle döşeli tübüller ve kordonlardan oluşur. İkinci popülasyon, zayıf sınırlı hücre sınırlarına ve orta miktarda sitoplazmaya sahip iç ile yıldız hücrelerden oluşur (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016). Bu iyi huylu mikst tümörlerde kıkırdak ve kemiğin kökeni hakkında bazı tartışmalar vardır (Misdorp ve ark., 1999). Kemik ve kıkırdak, epitel hücrelerin (Monlux, Roszel, MacVean & Palmer, 1977), miyoepitelyal hücrelerin (Destexhe, Lespagnard, Degeyter, Heymann & Coignoul, 1993; Pulley 1973; Tateyama, Uchida, Hidaka, Hirao & Yamaguchi, 2001) ve interstisyel stromal hücrelerin (Vos ve ark., 1993) metaplastik değişikliğinden kaynaklanabilir.

2.4.5.3. Malignant Epiteliyal Tümörler

2.4.5.3.1 Karsinom *in situ*

In situ karsinomlar, bazal membrandan çevredeki meme dokusuna yayılmayan, yoğun hücreli ve düzensiz tübüller halinde düzenlenmiş hücrelerden ve iyi sınırlı nodüllerden oluşan neoplastik bir dokudur (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.3.2. Tübüler Karsinom

Tübüler karsinom, hücrelerin ağırlıklı olarak tübüler bir şekilde düzenlendiği bir karsinomdur. Tübüler karsinomlar, köpeklerde sık görülen meme karsinomlarıdır. Tübüllerin epitel hücre hattı genellikle 1 ila 2 hücre kalınlığındadır ve hücrelerin morfolojileri değişkendir. Çekirdekler hipokromik, normokromik veya hiperkromik olabilir (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.3.3. Tübülopapiller Karsinom

Tübülopapiller karsinom, neoplastik tübüllerin ağırlıklı olarak sapsız veya saplı papiller tarzda düzenlendiği bir karsinomdur. Papilla, ince bir fibrovasküler bağ dokusu stroması tarafından desteklenir (Misdorp ve ark., 1999; Misdorp, Cotchin, Hampe, Jabara & von Sandersleben ve ark., 1973).

2.4.5.3.4. Kistik Papiller Karsinom

Meme karsinomlarının kistik-papiller tipidir, belirgin dilate ve kistik tübüler lümen içine uzanan papillalar olması bakımından tübüler tipten farklıdır. Papilla, ince bir fibrovasküler bağ dokusu stroması tarafından desteklenir ve genişlemiş tübüler lümen, dejenere olmuş granülositler ve köpüklü makrofajlarla birlikte, eozinofilik, genellikle ince homojen bir materyal içerebilir (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.3.5. Kribriform Karsinom

Nadir gözlenen bu tümör tipi genellikle elek benzeri bir düzen oluşturan neoplastik epitel hücre popülasyonunun proliferasyonu ile karakterizedir (Goldschmidt ve ark., 2011). Oluşan lümen genellikle çok küçük, yumuşak ve etrafı neoplastik hücre köprüleriyle çevrilidir. İnterstisyel bağ dokusu seyrek. Neoplastik hücreler kolumnardan poligonal hücrelere kadar değişir ve genellikle yetersiz homojen eozinofilik sitoplazmaya sahiptir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.3.6. Mikropapiller İnvazif Karsinom

Mikropapiller invazif karsinom, köpeklerde yakın zamanda tanımlanan bir meme tümörüdür (Gama, Alves & Schmitt, 2008). Meme dokusu içinde, küçük intralüminal düzensiz kümeler oluşturan intraduktal neoplastik bir popülasyon ve destekleyici bir fibrovasküler sapı olmayan ve boş laküner boşluklarla çevrili küçük papiller ile karakterize edilen bir veya daha fazla nodül bulunur. Neoplastik hücreler duktal duvarlar boyunca büyür ve periduktal kollajenöz stromaya infiltre olur (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.3.7. Solid Karsinom

Solid karsinomlar, hücrelerin ağırlıklı olarak solid tabakalar, kordonlar veya kitleler halinde düzenlendiği, lümensiz karsinomlardır (Misdorp, Cotchin, Hampe, Jabara & von Sandersleben, 1972). Bu tümör, tubüler tip meme karsinomundan daha az sıklıkta görülür ve ince bir fibrovasküler stroma tarafından desteklenen yoğun, düzensiz boyutlu lobüller oluşturmak üzere birbirine yakın dizilmiş hücrelerden oluşur (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.3.8. Komedokarsinom

Komedokarsinom, neoplastik hücre kümelerinin merkezinde nekrotik alanların varlığı ile karakterize bir meme tümörü tipidir. Nekroz alanlarında, hücre debrisleri, nekrotik nötrofiller ve makrofajlarla karışmış bol miktarda amorf eozinofilik materyal bulunur. Nekrozun apoptoz ve karyoreksisin bir kombinasyonu olduğu düşünülmektedir (Canadas ve ark., 2019; Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.3.9 Anaplastik Karsinom

Anaplastik karsinom, meme karsinomlarının en malignant olanıdır ve sıklıkla neoplastik hücreler tarafından interlobüler bağ dokusu ve lenfatik damarlara yaygın invazyonu gösterir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016;).

2.4.5.3.10. Kompleks Adenom veya Benign Mikst Tümörde Ortaya Çıkan Karsinom

Bu tümörün iyi huylu karşılığı olan kompleks adenom ya da benign mikst tümör preparat incelendiğinde kesitte hala gözlenmektedir ve bununla birlikte multifokal pleomorfik epitel hücre alanları ve çok sayıda mitoz gözlenmektedir. Nükleer ve hücresel pleomorfizmdaki bu belirgin artış, önceden var olan benign epitelyal bileşenle karşılaştırıldığında, bu tanıyı koymak için gerekli bir özelliktir (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.3.11. Kompleks Karsinom

Bu tümörler, malignant epitelyal bir bileşen ile benign miyoepiteliyal bir bileşen içerirler (Meuten, 2016). Bu tümör, fibrovasküler stroma tarafından desteklenen iki farklı hücre tipi ile karakterizedir (Meuten, 2016). Birinci tip hücre popülasyonu epitel hücrelerdir, tek bir katmanla, az ila orta miktarda eozinofilik sitoplazmaya sahip birkaç küboidal ila kolumnar hücre katmanıyla döşeli düzensiz tübüller halinde gözlenir. İkinci hücre popülasyon tipi, intersitisyum içindeki iç şeklindeki hücrelerden (miyoepiteliyal hücreler) oluşur ve bir fibriller bazofilik (miksoid) matriks içinde düzensiz demetler halinde görülmektedir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.3.12. Karsinom ve Malignant Miyoepiteliyom

Epiteliyal ve miyoepiteliyal bileşenlerin ikisinde malignant karakterdedir. İki tip histopatolojik varyantı bulunmaktadır. Daha yaygın olan varyant daha yaygın olarak küboid hücrelerden kolumnar hücrelere kadar değişen epitel hücreleri ile çevrili düzensiz tübüllerin meydana geldiği bir oluşumdur. Bu varyanttaki ikinci hücre popülasyonu ise periferik olarak tübüllere kadar genişleyen intersitisyum hücreleridir. Daha az yaygın olan varyantta, epitel hücrelerinin yuvaları ve trabekülleri vardır ve epitelyal bileşenin periferinde, genellikle iç şeklinde olan ve hücre sınırları zayıf

şekilde sınırlandırılmış ve orta derecede homojen eozinofilik veya bazofilik sitoplazmaya sahip ikinci hücre popülasyonu bulunur (Meuten, 2016).

2.4.5.3.13. Mikst Karsinom

Malignant epitelyal bileşene ve benign karakterde, kemik/kıkırdak gibi mezenkimal bileşene sahip olan bir meme tümörü tipidir. Bu tümör tipi fibrovasküler stroma ile desteklenmiş üç veya daha fazla farklı hücre popülasyonuna sahiptir. Birinci hücre tipi düzensiz tubülleri çevreleyen epitel hücreleri, ikinci hücre tipi iç şekilli miyoepitel hücreleri, üçüncü hücre tipi atipi içermeyen kıkırdak ve/veya kemik ve /veya yağ doku hücreleridir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.3.14. Duktal Karsinom

Duktal adenomun malignant karşılığı olan bu tümör tipi memedeki interlobüler kanalların farklılaşması sonucu meydana gelmektedir. Neoplastik hücre popülasyonu, genellikle belirgin anizokaryozis ve anizositozis gösteren çok katlı stratifiye epitel hücreleridir ve yarık benzeri, lümeni çevreleyen kordonlar ve tubülleri kaplar; ayrıca çok sayıda mitotik figür vardır (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.3.15. İntraduktal Papiller Karsinom

İntraduktal papiller adenomun malignant karşılığıdır. Stratifiye çok katlı epitel hücrelerinde proliferasyonlar ile birlikte epitel hücrelerinde pleomorfik şekilli hücreler, artmış hücre çekirdek oranı, anizositozis, anizokaryozis gibi değişiklikler gözlenmektedir (Meuten, 2016).

2.4.5.4. Özel Tip Malignant Epitelyal Tümörler

2.4.5.4.1. Yassı Hücreli Karsinom

Yassı hücreli karsinomlar sadece yassı epitel hücrelerinden oluşurlar. Tümörün kökeni ya meme kanalının yassı hücrelerinden ya da skuamöz metaplazi ve neoplastik transformasyon geçirmiş duktal epitel hücrelerindendir. Kökenleri meme bezinde olan yassı hücreli karsinomları, kökenleri üstteki epidermisten gelen ve alttaki meme bezine yayılmış olan yassı hücrelerden ayırmak genellikle zordur (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.4.2. Adenoskuamöz Karsinom

Bu tümör, tümör hücrelerinin skuamöz farklılaşma ve malignite özellikleri (yassı hücreli karsinom) sergilediği odaklarla birlikte herhangi bir tipteki karsinom alanlarından meydana gelir (Goldschmidt ve ark., 2011; Rasotto, Berlato, Goldschmidt & Zappulli, 2017).

2.4.5.4.3. Müsinöz Karsinom

Müsin üretimi ile karakterize nadir gözlenen bir meme tümörüdür. Neoplastik mukus üreten epitelyal hücreler tek tek olabilir veya tubül ve yuvalar oluşturabilirler. Bu hücreler Periyodik Asit-Schiff (PAS) ve müskarmin pozitif hücrelerdir (Meuten, 2016).

2.4.5.4.4. Lipidden Zengin Karsinom (Lipid Rich Carcinoma)

Genç kısır köpeklerde bulunabilen tümörlerdir. Hücreler yuvarlak ila ovaldır, belirgin hücre sınırları vardır ve çok sayıda küçük vakuol veya bazen çekirdeği periferalize eden tek bir büyük vakuol içeren orta ila bol sitoplazmalıdır. Preparatta gözlenmeyen bir fibrovasküler stromaya sahiptir (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.4.5. İğ Hücreli Karsinomlar

Bu tür meme tümörlerin hücre morfolojisi ve rutin boyamalar ile tanı koyulması zordur bu yüzden immunohistokimyasal boyamalar ile mezenkimal iğ hücreli sarkomalardan ayırt etmek gerekmektedir (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.4.5.1. Malignant Miyoepteliyom

Bu tümörde hücreler oval-iğ şekilli hücrelerdir. Oval hücrelerin sınırları genellikle zayıftır ve ara sıra intrasitoplazmik, berrak vakuollerle birlikte orta miktarda eozinofilik veya bazofilik sitoplazmaya sahiptir. Bu hücre popülasyonunun çevresinde, hücrelerin sitoplazmasındaki vakuoller içinde görülebilen yetersiz, değişken bazofilik fibriler materyal (miksoid matriks) bulunur (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.4.5.2. Yassı Hücreli Karsinomların İğ Hücre Varyantı

Yassı hücreli karsinomun iğ hücre varyantı, ince bir fibröz stroma tarafından desteklenen epitel hücrelerinin adalarından ve kordonlarından oluşur. Hücreler ve çekirdekler büyük ve iğ şeklindedir ve hücreler, ara sıra skuamöz epitel farklılaşmasının düzensiz odaklarının oluşumuyla birlikte intrasitoplazmik keratin tonofilamentleri ve hücreler arası köprüler üretir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.4.5.3. Karsinom-İğ Hücre Varyantı

Karsinomların iğ hücre varyantı, hücrelerin ağırlıklı olarak iğ şeklinde olduğu bir varyanttır (Misdorp ve ark., 1999). Tümör genellikle tübüler karsinom alanlarıyla doğrudan ilişkili olan epitel hücrelerinin ada ve kordon yapısı oluşturmasıyla meydana gelir. Bu hücreleri çevreleyen fibrovasküler bir stroma bulunmaktadır (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.4.6. İnflamatuvar Karsinom

İnflamatuvar karsinom terim olarak meme nodülleri olan veya olmayan meme bezlerinin ani ve şiddetli gelişen klinik seyir, ödem, eritem, sertlik ve sıcaklık ile karakterize bir klinik tablosudur (Clemente, Perez-Alenza, Illera & Pena, 2010). Histolojik olarak ayırıcı tanıda dermal lenfatik damarlarda neoplastik emboli gözlenir. Bölgede bulunan şiddetli ödem, yüzeysel lenfatiklerin tümör hücreleri tarafından tıkanması sonucu meydana gelir (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.5. Malignant Mezenkimal Tümörler (Sarkomlar)

2.4.5.5.1. Osteosarkom

Osteosarkomlar, köpek meme bezinin en yaygın mezenkimal kökenli tümörüdür ve genellikle bir süredir (yıllarca) mevcut olan bir meme kitlesinin yakın zamanda hızlı büyümesinin bir öyküsü vardır. Tümör dokusunda, osteoid ve/veya kemik oluşumu adaları ile ilişkili olarak, fusiformdan yıldız ve oval arasında değişen şekillerde hücrelerin proliferasyonu vardır. Mitozlar sıklıkla bulunur. Bu tümörlerin biyolojik davranışı, vücudun diğer bölgelerinde şekillenen osteosarkomlarınkine benzerdir ve hematojen yolla, özellikle akciğerlere metastaz yapar (Goldschmidt ve ark., 2011; Meuten, 2016).

2.4.5.5.2. Kondrosarkom

Yaygın olmayan kıkırdaktan köken alan bir tümördür. Genellikle çok loblu olarak gözlenmektedir. Lobüllerin periferindeki neoplastik hücreler, küçük, yuvarlak, hiperkromatik ve çift veya daha fazla çekirdekli (Meuten, 2016).

2.4.5.5.3. Fibrosarkom

Fibrosarkom, önceden var olan bir meme bezi tümörü içinde olabilen veya meme bezinin interstisyel stromasından kaynaklanabilen, nadir görülen bir meme tümörüdür. Belirgin bir şekilde iç içe geçmiş bir görünüme sahip fusiform hücrelerin proliferasyonu vardır (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.5.4. Hemanjiyosarkom

Bu tümör dermal bölge veya deri altında değil primer olarak meme dokusunun içinde meydana gelir (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.6. Karsinosarkom (Malignant Mikst Meme Tümörü)

Nadir gözlenen meme tümörüdür. Karsinom ve sarkoma meme dokusunda aynı anda gözlenir, sıklıkla tübüler karsinom ile osteosarkom birlikte (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.7. Meme Başının Tümörleri

2.4.5.7.1. Duktal Adenoma/Karsinom

Duktal adenoma ve karsinom, altta yatan meme bezinde neoplastik doku olmayan, yalnızca meme ucunun dokusunda bulunan nadir tümördür. Meme ucu büyümüş ve sertleşmiştir (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.7.2. Epidermal İnfiltrasyon ile Birlikte Karsinom (Paget-like Disease)

Meme başının altındaki meme bezinde karsinom bulunuyor iken neoplastik hücrelerin tek tek veya küçük gruplar halinde meme başındaki epidermiste gözlenmesidir (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.4.5.8. Meme Başının Hiperplazisi/Displazisi

2.4.5.8.1. Meme Başı Derisinde Melanozis

Meme ucu hiperplazisi/displazisi, epidermis içinde melanositlerin lentigo benzeri bir proliferasyonudur. Lezyon fokal bir odaktadır ve meme kanallarını çevreler. Epidermis hafif hiperplastiktir (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.5. Dişi Kedilerde Meme Tümörü

2.5.1. Dişi Kedilerde Meme Tümörü Giriş

Kedi meme tümörleri, en yaygın görülen 3 kedi tümöründen biridir ve kedilerde kutanöz/subkutanöz sarkomalar ve malignant hematopatilerden sonra gelir (Egenvall ve ark., 2010; Graf ve ark., 2016; Vascellari, Baioni, Ru, Carminato & Mutinelli, 2009). Dişi kedilerde gözlenen tüm tümörlerin %12'sini meme tümörleri oluşturmaktadır (Dorn ve ark., 1968; Hayes & Mooney, 1985). Kedi meme tümörlerinin %80-96'sının malignant karakterde olduğu yapılan çalışmalar tarafından bildirilmiştir (Bostock 1986; Hayden & Nielsen 1971; Hayes, Milne & Mandell, 1981; Patnaik, Liu, Hurvitz & McClelland, 1975)

2.5.2. Kedi Meme Tümörü İnsidensi

Kedilerde meme tümörlerinin insidensi yapılan çalışmalar, coğrafik bölgeler ve ülkelerin kısırlaştırma politikalarına göre değişmektedir (Morris 2013). Dorn ve ark. (1969) yaptığı bir çalışmada yıllık 100.000 dişi kedide 25.4 olarak bildirmesine rağmen son yıllarda yapılan yeni bir çalışmada ise yıllık insidens 100.000 kedide 230 olarak bulunmuştur (Egenvall ve ark., 2010). Vail ve MacEwen'in yaptığı bir çalışmada ise insanlarda yıllık insidens 100.000 bireyde yaklaşık 300 iken dişi köpeklerde 381 dişi kedilerde ise 264 olduğu belirtilmiştir (Vail & MacEwen 2000) Yakın bir zamanda yapılan bir çalışmada ise yıllık insidens köpeklerde 100.000 de 282 iken kedilerde bu oranın daha düşük olduğu ve 100.000 de 77 olduğu bildirilmiştir (Vascellari ve ark. 2009). Chactou ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada ise

100.000 kedide 184 olarak bulunmuş ve yıllık insidensin köpekler ile neredeyse aynı olduğu bildirilmiştir (Chocteau ve ark., 2019).

2.5.3. Kedi Meme Tümörlerinde Risk Faktörleri

Kedi meme tümörlerinde yapılan çalışmalarda en önemli risk faktörleri yaş, ırk, ovaryohisterektomi ve dışardan hormon uygulamaları olarak bildirilmiştir (Meuten, 2016).

2.5.3.1. Yaş

Kedilerde meme tümörleri 9 ay ile 19 yaş arası her yaşta rapor edilmiştir (Weijer, Head, Misdorp & Hampe, 1972). Hayes ve arkadaşları tarafından (1985) yapılan çalışmada en çok gözlenen yaştan ortalama 10.4 olduğu en çok da 10-14 yaş arasında gözlemlendiği bildirilmiştir (Hayes ve ark., 1985). Ito ve arkadaşlarının (1996) yılında yaptığı çalışmada 53 meme tümörü gözlenen kedi incelendiğinde meme tümörü görülme yaşının 7-21 yaş arasında gözlemlendiği ortalamanın ise 11.1 olduğu dikkati çekmiştir (Ito ve ark., 1996). Viste ve arkadaşlarının (2002) 37 hayvan üzerinde yaptığı bir çalışmaya göre ortalama meme tümörü görülme yaşı 12.3 olduğu en sık görülme yaşının ise 9-13 yaşları arasında olduğu bulunmuştur (Viste, Myers, Singh & Simko, 2002). Zapulli ve arkadaşları (2005) ise kedilerde ortalama meme tümörü görülme yaşının 10-11 iken bu riskin 14 yaş ve üzerine çıkıldıkça arttığını belirtmiştir (Zapulli, Zan, Cardazzo, Bargelloni & Castagnaro, 2005).

2.5.3.2. Irk

Yapılan çalışmalarda kedi meme tümörlerinde en çok riskli grubun Siyam ve domestik shorthair ırkı kediler olduğu bulunmuştur (Hayes ve ark., 1981). Viste ve arkadaşları (2002) tarafından 37 kedi ile yapılan bir araştırmada meme tümörü teşhisi konulan 37 kediden 22 tanesinin (%59) domestik shorthair, 4 tanesinin (%11) domestik longhair, 4 tanesinin (%11) Siyam ırkı kedi olduğu dikkati çekmiştir (Viste ve ark., 2002). Ito ve arkadaşlarının (1996) Japonyadaki kediler üzerinde yaptığı bir çalışmada ise 53 meme tümörü teşhisi konulan kediden 27 tanesinin Japon domestik

kedisi, 18 tanesi Siyam, 4 tanesinde İran kedisi ırkı olduğu bildirilmiştir (Ito ve ark., 1996). İlginç bir şekilde Siyam kedilerinin diğer meme tümörüne yatkın ırklardan daha erken yaşta meme tümörü görülmeye genetik olarak yatkın olduğu belirtilmiştir (Sorenmo 2011).

2.5.3.3. Hormonal Faktörler

Hormonal faktörler kedilerde meme tümörü gelişiminde ana rol oynarlar (Overley, Shofer, Goldschmidt, Sherer & Sorenmo, 2005; Sorenmo 2011). Normal meme bezleri östrojen ve progesteron reseptörleri içerir. Puberta ile birlikte kedilerde östrojen ve progesteron salınımı ile meme bezleri gelişmeye ve büyümeye başlarlar (Murphy 2008). Bu, meme kanallarının hücrelerinin ve stromal hücrelerin çoğalmasına neden olan büyüme faktörleri aracılığıyla gerçekleşir (Murphy 2008). Yapılan çalışmalar kedilerde östrojen, progesteron, prolaktin ve büyüme hormonlarının normal meme ve neoplastik meme dokusunun gelişiminde rol oynadığını göstermiştir (Martin, Cotard, Mialot, Andre & Raynaud 1984; Russo & Russo, 1998; Russo, Lareef, Balogh, Guo & Russo, 2003; Rutteman & Misdrop, 1993). Meme tümörleri eğer iyi huylu ise genelde östrojen ve progesteron pozitif kötü huylu ise östrojen ve progesteron negatif olma eğilimindedir (de las Mulas ve ark., 2000; de las Mulas, 2002; Millanta ve ark., 2005; Millanta, Calandrella, Vannozzi & Poli, 2006). Erken yaşta kısırlaştırma köpeklerde ve kedilerde meme tümörü üzerinde etkilidir. Yapılan bir çalışmaya göre 6 aylık yaşta kısırlaştırılan kedilerde kısırlaştırılmayan kedilere göre meme tümörü oluşum riskinin 7 kat daha azaldığı bildirilmiştir (Dorn ve ark., 1968). Ayrıca insanlarda doğurganlık yaşı ve çoklu doğum yapma nedenlerinin meme tümörü oluşumunu azalttığı bilinse de kedilerde bu nedenlerin meme tümörü gelişimi üzerine herhangi bir etkisi bulunamamıştır (Misdrop ve ark., 1991; Mogren, Stenlund & Hogberg, 2001).

2.5.4. Kedi Meme Tümörlerinde Prognostik Faktörler

Kedi meme tümörlerinde prognostik faktörler; TNM derecelendirme sistemi, lenf noduna invazyon, lenfovasküler emboli, tümörün boyutu, tümörün alttipi, histopatolojik grade sistemi, mitotik index, Ki67 pozitif hücre sayısı, östrojen

reseptörü pozitif boyanan hücre sayısı, HER2 pozitif boyanan hücre sayısı ve Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) boyanan pozitif hücre sayısı olduğu bildirilmiştir (Zapulli ve ark., 2015). TNM derecelendirme sistemine göre sınıflandırılan hastaların ortalama yaşam süreleri stage I için 24-29 ay arası, stage II için 12.5-13 ay arası, stage III için 6-9 ay arası, stage IV için ise 1 ay bulunmuştur (Ito ve ark., 1996; Seixas, Palmeira, Pires, Bento & Lopes, 2011). Lenf nodu invazyonuna göre bakıldığında ise eğer lenf nodu invazyonu yok ise ortalama yaşam süresi 13 ay iken lenf nodu invazyonu var ise yaşam süresi ortalama 5 ay olduğu gözlenmiştir (Seixas ve ark., 2011). Lenfovasküler emboli negatif iken ortalama yaşam süresi 36 ay iken pozitif olduğu durumlar da bu süre 7 aya düşmektedir (Seixas ve ark., 2011; Skorupski ve ark., 2005; Tanabe ve ark., 2002). Tümör boyutunun kedi meme tümörlerinde önemli bir prognostik faktör olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Matos, Baptista, Gartner & Rutteman, 2012; Morris 2013; Murphy 2008; Viste ve ark., 2002). Ito ve arkadaşlarının (1996) tümör boyutu ile yaşam süresi ilişkisi hakkında yaptığı bir çalışmada tümörün boyutu 3 cm veya daha küçükse ortalama yaşam süresini 9 ay 3 cm'den daha büyük ise 5 ay olarak belirlemişlerdir (Ito ve ark., 1996). Yine son yıllarda yapılan çalışmalar, 2 cm'den küçük tümörlerde ortalama yaşam süresinin 12-54 ay arasında olduğu, 2-3 cm arasındaki tümörlerde 5.1-24 ay olduğu ve 3 cm'den büyük tümörlerde ise 1.6-6 ay arasında olduğu bulunmuştur (MacEwen ve ark., 1984; Seixas ve ark., 2011; Skorupski ve ark., 2005; Weijer ve ark., 1983). Histopatolojik alt tiplere göre ortalama yaşam süresi arasında yapılan bir çalışmada tubülopapiller karsinomların 36 ay, kompleks tip karsinomların 27-32,6 ay arası, kompleks olmayan karsinomların 15,5 ay, invazif olmayan mikropapillar meme karsinomların (non-MIMC) 10 ay, solid karsinomlarda 8 ay, invazif mikropapillar meme karsinomlarında (MIMC) 4-7 ay ortalama yaşam süresi olduğu bildirilmiştir (Seixas, Palmiera, Pires & Lopes, 2007; Seixas, Palmiera, Pires & Lopes, 2008; Seixas, Pires & Lopes, 2008; Seixas ve ark., 2011). Histolojik olarak grade belirlenen kedi meme tümörlerinde grade I olarak sınıflandırılan tümörlere sahip olan kedilerde ortalama yaşam süresi 36 ay, grade II olan kedilerde 18 ay ve grade III olan kedilerde 6 ay olduğu belirtilmiştir (Castagnaro ve ark., 1998; Seixas ve ark., 2011). Ortalama yaşam süresi ile mitotik indeks arasındaki ilişki, mitotik indeks %1,1'e eşit veya az ise 13 ay, %1,1'den fazla ise 7 ay olarak bulunmuştur (Seixas ve ark., 2011). Ki 67 pozitif hücrelerin ortalama

sayısı ile ortalama yaşam süresi arasındaki ilişki ile ilgili yapılan bir çalışmada, Ki 67 pozitif hücre sayısı %25,2'ye eşit veya daha az ise operasyon sonrası 1 yıl içinde ölüm riskinin %12,5, %25,2'den fazla ise operasyon sonrası 1 yıl içinde ölüm riskinin %87,5'e çıktığı gösterilmiştir (Castagnaro ve ark., 1998). Ki 67 pozitif hücreler ve ortalama yaşam süresi arasındaki ilişki ile yapılan bir diğer çalışmada, Ki 67 pozitif hücrelerin sayısı %36,1'e eşit veya az ise ortalama yaşam süresinin 14 ay, %36,1'den fazla ise bu sürenin 7 ay olduğu bildirilmiştir (Seixas ve ark., 2011). Millanta ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan HER2 boyanma ile ortalama yaşam süresi arasındaki ilişki ile ilgili çalışmada, HER2 negatif kedi meme tümörlerinde ortalama yaşam süresinin 18,7 ay, HER2 pozitif meme tümörlerinde bu sürenin 14,6 ay olduğu belirtilmiştir (Millanta ve ark., 2005). VEGF ile ortalama yaşam süresi arasındaki ilişki ile ilgili yapılan bir çalışmada, VEGF pozitif hücreler %72'ye eşit veya daha az ise ortalama yaşam süresinin 18,4 ay, %72'den fazla olduğunda bu sürenin 14,2 ay olduğu bildirilmiştir (Millanta ve ark., 2002).

2.5.5. Kedi Meme Tümörlerinin Sınıflandırılması

1999 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kedi meme tümörlerini histopatolojik olarak sınıflandırmıştır (Hempe ve Misdorp 1973). Bu sınıflandırmadaki birçok tümör alt tipi köpek meme tümörlerinin karşılığı olarak gözükmemektedir. Fakat kedi meme tümörleri köpeklere kıyasla daha heterojen yapıda olduğu için birkaç tane farklı alt tip bulunmaktadır (Meuten, 2016). Köpek meme tümörleri ile birçok kedi meme tümörü alt tipi histolojik olarak aynı olduğu için aynı olanlar sadece başlık olarak verilmiştir. Köpeklerde olmayan ve kedilere spesifik olan alt tip ve lezyonlar ise açık bir şekilde anlatılmıştır.

2.5.5.1. Hiperplazi/Displazi

2.5.5.1.1. Kanal Ektazisi (Duct Ectesia)

2.5.5.1.2. Lobüler Hiperplazi (Adenosis)

2.5.5.1.2.1. Düzenli Lobüler Hiperplazi

2.5.5.1.2.2. Sekratuar Aktivite Gösteren Lobüler Hiperplazi

2.5.5.1.2.3. Fibrozis ile Seyreden Lobüler Hiperplazi

2.5.5.1.2.4. Atipik Lobüler Hiperplazi

2.5.5.1.3. Epiteliyozis

2.5.5.1.4. Papillomatozis

Bu değişiklik kedilerde çok yaygındır ve sıklıkla kanal ektazisi ve lobüler hiperplaziye eşlik eder (Meuten, 2016). Papillomatozis tümöral bir lezyona bitişik meme dokusunda veya karsinomlu meme tümörü olan hayvanda radikal mastektomi operasyonu sonucu komşu meme bezleri mikroskopta incelenirse komşu meme bezlerinde de papillomatozis gözlenebilir (Meuten, 2016).

2.5.5.1.5 Fibroadenomatöz Değişiklikler

Genellikle genç, siklus gösteren dişi kedilerde gözlenir fakat gebelik boyunca da şekillenebilir. Dişi ve erkek kedilerde bu değişiklikler hormonal tedavi ile ilişkilidir (Meuten, 2016). Hormonların, özellikle de progesteronun, lezyon gelişimindeki rolü, hormonal uyarının sona ermesinden sonra veya ovariohisterektomiye takiben gelişen gerileme ile iyi bir şekilde ortaya konmuştur (de las Mulas, Millan, Bautista, Perez & Carrasco, 2000; Loretto, Ilha, Breitsameter & Faraco, 2004; Marino ve ark., 2021; Ordas, Millan, de los Monteros, Reymundo & de las Mulas, 2004;).

2.5.5.1.6. Jinekomasti

2.5.5.2. Benign Meme Tümörleri

Kedilerde iyi huylu meme tümörleri nadiren gözlenir. Genellikle gözlenen tümörler ya malignant karakterdedir ya da displazi/hiperplazidir (Goldschmidt ve ark., 2011).

2.5.5.2.1. Adenom

2.5.5.2.2 İntraduktal papiller Adenom

Meme tümörünün bu alt tipi kedilerde çok yaygın değildir (Zapulli ve ark., 2013). Bu tümör genellikle multinodülerdir ve genişlemiş kanal lümenine doğru papiller tarzda genişlemeler bulunmaktadır (Meuten, 2016). Papillalar fibrovasküler bir stroma ile desteklenmektedir (Meuten, 2016).

2.5.5.2.3. Duktal Adenom

Duktal adenom bir önceki sınıflandırmada kompleks adenom olarak sınıflandırılmaktadır (Misdorp ve ark., 1999). Genişlemiş kanalın içinde tekli veya çoklu nodüler tarzda iyi sınırlanmış kitlelerin bulunması tipiktir (Meuten, 2016).

2.5.5.2.4. Fibroadenom

2.5.5.3. Malignant Epitelyal Tümörler

2.5.5.3.1. Karsinom *in situ*

2.5.5.3.2. Basit Karsinom

2.5.5.3.2.1. Tubüler Karsinom

2.5.5.3.2.2. Tubülopapiller Karsinom

2.5.5.3.2.3. Kistik Papiller Karsinom

2.5.5.3.2.4. Kribriform Karsinom

Bu tümörün lümeni, neoplastik hücreler ile kaplı olduğu için sadece yüksek büyütmede ve zar zor gözlenir. Bu tümör, daha belirgin bir lümene sahip olan tubüler karsinom ile karıştırılabilir (Meuten, 2016).

2.5.5.3.3. Mikropapiller İnvazif Karsinom

Bu tümör hem dişilerde hem de erkeklerde gözlenebilmektedir (Seixas, Palmeira, Pires & Lopes, 2007). Bu tümör tipinde sadece %50'sinde mikropapiller invazyon alanları bulunur (Meuten, 2016).

2.5.5.3.4. Solid Karsinom

2.5.5.3.5. Komedokarsinom

Bu tip kedi meme tümörlerinde, hızlı büyümeye bağlı olarak gelişen yetersiz kanlanma sonucunda geniş nekroz alanları gözlenmektedir (Meuten, 2016). Neoplastik dokuda çoklu küçük alanlar şeklinde iyi sınırlanmış nekroz alanları var ise bu tümörler komedokarsinom olarak sınıflandırılır (Meuten, 2016).

2.5.5.3.6. Anaplastik Karsinom

2.5.5.3.7. İntraduktal Papiller Karsinom

İntraduktal papiller adenom ile karşılaştırıldığında daha düzensiz papiller çıkıntılar ile birlikte artmış çekirdek ve hücre pleomorfizmi gösterir. Adenoma göre daha fazla mitotik hücre sayısı olduğu bilinmektedir (Meuten, 2016). Kedilerde nadiren gözlenen bu tümörün ortalama yaşam süresi teşhisten sonra 1 yıldır (Zapulli ve ark., 2013).

2.5.5.3.8. Duktal Karsinom

Duktal adenomun malignant karşılığı olan bu tümör kompleks karsinom olarak da bilinir (Seixas ve ark., 2008). Tümöral hücreler genellikle yarık benzeri bir lümeni çevreleyen kordonlar, tubüller ve daha solid alanlarda gözlenir.

2.5.5.4. Özel Tipte Malignant Epiteliyal Tümörler

2.5.5.4.1. Yassı Hücreli Karsinom

2.5.5.4.2. Adenoskuamöz Karsinom

Bu meme tümörü tipinde, adenokarsinom içinde, malignite özelliklerine sahip çok odaklı skuamöz farklılaşma alanları bulunur (Meuten, 2016).

2.5.5.4.3. Müsinöz Karsinom

Kedilerde çok fazla yaygın olmayan bu tümör tipinin en belirgin histopatolojik özelliği neoplastik epitel hücrelerini çevreleyen bol miktarda mukoid matrikstir ve hücre dışı olduğunda bazofilik, hücre içi olduğunda eozinofilik görünür (Sarlı, Brunetti & Benazzi, 2006).

2.5.5.4.4. Lipidden Zengin Karsinom (Lipid-Rich Carcinoma)

2.5.5.4.5. İğ Hücreli (Spindle Cell) Karsinom

2.5.5.4.5.1. Yassı Hücreli Karsinomunun İğ Hücreli Varyantı

2.5.5.4.5.2. Karsinomun İğ Hücreli Varyantı

2.5.5.4.6. İnflamatuvar Karsinom

Kedilerdeki inflamatuvar meme karsinomu, ventral abdomende hızlı başlayan deri altı ödem, eritem ve şiddetli ağrı ile karakterize histopatolojik değil klinik bir tanıdır (Meuten, 2016). Altta yatan bir nodüler lezyon zar zor algılanabilir veya olmayabilir. Posterior meme bezlerindeki lezyonların incelenmesinde, bunlar klinik olarak (lenf)anjiosarkom ve apokrin adenokarsinomdan ayırt edilmelidir. Tipik histolojik özelliği, dermal lenfatiklerdeki neoplastik hücrelerin şiddetli embolizasyonudur (Perez-Alenza, Jimenez, Nieto & Pena, 2004).

2.5.5.5. Malignant Mezenkimal Tümörler (Sarkomlar)

Kedilerde oldukça nadir gözlenen tümörlerdir (Meuten, 2016).

2.5.5.5.1. Fibrosarkom

2.5.5.5.2. Diğer Sarkomlar

2.6 . Deney Hayvanlarında Meme Tümörleri ve İnsan Modeli

Meme kanseri, tahmini 1,67 milyon yeni kanser vakasıyla kadınlarda en çok tekrarlayan karsinomdur. Gelişmekte olan ülkelerde kadınlarda en sık kanser ölüm nedenidir (toplamın %14,3'ü) (WHO 2012). Meme kanseri, ABD'li kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir ve her 8 kadından birine meme tümörü teşhisi konduğu tahmin edilmektedir (De Santis ve ark., 2019). Meme kanserinin karmaşık etiyopatogenezinin birçok yönü belirsizliğini korurken, çevre, üreme ve hormonal durum, yaş, meme yoğunluğu, alkol ve sigara kullanımı, kalıtsal genetik mutasyonlar (örneğin, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları) ve genetik polimorfizmlerin olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir ve hepsi predispozan faktörlerdir (Bernstein 2002; Byrne ve ark., 2017; Mahdevi ve ark., 2018; McDonald, Goyal & Terry, 2013; Odefrey ve ark., 2010; Rudolph, Chang-Claude & Schmidt, 2016; Tamimi ve ark., 2016;). Bilimsel araştırmalarda, balıklar, tavşanlar, sıçanlar, fareler, köpekler, insan olmayan primatlar ve büyük hayvanlar gibi çeşitli hayvan türleri bir hastalığa karşı

model olarak kullanılabilir ve araştırmacılar uzun yıllar boyunca bu risk faktörlerini ve hastalık duyarlılığını nasıl etkilediklerini daha iyi anlamak için kemirgenleri meme/meme karsinogenezi için translasyonel modeller olarak kullandılar (Alvarado, Faustino-Rocha, Colaço & Oliveira ve ark., 2017; Isaacs 1986; Jerry ve ark., 2018; Mceuen 1938). İnsan hastalıkları için ideal bir hayvan modeli basit olmalı, pahalı olmamalı ve mümkün olduğunca insana benzer olmalıdır (Alvarado ve ark., 2017). Fareler (*Mus musculus*) ve sıçanlar (*Rattus norvegicus*), Avrupa Birliği'nde yürütülen araştırma protokollerinde en sık kullanılan türler arasındadır (Commission 2013). Gerçekten de diğer türlerle karşılaştırıldığında deney hayvanları olarak kullanılmasında bazı avantajları vardır. Bunlar; fizyolojileri ve genetiği iyi bilinir, küçük hayvanlardır, barındırılmaları ve manipüle edilmeleri kolaydır, nispeten ucuzdurlar, kullanımları hayvanların korunmasına ilişkin mevzuat tarafından kolayca onaylanır ve en önemlisi, memelidirler ve insanlarla anatomi, fizyoloji, genetik ve biyokimya gibi pek çok benzerlikleri vardır (Cardiff 2007; Iannaccone ve Jacob 2009).

Dişi sıçanlarda meme tümörlerinin (meme fibroadenomu) oluşumu ilk kez 1938'de Mceuen tarafından iki buçuk yıl boyunca mısır yağı içinde bir estron çözeltisinin günlük vajinal uygulamasından sonra tanımlanmıştır (Mceuen 1938). O zamandan beri, dişi sıçanlar meme kanseri modeli olarak sürekli kullanılmaktadır ve günümüzde meme karsinogenezini incelemek için en sık kullanılan hayvan modellerinden birini oluşturmaktadır (Cardiff 2007). Gerçekten de dişi farelerdeki meme kanseri, hormon tepkisi, histoloji, biyokimyasal özellikler ve moleküler ve genetik özellikler gibi çeşitli özellikler açısından kadınların meme kanserlerine benzer niteliktedirler (Russo ve Russo 1998; Alvarado ve ark., 2017). Buna ek olarak, fareler ile karşılaştırıldığında, sıçanlar daha fazla miktarda kan ve doku örneği sağlarlar (Hoenerhoff, Shibata, Bode & Green, 2011; Mullins, Brooker & Mullins, 2002;).

2.7. Sıçan Meme Bezi Anatomi ve Histolojisi

Dişi sıçanlar iki meme zincirine (sağ ve sol) ve her birinde birer meme bulunan torasik bölgede üç çift (servikal bölgeye kadar uzanır) ve karın-kasık bölgesinde üç çift olmak üzere altı meme bezine sahiptir (Maeda, Ohkura & Tsukamura, 2000). Kadınlarda olanın tersine, sıçan meme bezleri zayıf bir şekilde

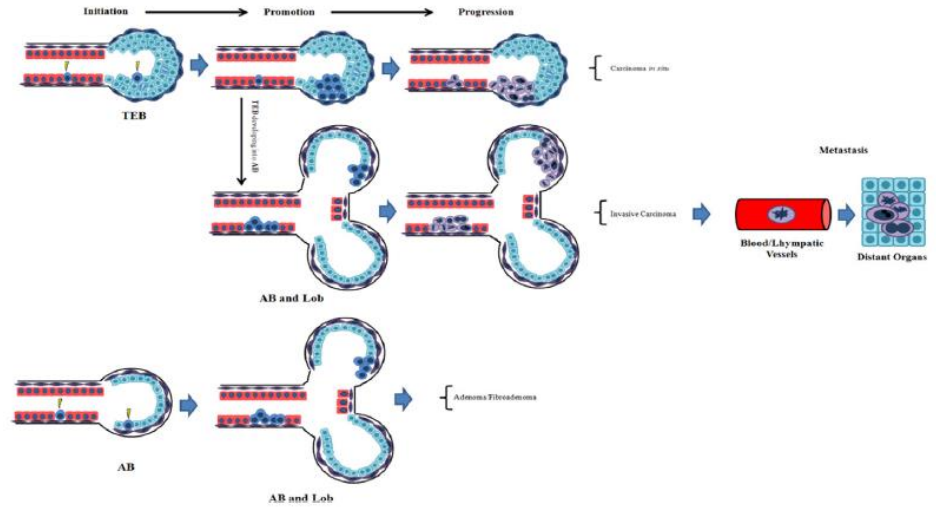
gelişmiştir ve yalnızca meme ucunun varlığıyla dışarıdan tanımlanabilirler (Maeda ve ark., 2000). Sıçan meme bezleri, büyük ölçüde çeşitli arterlerin dalları, yüzeysel servikal, torasik iç ve dış, dış pudental ve koltuk altı damarları tarafından iyi bir şekilde vaskülarize edilir (Maeda ve ark., 2000).

Mikroskopik olarak, sıçan meme bezi, bir grup dallanmış tubüler kanal ve alveolar tomurcuktan oluşan bir tubüloalveoler oluşuma sahiptir (Lucas ve ark., 2007). Sıçan meme bezi iki ana dokudan oluşur: parankimal ve stromal doku (bağ, yağ ve vasküler ağ dokuları) (Nandi, Guzman & Yang, 1995). Fare meme bezleri ile karşılaştırıldığında, sıçan meme bezi dokuları daha yüksek stromal ve parankimal bileşene sahiptir (Mullins ve ark., 2002; Hoenerhoff ve ark., 2011). Kadınlarda olduğu gibi, sıçan meme bezi hormon bağımlıdır ve östrus siklusu ve gebelikte gelişir (Hvid, Thorup, Sjörgen, Oleksiewicz & Jensen, 2012). Sonuç olarak meme bezinin salgı yapısı cinsel olgunluktan (yaklaşık 6 haftalıkken), östrus döngüsünden ve gebelikten etkilenir (Sengupta 2013). Östrojen ve büyüme hormonu, duktal uzamadan sorumlu ana hormonlar olarak kabul edilir. Bunlara rağmen, meme bezinin çoğalması, dallanma yapısı göstermesi ve farklılaşması, progesteron ve tiroid hormonları gibi diğer hormonlardan etkilenebilir. Gebelik meydana geldiğinde, progesteron, meme bezinin dıştan büyümesinden, meme bezi alveol oluşumundan ve süt üretimi için özel epitel gelişiminden ana sorumlu hormondur (Radisky ve ark., 2003).

2.8. Deneysel Yolla Meme Tümörü Oluşturma Yöntemleri

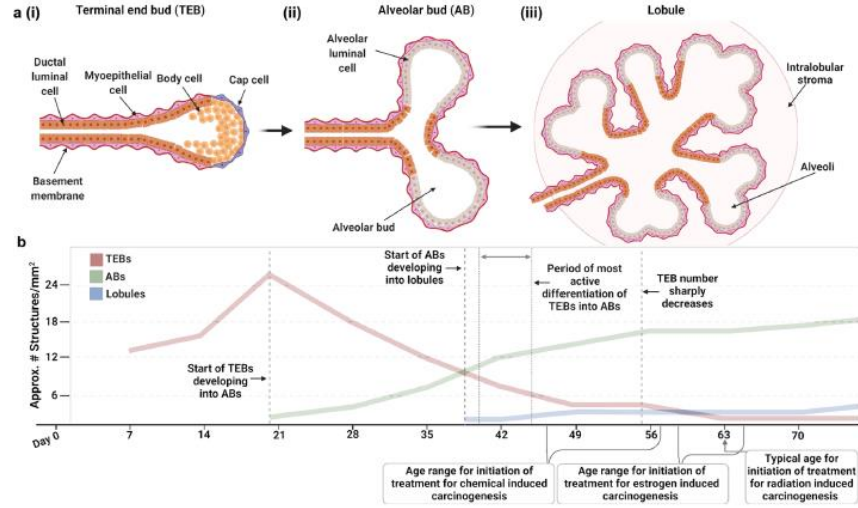
2.8.1. Kimyasal Maddeler ile İndüksüyon

Kimyasal maddeler, canlı dokularda kanser gelişimini tetikleyebilirler (Oliveira ve ark. 2007). Kimyasal yolla kanser oluşturma çalışmaları ilk defa 1963 yılında Howell adlı araştırmacı tarafından denenmiştir (Howell, 1963). Meme tümörleri, karsinogenezin ilk adımı (başlangıç) büyük ölçüde hayvanların kimyasal karsinogen uygulaması sırasındaki yaşına bağlıdır (Nandi ve ark., 1995; Russo & Russo 1996; Thordarson ve ark., 2001). Kimyasal karsinogenezis, kanserojen madde, terminal uç tomurcuklarının alveolar tomurcuklara aktif olarak farklılaşma zamanı ile çakışan 45 ile 60 günlük yaş (cinsel olgunluktaki hayvanlar) arasında uygulandığında maksimumdur (Russo ve Russo 1996) (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: Meme parankiminde karsinogenez aşamalarının şematik gösterimi. Kanserojen ajan 45 ila 60 günlükken (ergenlik) uygulandığında, başlatma terminal uç tomurcuklarda (TEB'ler) gerçekleşir. Daha sonra bu yapılarda meme karsinogenezi devam edebilir, intraduktal proliferasyon ve son olarak in situ karsinomlar oluşur. Başlangıçta (initiation) TEB, alveoler tomurcuk (AB) ve lobüllere dikotom olarak gelişebilir. Bu yapılardaki karsinogenez, nihayetinde farklı organlara metastaz yapabilen invaziv karsinomlardan neden olur. Kanserojen ajanlar, TEB'nin halihazırda AB ve lobüllere dönüştüğü puberteden sonra hayvanlara verildiğinde, AB ve lobüllerde karsinogenez başlar ve başlıca iyi huylu meme lezyonlarından (adenom ve fibroadenom) meydana gelir. (Alvarado ve ark., 2017)

Kimyasal karsinojen uygulamasından sonra ovariektominin meme tümörlerinin insidansını %96 oranında azaltabileceği de daha önce bildirilmiştir. Bununla birlikte, hormona bağımlı meme tümörleri, karsinogenezin ilk aşamasında östrojen hormonlarına bağılı olsa da daha sonra östrojen bağımlılığı ve ilgili reseptörlerin ekspresyonu olmadan daha agresif bir fenotipe ilerleyebilirler (Thorderson ve ark., 2001) (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: Sıçan meme bezinin anatomisi ve meme kanseri indüksiyonu ile ilgili yapısal gelişimin zaman çizelgesi. (a). Meme epitelinin (i) büyümesi ve işlevi ile ilişkili terminal uç tomurcuğu (TEB) ve çeşitli meme hücrelerinin şeması. TEB'in 20. gün civarında farklılaşmasından kaynaklanan alveoler tomurcuğun (AB) şeması (ii). On ayrı alveol ile farklılaşmış bir AB'den oluşan ve gevşek, destekleyici intralobüler stroma ile çevrili lobülün şeması (iii). (b). Sıçan ergenlikten cinsel olgunluğa ve yetişkinliğe doğru ilerlerken gelişen meme yapılarının oluşumunu açıklayan zaman çizelgesi. X eksen, meme yağ yastığındaki mm² başına yapı sayısını gösterir. Sprague-Dawley (SD) farelerinde zamanla yaklaşık TEB (kırmızı çizgi), AB (yeşil çizgi) ve lobül (mavi çizgi) sayıları gösterilmektedir. Altta yatan parantezler, kimyasal veya östrojen kaynaklı meme karsinogenezi için tedavinin başlatılmasının tipik dönemini gösterir ve ok, radyasyona bağlı meme karsinogenezi başlangıcının tipik yaşını (~ 63 gün) gösterir. (Miller ve ark., 2022)

2.8.1.1. Dimetilbenzantrasen (DMBA) ile Meme Tümörü İndüklenmesi

DMBA, meme bezinin destekleyici stroması gibi yağ bakımından zengin dokularda biriken lipofilik çevresel kimyasalların bir sınıfı olan ve kemirgenlerde meme tümörlerinin indüksiyonunda yaygın olarak kullanılan sentetik bir polisiklik aromatik hidrokarbondur (PAH) (Currier ve ark., 2005; Dhaheri, Hassouna, Al-Salam & Karam, 2008; Korsh, Shen, Aliano & Davenport, 2015; Russo & Russo 2000). 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA), Sprague Dawley farelerinde meme kanserini tetiklemek için yaygın olarak kullanılan bir maddedir. DMBA, karsinogenezden sorumlu genlerde mutasyonları başlatarak veya teşvik ederek etki eder (Manoharan, Muneeswaran & Baskaran, 2010). DMBA'nın oral uygulaması, hücresel sitozolik reseptör olan aril hidrokarbon reseptörünü (AhR) aktive eder. Aktive edilmiş AhR'ın çekirdeğe translokasyonu gerçekleşir ve AhR nükleer translokasyon proteini (ARNT) ile birleşir (Lee ve ark., 2008). AhR/ARNT kompleksi, AhR'ye yanıt veren genlerin yukarıdaki spesifik DNA tanıma bölgelerine bağlanarak gen transkripsiyonunu indükler. Bu tümör oluşumu, DMBA'yı DNA eklentileri oluşturan mutajenik bir

epoksit ara maddesine metabolize eden sitokrom p450 (CYP1A1 ve CYP1B1) enzimlerinin AhR'ye bağılı up regülasyonunu içerir. Bu DNA eklentileri, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) aracılı karsinogenez ile ilişkili mutasyonlar ve malignant dönüşüm ile ilişkilidir (Lee ve ark., 2008). 50-56 günlükken, kilogram başına 10 ila 100 mg arasında değişen tek bir dozda gavaj ile uygulandığında, çok sayıda meme tümörü gelişimine neden olur (Dhaheri ve ark., 2008). Kanserojen etkilerini göstermek için, DMBA'nın daha önce başlıca karaciğerde bulunan sitokrom P-450/P1-450 monooksijenaz enzim sistemleri tarafından biyoaktif edilmiş olması gerekir. Metabolitler mono- ve dihidroksimetildir ve bunlar ayrıca karşılık gelen dihidrodiollere, fenollere ve diğer oksidasyon ürünlerine metabolize edilebilir (Russo, Tay & Russo, 1982). Üretilen epoksitler, iki mekanizma aracılığıyla T:A için A:T ve T:A için G:C transversiyonlarını oluşturan DNA ile etkileşime girer: Bu mekanizmalar; DMBA-adenin ve DMBA-guanin eklentilerinin oluşumu ve DMBA epoksit ve DNA pürinleri hedefi arasındaki kompleksin kendiliğinden parçalanması ile pürinlerin kaybıdır (Alvarado ve ark., 2017).

2.8.1.2. N-metil-N-nitrozur (MNU) ile Meme Tümörü İndüklenmesi

MNU, DNA'da geri dönüşü olmayan değişikliklere neden olmak için metabolik aktivasyon gerektirmeyen doğrudan alkilleyici bir ajandır (Doctores ve ark., 1974; Murray, Ucci, Maffini, Sonnenschein & Soto, 2009). Glisin yerine glutamik asidi kodlayan Hras kodonu 12'de GGA'dan GAA'ya geçiş mutasyonunu teşvik ederek, guanin nükleositlerinin metilasyonu yoluyla bir kanserojen görevi görür (Murray ve ark., 2009; Lu, Jiang, Mitrenga, Cutter & Thompson, 1998; Sukumar, Notario, Martin-Zanca & Barbacid, 1983). Bu kanserojen madde sıçanlara 50 günlükken, kilogram başına 50 mg'lık standart bir dozda tek bir intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonu, duyarlı tüm hayvanlarda (insidansın %100'ü) meme tümörlerine neden olur (Alverado ve ark., 2016; Faustino-Rocha ve ark., 2015; Murray ve ark., 2009; Soares-Maria ve ark., 2013). MNU, intraperitoneal, deri altı veya gavaj yardımı ile oral yolla uygulanabilir. Uygulama yoluna göre tümör oluşum oranı değişkendir ve en yüksek tümör oluşumu intraperitoneal yolla uygulama sonucu gerçekleşir (Lu ve ark., 1998).

2.8.1.3. Diğer Kimyasal Maddeler ile İndüksüyon

DMBA ve MNU kadar etkili olmasada bazı kimyasal bileşiklerin de meme karsinogenezini başlattığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bisfenol A, bakır, resveratrol, folik asit, demir, Metil-amorain, süt, estron sülfat, Fenetilizotiyosiyanat gibi bazı kimyasal bileşiklerin meme karsinogenezini indüklediği gözlenmiştir (Alvarado ve ark., 2017).

2.8.2. Hormon ile İndüksüyon

Meme bezinin normal gelişiminde rol oynayan östrojenler, kimyasal maddeler ile birlikte uygulandığında veya radyasyon gibi fiziksel irritasyonlara maruz kaldıklarında tümör oluşturma potansiyeline sahiptirler (Russo ve Russo 1998). Östrojen ile meme tümörünü indüklemek için tekrarlayan damar içi enjeksiyonlar, kronik salınım için deri altı intraskapüler pelet uygulaması ya da deri altı silastik tüp yolları kullanılır (Ding ve ark., 2013; Harvell ve ark., 2002; Huggins, Briziarelli & Sutton, 1959; Jerry ve ark., 2018; Shull, Spady, Snyder, Johansson & Pennington, 1997; Shull, Dennison, Chack & Trentham-Dietz, 2018). En yaygın olarak doğal östrojen olan 17 β -estradiol (E2) kullanılır, ancak sentetik östrojen dietilstilbestrol (DES) daha etkilidir (Dunning & Curtis 1952; Flister, Joshi, Bergom & Rui, 2019). Östrojen ile meme tümörü indüksiyonu için özellikle ACI (August Copenhagen Irish) ırkı sıçanlar kullanılır ve bunun nedenide sıçanlarından alınan epitelyal meme dokusu östrojen uygulamasına karşı özellikle hassastır, bu hormona maruz kaldıktan sonra meme bezinden epitel hücrelerinin proliferasyonu ve transformasyonu gözlenir (Ravoori, Vadhanam, Sahoo, Srinivasan & Gupta, 2007). Dişi sıçanların cinsel olgunluğa ulaştığı zamana karşılık gelen 60 günlük yaşta östrojen uygulamasına başlanır. Duyarlı ACI farelerinde, meme tümörleri tipik olarak sürekli östrojen (E2) uygulamasından yaklaşık 125-140 gün sonra elle tutulur hale gelir (Turan ve ark., 2004; Shull ve ark., 2018). Kimyasal kanserojenlerle indükleme gibi, östrojen uygulaması da DNA eklentilerinin oluşumuyla sonuçlanır. Östrojen kaynaklı DNA eklentilerindeki artışların meme kanseri riski ile ilişkilendirilmesine ve bu eklentilerin en aza indirilmesinin riski azalttığı bilinmesine rağmen, karsinogenezdeki rollerinin

tam kapsamı belirsizliğini korumaktadır. (Cavalieri & Rogan 2010; Cavalieri & Rogan 2016; Dwivedy, Devanesan, Cremonesi, Rogan & Cavalieri, 1992; El-Bayoumy ve ark., 1996; Flister ve ark., 2019). Meme bezinin 2-hidroksiestradiol, 4-hidroksiestradiol, 16-hidroksiestradiol veya 4-hidroksiestron gibi diğer steroid hormonlara duyarlılığı farklıdır ve bu steroid hormonlar 17 β -estradiole benzer bir dozda uygulandığında meme tümörü gelişimini tetiklemezler (Turan ve ark., 2004).

2.8.3. Fiziksel Yol ve Radyoaktif Madde ile İndüksiyon

İnsan meme bezinin Hiroşima ve Nagazaki atom bombalarının iyonlaştırıcı radyasyonuna (gama ışınları) duyarlılığını açıklayan ilk çalışmalar, bu tür radyasyonun kanserojen etkilerini açıkça göstermiştir (McGregor ve ark., 1977). Ek olarak, bu çalışmalar ayrıca ergenliğe girmiş kadınların meme dokularının daha yaşlı kadınlarla karşılaştırıldığında daha yüksek bir duyarlılığa sahip olduğunu ve ergenliğe girmiş kadınlarda meme kanseri insidansının yetişkinlere kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir (McGregor ve ark., 1977). Sıçan meme bezi, X-ışınları, nötron, gama radyasyonu ve manyetik alanlar gibi farklı radyasyon türlerine karşı hassastır. Bu hayvanlarda meme karsinogenezi indüklemek için tipik olarak tüm vücuda verilen tek bir dozdan oluşur (Herrera, Ponce & Ruiz-Opazo, 2013; Lee, Zhu, Govindasamy & Gopalan, 2008;) veya kimyasal karsinojenler veya hormonlarla kombinasyon halinde kullanılabilirler (Russo ve Russo 1996; Thompson ve Singh 2000). Kadınlarda gözlenenin tersine, X-ışınlarına maruz kalan Sprague-Dawley dişi sıçanlarında meme tümörünün insidansı, farklı yaş grupları arasında aynı bulunmuştur. Hassas sıçan ırkları (Sprague Dawley) erişkinliğe ulaştıkları zaman (~ 63 gün) radyasyona maruz bırakıldıktan sonra yaklaşık 140-365 gün içinde tümörler ortaya çıkar (Broerse, Hennen, Klapwijk & Solleveld, 1987; Herrera ve ark., 2013; Moriyama ve ark., 2021; Nishimura ve ark., 2021; Russo & Russo 1996). Tespit edilen meme lezyonları histolojik olarak adenokarsinom ve fibroadenomlar olarak teşhis edilmiştir (Holtzman, Stone & Shellabarger, 1982). Fiziksel karsinojenler, doğal olarak oluşan veya sentetik olan lifler, metalik kobalt, asbest ve silikon jeller gibi çözünür malzemelerdir (Soffriti, Minardi & Maltoni, 2003). Bu karsinojenler, özellikle protez meme implantları genellikle silikon jeller ve poliüretan gibi sentetik malzemeler

içerdiğinden, meme kanseri alanında önemli bir ilgi alanıdır (Berkel, Birdsell & Jenkins, 1992). İlginç bir şekilde, sıçanlarda silikon jel implantları, nakil bölgesinde sarkom oluşumu riskini artırırken (Bryson & Bischoff 1967; Brand & Brand 1980), MNU tedavisini takiben meme tümörü insidansını azaltmıştır (Su, Dreyfuss, Krizek & Leoni, 1995).

2.8.4. Kanser Hücrelerinin İmplantasyonu

Bu yol ile meme tümörlerinin oluşturulmasında, tümör hücreleri tümör gelişimi için farelere doğrudan implante edilebilir. Kanser hücrelerinin kökenine bağlı olarak, bu modeller ksenograft veya singenik (syngeneic) olarak sınıflandırılabilir (Alvarado ve ark., 2017). Ksenograft modelinde, tümör hücreleri insan meme tümörlerinden türetilir ve bağışıklığı baskılanmış hayvanlara implante edilir (Kim, O'Hare & Stein, 2004). Bu model için en çok kullanılan sıçan modeli rnu/rnu nüde sıçanlardır (Yang ve ark., 2014). Singenik modellerde, tümör hücrelerinin kökeni, tümör hücrelerinin implante edileceği hayvanlara genetik olarak benzer laboratuvar hayvanlarından olmaktadır ve bu model için implantasyondan önce uygulanacak olan hayvanın bağışıklığını baskılamaya gerek yoktur. Bu yüzden bu model, bağışıklık sistemi ile kanser gelişimi arasındaki etkileşimi incelemek için kullanışlıdır (Khanna & Hunter, 2005). Hem ksenograft hem de syngenik modeller, meme tümörü hücreleri, tümör orijin bölgesine (meme yağ yastığı) implante edilirse ortotopik veya tümör hücreleri farklı bir yere implante edilirse (deri altı, periton içi, kas içi) heterotopik olabilir (Sano & Myers 2009; Vargo-Gogola & Rosen 2007).

2.8.5. Genetiği Değiştirilmiş Modeller

Genetiği değiştirilmiş hayvanlar, DNA dizilerinin eklenmesi (transgenik), değiştirilmesi (knock-in) veya çıkarılması (knock-out) yoluyla genetik materyali değiştirilmiş canlılardır (Forabosco, Löhms, Rydhmer & Sundström, 2013; Regua, Arrigo, Doheny, Wong & Lo, 2021). Genetiği değiştirilmiş farelerin sayısı, genetiği değiştirilmiş sıçanların sayısı ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek olmasına rağmen, genetiği değiştirilmiş sıçanlar, meme kanserinin moleküler

etiyojisini incelemek için mükemmel bir model haline gelmişlerdir (Blackshear, 2001; Smits ve ark., 2016; Sukumar, McKenzie & Chen, 1995). Spesifik meme kanseri oluşumu durumunda, genetiği değiştirilmiş sıçanlar, ras, neu, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin meme tümörlerinin malignant ilerlemesindeki rolünü değerlendirmek için mükemmel modellerdir (Cotroneo ve ark., 2007; Dwinwll, Lazar & Geurts, 2011; Hoenerhoff ve ark., 2011; Smits ve ark., 2016; Zan ve ark., 2003).

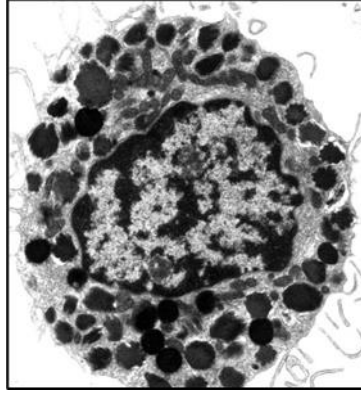
2.9. Mast Hücreleri

Mast hücreleri ilk kez Alman patolog Paul Ehrlich tarafından 1878 yılında anilin boyalı insan tümör dokularında tanımlanmıştır. Almanca yiyen hücre anlamına gelen “Mastzellen” olarak adlandırmış ve bazofillere benzerliklerinden dolayı dokudaki bazofiller olabilecekleri düşünülmüştür. 1937'de Holmgren ve Willander mast hücrelerini çok sayıda içeren dokuların heparin açısından zengin olduğunu bulmuştur (da Silva, Jamur & Oliver, 2014). Mast hücreleri, tüm omurgalı sınıflarında bulunurlar. Adaptif bağışıklığın gelişmesinden çok önce, yaklaşık 500 milyon yıl önce ortaya çıktıkları tahmin edilmektedir (Mulero, Sepulcre, Meseguer, Garcia-Ayala & Mulero, 2007).

2.9.1. Mast Hücrelerinin Morfolojisi

Bağ dokusunda adipositlerden sonra en büyük hücrelerdir. Yaklaşık çapları 20-30µm'dur. İntrasitoplazmik granüllerle dolu yuvarlak veya oval şekilde hücre gövdesi ve merkezi konumlu nukleusları bulunan myeloid hücrelerdir. Sitoplazmalarında mast hücrelerin en belirgin özelliği olan, yaklaşık çapları 0.3-2.0 µm'yi bulan, sayıları ise 50'den 500'e varan çok sayıda salgı granülleri bulunur (Dvorak, 2005; Yong, 1997) (Şekil 2-5).

Mast hücrelerinin morfolojik şekilleri bulundukları yere göre değişkenlik gösterir. Gevşek bağ dokusunda iken yuvarlak görünürler, ancak kan damarlarına yakın olduklarında uzun veya ovaldirler, dermal liflerde ise iğ şeklinde, yıldız şeklinde veya ipliksi bir görünüme sahip olabilirler (Yang, 1997)



Şekil 2-5: Mast hücresinin ve sitoplazmik granüllerinin ultrastrüktürel olarak görünümü. (Dvorak 2005)

2.9.2. Mast Hücrelerinin Kökeni, Göçü ve Olgunlaşması

Mast hücreleri, kanda dolaşan ve dokulara girdikten sonra farklılaşan, diğer immün sistem hücreleri gibi kemik iliği kaynaklı pluripotent hematopoetik progenitör hücrelerden köken alırlar. Mast hücresi progenitörleri (MCP), karakteristik salgı granüllerini içermez, kanda mononükleer lökositler olarak dolaşırlar, CD13, CD33, CD38, CD34 ve Kit eksprese ederler (Okayama & Kawakami, 2006).

Mast hücrelerinin embriyonik kökeni ise bir tartışma konusudur. Guiraldelli ve arkadaşlarının yapmış olduğu yakın zamanlı bir çalışmada para-aortik splenikopleura mezoderminden gelişen aorta-gonad-mezonefroz (AGM) bölgesi, sıçan embriyonik mast hücrelerinin orijin bölgesi olarak tanımlanmıştır (da Silva ve ark., 2014; Guiraldelli ve ark., 2013).

Mast hücre farklılaşması, büyümesi ve hayatta kalması, dokudaki çevresel faktörler tarafından düzenlenir. Kök hücre faktörü (SCF), c-Kit reseptörünün ligandı ve IL-3 en iyi bilinen faktörlerdendir. SCF esas olarak fibroblastlar ve diğer mezenkimal hücreler tarafından salgılanır ve mast hücrelerinin hayatta kalması, gelişmesi ve genişlemesinde önemli bir role sahiptir. SCF ve Kit bağlanması ile başlatılan sinyalizasyon, mast hücrelerinin çeşitli dokulara yönlendirilmesi ve göçü için kritiktir (Okayama & Kawakami, 2006; Ito ve ark., 2012). MCP'ler, mikro çevresindeki sitokinler ve büyüme faktörlerinden etkilenerek farklılaşmalarını tamamlamak üzere transendotelial göç yoluyla çeşitli periferik dokulara ulaşır (Gurish & Austen, 2012; Kitamura, Oboki & Ito, 2006). Mast hücrelerinin hedef konumlarına göç edebilmesi, integrinlerin, adezyon moleküllerinin, kemokinlerin, sitokinlerin ve

büyüme faktörlerinin etkilerine bağlıdır (Collington, Williams & Weller, 2011). IL-3 mast hücre proliferasyonu ve farklılaşmasından sorumlu ana sitokin olarak kabul edilirken ayrıca mast hücre dokularda olgunlaşmasına ve işlevine katkıda bulunan diğer endojen faktörler, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-33, sinir büyüme faktörü (NGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β)’dır (Jamur & Oliver 2011; Lee, Kim, Song & Cho, 2010; Westerberg, Ulleras & Nilsson, 2012). Mast hücre gelişmesini etkileyen tüm faktörler Tablo 2-1’de sunulmuştur.

Tablo 2-1: Mast hücrelerin gelişimini etkileyen faktörler (Jamur & Oliver 2011)
Mast Hücrelerinin Gelişimini Etkileyen Faktörler

Sitokin	Reseptör	Etki
<i>SCF</i>	<i>Kit</i>	Progenitörlerin çoğalmasını uyarır.
<i>IL-3</i>	<i>IL-3 R</i>	Progenitörlerin çoğalmasını uyarır.
<i>IL-4</i>	<i>IL-4 R</i>	Proliferasyon için kofaktör. Bağ dokusu fenotipini destekler.
<i>IL-5</i>	<i>IL-5 R</i>	Proliferasyon için kofaktör.
<i>IL-6</i>	<i>IL-6 R</i>	TNF- α ile kombinasyon olarak MH gelişimini indükler.
<i>IL-9</i>	<i>IL-9 R</i>	Proliferasyon için kofaktör Mukozal fenotipini destekler.
<i>IL-10</i>	<i>IL-10 R</i>	Proliferasyon için kofaktör Mukozal fenotipini destekler.
<i>IFN-γ</i>	<i>IFN-γ R</i>	Proliferasyonu inhibe eder.
<i>NGF</i>	<i>NGF R</i>	Proliferasyon için kofaktör Bağ dokusu fenotipini destekler.
<i>TGF-β</i>	<i>TGF-β R</i>	Proliferasyonu inhibe eder.
<i>GM-CSF</i>	<i>GM-CSF R</i>	Proliferasyonu inhibe eder.
<i>TPO</i>	<i>TPO R</i>	MH gelişimini indükler.

2.9.3. Mast Hücrelerinin Boyanması

Mast hücreleri morfolojileri sayesinde histolojik boyama metotlarıyla kolaylıkla ayrılabilirler, Hematoksilen-Eozin (H-E), May-Grünwald Giemsa, Toluidine Blue, safranin o, metilen mavisi, thionin, alcian blue gibi histokimyasal boyalarla ya da proteaz içeriklerine bağlı olarak kimaz-triptaz’a karşı antikorlar kullanılarak yapılan immunohistokimyasal metotlarla ile belirlenebilirler. Rutin H-E boyamasında pembe sitoplazma ve soluk pembe granül içeriği ile tanımlansalar da bu yöntem kullanılarak mast hücresi incelemek güvenilir değildir. (Tikoo ve ark., 2018).

Metakromazi özelliği hücrelerin boyandıkları boyanın orijinal renginden farklı bir renkte boyanabilmesidir. Mast hücreleri içerdiği sitoplazmik granüllerin kondroitin sülfat ve heparin gibi proteoglikanları içermesi nedeniyle metakromazi

özelliği gösterirler bu özellik onların dokularda tanımlanması için çok kolaylık sağlar. Bu asit karakterdeki sitoplazmik granüller sayesinde mast hücreleri toluidine blue, tionin ve metilen mavisi gibi bazik boyalarla fuşya-mor tonlarda boyanabilirler. Mast hücrelerinin histokimyasal boyaması için toluidin blue, metakromazik boyama için en çok tercih edilen boyadır. Ayrıca Alcian blue gibi granüllere özgü boyalarla da boyanabilirler. Alcian blue boyası tek başına ya da Safranin O ile kombine edilerek de kullanılabilir. Bu metotta mast hücresinin içerdiği proteoglikan çeşidi veya proteaz içeriğine bağlı olarak granülleri kırmızı ya da mavi tonlarında boyanır (Bancroft & Cook, 1984; Tikoo ve ark., 2018).

2.9.4. Mast Hücre Sınıflandırılması

Proteaz içeriklerine ve boyama özelliklerine göre kemirgenlerde mast hücreleri, mukozal ve bağ dokusu mast hücreleri olarak sınıflandırılmaktadır. MMC (Mukozal mast hücre) granüllerinin proteaz içeriğinde ağırlıklı olarak, serglisin proteoglikanlarının kondroitin sülfat zincirlerine bağlı kimazlar (mMCP-1 ve mMCP-2) bulunur. CTMC'lerinin (bağ dokusu tipi mast hücreleri) granülleri ise, serglisin proteoglikanlarının heparin zincirlerine bağlanan kimazlar (mMCP-4), triptazlar (mMCP-5 ve mMCP-6) ve karboksipeptidaz A (mCPA) içerir. Bunlar deriden, periton boşluğundan ve bağırsak submukozasından izole edilebilir (da Silva ve ark., 2014).

İnsanlarda mast hücreleri, proteaz içeriklerine göre ağırlıklı olarak triptaz veya (daha nadiren) kimaz veya her iki ana proteazı içerenler olarak kategorize edilmiştir. Hem triptaz hem de kimaz içeren mast hücreleri "MC-TC " olarak adlandırılırken, yalnızca triptaz içeren mast hücreleri "MC-T " olarak adlandırılır (Irani, Schechter, Craig, DeBlois & Schwartz, 1986; Pejler, Rönnberg, Waern & Wernersson, 2010; Schwartz, 2006).

2.9.5. Mast Hücrelerin Rol Aldığı Fizyolojik ve Patolojik Durumlar

Memelilerde fizyolojik koşullar altında, mast hücreleri, mineralize kemik, kıkırdak ve kornea gibi avasküler dokular dışındaki organların bağ dokusunda

özellikle kan, lenf damarları ve periferik sinirlerin çevresinde yakın yerleşimli olarak bulunurlar (Norrby, 2002).

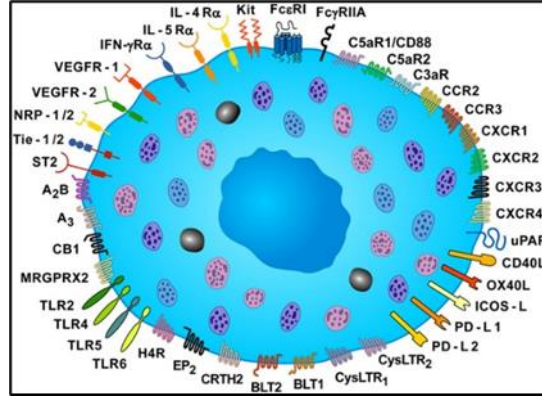
Mast hücreleri, bağışıklık sisteminin normal dengesinin korunmasında görevli hücrelerden biridir. Enfeksiyonun erken döneminde, mast hücreleri, bir patojenin varlığını, enfeksiyon bölgesinde yakınlarda birçok hücre tipine iletmek için görev alabilir. Deri ve mukozadaki konumları ile, vücuda giren antijenlere karşı ilk savunma hattı olarak görevi yapar, çeşitli patojenlere karşı savunmada ve bunların temizlenmesinde önemli bir rol oynarlar (Abraham & John, 2010; Bulfone-Paus & Bahri, 2015).

Mast hücreleri doku yenilenme (remodelling) olaylarına katılırlar, VEGF-A, CXCL16, Endotelin-1, GM-CSF, CXCL8 ve CCL2 gibi anjiyojenik maddelerin doğrudan veya dolaylı yoldan salınımını sağlayarak damar oluşumunu teşvik eden, pro-anjiyojenik hücrelerdir (Jeong ve ark., 2013; McHale, Mohammed & Gomez, 2019; Starkey, Crowle & Taubenberger, 1988).

2.9.6. Mast Hücreleri ve Kanser İlişkisi

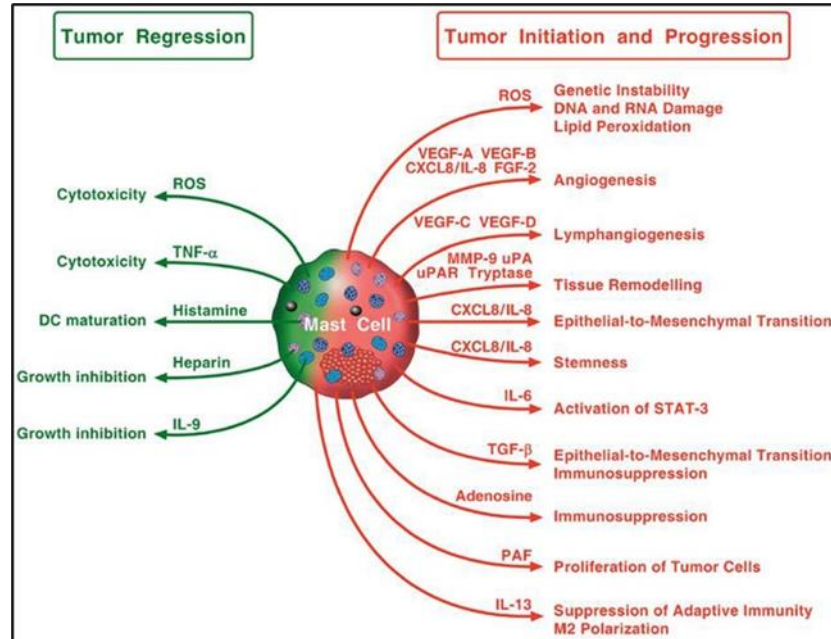
Kanserin başlaması ve ilerlemesi, çok sayıda genetik ve epigenetik değişiklikler ile karakterize edilen çok adımlı süreçtir. İmmün sistem hücreleri, sürekli olarak üretilen mutant hücreleri tanır ve ortadan kaldırırken dirençli kanser hücreleri bu sistemden geçebilir ve tümör geliştirmeye devam edebilir (Dawson, Kouzarides & Huntly, 2012; Zitvogel ve ark., 2008; Zitvogel, Galluzzi, Smyth & Kroemer, 2013)

Tümörlerin gelişme ve büyüme hızı, tümör hücrelerinin kendileri ve çevresindeki mikro çevre tarafından uyarılan pro- ve anti-tümörojenik etkiler tarafından düzenlenir. Kanser hücreleri ve kanser mikroçevresinde bulunan diğer hücreler arasında güçlü bir etkileşim vardır ve bu sinyalleşmeler tümör büyümesinin hem ilerlemesine hem de durmasına neden olabilir. Mast hücreleri de mikroçevre değişikliklerini algılayabilen geniş bir reseptör dizisi ile donatılmıştır (Şekil 2-6). Ayrıca tümör büyümesinin modülasyonunu etkileyebilecek birçok faktörü salgılayabilirler.



Şekil 2-6: Mast hücre yüzey reseptörleri. (Varricchi ve ark., 2017)

Tümör mikroçevresine mast hücreleri tarafından salınan proteazlar (örn. Triptaz) metalloproteinazları aktive ederek, ekstraselüler matriksin bozulmasına neden olup, anjiyogenik faktörlerin salgılanmasına neden olarak, anjiyogenez ve metastaz yönünden modifiye eder. Tümörün ilerlemesi sırasında, mast hücreleri ayrıca nötrofillerin ve eozinofillerin toplanması, T ve B immün yanıtlarının aktivasyonu (Aponte-Lopez ve ark., 2018] ve tümör mikroçevresinde biriken ve kötü prognozla ilişkili olan miyeloid türevli baskılayıcı hücreler üzerinde de etki eder (Şekil 2-7) (Aponte-Lopez ve ark., 2018).



Şekil 2-7: Mast hücrelerinin tümör ilerlemesi ya da gerilemesini sağlayan faktörlerinin şematize edilmiş hali (Varricchi ve ark., 2017).

Mast hücre inhibitörü olan kromolinin kullanıldığı fare prostat adenokarsinom modellerinde, kanser hücrelerinin sayısını ve aktivitesini azaltabileceğini ve hastalık sonuçlarını iyileştirebileceği ileri sürülmüştür (Pittoni P. 2011). Mast hücre sağkalım proteini c-Kit'e karşı inhibitör aktivite gösteren masitinib uygulaması pankreas kanseri hastalarıyla yapılan bir prelinik çalışmada, masitinib artı standart kemoterapi kombinasyonu alan hastaların tek başına kemoterapi alan hastalarla karşılaştırıldığında sağkalımda artış bulunmuştur (Mitry ve ark., 2010).

Peritümöral veya intratümöral yüksek mast hücre yoğunluğuna sahip kanserlerin örnekleri tiroid, mide, pankreas, prostat, melanom ve meme kanseridir (Ch'ng, Wallis, Yuan, Davis & Tan, 2005; Dünder, Öner, Peker, Metintaş, Işıksoy & Ak, 2008; Johansson ve ark., 2010; Varricchi ve ark., 2017; Tuna, Yörükoğlu, Ünlü, Mungan & Kirkali, 2006) Şaşırtıcı olan, bu neoplazilerdeki mast hücrelerinin protümörijenik, antitümörijenik veya sadece masum seyirciler olarak rapor edildiğidir (Aponte-Lopez ve ark., 2018). Tümöral çevrede mast hücre artışı gastrik, pankreatik ve kolorektal tümörlerde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.

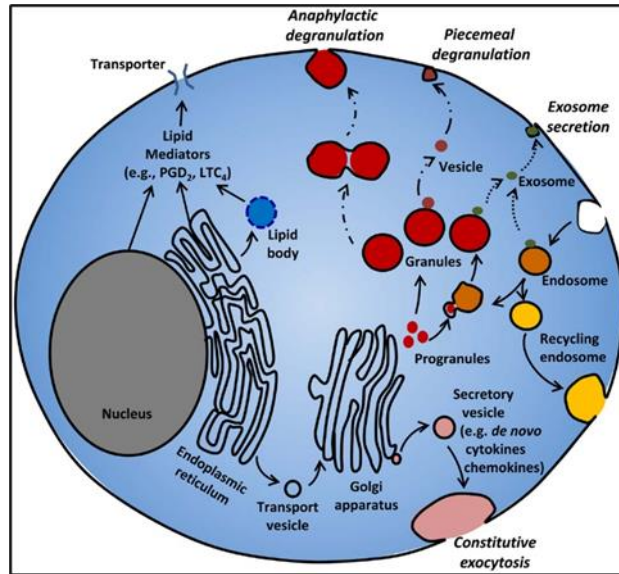
2.10 Mast Hücre Mediyatörleri ve Mast Hücre Aktivasyonun Kanserdeki Roller

2.10.1 Mast Hücre Aktivasyonu

Degranülasyon terimi, granüllerin kaybı veya salınması anlamına gelir, büyük hücre içi granülleri olan mast hücreleri ve bazofiller tarafından gerçekleştirilir. Salgı ise, bir hücre içi maddenin, hücre dışı ortamına salınmasını tanımlar. Eksozitoz veziküllerde bulunan maddelerin, veziküler zarın dış hücre zarı ile füzyonu yoluyla hücreden boşaltıldığı bir hücre salgısalama veya atılım işlemidir. Mast hücreleri, bu salınım olaylarının tüm biçimlerini sergilerler. Ancak, mast hücre aktivasyonu terimi en tipik salınım şekli olan degranülasyonu tanımlar (Burgoyne & Morgan, 2003; Moon, Befus & Kulka 2014; Wernersson & Pejler, 2014).

Mast hücre aktivasyonu, klasik olarak hızlı bir şekilde meydana gelebilir ve bu da yangısal mediyatörlerin yoğun bir şekilde salınmasına ve anafilaksi ve anjiyoödem gibi dramatik klinik tablolara yol açar. Bununla birlikte, bu süreçler, kronik enflamatuar ve lokal doku değişikliklerine yol açan spesifik mediyatörlerin

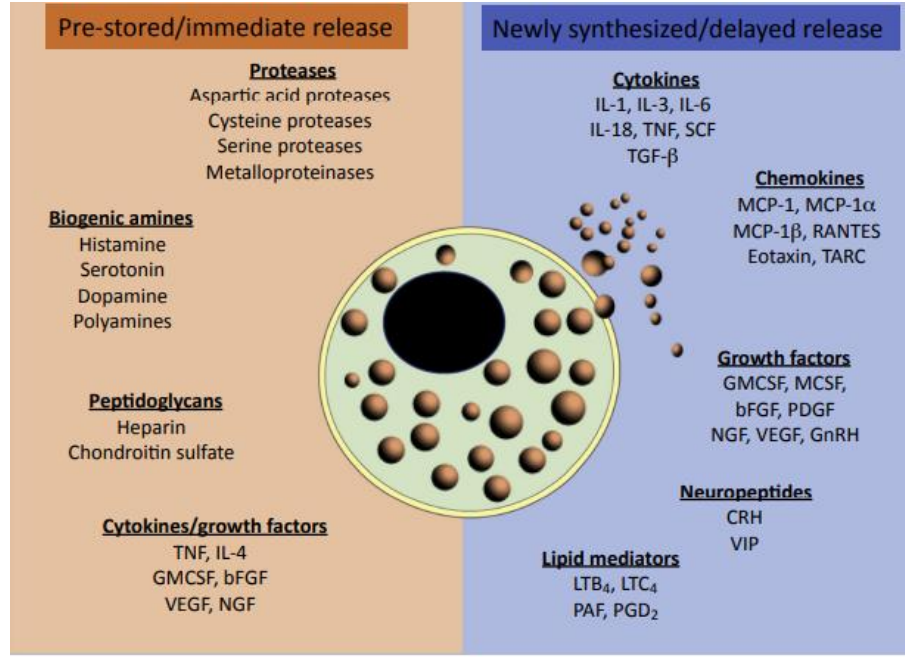
yavaş salınımı ile kademeli olarak da meydana gelebilir. Mast hücre aktivasyonunun bu şekli, mast hücrelerinin doku yeniden modellenmesinin merkezi düzenleyicileri ve doğal ve adaptif bağışıklık tepkilerini koordine eden koruyucu bağışıklık hücreleri olarak işlev gördüğü kanser patolojilerinde önemlidir (Oldford & Marshall, 2015) (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Mast hücrelerinin mediyatör salgılama tipleri (Moon ve ark., 2014)

2.10.2 Mast Hücre Mediyatörleri

Mast hücre mediyatörleri sentezlenme şekline göre ikiye ayrılır; bunlar önceden sentezlenmiş olup depo edilenler primer mediatörlerdir veya bir uyarımdan sonra sentezlenenler ise sekonder mediyatörlerdir (Forsythe, 2018). Primer mediyatörler her an salgılanmaya hazır durumda iken sekonder mediyatörler gecikmeli olarak salınırlar (Forsthye, 2018) (Şekil 2-9).



Şekil 2-9: Aktivasyon üzerine mast hücreleri çok çeşitli mediyatörleri salgılayabilir. Bununla birlikte, bir mast hücresinin spesifik mediyatör profili, hücrenin geliştiği doku mikro ortamına bağlıdır. Proteazlar, biyojenik aminler ve peptidoglikanlar (solda) dahil olmak üzere birçok mediyatör, granüllerle birlikte depolanır. Mast hücreleri ayrıca belirli sitokinleri önceden depolama konusunda benzersiz bir yeteneğe sahiptir. Anafilaksi sırasında gözlemlendiği gibi, yüksek seviyelerde önceden depolanmış mediyatörler, tam degranülasyon yoluyla hızla salınabilir, ancak daha çok parça parça degranülasyon yoluyla sınırlı seviyelerde salınır. Mast hücre aktivasyonu ayrıca sitokinlerin, kemokinlerin, büyüme faktörlerinin, nöropeptitlerin ve lipid türevli araçların (lökotrienler ve prostaglandinler; sağda) de novo sentezi ve salgılanmasıyla sonuçlanır. Lipid araçlarının sentezi ve salgılanması, hücre aktivasyonundan sonraki dakikalar içinde gerçekleşirken, sitokin üretimi saatler içinde gerçekleşir. Mast hücreleri, degranülasyon olmadığında yeni sentezlenen mediyatörleri salmak için aktive edilebilir (Forsythe 2019).

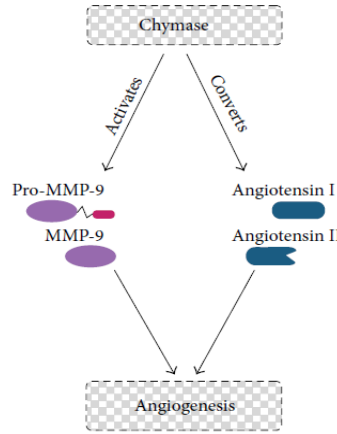
2.10.2.1. Histamin

Mast hücre mediyatörleri arasında histamin en iyi bilinen biyojenik amindir, vazodilatasyon ve bronkokonstriksiyonun düzenlenmesindeki rolüyle tanınır (Barnes, 1991; Hill, 1992). Histamin, mast hücresi olgunlaşması sırasında artan bir enzim olan histidin dekarboksilaz (HDC) enzimi ile katalize edilen reaksiyon sonucunda tek adımda sentezlenir (Ringvall ve ark., 2008; Rothschild & Schayer, 1959). Kanselerde histamin etkisi büyük ölçüde tümör tipine ve histamin reseptörlerinden hangisinin (H1R, H2R, H3R ve H4R) uyarıldığına bağlı olarak değişen çok çeşitli aşağı akış etkileri sinyal yollarını aktive edebildiğine bağlıdır. Bu sinyaller kanser hücreleri üzerinde doğrudan anti-tümör ve pro- tümör etkileri olduğu gösterilmiştir (Massari, Nicoud & Medina, 2020). Örneğin, histamin reseptörü H3R'nin inhibisyonu, kanser

hücrelerinin apoptozunu arttırıp prostat kanseri büyümesini baskılamıştır (Chen & Hu, 2018). Bununla birlikte Martinel Lamas ve arkadaşları, histamin ile kemoterapi kombinasyon tedavisinin, toksisiteyi azaltarak ve anti-tümör aktiviteyi güçlendirdiğini göstermiştir (Martinel Lamas, Nicoud, Sterle, Cremaschi & Medina, 2015). Klinik bir çalışmada, IL-2 ile kombine histamin uygulamasının, artmış doğal öldürücü (NK) hücresi aracılı tümör hücresi sitotoksitesine neden olduğu ve IL-2 tedavisinin etkinliğini arttırdığı bulunmuştur (Agarwala ve ark., 2002).

2.10.2.2. Kimaz

Kimazlar, serin proteaz ailesine ait mast hücre spesifik proteazlardır ve monomerik yapıda bir endopeptidazdır (Urata, Kinoshita, Misono, Bumpus & Husain, 1990). Yapısı ve substrat özelliğine göre iki farklı kimaz türü (alfa ve beta-kimaz) tanımlanmıştır (Caughey, Raymond & Wolters, 2000; Chandrasekharan, Sanker, Glynnias, Karnik & Husain, 1996). Mast hücrelerinde kimazlar, salgı granüllerinde heparin ile birlikte makromoleküler bir kompleks içinde aktif enzimler olarak depolanır. Salgılanmadan önce, mast hücre kimazları dipeptidil peptidaz I tarafından aktive edilir (Caughey, 2002). Hücre dışı sıvıya salgılandıktan sonra, kimazlar, kimazları hücre dışı sıvıda bulunan endojen kimaz inhibitörleri tarafından inhibisyonundan koruyan heparin proteoglikan ile bir kompleks içinde kalır (Lindstedt, Lee & Kovanen, 2001). Kimazların farklı dokularda bulunması ve çok sayıda substratı parçalaması gerçeği, kimazların tümör anjiyogenezi de dahil olmak üzere fizyolojik ve patolojik koşullarda birçok farklı rol oynayabileceğini, ancak bu rollerin iyi karakterize edilmediğini gösterir (de Souza Junior ve ark., 2015). Yine de birçok tümör tipinde mast hücre kimazlarının arttığı gösterilmiştir. Kolorektal kanserlerde, hepatoselüler karsinomlarda ve intrahepatik kolanjiyokarsinomlarda hem triptaz-kimaz pozitif hemde triptaz pozitif mast hücrelerinin arttığı ve tümör bölgesine infiltre olduğu bilinmektedir (Tan ve ark., 2005; Terada & Matsunga, 2000). Kimaz, tümör bölgesinde indirekt yol ile anjiyogenezi artırdığı düşünülmektedir (Şekil 2-10) (de Souza Junior ve ark., 2015).



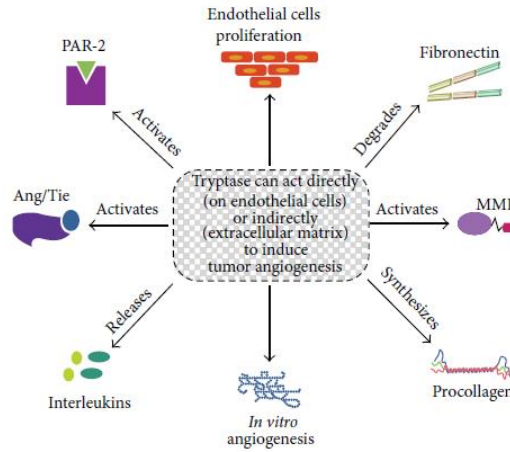
Şekil 2-10: Kimazlar, MMP-9’u aktive edebilir veya Angiotensin I’i Angiotensin II’ye dönüştürebilir. (de Souza Junior ve ark., 2015)

2.10.2.3. Triptaz

Mast hücre triptazı, 134 kDa moleküler ağırlığına sahip, tetramerik yapıda, nötr bir serin proteazdır (McNeil ve ark., 2008; Schwartz ve ark., 1981). Mast hücreleri, hücre başına 10-35 pikogram (pg) triptaz içerirler (Schwartz, 1990). İnsan mast hücreleri iki tip triptaz (alfa ve beta) içerirler. Alfa-triptaz dolaşımdaki ana izoformdur ve beta-triptaz, salgı granüllerinde depolanan ana triptaz tipi gibi görünmektedir (McNeil ve ark., 2008; Pejler ve ark., 2010; Wernersson & Pejler, 2014; Xia ve ark., 1995). Kemirgenlerde eksprese edilen mast hücre triptazları (MCP-6 ve MCP-7), sırasıyla insan alfa-triptaz ve beta-triptazların benzerlerini temsil ettiği düşünülmektedir (Wernersson & Pejler, 2014; Xia ve ark., 1995).

Kankkunen ve arkadaşları tümör anjiyogenezi ile mast hücre triptazları arasındaki ilişki ile ilgili ilk çalışmayı yapmışlar ve iyi huylu tümörlere oranla kötü huylu tümörlerde triptaz pozitif mast hücre sayısının 4 kat fazla olduğunu bildirmişlerdir (Kankkunen, Harvima & Naukkarinen, 1997). Daha sonra birçok araştırmacı tarafından akciğer adenokarsinomlarında (Imada, Shijubo, Kojima & Abe, 2000), B hücreli Non-Hodgkin lenfomalarında (Ribatti ve ark., 2010), beyinde (Nico ve ark., 2004) ve servikal kanserlerde (Taverna ve ark., 2013), miyelodisplastik sendromlarda (Ribatti & Crivellato, 2012), B hücreli kronik lenfositik lösemilerde (Ribatti ve ark., 2003), melanomlarda (Ribatti ve ark., 2003), hepatoselüler karsinomlarda (Goffredo, Gadaleta, Laterza, Vacca & Ranieri, 2013), gastrointestinal kanserlerde (Ammendola ve ark., 2013), erken meme kanserlerinde (Marech ve ark.,

2014) ve kolorektal kanserlerde (Marech ve ark., 2014) triptaz pozitif mast hücreleri ile malignant tümörler arasındaki ilişki incelenmiştir. Son 20 yılda, triptazlar, mast hücreler için spesifik belirteç (marker) olarak kullanılmış ve tümör anjiyogenez ile ilişkili oldukları düşünülmüştür. Bu yüzden de kötü huylu tümörlerde, tümörün agresifliği ve kötü prognozdan sorumlu olabilecekleri bildirilmiştir Ammendola ve ark., 2014; Malfettone ve ark., 2013; Theoharides ve ark., 2012) (Şekil 2-11).



Şekil 11: Triptaz direkt veya indirekt yol ile tümör anjiyogenezini indükleyebilir (de Souza Junior ve ark., 2015).

2.10.2.4. Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF-alfa)

Tümör nekroz faktörü (TNF), ilk olarak Carswell tarafından tümör hücrelerini in vitro ve in vivo olarak parçalayabildiğinin gösterilmesi ile, tümör gerilemesine neden olan bir sitokin olarak tanımlanmıştır. TNF-dönüştürücü enzim (TACE) ile bölünerek ekstraselüler alana salınan, zara bağlı bir protein olarak sentezlenir. İnflamasyon ve hücre bağışıklık tepkilerinin özellikle önemli bir mediyatörü olarak bilinir (Murtaugh, Baarsch, Zhou, Scamurra & Lin, 1996; Wang & Lin, 2008). Genellikle TNF-alfa'nın ana kaynağı doku makrofajlarının olduğu düşünülmektedir. Ancak, mast hücreleri, lenfositler, doğal öldürücü (NK) hücreleri, nötrofiller ve eozinofiller dahil olmak üzere birkaç farklı hücre tipi, uygun şekilde uyarıldığında TNF alfa üretir (Dery ve ark., 2000).

TNF-alfa'nın bağlanması için hücrelerde iki reseptör vardır, TNF reseptörü 1 (TNFR-1, p55 reseptörü) ve TNFR-2 (p75 reseptörü). TNFR-1 her yerde eksprese edilirken, TNFR-2 esas olarak immün hücrelerde eksprese edilir. Çoğu hücre tipinde TNF'nin hücresel etkilerine aracılık eden ana reseptör TNFR-1'dir ve bu reseptörün

aktivasyonu apoptotik hücre ölümünü indükleyen bir sinyalizasyonu başlatır (Aggarwal, 2003). Bununla birlikte kronik inflamasyon varlığı, tümör gelişimini ve ilerlemesini desteklemektedir. Başlıca bir proinflamatuvar sitokin olarak TNF-alfa, inflamasyon ve karsinogenez için endojen bir tümör promotörü olarak işlev görebilir. TNF-alfa ekspresyonu çeşitli pre-neoplastik dokuda ve kanser dokularında daha yüksek seviyelerde rapor edilmiştir ve kronik lenfositik lösemi, Barrett adenokarsinomu, meme kanseri ve servikal karsinom gibi kanser türlerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Ahmed, Salahy, Fayed, El-Hefnawy & Khalifa, 2001; Ferrajoli ve ark., 2002; Garcia-Tunon ve ark., 2006; Szlosarek ve ark., 2004; Tselepis ve ark., 2002).

Mast hücreleri ve makrofajlar, tümör hücrelerinin sitotoksitesinde önemli roller oynar. Özellikle mast hücreleri yüksek oranda TNF-alfa salgılayabilmek için yüksek miktarlarda TNF alfa depolar, bu da doğrudan tümör hücresi sitotoksitesine yol açabilirken diğer bağlamlarda ise TNF-alfa kronik inflamasyonu arttırdığından tümör büyümesini destekleyebilir (Wang ve ark., 2008; Dery ve ark., 2000).

2.10.2.5. MMP-9

Matriks metaloproteinazlar (MMP'ler), hücre dışı matriks (ECM) bileşenlerini ve protein olmayanları parçalayan çinko ve kalsiyuma bağımlı proteolitik enzimlerin bir ailesidir (Egeblad & Werb 2002). MMP-9, proinflamatuvar bir faktör olarak kategorize edilmiştir. Mast hücreleri kendileri MMP-9 üretebilir, ayrıca bağ dokuda fibroblastlarla adeziv etkileşimleri, MMP-9 salınımına neden olur (Gauchotte ve ark., 2013; Purwar, Kraus, Werfel & Wittmann, 2008).

MMP-9 (jelatinaz B) özellikle bazal membrandaki tip IV kollajeni parçalayabilir, bu nedenle anjiyogenezde olduğu kadar tümör invazyonu ve metastazında da önemli bir rol oynamaktadır (Coussens; Tinkle & Hanahan & Werb, 2000; Egeblad & Werb 2002;). MMP'ler, hemen hemen tüm kanserlerde up-regüle olur ve bu artış genellikle kötü prognoz ile ilişkilendirilir (Egeblad & Werb, 2002).

2.11. Malignant Meme Tümörlerinde Mast Hücreleri

Birçok kanser türünde olduğu gibi, meme kanserlerinin tümör stromasında ve intratümöral alanda mast hücreleri sıklıkla gözlenir, ancak bu hücrelerin hem pro- hem de anti-tümör rolleri belirsizliğini korumaktadır. Mast hücrelerinin meme tümör dokularını infiltre ettiğini destekleyen çok sayıda kanıt olmasına rağmen, prognostik rolleri ve işlevleri tartışmalıdır (Aponte-López ve ark., 2018).

Tedavi almamış insan meme kanseri hastalarının kan serum örneklerinde yüksek triptaz seviyeleri bulunması, mast hücre aktivasyonu düşündürmektedir. Triptaz pozitif mast hücreleri sıklıkla erken evre insan meme kanseri olgularında peritümöral bölgede gözlenebilmektedir (Marech ve ark., 2014; Samoszuk & Corwin 2003).

Ayrıca meme kanserli hastaların lenf nodlarındaki triptaz pozitif mast hücre sayısına paralel olarak mikrodamar sayımlarının da arttığı ve mikrometastazlı lenf nodlarında değerlerinin metastazı olmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Marech ve ark., 2014). Bu nedenle, mast hücrelerinin, tümör gelişiminin erken evrelerinde ortaya çıkan mikrometastaza ve onu destekleyen anjiyogeneze en azından kısmen katkıda bulunduğu öne sürülmüştür.

Mast hücrelerinin tümör yerleşimi ile ilgili olarak, bir çalışmada intratümöral mast hücrelerinin lenfatik ve perinöral invazyonla daha iyi ilişkili olduğu ve bunun olumsuz bir prognostik parametre olduğu bulunmuştur.

Histamin H4 reseptörünün antagonistinin uygulanması meme kanseri hücre hattında TUNEL pozitif hücrelerde artışa neden olmuştur (Medina ve ark., 2011).

Tez çalışmasında, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan meme karsinomları ve kedi, köpek meme tümörlerinde mast hücrelerinin granülasyon durumu ve tümöral yerleşim yerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca TNF-alfa ve MMP-9 ekspresyonları tümörlü dokularda incelenerek PCNA değeri ile birlikte meme tümörlü dokularda mast hücrelerinin artışının anti-tümörojenik ve pro-tümörojenik etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 . Sıçanlarda Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada toplam 45 adet, 6 haftalık yaşta, Sprague Dawley ırkı dişi sıçanlar 3 gruba ayrılmıştır.

Grup I (Gavaj-G Grubu): Bu grupta 20 adet Sprague Dawley ırkı dişi sıçana sadece 20 mg dozunda 7-12 Dimetilbenzentraseren (DMBA) 1 ml pamuk yağı içerisinde eritilmiş ve gavaj uygulanarak oral yolla verilmiştir. Daha sonra sıçanlar gün gün takip edilmiş ve meme tümörü 3 cm çapına ulaşmaya kadar herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Sıçanlara ad libitum beslenme yapılmıştır ve her gün suları yenilenmiştir. Normal gün ışığı ve sıcaklık sağlanmış ve hayvan refahı gözetilerek bakılmıştır. Meme tümörleri 3 cm çapında olduktan sonra bu hayvanlar önce Sevofluran (Sevorane %100, Abbvie) ile anesteziye alınmış sonra servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi uygulanmış ve tümörlü dokular toplanarak tespit işlemi için %4'lük paraformaldehit solüsyonuna konulmuştur.

Grup II (Enjeksiyon-E Grubu): Bu grupta 20 adet Sprague-Dawley ırkı, dişi sıçana 20 mg dozunda 7-12 DMBA 1 ml pamuk yağı içerisinde eritilmiş ve oral yol ile gavaj uygulamasını takiben 4 hafta sonrasında deri altı yolla 25 mg tek doz Medroksiprogesteron asetat (Depo-Provera, Pfizer) uygulaması yapılmıştır. Daha sonra sıçanlar gün gün takip edilmiş ve meme tümörü 3 cm çapına ulaşmaya kadar herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Sıçanlara ad libitum beslenme yapılmıştır ve her gün suları yenilenmiştir. Normal gün ışığı ve sıcaklık sağlanmış ve hayvan refahı gözetilerek bakılmıştır. Daha sonra 3 cm çapında meme tümörü oluşan hayvanlar önce Sevofluran (Sevorane %100, Abbvie) ile anesteziye alındıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi uygulanmış ve tümörlü dokular toplanarak tespit işlemi için %4'lük paraformaldehit solüsyonuna alınmıştır.

Grup III (KS Grubu): Bu grupta 5 adet sıçana hiçbir uygulama yapılmamıştır. Her bir sıçandan bir adet meme lobu toplanmış ve toplam 5 adet meme lobu kontrol meme dokusu olarak kullanılmıştır. Sıçanlardan alınan 5 adet kontrol meme dokusu 5 farklı sıçandan alınmıştır. Sıçanların puberteye girdikleri ve daha önce herhangi bir deneysel uygulama yapılmadıkları bilinmektedir. Makroskobik olarak

sıçanlarda meme bezleri tam belli olmamakla birlikte meme başını bulduktan sonra meme başı ve hemen altındaki yağ doku ile birlikte alınmıştır.

3.2 . Kedi ve Köpeklerden Doğal Meme Tümörü Olgularının Eldesi

Bu olgular Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Bilimleri Bölümü Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'na gelen ve tedavi amacıyla meme tümörü dokusu operasyon ile alınan veya özel kliniklerden gelen ve bu tez için uygun görülen meme karsinomu olgularından seçilmiştir. Kedi ve köpeklere bu tez çalışması için hiçbir müdahale yapılmamıştır. Meme tümörü operasyonları uygun analjezi ve anestezi teknikleri gözetilerek normal meme tümörü operasyon prosedürüne uygun halde ve bu konuda yetki ve uzmanlığa sahip veteriner hekimler tarafından hayvan refahına uygun şekilde yapılmıştır.

Kontrol meme dokuları, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Patoloji Anabilim Dalı'na nekropsi yapılmak üzere getirilen 5 adet dişi kedi ve 5 adet dişi köpekten sağlıklı, 1 yaşından büyük, kısırlaştırılmamış ve ölümünün üzerinden kısa bir süre geçmiş kadavralardan meme dokuları toplanmış ve kontrol amacıyla kullanılmıştır.

Araştırma için etik kurul izni alınmış olup (B. U. Ü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 25.02.2020 tarih ve 2020-04/03 sayılı kararı) kedi ve köpek meme tümörü örneklerinin toplanması hastaların rutin tedavi prosedürünün bir parçası olarak B. U. Ü Veteriner Fakültesi Klinik Bilimleri Bölümü Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda ve özel veteriner kliniklerinde sorumlu veteriner hekimleri tarafından hayvan refahı prensiplerine göre gerekli anestezi prosedürlerine uyularak gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamına araştırmacılar hiçbir müdahalede bulunmamışlardır. Ayrıca bu tez çalışmasının 22.02.2021 tarihinde Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Projeleri Birimi tarafından (Proje No: TDK-2021-354) desteklenmesi uygun bulunmuştur.

3.3 . Histopatolojik Değerlendirme

3.3.1 . Doku Takibi

Çalışmada kullanılan taze alınmış meme tümörü dokuları, bilimsel olarak uygun biçimde küçültülerek % 4'lük paraformaldehit solüsyonunda, + 4 derecede 2 gün boyunca tespit edilmiştir. Tespit edildikten sonra dokular 1 saat akan su altında yıkanmıştır. Yıkanan dokular birer saat boyunca sırası ile %70, % 80, %90, absolü alkol I ve absolü alkol II' ye konulmuş, absolü alkol II'de bir gece bekletilmiştir. Ertesi sabah Ksilen I ve Ksilen II solüsyonunda 1,5 saat bekletilen dokular 56 derecede sıvı halde bulunan parafine konulmuştur. Daha sonra toplam 4 saat parafinde bekletilen dokular metal kasetlere gömülerek parafin blok halinde buzdolabında muhafaza edilmiştir. Bu dokular Leicia marka mikrotom ile 4 mikron kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin ve Toluidin blue prosedürleri izlenerek boyanmıştır. Histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler yapılırken paralellik olması için ardışık kesitler alınmıştır.

Her bir olguya ait hazırlanan tüm preparatlar incelenerek her olgu için tümörü en iyi şekilde temsil eden tek bir parafin blok seçilmiş ve kullanılmıştır.

3.3.2 Hematoksilen-Eozin Boyama

Hematoksilen-Eozin boyama için alınan kesitler bir gece boyunca etüvde bekletilmiştir. Daha sonra 20 dk Ksilen I, 20 dk Ksilen II solüsyonunda tutulan kesitler, rehidrasyon işlemi için 3'er dk dereceli alkollerden geçirilmiştir. Bu işlemten sonra 3 dk distile su ile yıkanan kesitler 10 dk Hematoksilen solüsyonunda bekletilmiştir. 3 dk distile suda yıkanan kesitler, bir kere daldır-çıkar yapılarak asit alkolden geçilmiştir. Daha sonra mavileşinceye kadar amonyak solüsyonunda bekletilmiştir. Eozin solüsyonunda 3 dk bekletilen kesitler hızlıca distile suda yıkanarak dereceli alkollerde birer kere daldır çıkar yapılmıştır. Boyanan kesitler, kurutulduktan sonra ksilen solüsyonunda 20 dk bekletildikten sonra entellan ile kapatılarak değerlendirmeler için kullanılmıştır.

Histopatolojik inceleme için yapılan Hematoksilen-Eozin boyamada hücreler malignite kriteri olan sitoplazma ve çekirdek boyutları (anizositozis ve anizokaryozis) yönünden değerlendirilmiştir. Malignite kriterlerinden bir diğeri olan mitotik aktivite incelenen tümörlü dokularda değerlendirilerek malignite kriterlerine göre en kötü huylu olan meme tümörleri seçilmiştir.

3.3.3 Toluidin Blue Boyama

Toluidin blue boyamaları için öncelikle toz halde bulunan Toluidin blue boyasından 1 gram alınarak 100 ml %70'lik alkol ile karıştırılarak stok solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra çalışma solüsyonu için stok solüsyonundan 5 ml alınarak 45 ml %1'lik sodyum klorid solüsyonu ile karıştırılmıştır. Çalışma solüsyonu her seferinde taze hazırlanmıştır. Daha sonra 4 mikrometre kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 2x20 dk ksilde bekledikten sonra rehidrasyon işlemi için dereceli alkollerden geçirilerek distile suda yıkanmıştır. Daha sonra hazırlanan Toluidin blue çalışma solüsyonundan kesitlerin üstü kapanacak şekilde damlatılarak 2 dk boyunca tutulmuştur. Distile suda yıkanan kesitler dereceli alkollerden geçirilerek ksilen solüsyonunda 20 dk beklendikten sonra entellan ile kapatılmıştır. Pozitif kontrol için sıçan derisi kullanılmıştır.

Metakromazik boyalar mast hücrelerinin gösterilmesi ve boyanması için önemlidir ve bu boyaların en bilinenlerinden biri Toluidin blue boyasıdır (Ribatti 2018). Meme tümörü dokuları, Toluidin blue boyama yöntemi ile boyandıktan sonra 20x objektifte 10 tane alan seçilerek mast hücreler sayılarak, toplam mast hücre sayısı, granüllü ve degranüle olan mast hücre sayıları ve intratümöral veya peritümöral mast hücre sayıları hesaplanmıştır. İntratümöral ve peritümöral mast hücre sayıları Glajcar ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmada bildirdiği şekilde, mast hücreleri tümör dokusunun merkezinde ve tümör sınırının en fazla 1 yüksek büyütme alanı (0.2 mm² saha alanı) kadar dışında ise bu mast hücreleri intratümöral olarak, tümör kenarının 1 yüksek büyütme dışında olanlar ve en fazla 2 yüksek büyütme dışında olanlar peritümöral mast hücreleri olarak sınıflandırılmıştır (Glajcar ve ark., 2017).

3.3.4 Oil-Red-O Boyama

Çalışmamızda, deneysel yolla oluşturulan 11 adet meme tümörü olgusunda hem sitolojik inceleme hem de Hematoksilen-Eozin boyama sonucunda neoplastik hücrelerin epitellerinde vakuoller gözlenmiştir. Bu nedenle bu 11 olgunun histopatolojik değerlendirmesi sonucu lipidden zengin karsinom (lipid-rich carcinoma) şüphesi nedeniyle oil-red-o boyaması yapılması uygun görülmüştür. Oil-red-o boyama için kesitler formol-kalsiyum solüsyonunda fiksasyonu sağlandıktan sonra öncelikle 0,5 gr oil-red-o 200 ml isopropil alkolde eritilmiştir. Bu solüsyon 2 litrelik bir balon jodede 56 °C’de benmaride 1 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen bu solüsyondan 6 ml alınarak, üzerine 4 ml distile su eklenmiştir. Karıştırıldıktan sonra filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Boyama için kesitler tespit edildikten sonra hiçbir işlem uygulanmamıştır. Kriyostat mikrotomunda, -18 derecede, 15 mikron kalınlığında alınan kesitler lamaların üzerine alınarak %60 izopropil alkole bir kere batırıp çıkartılmıştır. Daha sonra kesitler, oil-red-o solüsyonu içerisinde, 10 dk boyunca bekletilmiştir. Tekrar hızlı bir şekilde izoproil alkol solüsyonundan geçirilen kesitler hematoksilen solüsyonunda çekirdek boyaması için 1 dk boyunca bekletilmiştir. Daha sonra akan suda yıkanan kesitlerin üzerleri gliserin içerikli bir kapatıcı ile kaplanarak lamel ile kapatılmıştır.

3.4. İmmunohistokimyasal Boyamalar

Tez çalışmasında toplanan ve incelenen tüm dokular anti-kimaz, anti-triptaz, anti-MMP-9, anti-TNF-alfa ve anti-PCNA antijenlerine karşı geliştirilmiş ticari antikolar (monoklonal) ile Horseradish-peroksidaz tekniği kullanılarak boyanmıştır. İzlenen protokol aşağıda detaylı olarak anlatılarak kullanılan antikoların dilüsyonları Tablo-3.1’ de verilmiştir.

Tablo 3.1: Tez çalışması kapsamında kullanılan primer antikorlar, dilüsyonları, inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları

Antikor	Üretici Firma	Ürün kodu	Dilüsyon oranı	İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi
Mouse Anti-PCNA	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-25280	1/150	+4	1 gece
Mouse Anti-TNF alfa	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-52746	1/100	+4	1 gece
Mouse Anti-Chymase	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-59586	1/50	+4	1 gece
Mouse Anti-Tryptase	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-59587	1/100	+4	1 gece
Mouse Anti-MMP-9	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-393859	1/100	+4	1 gece

İmmunohistokimyasal boyamalar için kullanılan 60 adet parafin bloklara gömülmüş meme dokusu 4 mikrometre kalınlığında, pozitif şarjlı lamlara (Isotherm, Almanya) alınarak 1 gece 56 °C ısıdaki etüvde bekletilmiştir. Dokular 2x20 dk deparafinizasyon işlemi için Ksilen solüsyonunda bekletilmiştir. Daha sonra rehidrasyon işlemi için dereceli alkollerden geçirilen örnekler distile suda yıkanmıştır. Antijen açığa çıkarma işlemi için sodyum sitrat (antijen retrieval solüsyonu, pH 6,0; AP-9003-999, Thermo Fisher Scientific, Amerika) (90 ml distile su, 10 ml sitrat buffer) çözeltisi içerisinde ısıya dayanıklı bir şale içerisinde, mikrodalga fırında, 600 W'ta 3x5 dk kaynatma işleminden sonra oda sıcaklığına (yaklaşık 20 dakika) getirilmiştir. Oda sıcaklığına gelen kesitler 3x5 dk PBS (PBS tablet, P4417, Sigma-Aldrich, Almanya) içerisinde yıkanarak immunohistokimyasal boyamanın ön işlemi tamamlanmıştır.

Boyama prosedürü için işaretlenmiş Horse-radish-peroksidaz prensibine dayalı immunohistokimya sekonder-DAB kiti (Ultra Vision Detection System HRP Polymer/DAB, Waltham, MA, Amerika) kullanılmıştır.

Kullanılan immunohistokimya kitinin protokolüne göre sırası ile;

- PBS ile yıkanan kesitler, endojen peroksidaz nedeniyle oluşan non-spesifik arka plan boyanmasını azaltmak için Hidrojen-Peroksit solüsyonunda, oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır,
- 3x5 dakika PBS ile yıkama yapılmıştır,
- Protein bloklama işlemi için (oda sıcaklığında 5 dakika) protein bloklama solüsyonunda inkübe edilmiştir,
- Primer antikor ile inkübasyon (negatif kontrol için sadece antikor sulandırma solüsyonu damlatılarak inkübasyon sağlanmıştır, kullanılan her antikora ait sulandırma bilgisi, klon ve marka bilgileri ile izlenen inkübasyon protokolü Tablo 3-1'de verilmektedir.) öncesinde primer antikorlar antikor sulandırıcı solüsyon (TA-125-UD, Thermo Fisher Scientific, Amerika) ile uygun dilüsyonda sulandırılmıştır. Daha sonra içerisinde su ve pamuk ile nemlendirilen, ışık geçirmeyen bir kabın içerisinde primer antikor damlatıldıktan sonra +4 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
- Ertesi gün oda ısısına getirilen preparatlar 3x5 dakika PBS ile yıkanmıştır
- Primer antikor enhancer (Thermofisher Scientific, USA) ile 10 dakika antikorların daha yüksek derecede tutunması sağlanmıştır.
- 3x5 dakika PBS ile yıkanmıştır.
- Sekonder antikor ile (oda sıcaklığında, 30 dakika) inkübasyon yapılmıştır,
- 3x5 dakika PBS ile yıkanmıştır.
- Kromojen ile inkübasyon (DAB kromojeni kullanılmış olup, kitin protokolünde önerilen 1x50 dilüsyonda hazırlanmıştır. İnkübasyon süresi dokulardaki boyanma incelenerek 2 dakika ile 10 dakika arasında değişmiştir ve aynı antikorlar eş olması bakımından aynı süre bekletilmiştir) yapılarak 2 ile 20 dakika arasında bekletilmiştir.
- DAB koromojen ile boyanan preparatlar akan su altında yaklaşık 10 dakika yıkanmıştır.
- Mayer hematoksilen ile 15 saniye boyanarak çekirdek (zıt) boyama yapılmıştır.
- Akan su altında 5 dakika yıkanan preparatlar 2 kere amonyak solüsyonunda daldır çıkar yapılarak dereceli alkollerden geçirilmiştir.
- Kurutma işleminden sonra 10 dakika ksilol solüsyonunda bekletilen preparatlar Entellan (Merck, 1.07961.0100, Almanya) ile yapıştırılarak üzerlerine lamel kapatılmıştır.

İmmun boyama yapılırken her bir antikor için 1 adet fazladan kesit alınarak bu kesitler negatif kontrol için kullanılmıştır. Bu kesit immün boyama sırasında primer antikor yerine sadece antikor sulandırma solüsyonu ile inkübasyonu sağlanarak negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca her antikor için önerilen pozitif kontrol dokusu (triptaz ve kimaz için sıçan deri dokusu, MMP-9 için dalak dokusu, TNF-alfa için tümöral dokudaki mast hücreleri ve yangı hücreleri, PCNA için lenf yumrusu) sağlanarak her bir primer antikor için pozitif kontrol boyanması yapılmıştır.

3.5. İmmun Reaksiyonların Değerlendirilmesi

İmmunohistokimyasal olarak boyanan kesitler, kontrol dokuların boyanmasına bakılarak, Olympus CX41 ışık mikroskobu altında bütün alanlar taranarak öncelikli olarak tümör hücrelerinde immün reaksiyonun varlığına göre pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra incelenen her bir antikor için uygun değerlendirme sistemlerine göre incelenerek değerlendirme yapılmıştır. Çekilen resimler Olympus BX51 floresan mikroskobu ile fotoğraflanmıştır.

3.5.1 . Triptaz ve Kimaz Pozitif Hücrelerin Değerlendirilmesi

Triptaz ve kimaz ekspresyonu kalitatif ve kantitatif yöntemler ile 20x objektifte 10 alan incelenerek immün olarak pozitiflik gösteren triptaz ve kimaz pozitif mast hücreleri Olympus CX 41 ışık mikroskobu ile sayılmıştır. Kontrol meme dokularıda aynı yöntemle incelenerek tümör dokusu ve normal meme dokusu mast hücre ve triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı bakımından karşılaştırılmıştır. İntratümöral-peritümöral mast hücreleri belirlenerek triptaz-kimaz sayıları intratümöral ve peritümöral olarak değerlendirilmiştir. Alan seçimleri hem kontrol hem tümörlü doku için düşük büyütmede (4x) yoğun ve çok sayıda hücre boyanan alanlar belirlenerek yapılmıştır.

3.5.2 . TNF-alfa Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

TNF-alfa ekspresyonu pozitif hücrelerin oranı ile boyanma yoğunluğu değerlerinin çarpımına göre iki araştırmacı tarafından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre 0 ile 12 arasında bir skor elde edilmiştir. Bu skor pozitif hücrelerin oranı; %80'den fazla hücre boyanması var ise 4 puan, %51 ile %80 arasında bir boyanma var ise 3 puan, %10 ile %50 arasında bir boyanma var ise 2 puan %10'dan daha az bir boyanma var ise 1 puan, hiç boyanma yok ise 0 puan verilerek yapılmıştır. Boyanma yoğunluğu; hiç reaksiyon yok ise 0, hafif bir pozitif boyanma var ise 1, orta yoğunlukta bir boyanma var ise 2, güçlü bir boyanma var ise 3 puan verilerek değerlendirilmiştir. Bu iki değerın çarpımı sonucu 9 veya daha yüksek bir boyanma elde edilmiş ise güçlü pozitif reaksiyon, 3 ile 8 arasında bir değer elde edilmiş ise orta pozitif reaksiyon, 3'ten küçük bir rakam elde edilmiş ise zayıf pozitif reaksiyon, 0 değeri elde edilmiş ise pozitif reaksiyon yok olarak değerlendirilmiştir (Weigel ve ark.,2012).

3.5.3 MMP-9 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

MMP-9 ekspresyonu pozitif hücrelerin oranı ile boyanma yoğunluğu değerlerinin çarpımına göre iki araştırmacı tarafından değerlendirildi. Bu değerlendirmeye göre 0 ile 12 arasında bir skor elde edilmiştir. Bu skor pozitif hücrelerin oranı; %80'den fazla hücre boyanması var ise 4 puan, %51 ile %80 arasında bir boyanma var ise 3 puan, %10 ile %50 arasında bir boyanma var ise 2 puan %10'dan daha az bir boyanma var ise 1 puan, hiç boyanma yok ise 0 puan verilerek yapılmıştır. Boyanma yoğunluğu; hiç reaksiyon yok ise 0, hafif bir pozitif boyanma var ise 1, orta yoğunlukta bir boyanma var ise 2, güçlü bir boyanma var ise 3 puan verilerek değerlendirilmiştir. Bu iki değerin çarpımı sonucu 9 veya daha yüksek bir boyanma elde edilmiş ise güçlü pozitif reaksiyon, 3 ile 8 arasında bir değeri elde edilmiş ise orta pozitif reaksiyon, 3'ten küçük bir rakam elde edilmiş ise zayıf pozitif reaksiyon, 0 değeri elde edilmiş ise pozitif reaksiyon yok olarak değerlendirilmiştir (Weigel ve ark.,2012).

3.5.4 PCNA Pozitif Hücrelerin Değerlendirilmesi

PCNA ekspresyonu değerlendirilmesinde, 1000 adet neoplastik hücre sayılarak çekirdekleri immün olarak pozitif hücre sayısı bulunmuş ve pozitif hücreler yüzde olarak hesaplanmıştır (Pena, Nieto, Perez-Alenza, Cuesta & Castano, 1998).

3.6 . İstatiksel Analizler

Gruplar arasındaki istatistiksel analizler, IBM SPSS Statistics programı Versiyon 28 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm gruplar istatistiksel farklılıklar açısından karşılaştırılmadan önce verilerin normal dağılımda olup olmadığı Shapiro-Wilk Testi ile değerlendirilmiştir. Shapiro-Wilk testi ile elde edilen değerin 0,05'ten büyük olması durumunda, veriler normal dağılıma uygun olarak kabul edilmiştir. Normal dağılım gösterenler parametrik test olan ve 2 grup arasındaki farklılıkları değerlendirmek için kullanılan Student T testi ile, normal dağılım göstermeyenler, 2 grup arasındaki farklılıkları değerlendirmek için non-parametrik test olan Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edilmiştir. Normal dağılım gösteren 3 grup arasındaki farklılıkların değerlendirmesi için One Way ANOVA testi kullanılmıştır. Öncelikle, gruplarda varyansların homojen dağılım gösterip göstermediği Levene's test ile analiz edilmiş, homojen dağılım gösteriyorsa One Way ANOVA, homojen dağılım göstermiyorsa aynı gruplar, Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen 3 grup arasındaki farklılıkların değerlendirmesi de yine Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ değeri kullanılmıştır.

Korelasyon analizleri, iki değişken arasında bir ilişki olup olmadığını, eğer bir ilişki varsa bunun pozitif veya negatif yönde olup olmadığını değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılımda olup olmadığı değerlendirildikten sonra, normal dağılımda olan gruplar için Pearson korelasyon analizi, normal dağılıma uygun olmayan gruplar için Spearman korelasyon analizi kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Genel ve Klinik Bulgular

Köpek ve kedilere ait ırk, yaş, kısırlaştırma durumu ve histopatolojik tanı bilgileri Tablo 4-1 ve Tablo 4-2’de sunulmuştur. Meme tümörü örnekleri alınan 10 adet köpeğin yaş ortalaması 9,72 iken meme tümörü örneği alınan kedilerin yaş ortalaması 9,22 bulunmuştur. Toplanan köpek meme tümörü örneklerinde, en çok meme tümörü gözlenen köpek ırkı % 30 ile melez ırk ve Terrier ırkı köpekler olduğu dikkati çekmiştir. Kedilerde ise en çok gözlenen ırkın Tekir ırkı (%70) kediler olduğu görülmüştür.

Tablo 4-1: Köpek meme tümörünün alındığı hastalara ait genel bilgiler ve histopatolojik tanı (VY: Veri Yok)

Olgu No.	İrk	Yaş	Kısırlaştırma Durumu	Histopatolojik Tanı
K-1	Melez	VY	VY	Kompleks Karsinom
K-5	Melez	6	VY	Yassı Hücreli Karsinom
K-8	Melez	7	Evet	Tübüler Karsinom
K-11	Golden Retriever	14	VY	Tübüler Karsinom
K-19	Terrier	10	VY	Tübüler Karsinom
K-20	Terrier	12	Evet	Tübülopapiller Karsinom
K-21	Cocker	4.5	VY	Malignant Mikst Tümör
K-22	Alman Çoban Köpeği	12	VY	Tübüler Karsinom
K-26	Terrier	12	Evet	Malignant Miyoepitelyom
K-27	Alman Çoban Köpeği	10	Hayır	Tübüler Karsinom

Tablo 4-2: Kedi meme tümörünün alındığı hastalara ait bilgiler ve histopatolojik tanı VY: Veri Yok

Olgu No.	İrk	Yaş	Kısırlaştırma Durumu	Histopatolojik Tanı
Ke-1	Tekir	VY	VY	Tübüler Karsinom
Ke-2	Tekir	10	Hayır	Tubulopapiller Karsinom
Ke-3	Tekir	9	Evet	Solid Karsinom
Ke-4	Tekir	10	Hayır	Kistik Karsinom
Ke-5	Tekir	9	Hayır	Tubulopapiller Karsinom
Ke-7	Tekir	11	Evet	Tübüler Karsinom
Ke-8	Van Kedisi	9	Evet	Solid Karsinom
Ke-9	Siyam	12	Hayır	Tubulopapiller Karsinom
Ke-12	Tekir	1,5	Evet	Tübüler Karsinom
Ke-16	VY	11,5	Hayır	Tübüler Karsinom

Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan meme tümörlerinde sadece gavaj ile DMBA uygulanan G grubu ve DMBA uygulamasını takiben 30 gün sonra progesteron uygulanan E grubunda tümörler DMBA uygulamasından 30 gün sonra tümör varlığı yönünden incelenmeye başlanmıştır. Tez çalışmasında G grubu sıçanlarda tümör oluşumu DMBA uygulamasını takiben 4 ile 13 ay arasında oluşmuştur ve ortalama 8,5 ay sonra tümörler elde edilmiştir. E grubunda ise 5 ile 9 ay arasında tümörler elde edilmeye başlanmış ve ortalama 7 ay sonra tümörlerin elde edilmesi sağlanmıştır. Deney grupları ile ilgili genel ve klinik bilgiler Tablo 4-3'te verilmiştir.

Tablo 4-3: Deneysel olarak oluşturulan meme tümörü grubuna ait tümörün yerleşim yeri ve histopatolojik tanı

<i>Olgu No</i>	Tümörün Yerleşim Yeri	Histopatolojik Tanı
G-1	Sağ aksiller meme lobu	Lipidden zengin karsinom
G-2	Sağ aksiller meme lobu	Lipidden zengin karsinom
G-3	Sağ aksiller meme lobu	Solid Karsinom
G-4	Sol 1. inguinal meme lobu	Solid Karsinom
G-5	Sağ aksiller meme lobu	Tübüler Karsinom
G-6	Sol 2. torakal meme lobu	Tübüler Karsinom
G-8	Sol aksiller meme lobu	Lipidden zengin karsinom
G-9	Sol 1. inguinal meme lobu	Lipidden zengin karsinom
G-10	Sağ aksiller meme lobu	Lipidden zengin karsinom
G-11	Sağ 2. torakal meme lobu	Lipidden zengin karsinom
G-12	Sağ 1. torakal meme lobu	Tübüler Karsinom
G-13	Sağ 2. torakal meme lobu	Lipidden zengin karsinom
G-14	Sol aksiller meme lobu	Solid Karsinom
G-15	Sol aksiller meme lobu	Solid Karsinom
E-1	Sol inguinal meme lobu	Tübüler Karsinom
E-2	Sağ 2. inguinal meme lobu	Tübüler Karsinom
E-3	Sağ 2. inguinal meme lobu	Tübüler Karsinom
E-4	Sağ 2. inguinal meme lobu	Solid Karsinom
E-5	Sol 2. torakal meme lobu	Lipidden zengin karsinom
E-6	Sağ 1. torakal meme lobu	Lipidden zengin karsinom
E-7	Sağ aksiller meme lobu	Tübüler Karsinom
E-8	Sol 1. torakal meme lobu	Lipidden zengin karsinom
E-9	Sağ inguinal meme lobu	Lipidden zengin karsinom
E-10	Sol aksiller meme lobu	Tübüler karsinom

4.2. Makroskobik Bulgular

Oluşturulan deneysel meme tümörleri çapı $3\pm 0,5$ cm olana kadar hayvanlar takip edilmiştir ve bu boyuta ulaşana kadar tümörlere herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Tümör oluşan hayvanlardan 4 tanesinde birden fazla tümör meydana geldiği için ilk tespit edilen tümör 3 cm oluncaya kadar beklenmiş ve diğerleri daha küçük boyutta alınmıştır. Deneysel olarak oluşan tümörlerin 11 tanesine lipidden zengin karsinoma (lipid rich carcinoma), 8 tanesine tübüler karsinom, 5 tanesinde solid karsinom teşhisi konulmuştur. Lipidden zengin karsinom teşhisi konulan tümörler makroskobik olarak yumuşak bir kıvamda ve kesit atıldığında kesit yüzeylerinde lobüler tarzda üremelere sahip oldukları dikkati çekmiştir (Şekil 4-1). Tübüler karsinom teşhisi konulan tümörlerin fibroelastik-sert bir yapıya sahip olduğu kesit yüzeylerinin ise yer yer nekrotik görünüme sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 4-2). Solid karsinom teşhisi konulan tümörlerin ise fibroelastik kıvamda olduğu kesit yüzeylerinin pürüzsüz bir görünüme pürüzsüz bir görünüme sahip oldukları görülmüştür.

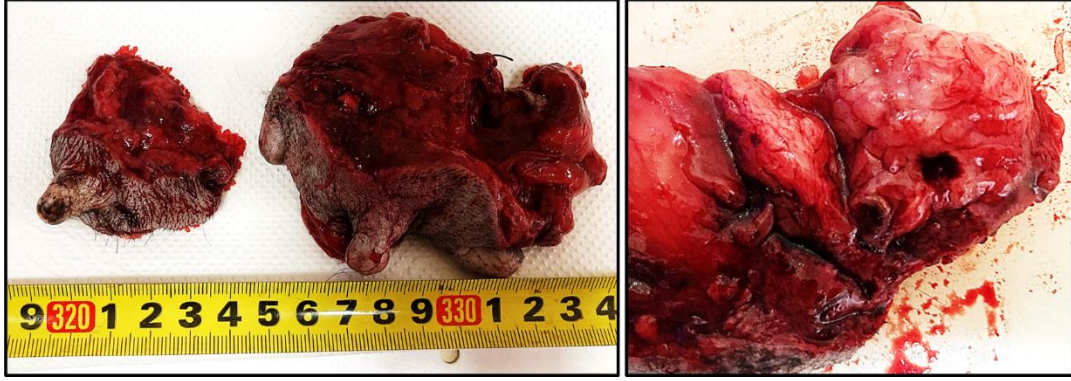


Şekil 4-1: Lipidden zengin karsinom tanısı konan enjeksiyon grubuna ait tümörün makroskopik görünümü



Şekil 4-2: Tubüler karsinom tanısı konan gavaj grubuna ait tümörün makroskopik görünümü

Köpeklerden alınan meme tümörü örnekleri makroskopik olarak incelendiğinde boyut olarak tümörün tespit edilme zamanı ve hasta sahibinin kliniğe köpeği getirme zamanına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Ayrıca çoğu meme tümörü dokusu veteriner hekimin operasyon sonrası alır almaz formalin solüsyonuna koyması sonucu kıvam ve renk olarak sağlıklı bir değerlendirme imkânı sunmamıştır. Köpek meme tümörleri boyut olarak 1-10 cm arasında değişen boyutlarda ve deri ile kaplı oldukları gözlenmiştir. Formalin solüsyonunda getirilmeyenler kıvam olarak fibroelastik kıvamda olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: Köpek meme tümörü makroskopik görünüm

Kedilerden alınan meme tümörü örnekleri makroskopik olarak incelendiğinde boyut olarak tümörün tespit edilme zamanı ve hasta sahibinin kliniğe kediye getirme zamanına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Ayrıca çoğu meme tümörü dokusu veteriner hekimin operasyon sonrası alır almaz formalin solüsyonuna koyması sonucu kıvam ve renk olarak sağlıklı bir değerlendirme imkânı sunmamıştır. Makroskopik olarak bu tümörlerin boyutları ölçüldüğünde 0,5 ile 5,7 cm arasında değişen boyutlarda oldukları dikkati çekmiştir (Şekil 4-4). Hepsi deri ile kaplı olan bu tümörlerin sadece 2 tanesinin yumuşak, 3 tanesinin ise fibroelastik kıvamlı oldukları gözlenmiştir. Bu tümörlerin üçünün kesit yüzeyinde nekrotik alanlar görülmüş, ikisinin kesit yüzeyinin pembe-kırmızı renkte ve lobüler yapıda oldukları dikkati çekmiştir. Diğer 5 tümör formalin solüsyonunda getirildiğinden makroskopik muayeneleri yapılamamıştır.



Şekil 4-4: Kedi meme tümörünün makroskopik görünümü

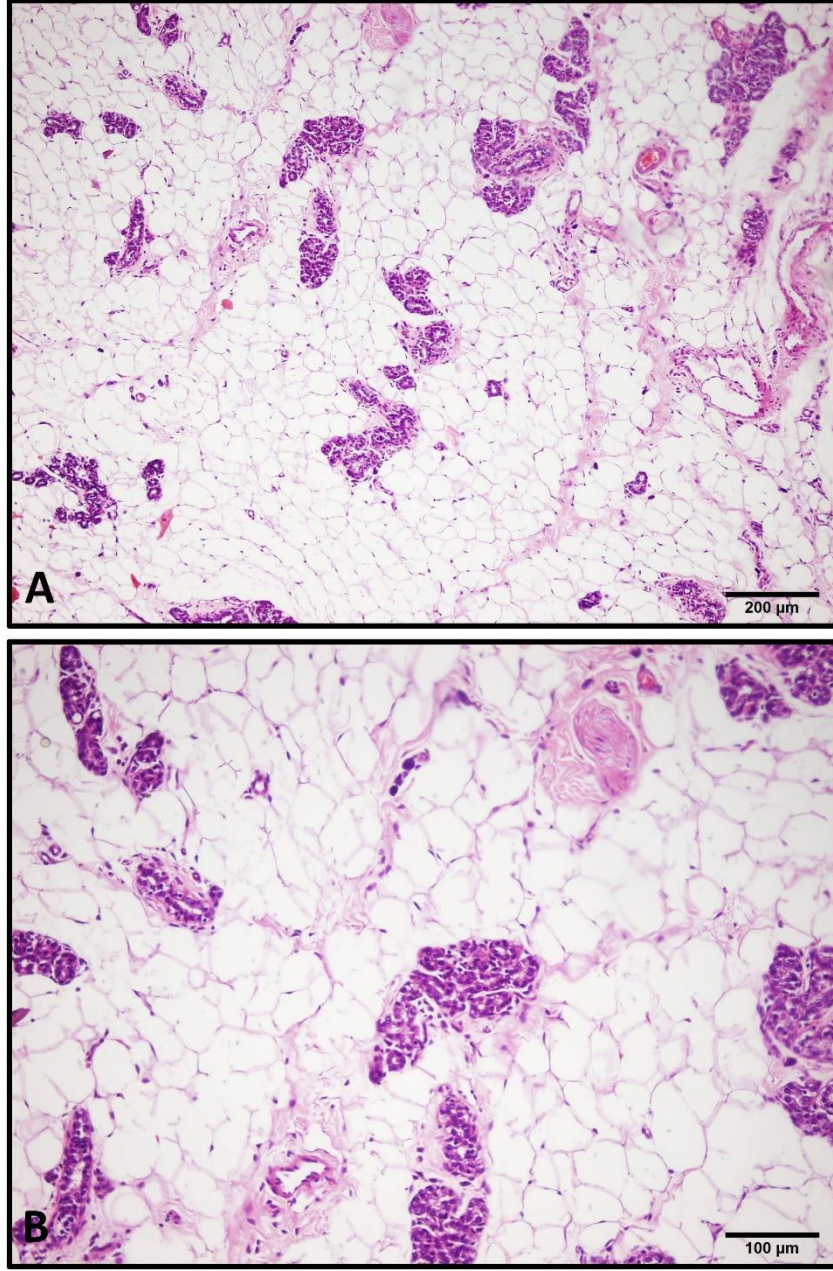
4.3. Mikroskopik Bulgular

4.3.1. Tümör Dokularında Histopatolojik Alt Tiplerinin Değerlendirmesi

Meme tümörü dokularından elde edilen kesitler hematoksilin-eozin boyaması yapılarak sıçan, kedi ve köpek meme tümörlerinde histopatolojik tanı yapılmıştır.

4.3.1.2. Deneysel Olarak Oluşturulan Sıçan Meme Tümörü Dokularında Histopatolojik Alt Tiplerin Değerlendirilmesi

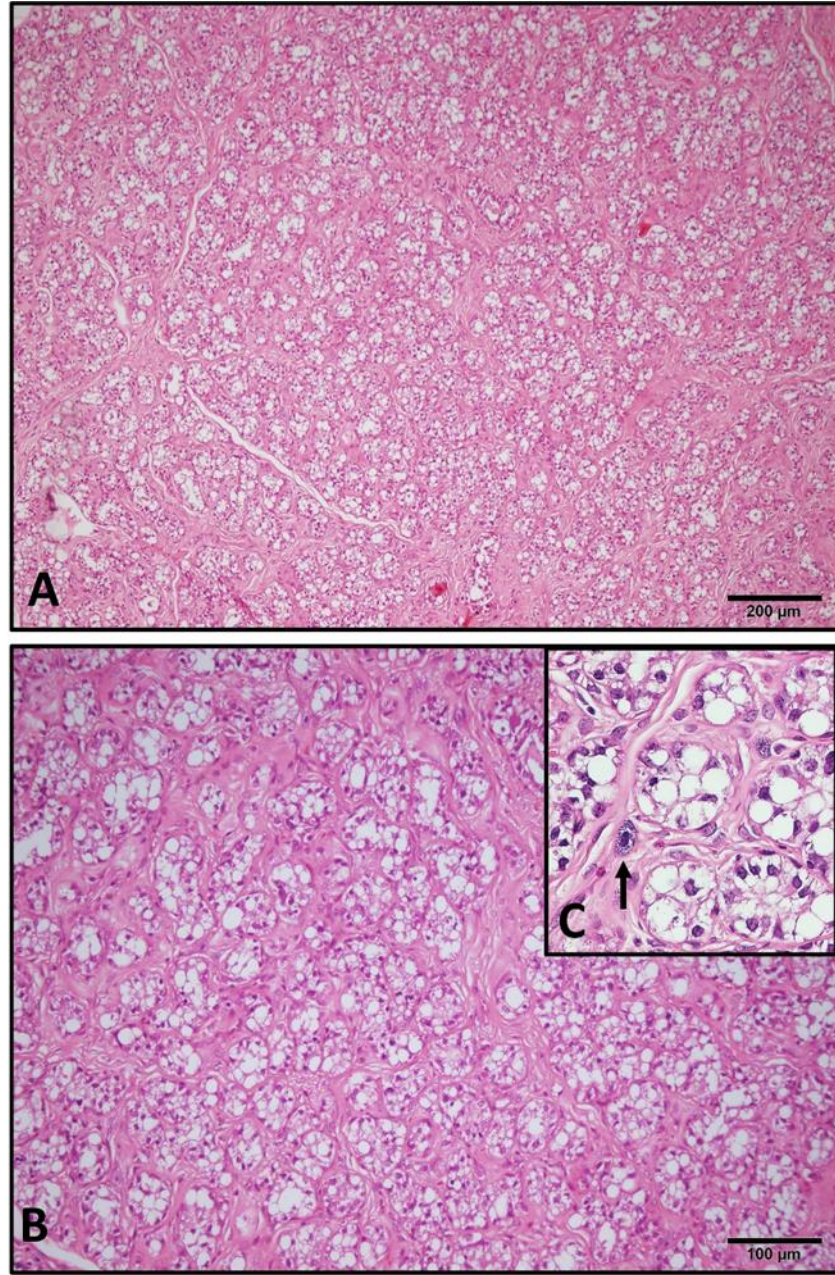
Kontrol sıçan meme dokuları mikroskopik olarak incelendiğinde, çok sayıda beyaz boya almayan sitoplazmaya ve periferite itilmiş bazofilik çekirdeğe sahip yağ hücrelerinin arasında ince bir bağ doku ve meme tubül ve bezleri görülmüştür (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: Sıçan kontrol meme bezi, Hematoksilen-Eozin boyama

Sıçan meme tümörü olgularında, lipidden zengin karsinom tanısı konan 11 adet meme tümörü olgusunda bağ dokudan zengin bir stromaya sahip, proliferen epitel hücreleri ile kaplı tubül ve bezlerden oluşan yapılar gözlenmiştir. Neoplastik epitel hücrelerinin sitoplazma ve çekirdek boyutlarının birbirinden farklı oldukları (anizositozis, anizokaryozis) ve sitoplazmalarının içerisinde boya almayan, çok sayıda, irili ufaklı vakuollerin bulunduğu dikkati çekmiştir. Bu olguların hemen

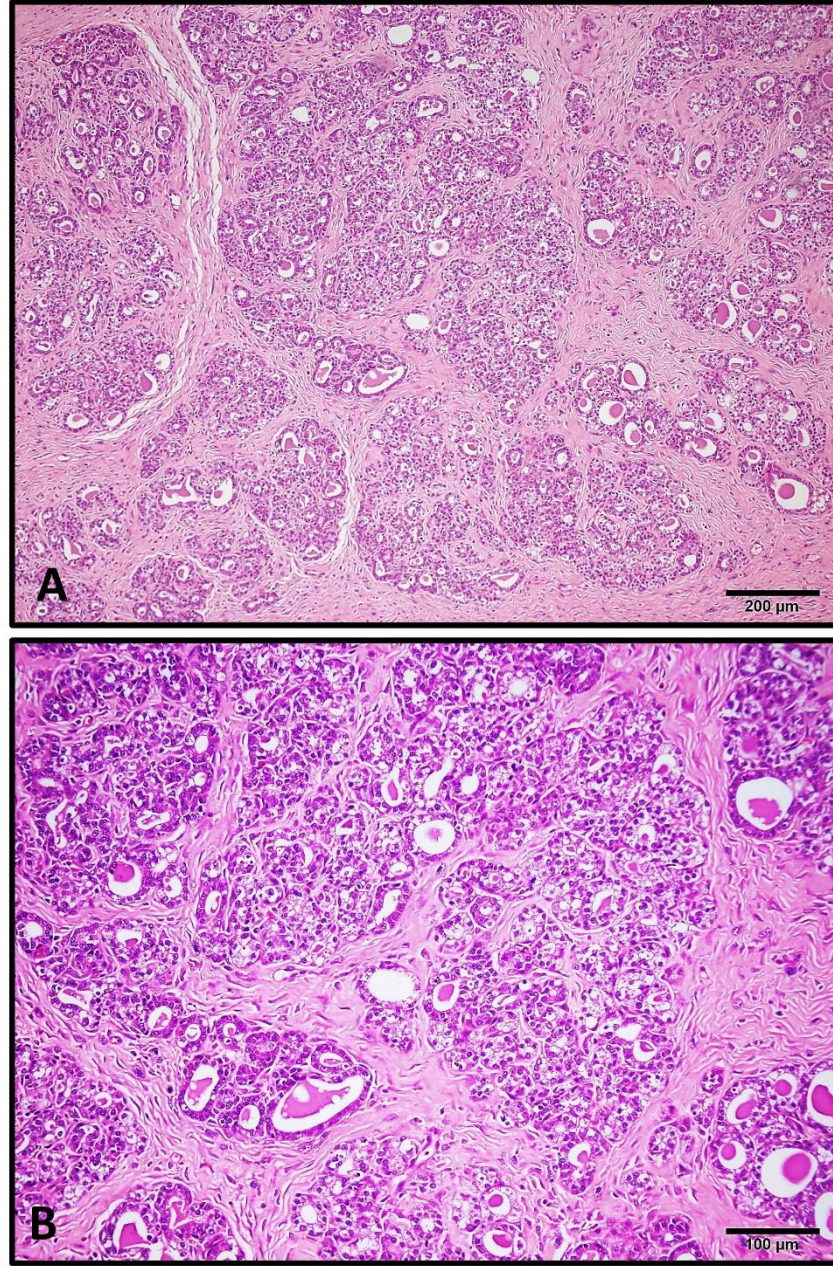
hepsinde mitotik figürlerin ya çok az (40x büyütmede 5 alanda 1-2 adet) ya da hiç bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Neoplastik epitel hücrelerin sitoplazmalarında gözlenen irili-ufaklı yağ vakuolleri, deneysel sıçan meme tümörü modeli, Lipidden zengin karsinom, Hematoksilen-Eozin boyama, **siyah ok:** mast hücresi

Tübüler karsinom tanısı konan 8 adet meme tümörünün bağ dokusundan zengin oldukları görülmüştür. Tübüler yapılar gösteren tümöral epitel hücrelerinin veziküler çekirdeğe sahip oldukları gözlenmiştir. Epitel hücrelerinin sitoplazma ve çekirdek boyutlarının birbirinden farklı oldukları görülmüştür (anizositozis,

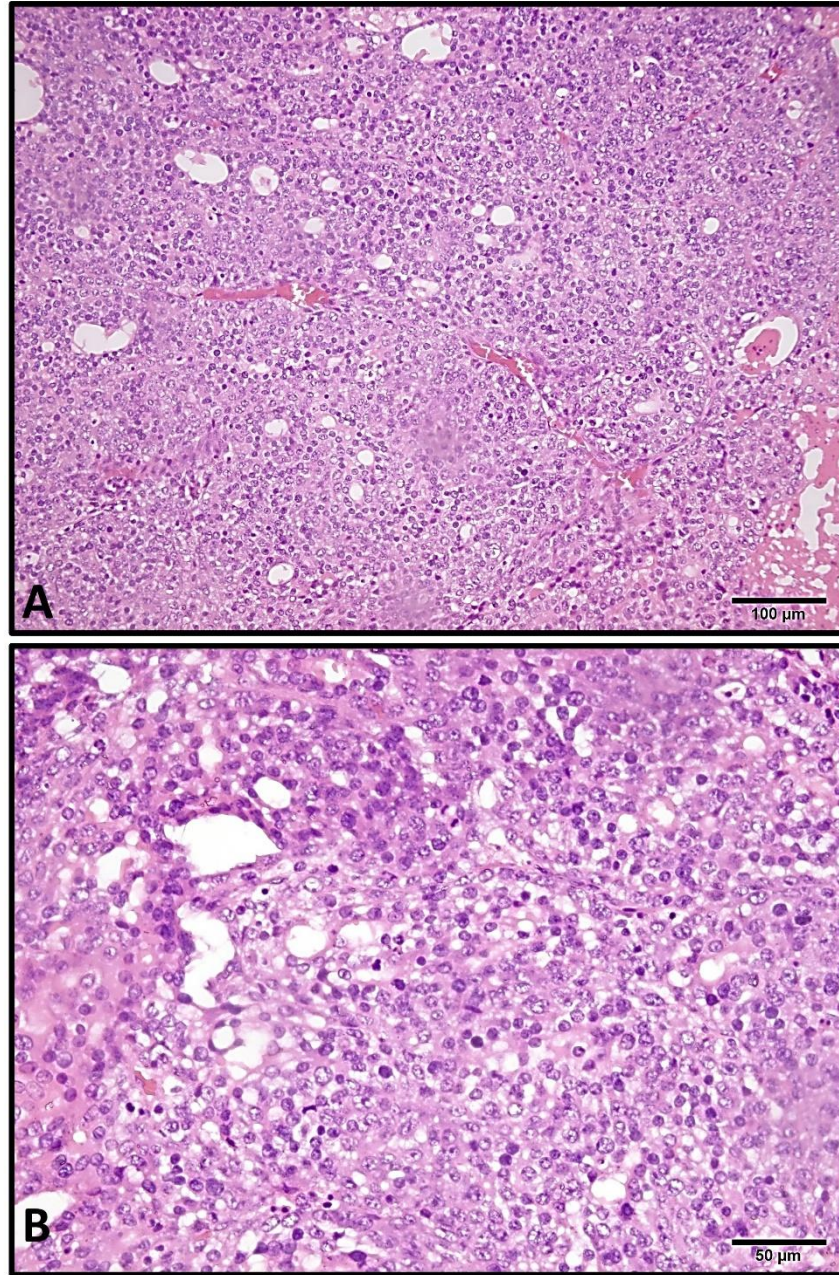
anizokaryozis). Hemen her alanda (40x büyütme) 2-5 adet mitotik figürlere rastlanmıştır (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: Tubüler yapılar oluşturan neoplastik epitel hücreleri, Tubüler karsinom, deneysel sıçan meme tümörü modeli, Hematoksilen-Eozin boyama

Solid karsinom tanısı konan 5 adet sıçan meme tümörü olgusunda neoplastik hücrelerin solid kordonlar şeklinde dizildikleri ve genellikle her yerinde neoplastik hücrelerin görüldüğü dikkati çekmiştir. Bu hücrelerin sitoplazma ve çekirdek boyutları birbirinden farklıydı (anizositozis, anizokaryozis) ve hemen her alanda (40x büyütme)

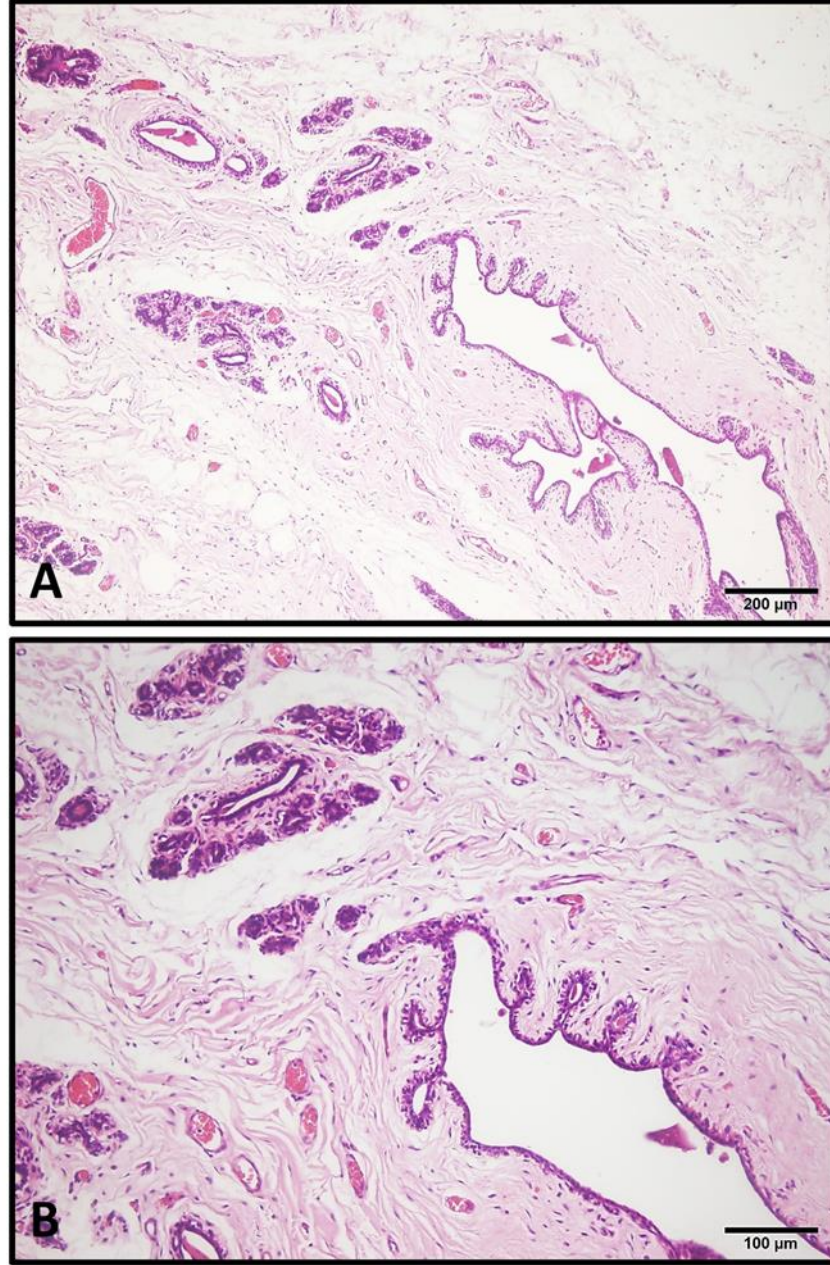
çok sayıda (5-10 arası) mitotik figür sergileyen hücrelere rastlanmıştır. Tümör dokusunun ince bir fibrovasküler stromaya sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: Veziküler çekirdeğe sahip, solid kordonlar şeklinde dizilmiş neoplastik epitel hücreleri ve mitotik figürler, Solid karsinom, deneysel sıçan meme tümörü modeli, Hematoksilen-Eozin boyama

4.3.1.3. Köpek Meme Tümörü Dokularında Histopatolojik Alt Tiplerin Değerlendirilmesi

Köpek kontrol meme dokusu mikroskopik olarak incelendiğinde fibrovasküler bir stromanın içerisinde çok sayıda tek katlı epitel hücrelerinden oluşan tubül ve bez yapıları dikkati çekmiştir (Şekil 4-9).

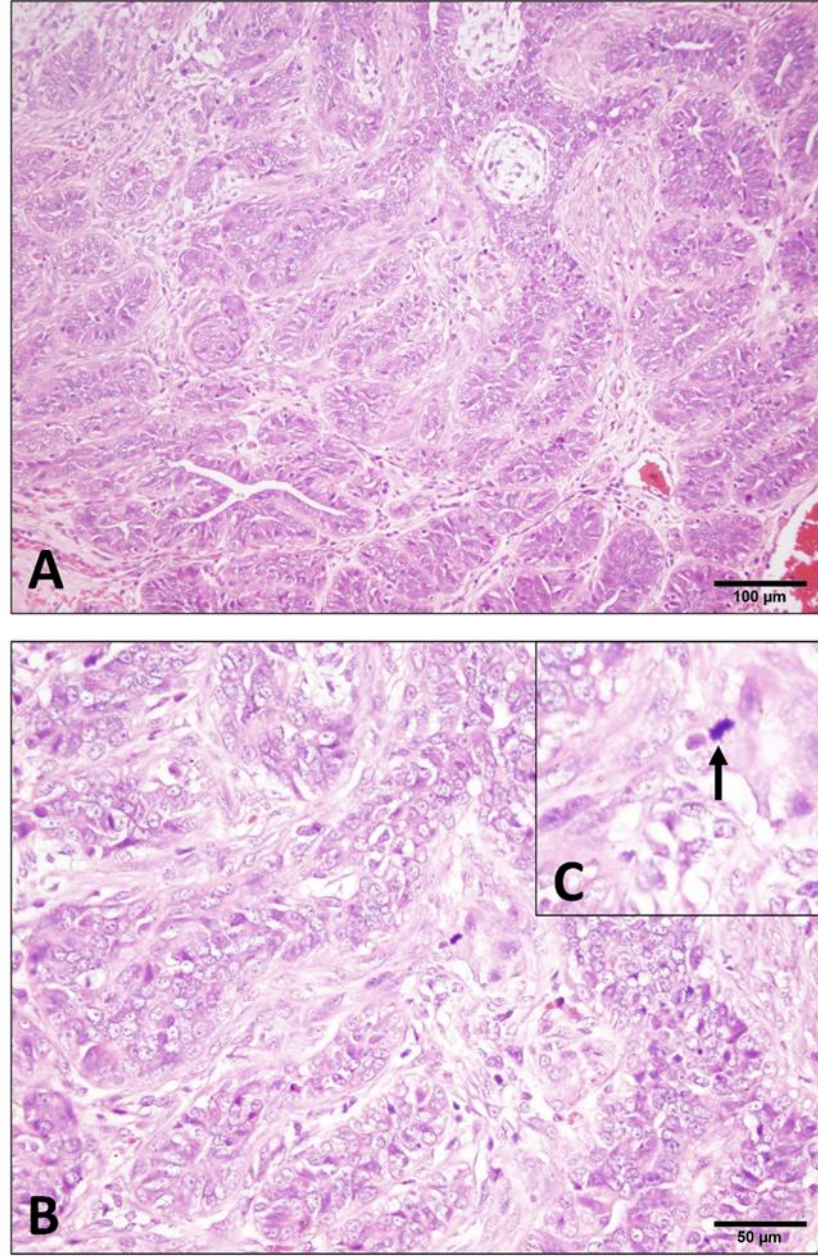


Şekil 4-9: Köpek sağlıklı meme bezine ait histolojik görünüm

Köpeklerden alınan 10 adet tümör dokusunun 5 tanesine tubüler karsinom, 1 tanesine kompleks karsinom, 1 tanesine yassı hücreli karsinom, 1 tanesine malignant

miyoepitelyoma, 1 tanesine malignant mikst tümör ve 1 tanesine tubülopapiller karsinom tanısı konmuştur.

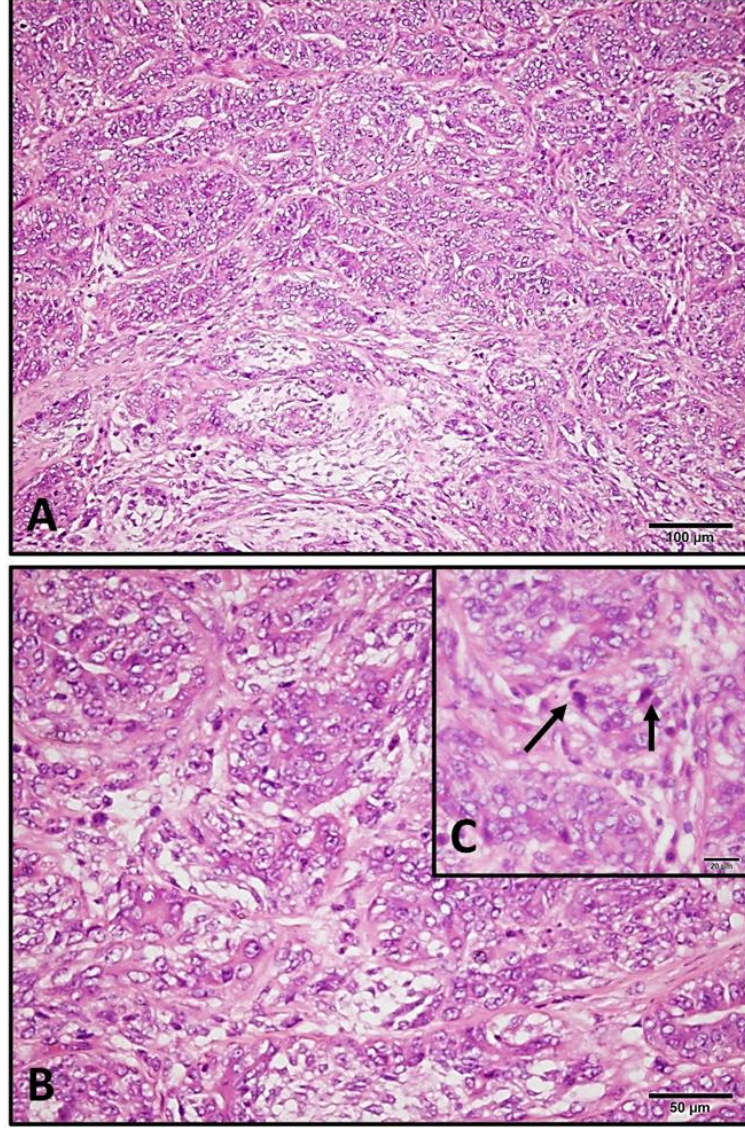
Köpek meme tümörleri H&E boyamada incelendiğinde, tübüler karsinom tanısı konan 5 adet tümörde tubül epitellerinin veziküler çekirdeğe ve eozinofilik sitoplazmaya sahip olduğu dikkati çekmiştir. Tubülleri oluşturan epitel hücrelerinin proliferasyonla dolu ve tek katlı epitel tabakasının yerine epitel hücre proliferasyonları nedeniyle çok katlı bir görünüm aldığı tespit edilmiştir. Epitel hücrelerinin sitoplazma ve çekirdek boyutlarının birbirinden farklı oldukları gözlenmiştir (anizositozis, anizokaryozis). Yüksek büyütmede (40x) hemen her alanda 8-10 adet mitotik figürlere rastlanmıştır (Şekil 4-10).



Şekil 4- 10: Tubül şeklinde yapılar oluşturmuş neoplastik epitel hücreleri, Tubüler karsinom, köpek meme tumörü, Hematoksilen-Eozin boyama

Kompleks karsinom tanısı konan 1 adet köpek meme tumörünün mikroskopik incelemesinde epitel hücrelerinin veziküler çekirdeğe ve belirgin çekirdekçiğe sahip oldukları gözlenmiştir. Bu hücreler arasında sitoplazma ve çekirdek boyutları bakımından belirgin bir farklılık (anizositozis, anizokaryozis) saptanmıştır. Bu tumörde malignant epitelyal üremelerin yanı sıra benign karakterde miyoepitelyal üremeler dikkati çekmiştir. Yüksek büyütmede (40x) hemen her alanda mitotik

figürlere rastlanmıştır. Tümöral dokunun özellikle merkezinde multifokal nekrotik alanlar dikkati çekmiştir (Şekil 4-11).



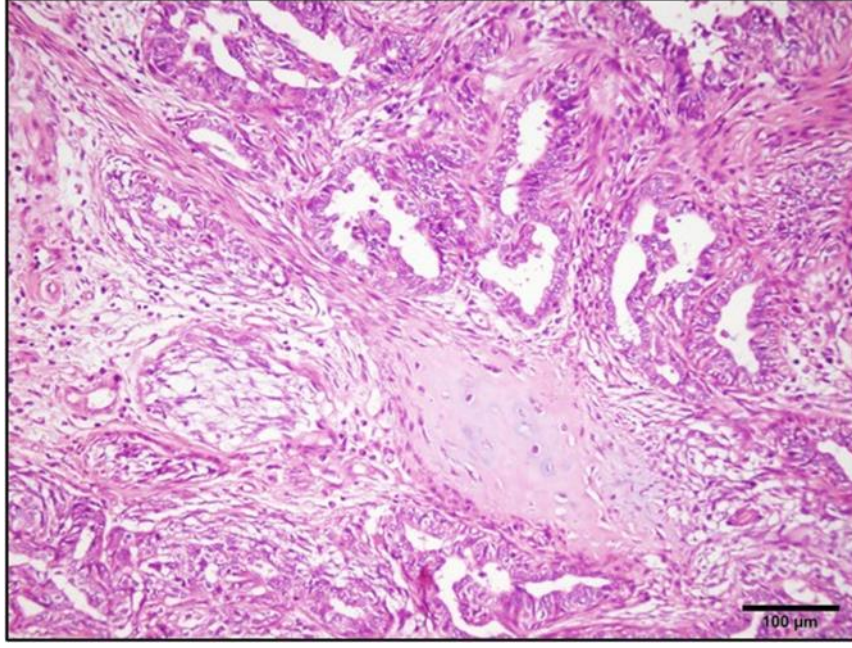
Şekil 4-11: Veziküler çekirdeğe ve belirgin çekirdekçiğe sahip neoplastik epitel hücreleri ve benign miyoepitelyal üremeler, Kompleks karsinom, köpek meme tümörü, Hematoksilen-Eozin boyama, **siyah ok:** mitotik figürler

Yassı hücreli karsinom teşhisi konan 1 adet köpek meme tümörü olgusunun histopatolojik incelemesinde neoplastik epitel hücrelerinin adacıklar oluşturduğu gözlenmiştir. Yer yer multifokal dağılım gösteren ve merkezinde pembe renkte keratin oluşumları gözlenen keratin incilerine rastlanmıştır.

Tübülopapiller karsinom tanısı konan 1 adet köpek meme tümörü mikroskobik olarak incelendiğinde epitel hücrelerinin tubül lümenine doğru parmaklı çıkıntılar oluşturduğu gözlenmiştir. Neoplastik epitel hücrelerinin veziküler bir çekirdeğe ve belirgin çekirdekçiklere sahip oldukları gözlenmiştir. Epitel hücreleri sitoplazma ve çekirdek boyutları yönünden incelendiğinde birbirinden farklı oldukları dikkati çekmiştir (anizositozis, anizokaryozis). Yüksek büyütmede (40x) her alanda çok sayıda mitotik hücelere rastlanmıştır.

Malignant miyoepitelyoma tanısı konan 1 adet köpek meme tümörü dokusunun mikroskobik incelemesinde, Hematoksilen-Eozin boyamada, kitlenin dermiste yerleşik meme bezleri ile bunlar arasında yer alan miyoepitel hücre üremelerinden oluştuğu gözlenmiştir. Bu hücrelerin bazı alanlarda düzenli bazı alanlarda ise düzensiz çoğaldığı, hücre çekirdeklerinin mekik şekilli oldukları, sitoplazma sınırlarının belirgin olmadığı dikkati çekmiştir. Ayrıca, multifokal nekroz alanlarının yanı sıra çok az sayıda mitotik aktiviteye sahip hücelere de rastlanmıştır.

Malignant mikst tümör teşhisi konan 1 adet köpek meme tümörü dokusu incelendiğinde, meme dokusuna ait kitlede meme bez epitellerinin proliferasyonu olduğu, yer yer bez lümenlerine doğru papiller tarzda çıkıntılar yaptığı dikkat çekmiştir. Neoplastik hücrelerin yuvarlak-oval veziküler çekirdeğe ve sınırları yer yer belirgin, yer yer de belirgin olmayan açık renkli sitoplazmaya sahip oldukları tespit edilmiştir. Prolifere olan meme bez epitellerinin yanı sıra miyoepitel hücrelerinde de aşırı proliferasyon görülmüştür. Bir alanda fokal kıkırdak metaplazisi dikkati çekmiştir (Şekil 4-12).

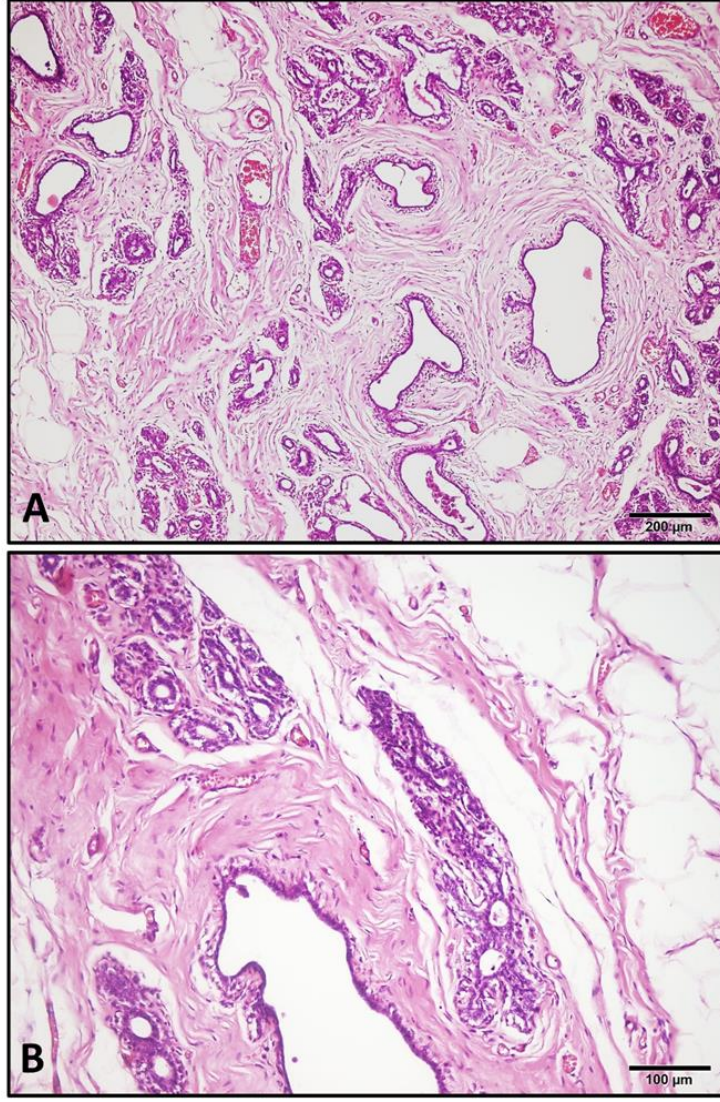


Şekil 4-12: Malignant mikst meme tümörü, Köpek, Hematoksilen-Eozin boyama

Prolifere olan bu hücrelerin çoğunlukla berrak sitoplazmaya sahip oldukları gözlenmiştir. Kitlenin merkezinde geniş koagülasyon nekrozu alanlarına rastlanmıştır. Yer yer bazı alanlarda yangı hücresi (nötrofil, lenfosit ve plazma hücresi) infiltrasyonları dikkati çekmiştir.

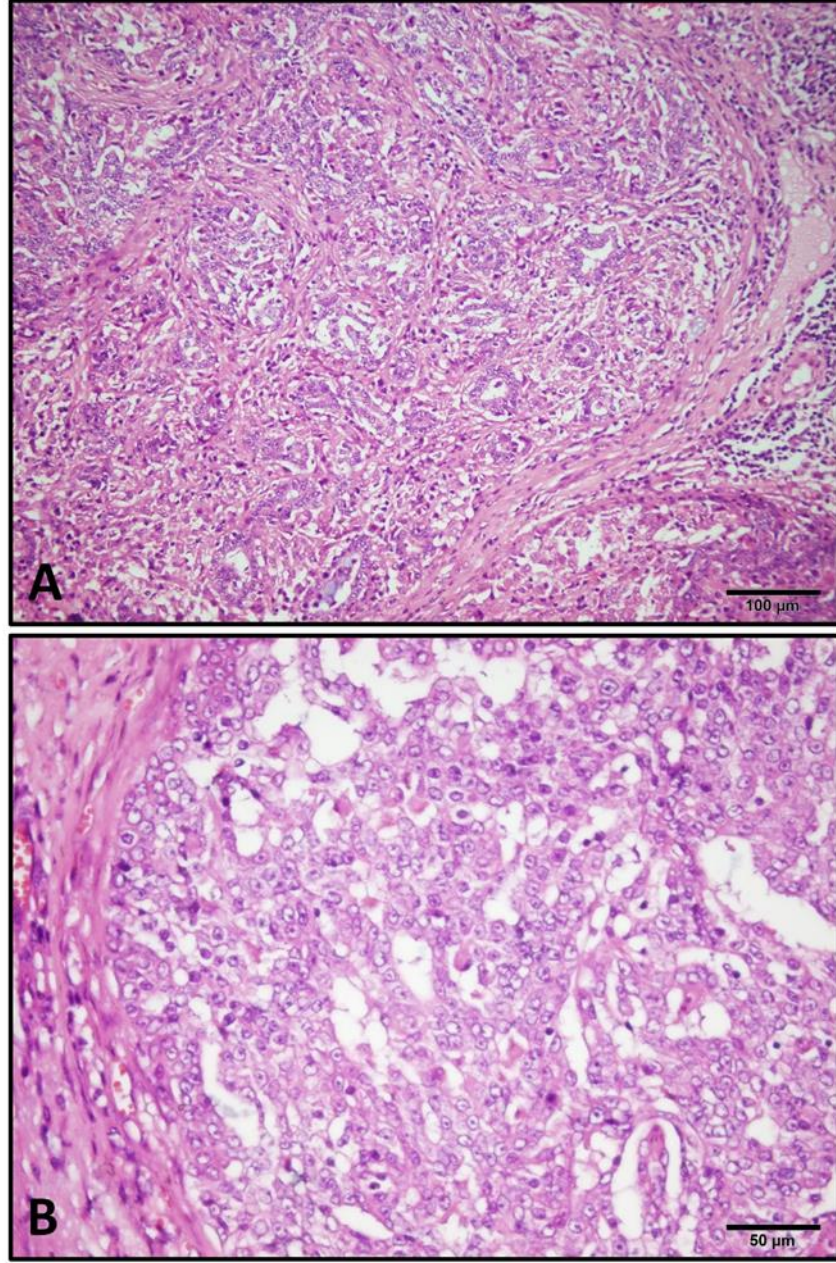
4.3.1.4. Kedi Meme Tümörü Dokularında Histopatolojik Alt Tiplerin Değerlendirilmesi

Kedi kontrol meme dokusu mikroskopik olarak incelendiğinde fibrovasküler bir stromanın içerisinde çok sayıda tek katlı epitel hücrelerinden oluşan tubül ve bez yapıları dikkati çekmiştir (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: Kedi sağlıklı meme bezinin histolojik görünümü

Kedilerden elde edilen 10 adet meme tümörü dokusunun 4 tanesinde epitel hücrelerinde üremelerin olduğu ve bu hücrelerin tubüler tarzda oluşumlar gösterdikleri dikkati çekmiştir. Hücre çekirdeklerinin yer yer koyu, yer yer veziküler olduğu gözlenmiştir. Neoplastik epitel hücre sitoplazma ve çekirdek boyutlarının birbirinden farklı olduğu dikkati çekmiştir (anizositozis, anizokaryozis). Yüksek büyütmede her sahada çok sayıda mitotik aktivite gösteren hücrelere rastlanmıştır. Bu bulgular ışığında 4 adet meme tümörü dokusuna tübüler karsinom tanısı konmuştur (Şekil 4-14).

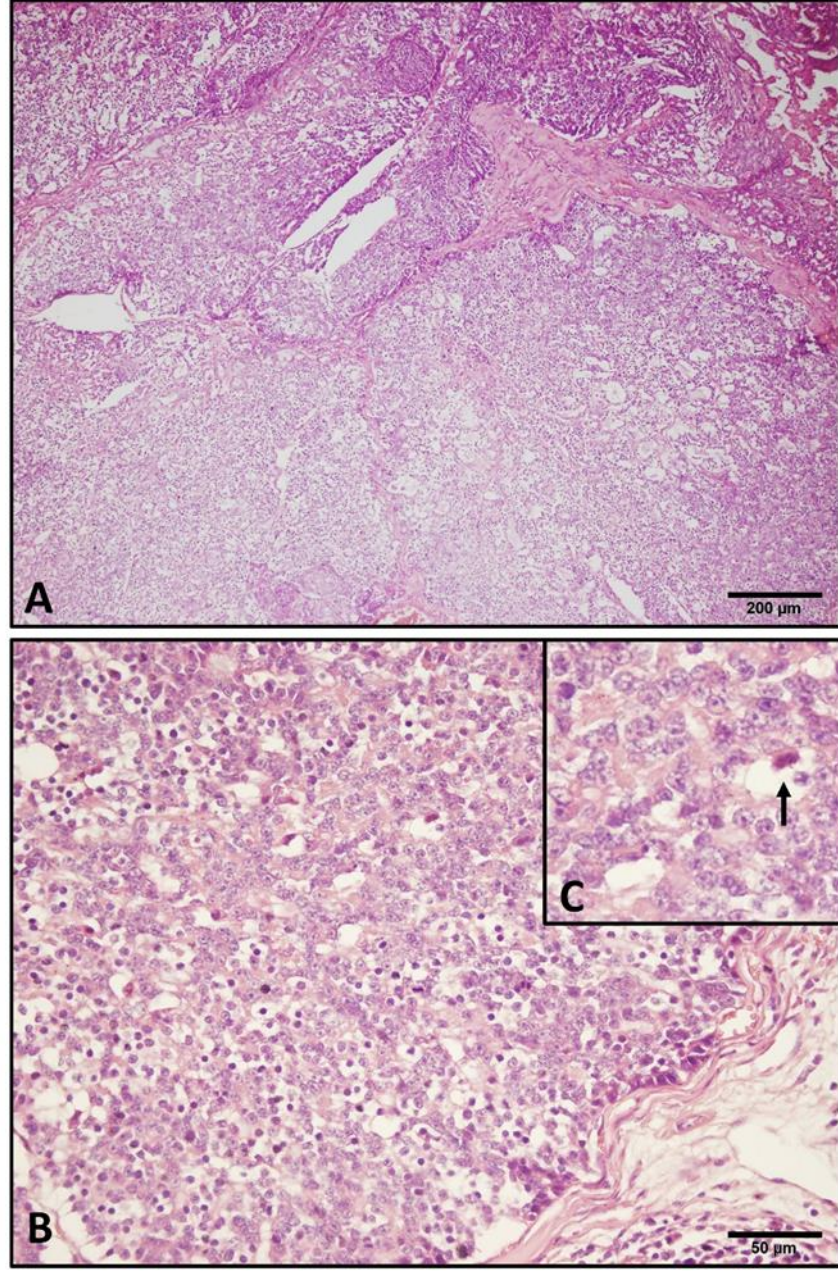


Şekil 4-14: Veziküler çekirdeğe sahip neoplastik epitel hücrelerinin tubül benzeri yapılar oluşturması, Tubüler karsinom, Kedi meme tümörü, Hematoksilen-Eozin boyama

Tubülopapiller karsinom tanısı konulan 3 adet meme tümörü dokusunun mikroskopik incelemesinde deri altında yerleşim gösteren kitlenin kübik epitellerin oluşturduğu tubüllerden meydana geldiği gözlenmiştir. Yer yer tubüllerin içinde papiller tarzda üremeler dikkati çekmiştir. Fibröz doku içine invazyon gösteren neoplastik hücrelere rastlanmıştır. Kitlenin merkezinde geniş nekrotik alanların varlığı dikkati çekmiştir. Neoplastik hücre çekirdeklerinin yuvarlak, hiperkromatik özellikte

olup belirgin anizokaryozis gösterdikleri tespit edilmiştir. Yer yer mitotik figürlere rastlanmıştır.

Solid karsinom tanısı konulan 2 adet meme tümörü dokusu incelendiğinde, genel olarak yuvarlak-oval şekilli, bazofilik boyanan merkezi çekirdeğe sahip, belirgin sitoplazması olan hücreler gözlenmiştir. Bu hücrelerin yer yer kümeler halinde bez benzeri yapılar oluşturduğu, bu bez benzeri yapıların bazı alanlarda düzenli, çoğu alanda ise düzensiz hücre kümelerinden oluştuğu saptanmıştır. Bazı hücre çekirdeklerinin iri ve çekirdekçiklerinin belirgin olduğu tespit edilmiştir. Hücre (anizositozis) ve çekirdek (anizokaryozis) boyutlarının birbirinden farklı olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4-15).



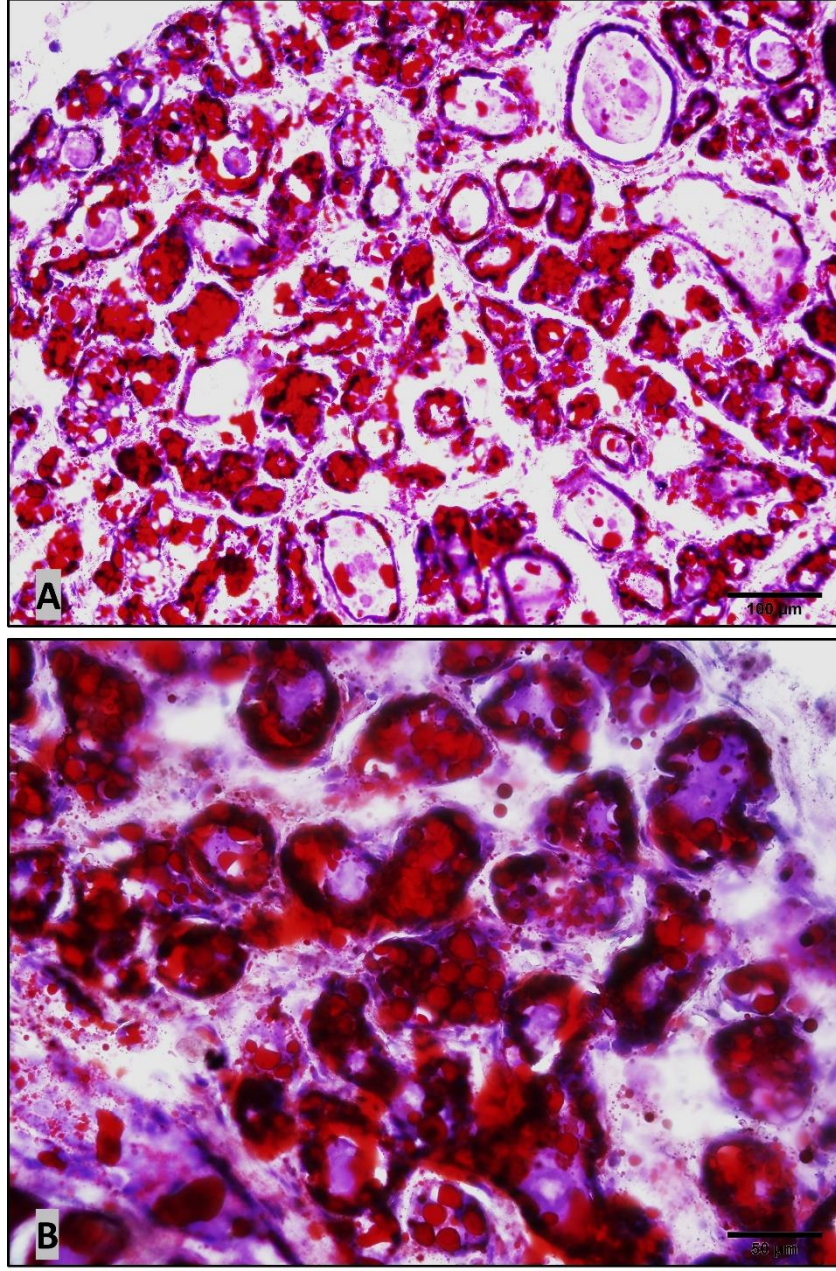
Şekil 4-15: Veziküler çekirdeğe ve belirgin çekirdekçiğe sahip solid kordonlar şeklinde dizilen neoplastik epitel hücreleri, Solid karsinom, Kedi meme tümörü, Hematoksilen-Eozin boyama

Kedi meme tümörü olgularından kistik karsinom tanısı konan olgunun mikroskopik incelemesinde, meme bez epitellerinin ürettiği, yer yer lümen içerisine doğru papiller çıkıntılar yaptığı ve geniş kistik bir yapının gelişmiş olduğu gözlenmiştir. Epitel hücrelerinin yuvarlak-oval şekilli, veziküler çekirdeğe, az miktarda sitoplazmaya sahip oldukları, çekirdekteki kromatinin dağınık olduğu ve bazı

çekirdekler içerisinde belirgin çekirdekçiklerin yer aldığı görülmüştür. Neoplastik epitel hücreleri arasında belirgin anizositozis ve anizokaryozise rastlanmıştır.

4.3.2. Oil-Red-O Boyama

Lipidden zengin karsinomdan şüphelenilen ve teşhis için oil-red-o boyamaları gerçekleştirilen 11 adet sıçan meme tümörü olgusunda yapılan boyama sonucunda epitel hücrelerinin sitoplazmalarında kırmızı renkte boyanma özelliği gösteren irili-ufaklı çok sayıda yağ vakuollerinin varlıkları dikkati çekmiştir. Hematoksilen-eozin, oil-red-O boyama (Şekil 4-16) ve immunohistokimyasal olarak boyanan PCNA dikkate alındığında bu tümör dokularına lipidden zengin karsinom tanısı konulmuştur.

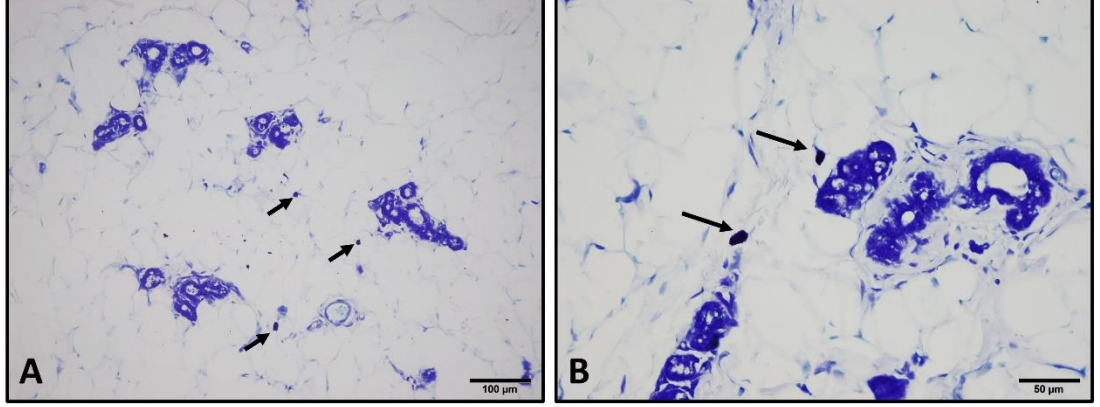


Şekil 4-16: Lipidden zengin karsinom. Neoplastik hücrelerin sitoplazmasında gözlenen çok sayıda irili ufaklı kırmızı renkte lipid vakuolleri, Deneyisel sıçan meme tümörü modeli, oil-red-O

4.3.3. Toluidin Blue Boyama ile Mast Hücrelerinin Tümör Dokusundaki Değerlendirmeleri

Mast hücrelerinin metakromazi özelliğinden yararlanarak mast hücrelerinin sayılarını belirlemek, granüle ve degranüle mast hücre sayılarını tespit etmek ve mast hücrelerini intratümöral, peritümöral olarak ayırarak tümöral yerleşimini ortaya

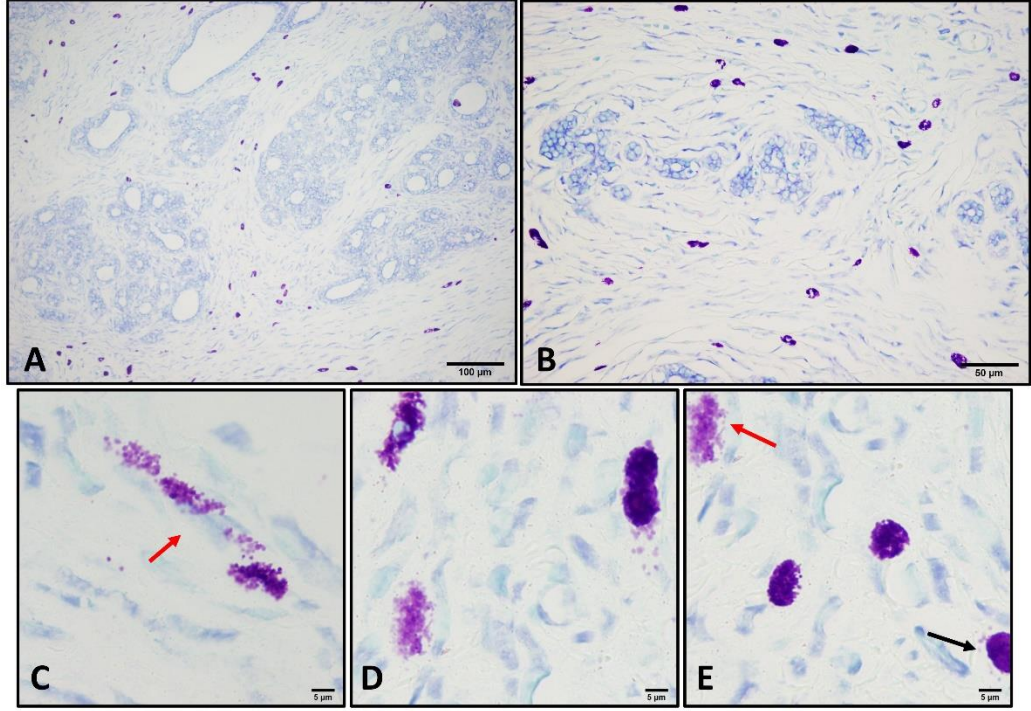
koyamak amacıyla tüm tümör dokuları ve kontrol amacıyla sağlıklı meme dokuları Toluidin Blue ile boyanmıştır (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: Sıçan kontrol meme bezinde mast hücrelerinin gösterilmesi, Toluidin Blue boyama, **siyah ok:** Toluidin Blue ile boyanan mast hücreleri

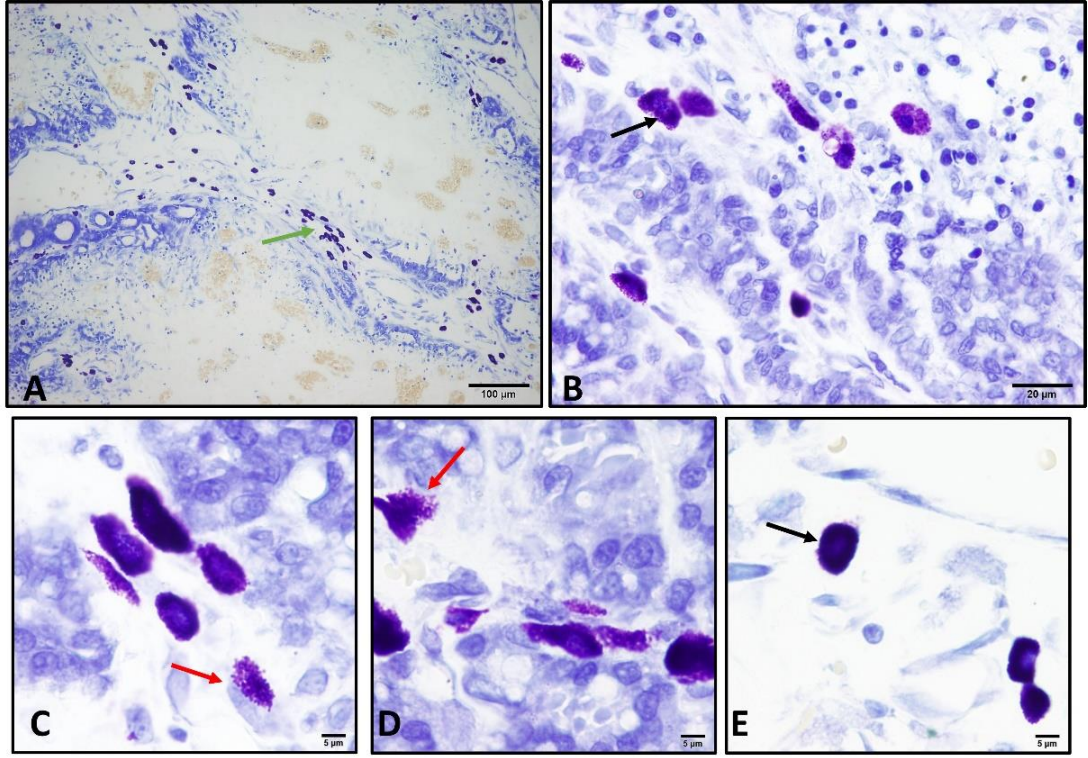
4.3.3.1. Deneyisel Olarak Oluşturulan Sıçan Meme Tümörlerinde Toluidin Blue Boyama ile Mast Hücrelerinin Değerlendirilmesi

Sıçan gruplarında G grubu olarak adlandırılan, sadece gavaj ile oral yolla DMBA verilen grupta, 20 x büyütmede 10 alan sayıldığında ortalama mast hücre sayısı 19,2 olarak bulunmuştur. G grubunda intratümöral olarak gözlenen ortalama mast hücre sayısı 15,25, peritümöral mast hücre sayısı 3,97 olarak hesaplanmıştır. Bu grupta degranüle olmuş mast hücre sayısı 14,54, granüle mast hücre sayısı başına 4,68 olarak sayılmıştır (Şekil 4-18).



Şekil 4-18: G grubu sıçan meme tümöründe mast hücrelerinin tespiti, Toluidin Blue boyama, **kırmızı oklar:** degranüle mast hücresi, **siyah ok:** granüle mast hücresi

DMBA ile beraber progesteron enjeksiyonu yapılan E grubunda ise ortalama toplam mast hücre sayısı yine 200x büyütmede 10 alanda 19,02 adet bulunmuştur. E grubunda intratümöral yerleşim gösteren mast hücre sayısı 15,11 iken ortalama peritümöral mast hücre sayısı 3,91 olarak hesaplanmıştır. Bu grupta degranüle mast hücre sayısı 13,93, granüle mast hücre sayısı 5,09 olarak sayılmıştır (Şekil 4-19).



Şekil 4-19: E grubu sıçan meme tümöründe mast hücrelerinin Toluidin Blue boyama ile gösterimi, **(A)** Peritümöral mast hücreleri, **(B)** İntratümöral mast hücreleri, **(C-D)** İntratümöral granüle ve degranüle mast hücreleri, **(E)** peritümöral granüle mast hücreleri, **yeşil ok:** peritümöral mast hücreleri, **kırmızı ok:** intratümöral degranüle mast hücreleri, **siyah ok:** peritümöral granüle mast hücreleri

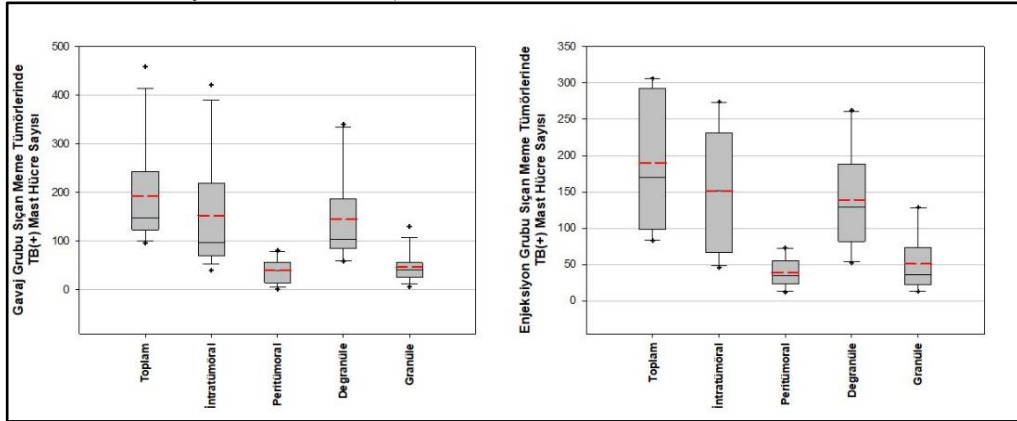
Kontrol sıçan memesinde ise ortalama mast hücre sayısı 10 alanda 200x büyütmede sayıldığında 3,82 olarak bulunmuştur. Bu grubun degranüle mast hücre sayısı ortalama 1,28, granüle mast hücre sayısı ortalama 2,54 olarak sayılmıştır. G grubu sıçan meme tümörleri ile kontrol grubu sağlıklı sıçan meme dokusu toplam mast hücre sayısı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,001$). E grubu sıçan meme tümörü dokusu ile kontrol grubu sıçan sağlıklı meme dokusu arasındaki toplam mast hücre sayısı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,001$). G grubu ile E grubu toplam mast hücre sayısı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,931$).

G grubu sıçan meme tümörlerinde ortalama degranüle mast hücre sayısı ile kontrol meme dokusunda ortalama degranüle mast hücre sayısı karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0,001$). E grubu sıçan meme tümörleri ile sıçan kontrol meme dokusunda bulunan ortalama degranüle mast hücre sayısı karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,001$). G grubu

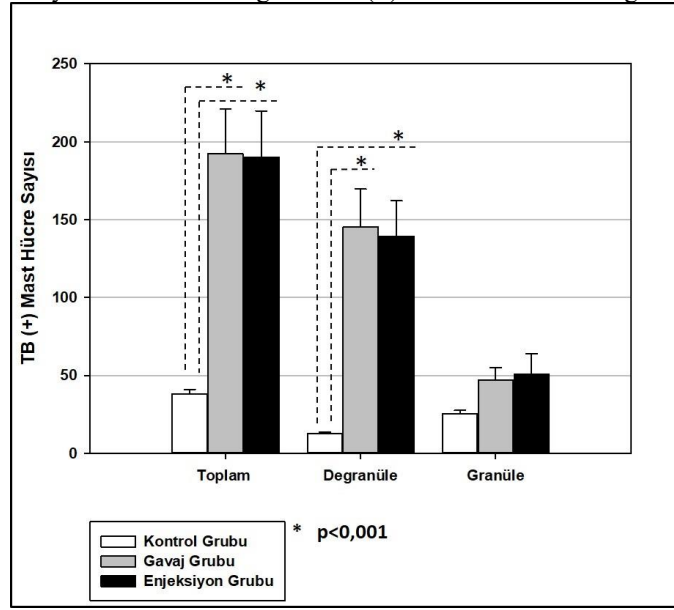
ile E grubu ortalama degranüle mast hücre sayısı bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,841$).

G grubu ile kontrol sıçan meme dokuları granüle mast hücre sayısı açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında bu iki grup arasında anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır ($p: 0,070$). E grubu ile kontrol sıçan meme dokuları ortalama granüle mast hücre sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p: 0,206$). G ve E grubu meme tümörleri arasında ortalama granüle mast hücre sayıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,796$). Kontrol meme dokusu, G grubu ve E grubu arasındaki toplam mast hücre sayısı, degranüle mast hücre sayısı ve granüle mast hücre sayısı istatistik grafikleri Grafik 4-2’de verilmiştir.

Grafik 4-1: Deneysel sıçan meme tümörü modeli Gavaj ve Enjeksiyon grubunda TB (+) mast hücrelerinin dağılım grafiği (**siyah düz çizgi:** medyan, **kırmızı kesik çizgi:** ortalama değer, + ile gösterilen değerler grubun en düşük ve en yüksek değerini vermektedir. Grafikteki değerler 10 alanda toplam mast hücre sayısını vermektedir.)

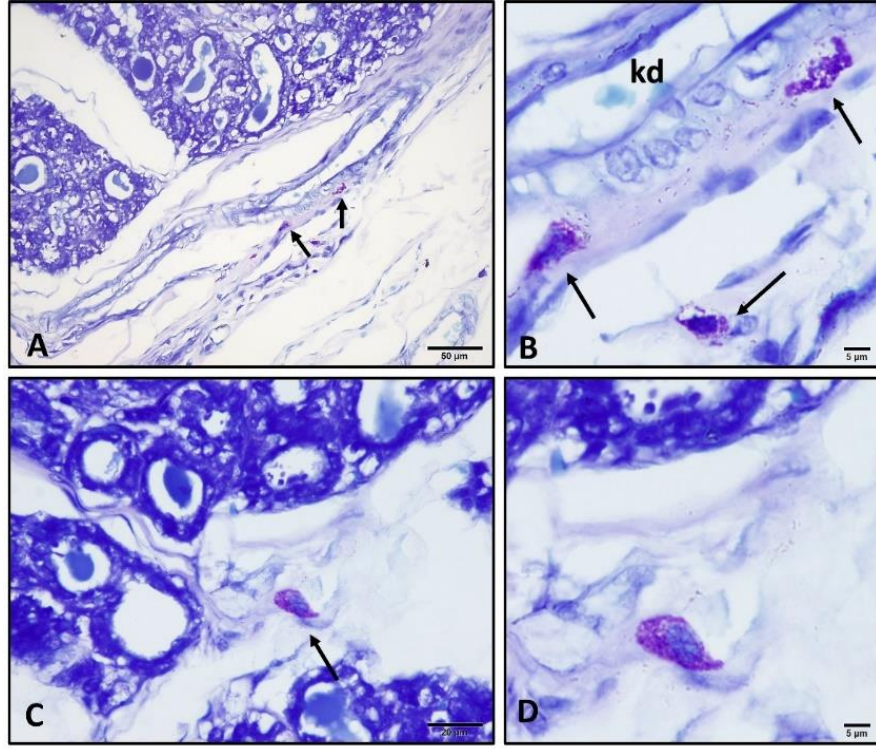


Grafik 4-2: Sıçan deneysel meme tümörü grubu TB (+) mast hücre istatistik grafiği

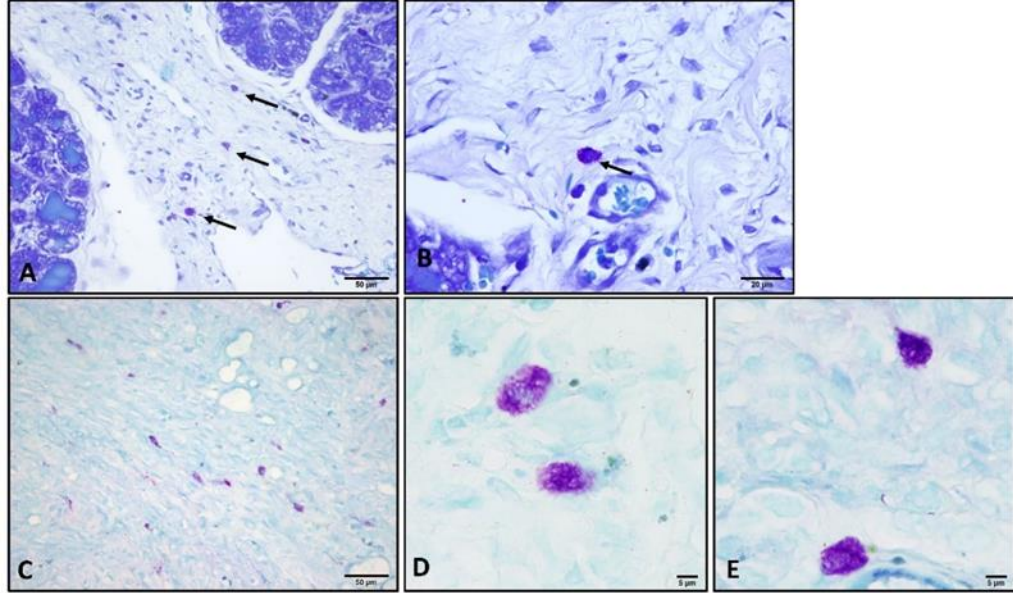


4.3.3.2. Köpek Meme Tümörlerinde Toluidin Blue Boyama ile Mast Hücrelerinin Değerlendirilmesi

Köpek meme tümörü dokularına uygulanan Toluidin blue boyamaları sonucuna göre, 200x büyütmede toplam 10 alan sayılarak yapılan sayımlarda kontrol meme dokularında ortalama toplam mast hücre sayısı 2,58, köpek meme tümörü dokularında 15,46 olarak hesaplanmıştır. Kontrol meme dokularında bulunan toplam mast hücre sayısının ortalama 1,6 tanesi granüle iken ortalama 0,98 tanesi degranüle olarak sayılmıştır. Köpek meme tümörü dokularında ortalama 4,48 adet granüle mast hücresi, ortalama 11,34 adet degranüle mast hücre sayısı gözlenmiştir. Ayrıca meme tümörü dokularında gözlenen mast hücrelerinin ortalama 9,87 tanesi intratümöral alanda gözlenmiş, ortalama 5,95 tanesi peritümöral alanda gözlenmiştir (Şekil 4-20 ve Şekil 4-21) (Grafik 4-3).



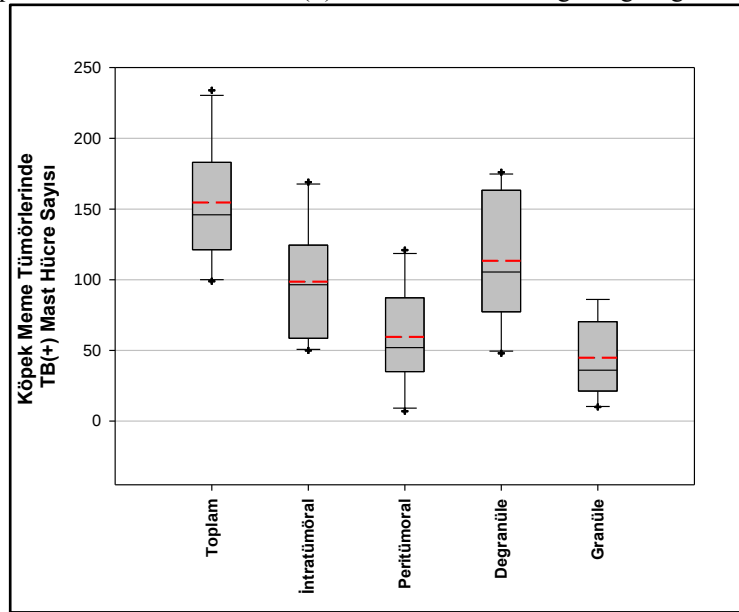
Şekil 4- 20: Kontrol meme dokusunda Toluidin Blue boyanan mast hücrelerinin mikroskopik görünümü, (A-B) Mast hücrelerinin kan damarı ile yakın ilişkisi, **kd:** kan damarı



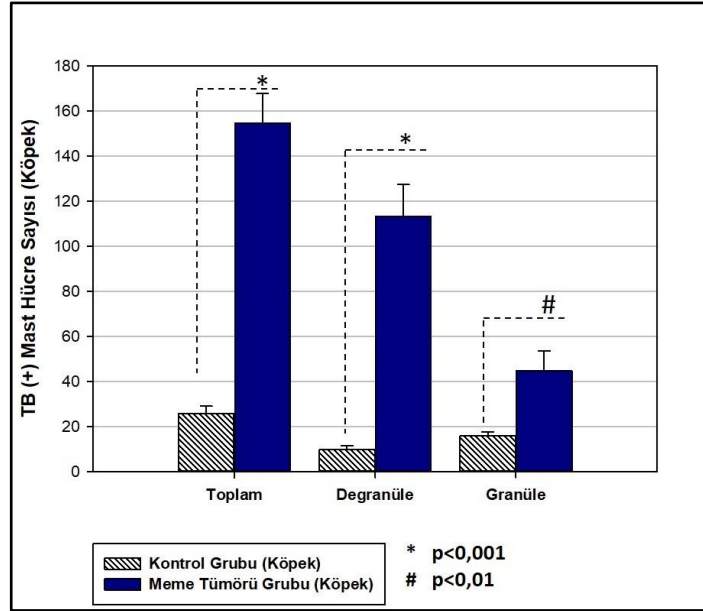
Şekil 4-21: Köpek meme tümörü dokularında ile mast hücrelerinin gösterilmesi, Toluidin Blue boyama (A) Stromada mast hücrelerinin yerleşimi, (B) Kan damarı etrafında yerleşim gösteren peritümöral mast hücreleri, (C-E) Köpek meme tümörlerinde mast hücrelerinin Toluidin Blue boyama ile gösterilmesi, (D) İntratümöral degranüle mast hücreleri, (E) Kan damarı etrafında peritümöral mast hücrelerinin gösterilmesi, **siyah ok:** Toluidin Blue boyanan mast hücreleri

Köpek meme tümörü dokuları ile köpek kontrol meme dokusu arasında 5,99 kat artış gözlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Ortalama granüle mast hücre sayısı kontrol köpek meme dokusu ile köpek meme tümörleri arasında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmıştır ve 2,8 kat arttığı gözlenmiştir ($p: 0,009$). Köpek kontrol meme dokusu ile meme tümörü dokuları karşılaştırıldığında degranüle mast hücre sayısı kontrol grubuna göre köpek meme tümörü grubunda 11,57 kat arttığı gözlenmiş ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,001$) (Grafik 4-4). Köpek meme tümörleri dokusunda intratümöral mast hücreleri ile degranüle mast hücreleri arasındaki ilişki incelendiğinde aralarında yüksek pozitif korelasyon gözlenmiştir ve bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p:0,007$, $r: 787$) (Grafik 4-5).

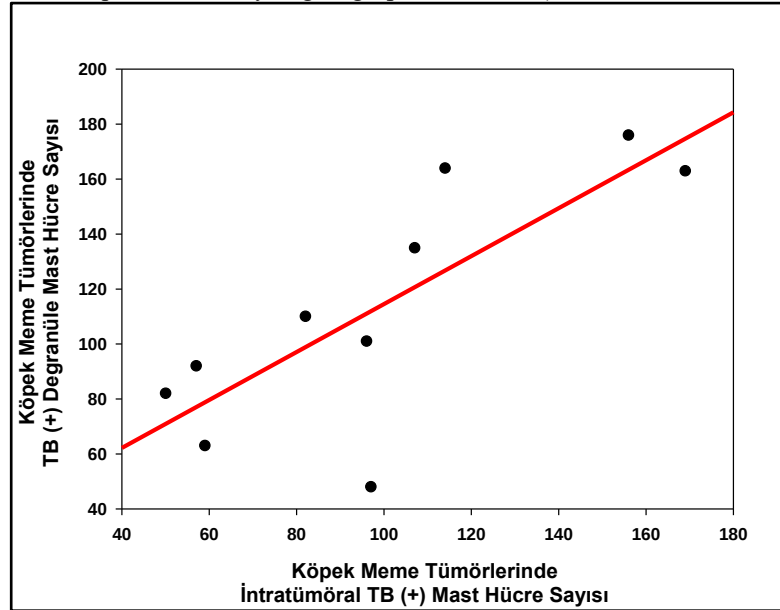
Grafik 4-3: Köpek meme tümörlerinde TB (+) mast hücrelerinin dağılım grafiği



Grafik 4-4: Köpek meme tümörü olgularında TB (+) pozitif mast hücrelerinin istatistik grafiği (Grafikteki değerler 10 alandaki toplam mast sayıları olarak verilmiştir)



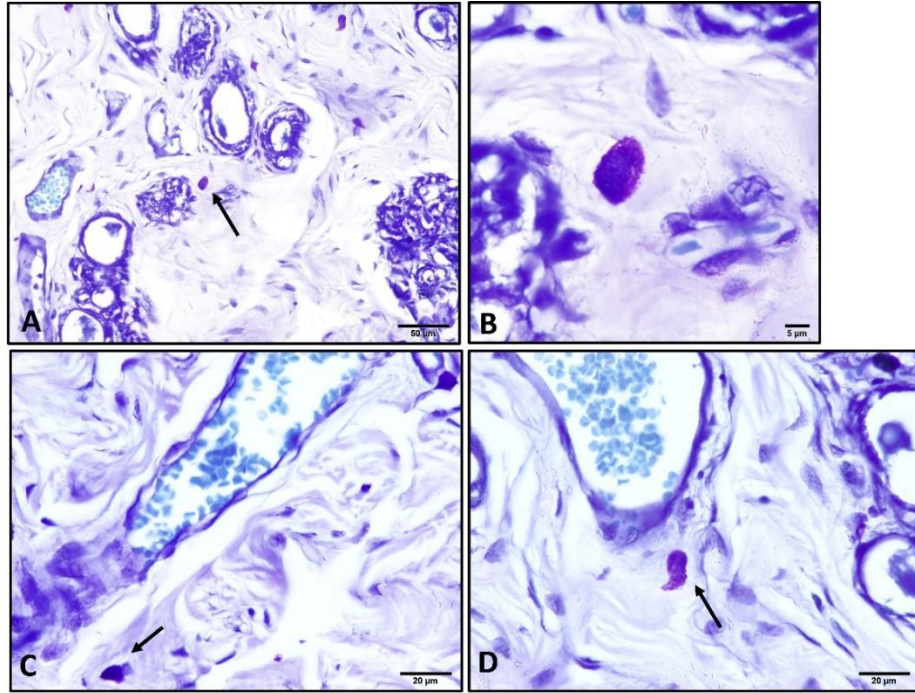
Grafik 4-5: Köpek meme tümörlerinde intratümöral TB (+) mast hücre sayısı ile degranüle TB (+) mast hücre sayısı arasındaki pozitif korelasyon grafiği ($p:0,007$; $r:787$)



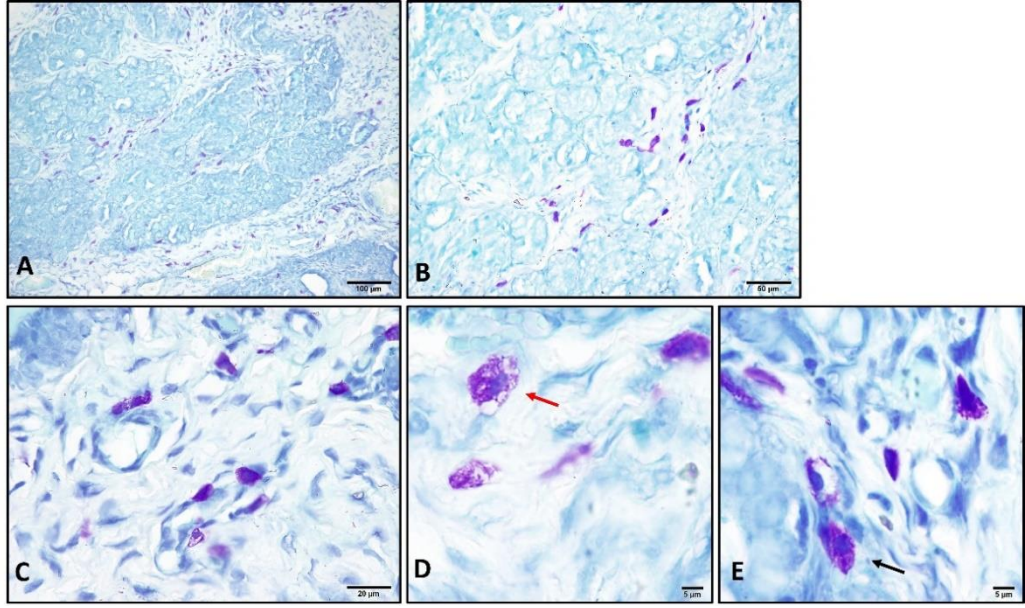
4.3.3.3. Kedi Meme Tümörlerinde Toluidin Blue Boyama ile Mast Hücrelerinin Değerlendirilmesi

Kedi meme tümörü dokularına uygulanan Toluidin blue boyamaları sonucuna göre, 200x büyütmede toplam 10 alan sayılarak bulunan ortalama toplam mast hücre sayısı kedi kontrol meme dokusunda 1,46 iken kedi meme tümörü dokularında bu sayı

ortalama 19,72 olarak hesaplanmıştır. Kontrol dokularında bulunan mast hücre sayısının ortalama 0,46 tanesi degranüle iken kedi meme tümörlerinde degranüle mast hücre sayısı ortalama 14,87 olarak bulunmuştur. Granüle mast hücre sayısı kontrol meme dokularında ortalama 1, kedi meme tümörü dokularında ortalama 4,85 olarak sayılmıştır. Ayrıca meme tümörü dokularında gözlenen mast hücrelerinin ortalama 13,48 tanesi intratümöral yerleşim gösterirken ortalama 6,24 tanesi peritümöral alanda yerleşim göstermiştir (Şekil 4-22). Kedi kontrol meme dokusu ile kedi meme tümörleri arasında toplam mast hücre sayısı karşılaştırıldığında 13,5 kat bir artış gözlenmiştir ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$) (Şekil 4-23). Ortalama granüle mast hücre sayıları kedi kontrol dokuları ile karşılaştırıldığında meme tümörü dokularında 4,85 kat bir artış bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p<0,001$). Kedi meme tümörlerinde degranüle mast hücre sayısı kontrol meme dokusuna göre 32,32 kat artış göstermiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$) (Grafik 4-6). Kedi meme tümörleri dokusunda intratümöral mast hücreleri ile degranüle mast hücreleri arasındaki ilişki incelendiğinde aralarında yüksek pozitif korelasyon gözlenmiştir ve bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$, $r: 965$) (Grafik 4-7).

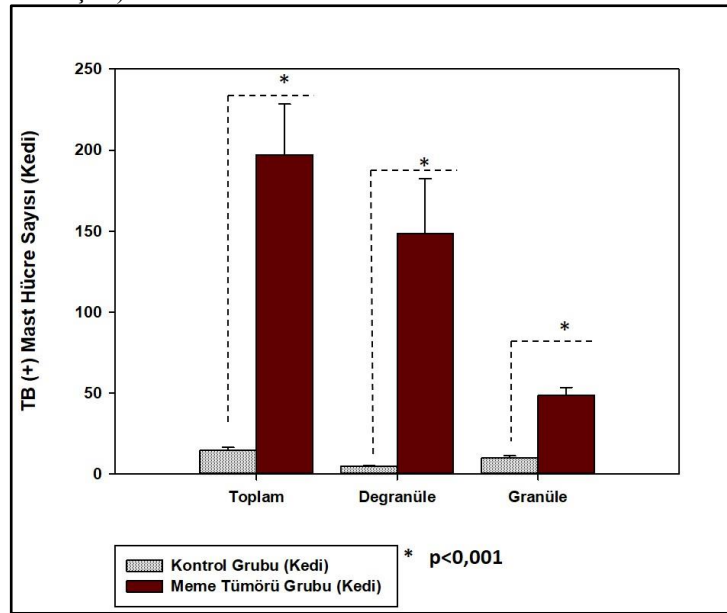


Şekil 4-22: Kedi kontrol meme dokusunda mast hücrelerinin farklı büyütmelerdeki gösterimi, **siyah ok:** Toluidin Blue ile boyanan mast hücreleri

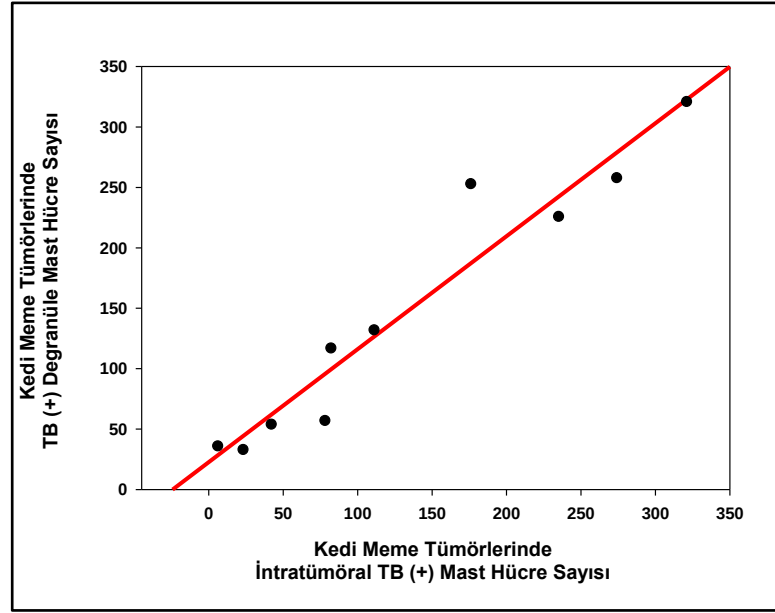


Şekil 4-23: Kedi meme tümöründe mast hücrelerinin Toluidin Blue ile gösterimi, (A) İntratümöral mast hücreleri, (B) İntratümöral mast hücrelerinin 40x büyütmedeki görünümü, (C) Kan damarı etrafında ve stromada peritümöral mast hücrelerinin gösterimi, (D) İntratümöral degranüle mast hücreleri, (E) Granüle mast hücresi, **kırmızı ok:** degranüle mast hücresi, **siyah ok:** granüle mast hücresi

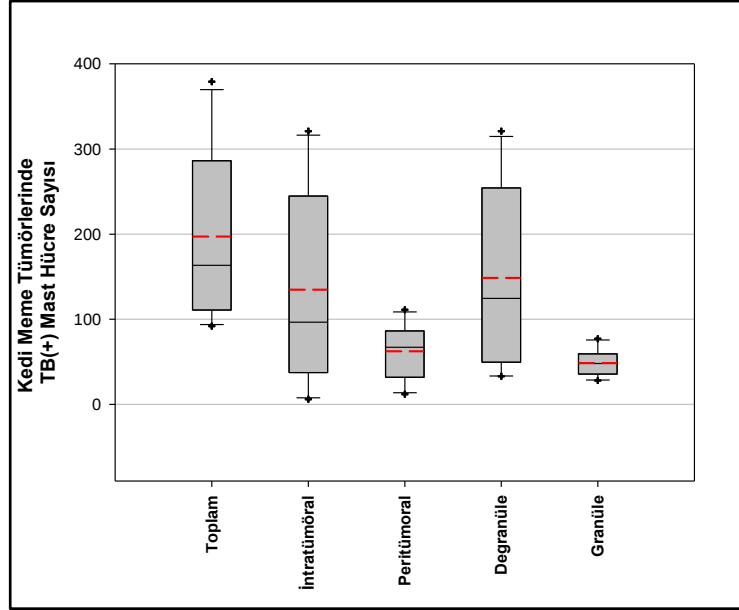
Grafik 4-6: Kedi meme tümörlerinde TB (+) mast hücre sayılarının kontrol meme dokusundaki TB (+) mast hücre sayılarına göre istatistiksel grafiğinin görünümü. (Grafikte verilen değerler 10 alanın toplam değerleri olarak verilmiştir.)



Grafik 4-7: Kedi meme tümörlerinde TB (+) intratümöral mast hücre sayısı ile degranüle TB (+) mast hücre sayısı korelasyon grafiği ($p<0,001$; $r: 965$)



Grafik 4-8: Kedi meme tümörlerinde TB (+) mast hücre sayısının dağılım grafiği (Veriler 10 alan toplamı olarak verilmiştir)



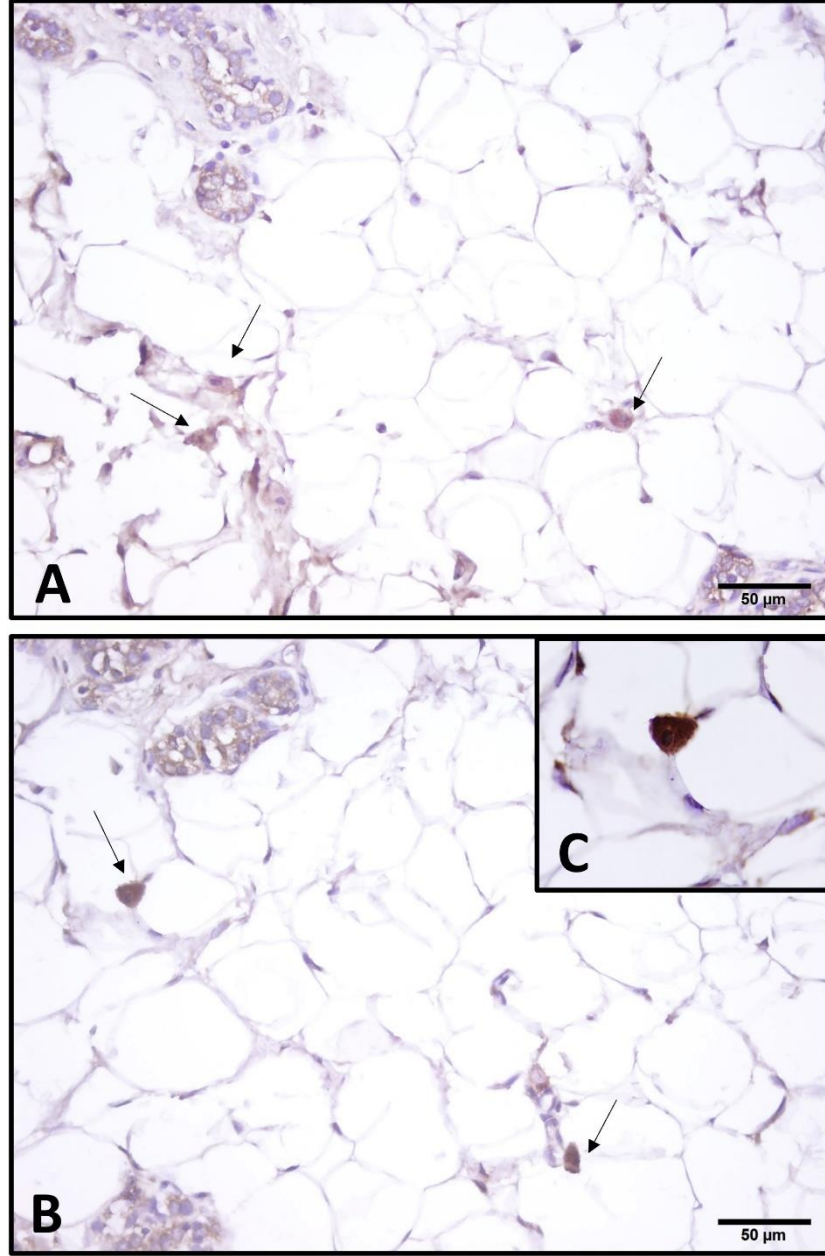
4.3.4. İmmunohistokimyasal Boyamalar

4.3.4.1. Deneyisel Olarak Oluşturulan Sıçan Meme Tümörlerinde Triptaz Eksprese Eden Mast Hücreleri ve Triptaz-Pozitif Mast Hücrelerinin Sayıları

İmmunohistokimyasal olarak tümör dokuları triptaz pozitif mast hücrelerinin tespiti için triptaz antikoru ile boyanmıştır. Triptaz-kimaz pozitif mast hücrelerini elemine etmek için triptaz ve kimaz mast hücreleri sayılmıştır. Kimaz pozitif boyananlar triptaz-kimaz pozitif kabul edilmiştir. Triptaz pozitif sayılan mast hücre sayısından triptaz-kimaz mast hücre sayısı çıkarıldığında ise triptaz pozitif mast hücre sayısı elde edilmiştir.

Triptaz eksprese eden mast hücreleri sayısı her tümörde 200x büyütmede 10 alan sayılarak triptaz boyanan tüm mast hücrelerin ortalama sayısı olarak verilmiştir. Triptaz pozitif mast hücrelerinden farkı triptaz eksprese eden mast hücreleri hem triptaz pozitif mast hücreleri hemde triptaz-kimaz pozitif mast hücrelerinin ikisini de kapsamaktadır.

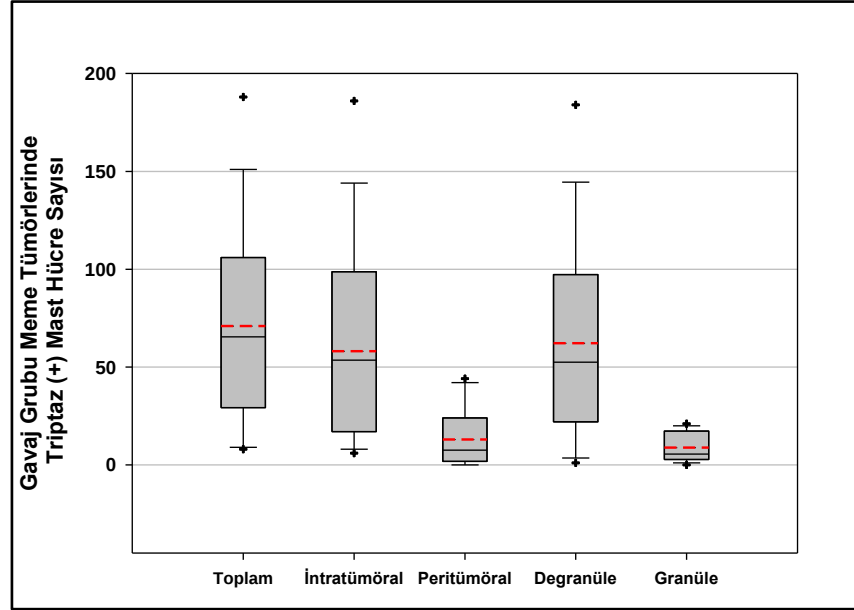
Kontrol olarak alınan sıçan meme dokusunda toplam triptaz pozitif mast hücre sayısı ortalama 1,12 olarak bulunmuştur. Bunların ortalama 0,54 tanesi degranüle olarak bulunurken 0,58 tanesi granüle olarak sayılmıştır. Triptaz eksprese eden toplam mast hücre sayısı ortalama 2,14 bulunmuştur ve bunların ortalama 0,9 tanesi triptaz eksprese eden degranüle mast hücre sayısı, ortalama 1,24 tanesi ise triptaz eksprese eden granüle mast hücre sayısı olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-24).



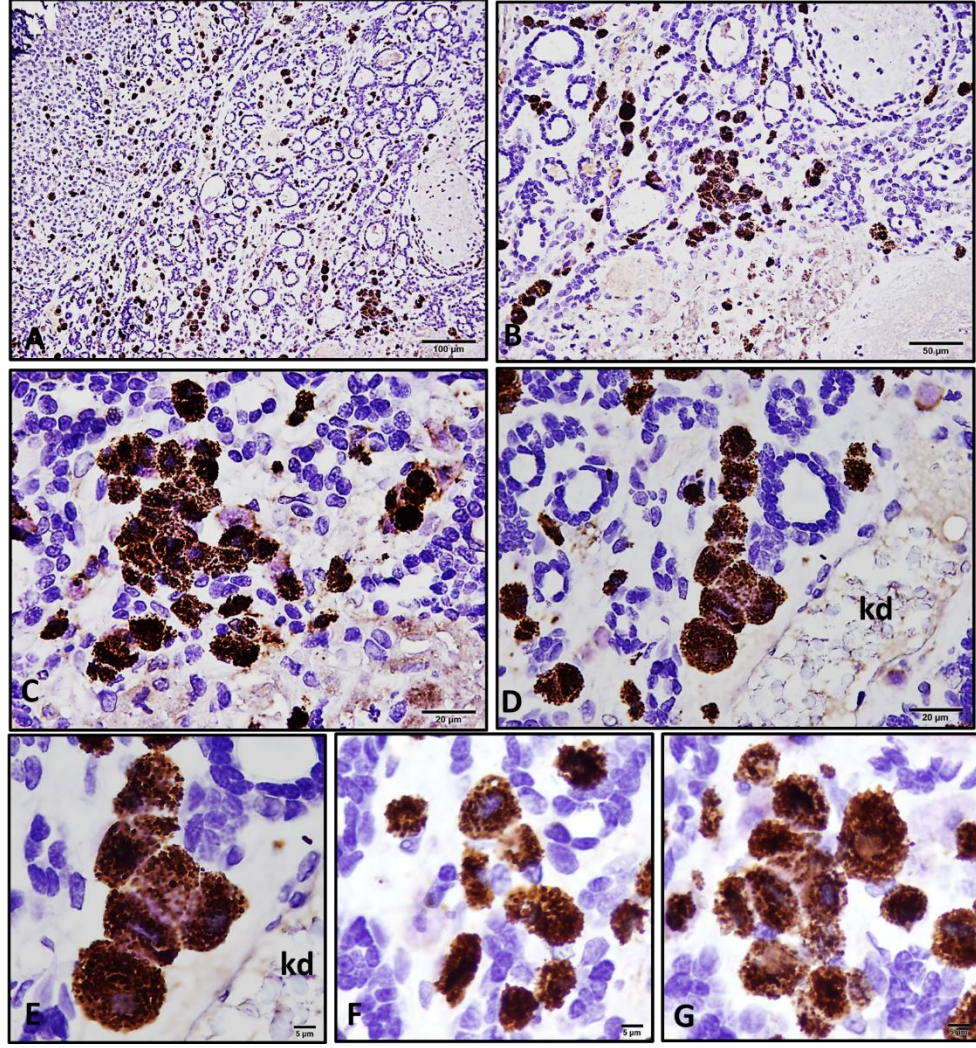
Şekil 4-24: Kontrol sıçan meme bezinde triptaz eksprese eden mast hücrelerin gösterimi, *Horseradish Peroksidaz*, *DAB*, **siyah ok:** Triptaz eksprese eden mast hücresi

Sıçan meme tümörleri incelendiğinde, 20x büyütmede, 10 alanda G grubunda ortalama triptaz pozitif mast hücre sayısı 7 olarak bulunmuştur. Bu hücrelerin ortalama 5,8 tanesi intratümöral alanda iken ortalama 1,2 tanesi ise peritümöral alanda gözlenmiştir. Sıçanlarda G grubunda ortalama degranüle mast hücre sayısı 6,21 iken granüle mast hücre sayısı 0,88 olarak bulunmuştur (Grafik 4-9).

Grafik 4-9: G grubu sıçan meme tümörlerinde triptaz (+) mast hücrelerinin istatistiksel dağılım grafiği. + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.

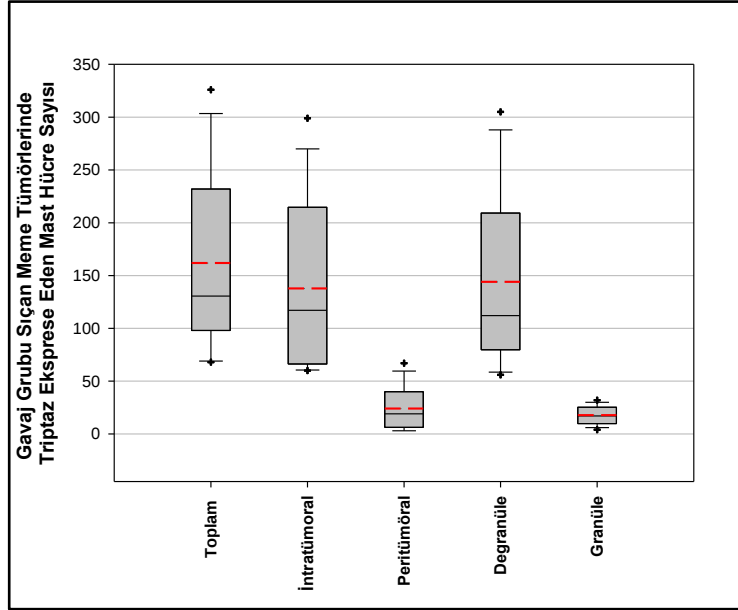


G grubunda triptaz eksprese eden toplam mast hücre sayısı ortalama 16,19 olarak hesaplanmıştır. Triptaz eksprese eden mast hücrelerinin 13,78 tanesi intratümöral olarak yerleşim gösterirken 2,4 tanesi peritümöral yerleşim göstermiştir. Triptaz eksprese eden mast hücrelerinin ortalama 14,41 tanesi degranüle halde, ortalama 1,77 tanesinde granüle halde gözlenmiştir (Şekil 4-25). Bu grupta triptaz eksprese eden mast hücre sayıları detaylı olarak Grafik 4-10'da verilmiştir.



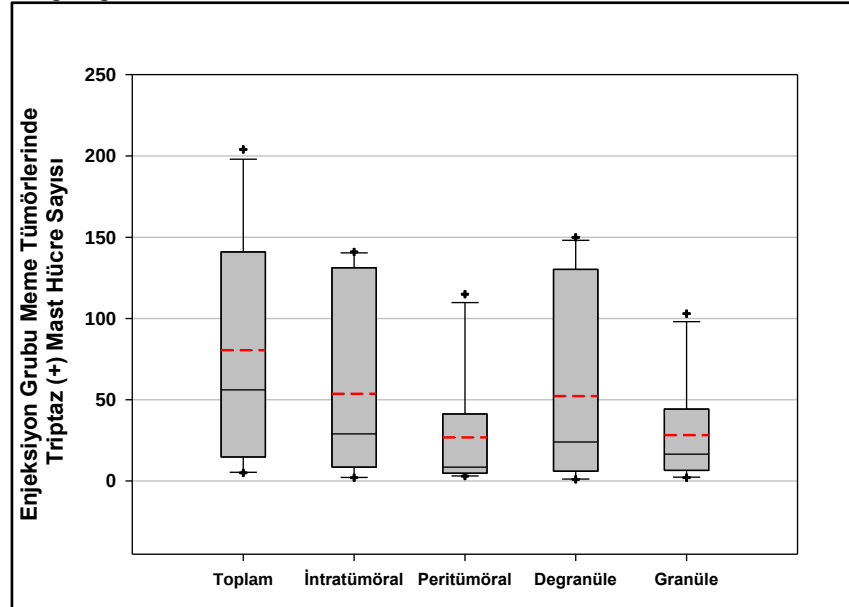
Şekil 4-25: Gavaj grubu sıçan meme tümöründe triptaz eksprese eden mast hücreleri, *Horseradish Peroksidaz*, DAB, (A) Triptaz eksprese eden intratümöral mast hücreleri, (B) Triptaz eksprese eden peritümöral mast hücreleri, (C) İntratümöral degranüle mast hücreleri, (D) İntratümöral degranüle mast hücreleri, (E) İntratümöral degranüle mast hücrelerinin 4000x büyütmedeki görünümü, (F) Degranüle mast hücrelerinin 4000x büyütmedeki görünümü, (G) İntratümöral degranüle mast hücrelerinin 4000x büyütmedeki görünümü, **kd:** kan damarı

Grafik 4-10: G grubunda triptaz eksprese eden mast hücre sayılarının görünümü. + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.

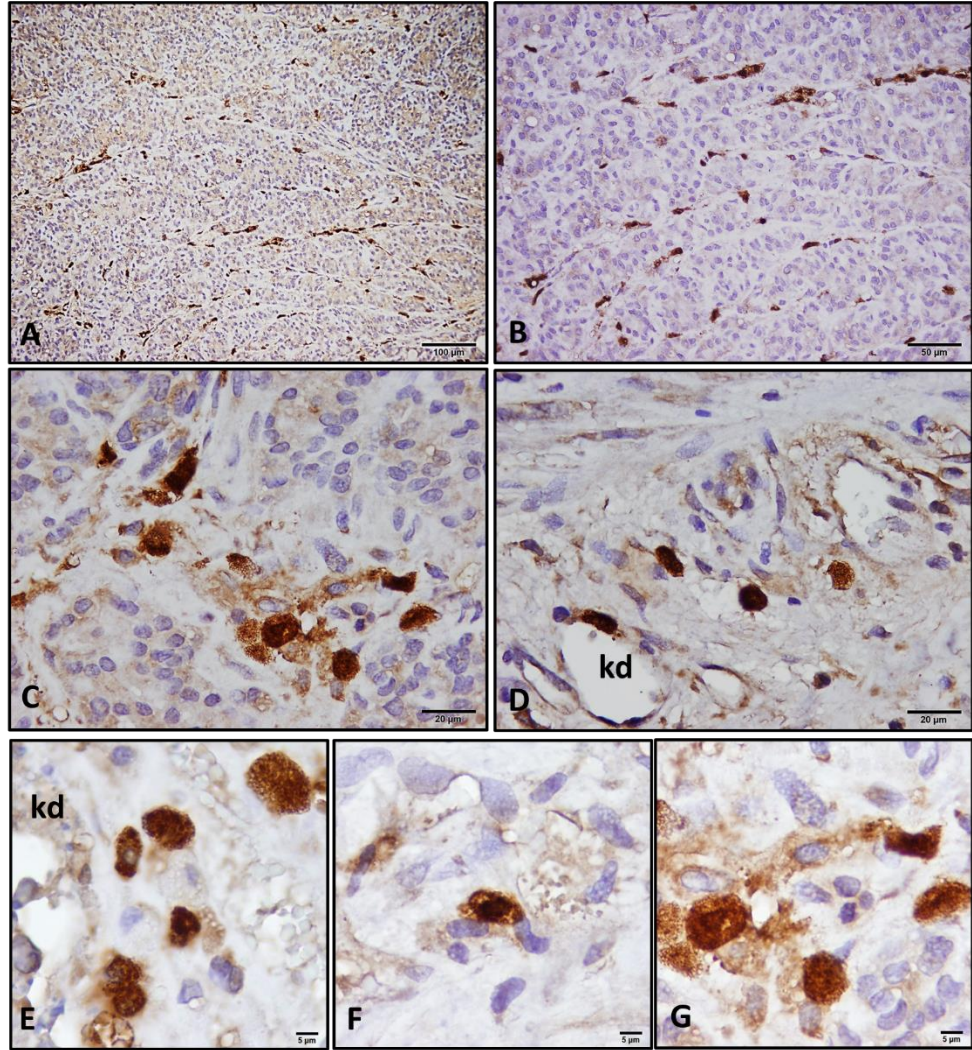


E grubunda yapılan ortalama triptaz pozitif mast hücre sayılarına göre toplam triptaz pozitif mast hücresi 8,4 adet gözlenmiş, bunların 5,36 tanesi intratümöral, 3,04 tanesi ise peritümöral olarak yerleşim göstermiştir. Ortalama degranüle triptaz-pozitif mast hücre sayısı bu grupta 5,22 iken ortalama granüle triptaz-pozitif mast hücre sayısı 3,2 olarak gözlenmiştir (Grafik 4-11).

Grafik 4-11: Enjeksiyon grubu sıçan meme tümörlerinde triptaz (+) mast hücrelerinin istatistiksel dağılım grafiği + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.

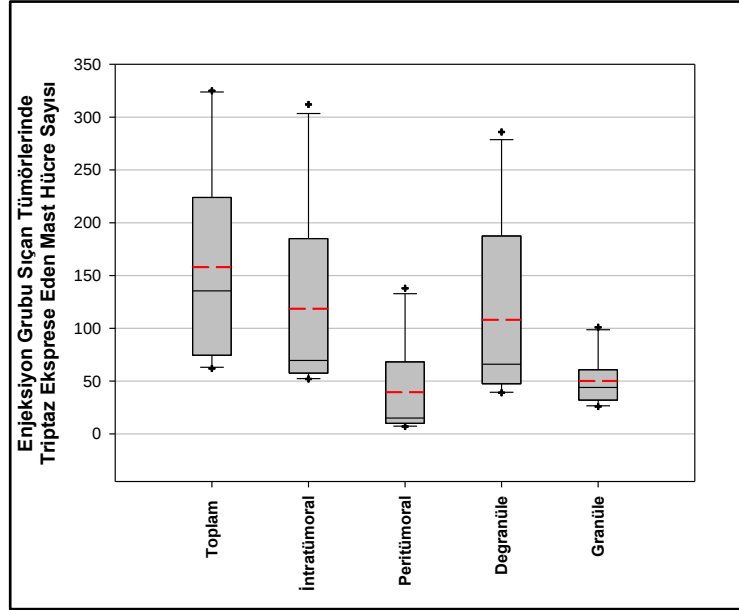


E grubunda triptaz eksprese eden mast hücrelerinin ortalama sayısı 15,81 olarak hesaplanmıştır. Bu hücrelerin 11,85 tanesi intratümöral yerleşim gösterirken 3,96 tanesi peritümöral yerleşim göstermişlerdir. Triptaz eksprese eden degranüle mast hücrelerinin ortalama sayısı 10,8 iken bu sayı granüle olan mast hücrelerinde 5,01 olarak sayılmıştır (Şekil 4-26). Bu grubun triptaz eksprese eden mast hücre sayıları Grafik 4-12’de detaylı olarak verilmiştir.



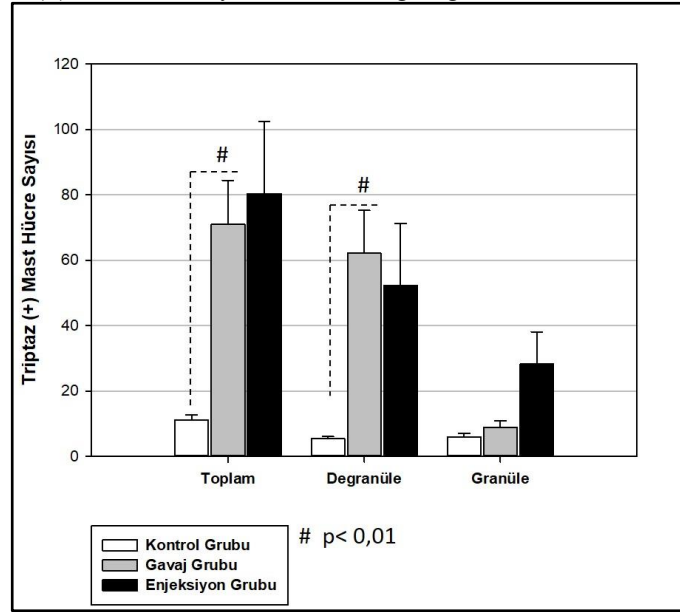
Şekil 4-26: Enjeksiyon grubu sıçan meme tumoründe triptaz eksprese eden mast hücrelerinin görünümü, *Horseradish Peroxidaz*, *DAB*, (A) İnatümöral mast hücreleri, (B) İnatümöral mast hücreleri, (C) Degranüle inatümöral mast hücreleri, (D) Peritümöral degranüle ve granüle mast hücreleri, (E) Degranüle mast hücrelerinin 4000x büyütmedeki görünümü, (F) İnatümöral mast hücrelerinin 4000x büyütmedeki görünümü, (G) İnatümöral degranüle mast hücrelerinin 4000x büyütmedeki görünümü

Grafik 4-12: E grubunda triptaz eksprese eden mast hücre sayılarının dağılım grafiği. + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.



Kontrol grubu ile G ve E grubu triptaz pozitif mast hücreleri toplam mast hücresi yönünden istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol grubu ile G grubu arasında toplam triptaz pozitif mast hücre sayısı bakımından anlamlı bir fark bulunmuştur ($p: 0,007$). Toplam triptaz pozitif mast hücre sayısı kontrol-enjeksiyon ve gavaj-enjeksiyon grubu arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,055$; $p: 0,931$). Triptaz pozitif degranüle mast hücreleri açısından kontrol grubu ile G grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur ($p: 0,005$). Triptaz pozitif degranüle mast hücreleri bakımından kontrol-E grubu ve G ile E grubu arasında istatistiksel olarak artış gözlenmemiştir ($p: 0,099$; $p: 0,437$). Triptaz pozitif granüle mast hücre yönüyle istatistiksel olarak karşılaştırma yapıldığında sadece G ve E grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuş ($p: 0,042$) kontrol-G grubu ve kontrol-E grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır ($p: 0,964$; $p: 0,075$) (Grafik 4-13).

Grafik 4-13: Triptaz (+) mast hücre sayısının istatistik grafiği

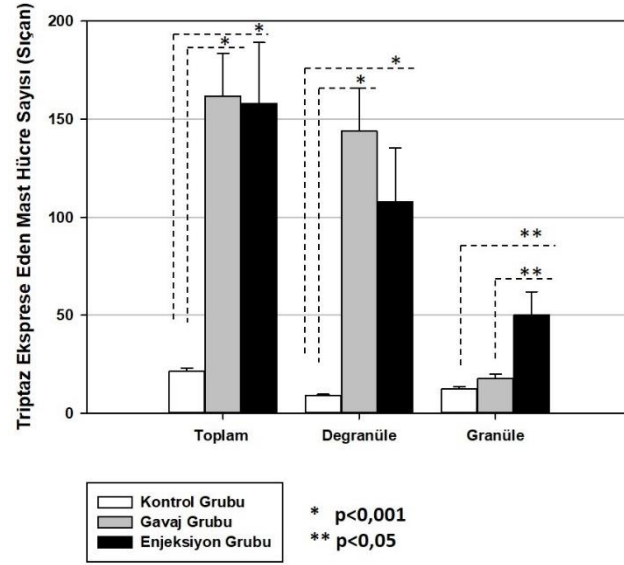


Kontrol grubu ile G ve E grubu meme tümörleri triptaz eksprese eden toplam mast hücre sayıları olarak istatistiksel olarak karşılaştırıldığında hem G hem de E grubu meme tümörlerinde kontrol meme bezine göre sırasıyla 7,56 ve 7,38 kat artış gözlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$, $p < 0,001$). G ve E grubu meme tümörleri arasında triptaz eksprese eden toplam mast hücreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,709$). Kontrol meme dokusu ile triptaz eksprese eden granüle mast hücre sayısı bakımından meme tümörü dokuları karşılaştırıldığında G grubunda 1,42 kat arttığı gözlenmiş ve anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,298$). E grubunda 4,04 kat arttığı gözlenmiştir ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p: 0,013$). G ve E grubu kendi içinde triptaz eksprese eden granüle mast hücresi yönüyle kıyaslandığında E grubunda G grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p: 0,011$). Triptaz eksprese eden degranüle mast hücre sayısı kontrol grubuna göre G grubunda 16,01 kat artış gösterirken, E grubunda artış 12 kat olarak hesaplanmıştır ve iki grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$, $p < 0,001$). G ve E grubu kendi arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,084$) (Grafik 4-14).

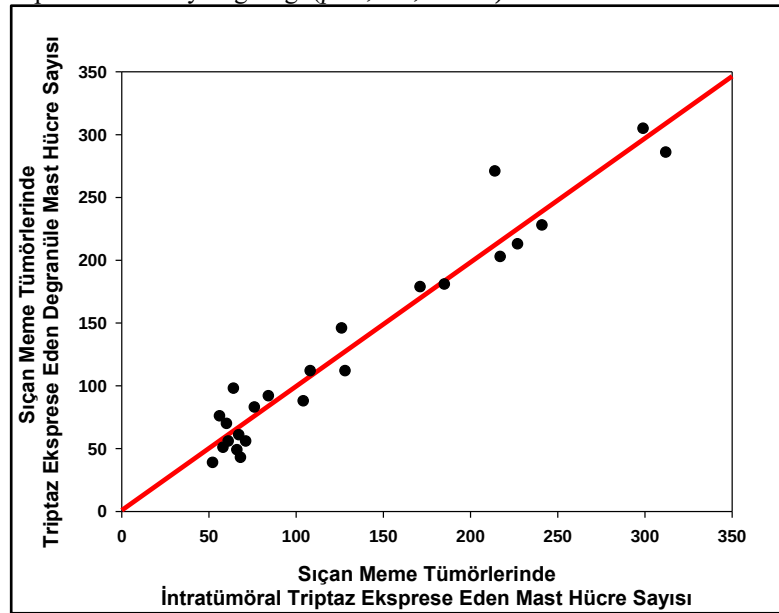
Sıçan meme tümörlerinde triptaz eksprese eden mast hücre sayıları ile intratümöral triptaz eksprese eden mast hücre sayıları arasında korelasyon istatistiği

incelendiğinde iki değer arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p<0,001$; $r:903$) (Grafik 4-15). Triptaz eksprese eden peritümöral mast hücreleri ile granüle mast hücreleri arasında korelasyon istatistiği yapıldığında iki değer arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p<0,001$; $r:805$) (Grafik 4-16).

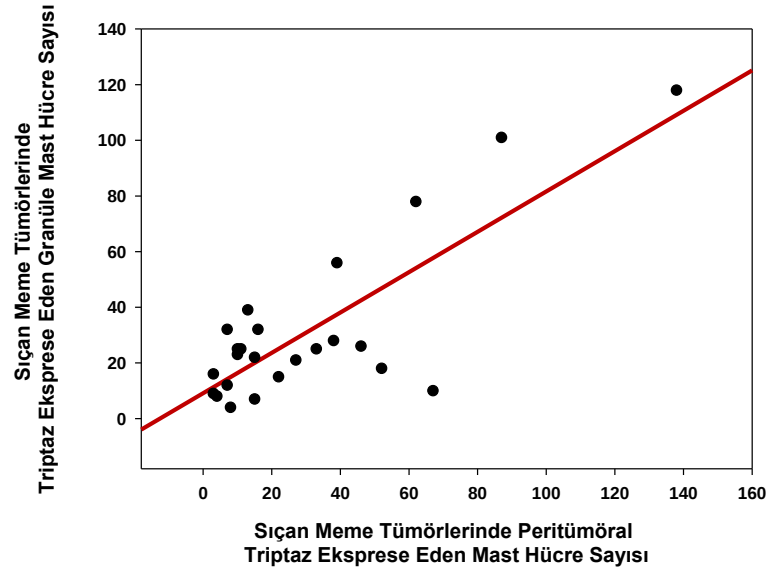
Grafik 4-14: Triptaz eksprese eden mast hücrelerinin istatistik grafiği



Grafik 4-15: İntratümöral triptaz eksprese eden mast hücresi ile degranüle triptaz eksprese eden mast hücre arasındaki pozitif korelasyon grafiği ($p<0,001$; $r: 903$)



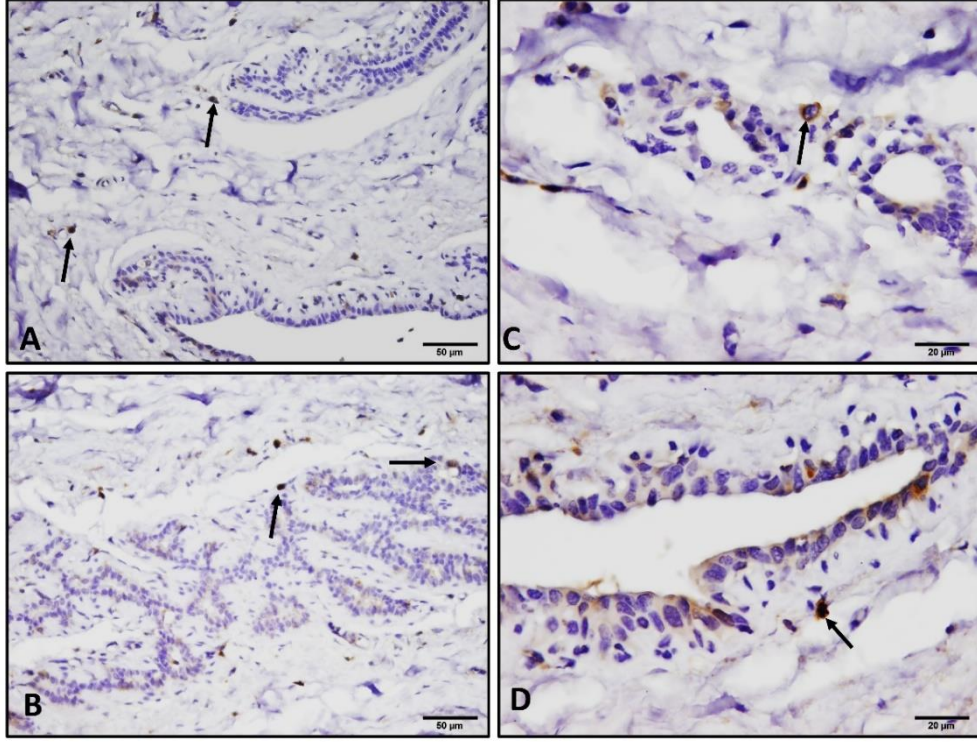
Grafik 4-16: Sıçan meme tümörlerinde peritümöral triptaz eksprese eden mast hücresi ile granüle triptaz eksprese eden mast hücresi korelasyon grafiği ($p<0,001$; $r:805$)



4.3.4.2 Köpek Meme Tümörlerinde Triptaz Eksprese Eden Mast Hücreleri ve Triptaz Pozitif Mast Hücrelerinin Sayıları

Köpek sağlıklı meme dokusunda triptaz pozitif mast hücre sayısı sayıldığında 200x büyütmede, 10 alan sayıldığında ortalama triptaz mast hücre sayısı 0,94 olarak bulunmuştur. Bu hücrelerin ortalama 0,4 tanesi degranüle triptaz pozitif mast hücresi iken, ortalama 0,54 tanesi ise granüle triptaz pozitif mast hücresi olarak sayılmıştır.

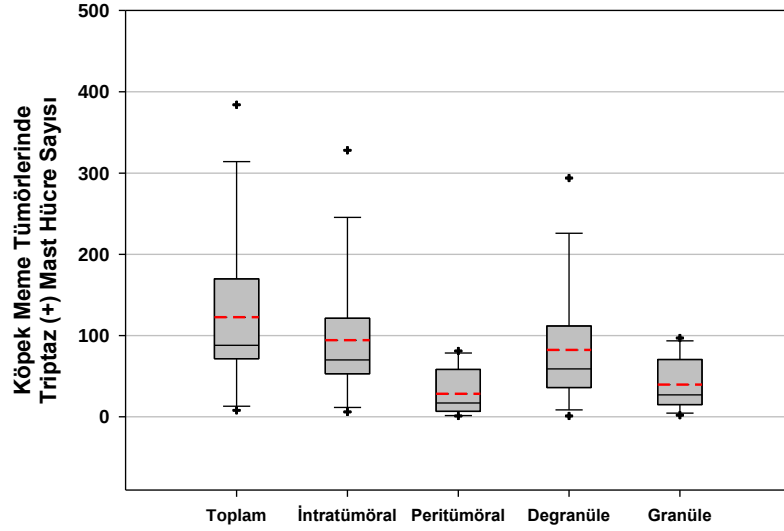
Köpek sağlıklı meme dokusunda triptaz eksprese eden toplam mast hücre sayısı 1,96, triptaz eksprese eden degranüle mast hücre sayısı 0,68 ve triptaz eksprese eden granüle mast hücre sayısı ise 1,28 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-27).



Şekil 4-27: Köpek kontrol meme bezinde triptaz eksprese eden mast hücreleri, *Horseradish Peroksidaz*, *DAB*

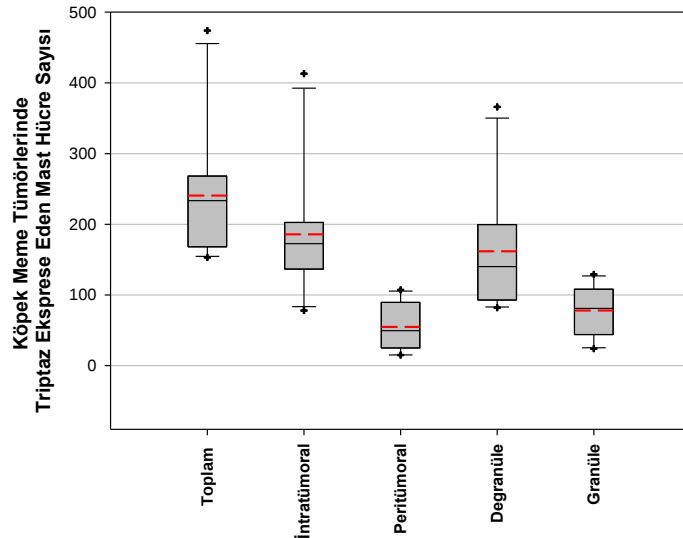
Köpek meme tümörü dokularında, triptaz pozitif mast hücre sayıları, 200x büyütmede toplam 10 alan sayılarak hesaplanmıştır. Köpek meme tümörü dokularında ortalama triptaz pozitif mast hücre sayısı 15,3 olarak sayılmıştır, bunların 11,79 tanesi intratümöral olarak yerleşim gösterirken 3,57 tanesi ise peritümöral yerleşim göstermiştir. Ortalama degranüle triptaz pozitif mast hücre sayısı 10,1 olarak granüle triptaz pozitif mast hücre sayısı ise 5,09 olarak bulunmuştur (Grafik 4-17).

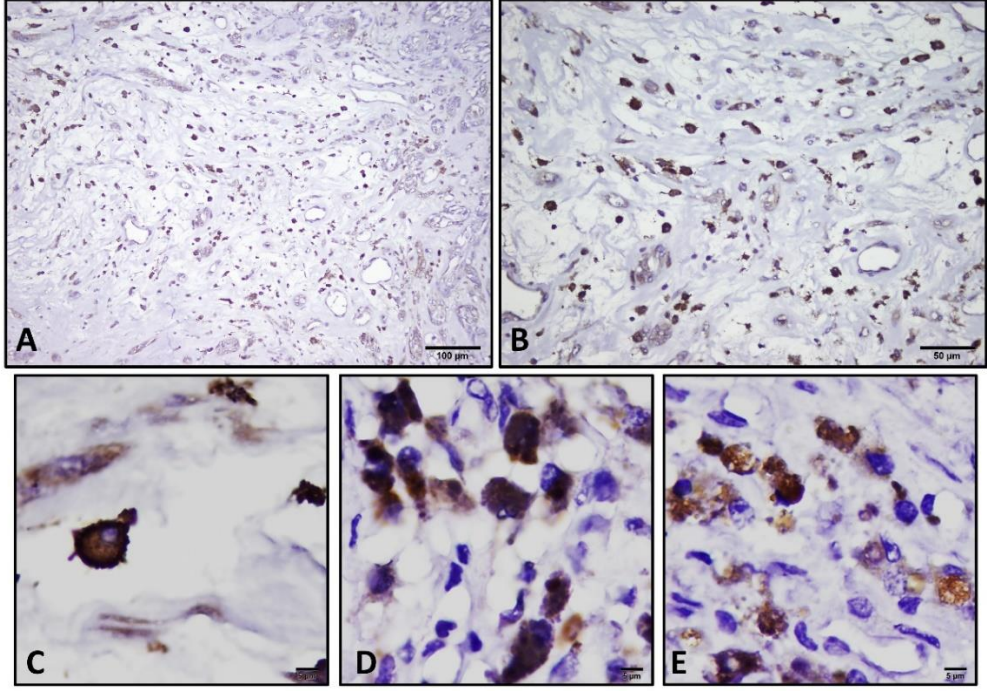
Grafik 4-17: Köpek meme tümörlerinde triptaz (+) mast hücrelerinin istatistiksel dağılım grafiği. + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.



Köpek meme tümörü örneklerinde triptaz eksprese eden toplam mast hücre sayısı ortalama olarak 24,06 olarak sayılmıştır. Bu hücrelerin 18,58 tanesi intratümöral olarak yerleşim gösterirken 5,48 tanesi peritümöral yerleşim göstermiştir. Triptaz eksprese eden degranüle mast hücre sayısı 16,17 iken granüle mast hücre sayısı 7,79 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-28). Köpek meme tümörlerinde triptaz eksprese eden mast hücre sayıları Grafik 4-18’de detaylı olarak verilmiştir.

Grafik 4-18: Köpek triptaz eksprese eden mast hücrelerinin istatistiksel dağılım grafiği. + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.

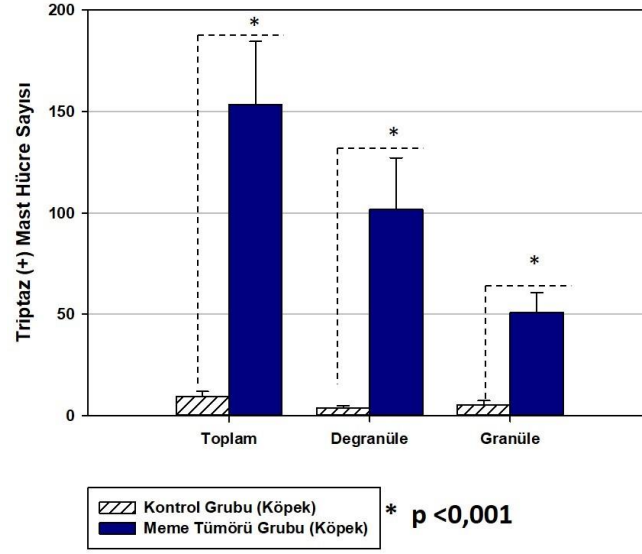




Şekil 4-28: Köpek meme tümörlerinde triptaz eksprese eden mast hücrelerinin görünümü, **(A)** Triptaz eksprese eden peritümöral mast hücreleri, **(B)** Triptaz eksprese eden peritümöral mast hücrelerinin 400x büyütmedeki görünümü, **(C)** Köpek triptaz eksprese eden mast hücresi, **(D)** İntratümöral triptaz eksprese eden mast hücreleri, **(E)** İntratümöral triptaz eksprese eden degranüle mast hücreleri

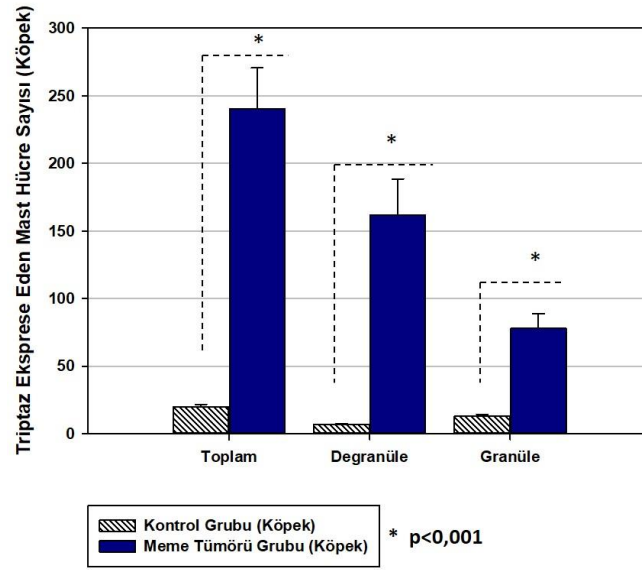
Köpek meme tümörlerinde triptaz pozitif mast hücreleri ile sağlıklı meme bezinde sayılan triptaz pozitif mast hücreleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında toplam triptaz pozitif mast hücre sayısı kontrole göre 15,98 kat artmış ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Degranüle triptaz pozitif mast hücreleri kontrol meme dokusu ile karşılaştırıldığında meme tümörü dokusunda 25,02 kat arttığı gözlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Granüle triptaz pozitif mast hücreleri açısından tümör dokusu ile kontrol meme dokusu karşılaştırıldığında 9,42 kat artış gözlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$) (Grafik 4-19).

Grafik 4-19: Triptaz (+) mast hücrelerinin istatistik grafiği

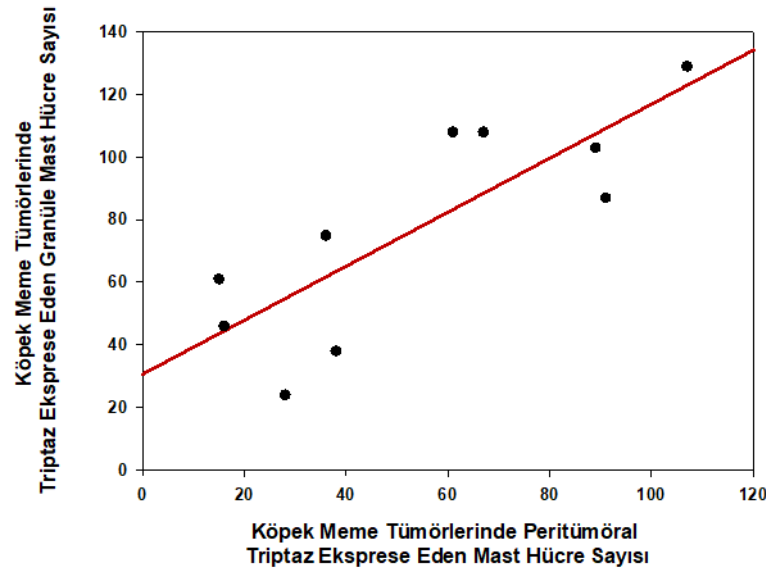


İstatistiksel olarak köpek meme tümörü dokularındaki triptaz eksprese eden toplam mast hücre sayısı ile sağlıklı meme bezindeki triptaz eksprese eden toplam mast hücre sayısı karşılaştırıldığında 12,27 kat artış bulunmuş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p < 0,001$). Granüle triptaz eksprese eden mast hücre sayıları açısından kontrol grubu ile meme tümörü grubu arasında 6,08 kat artış gözlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Degranüle triptaz eksprese eden mast hücreleri yönünden kontrol ve meme tümörü dokuları istatistiksel olarak 23,77 kat artış gözlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$) (Grafik 4-20). Ayrıca triptaz eksprese eden granüle mast hücre sayısı ile peritümöral mast hücreleri arasında pozitif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p: 0,004$; $r: 805$) (Grafik 4-21).

Grafik 4-20: Triptaz eksprese eden mast hücre sayılarının meme tümörü ile kontrol dokuları arasındaki istatistik grafiği (Grafikteki değerler 10 alanın toplamı olarak verilmiştir)



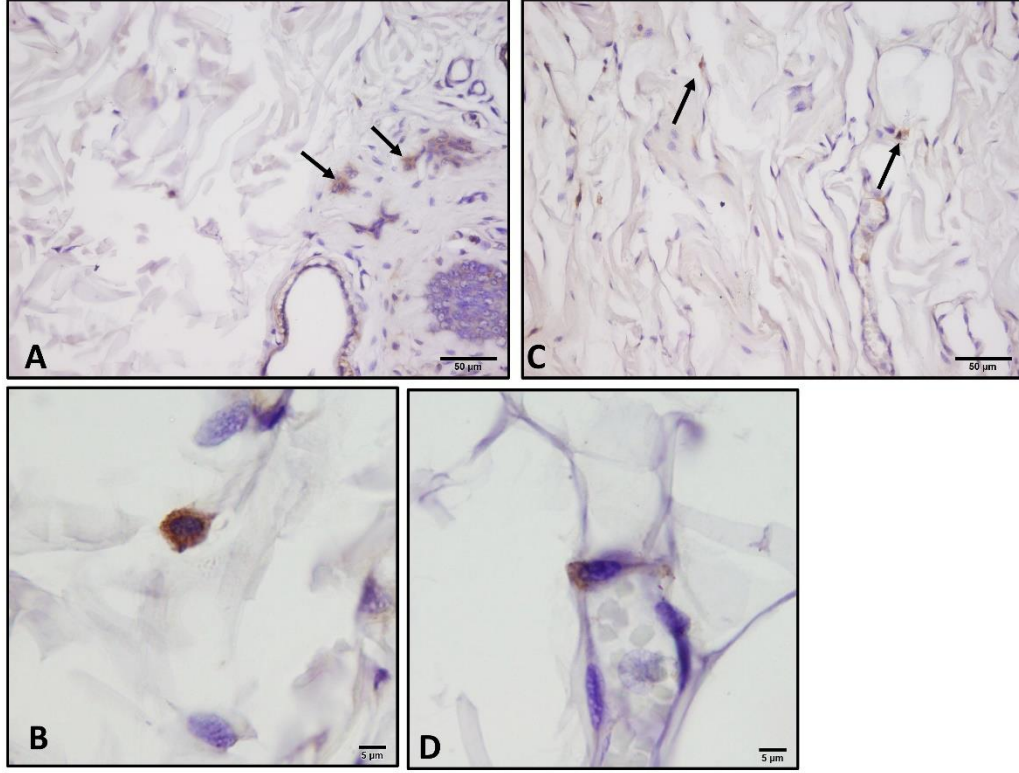
Grafik 4-21: Köpek meme tümörlerinde peritümöral triptaz eksprese eden mast hücresi ile granüle triptaz eksprese eden mast hücresi korelasyon grafiği ($p:0,004$; $r:818$)



4.3.4.3 Kedi Meme Tümörlerinde Triptaz Eksprese Eden Mast Hücre ve Triptaz Pozitif Mast Hücrelerinin Sayıları

Kedi kontrol meme bezi dokusunda toplam triptaz pozitif mast hücre sayısı ortalama 0,92 adet iken, degranüle triptaz pozitif mast hücre sayısı ortalama 0,46, granüle triptaz pozitif mast hücre sayısı ortalama 0,46 olarak hesaplanmıştır.

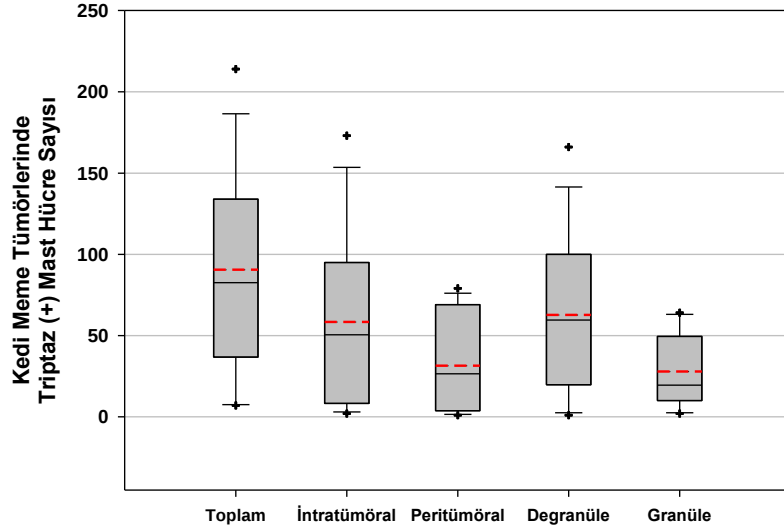
Kedi kontrol meme bezi dokusunda triptaz eksprese eden toplam mast hücre sayısı ortalama 2,16, triptaz eksprese eden granüle mast hücre sayısı 1,32 ve triptaz eksprese eden degranüle mast hücre sayısı ortalama 0,84 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-29).



Şekil 4-29: Kedi kontrol meme bezinde triptaz eksprese eden mast hücreleri, *Horseradish Peroksidaz*, DAB

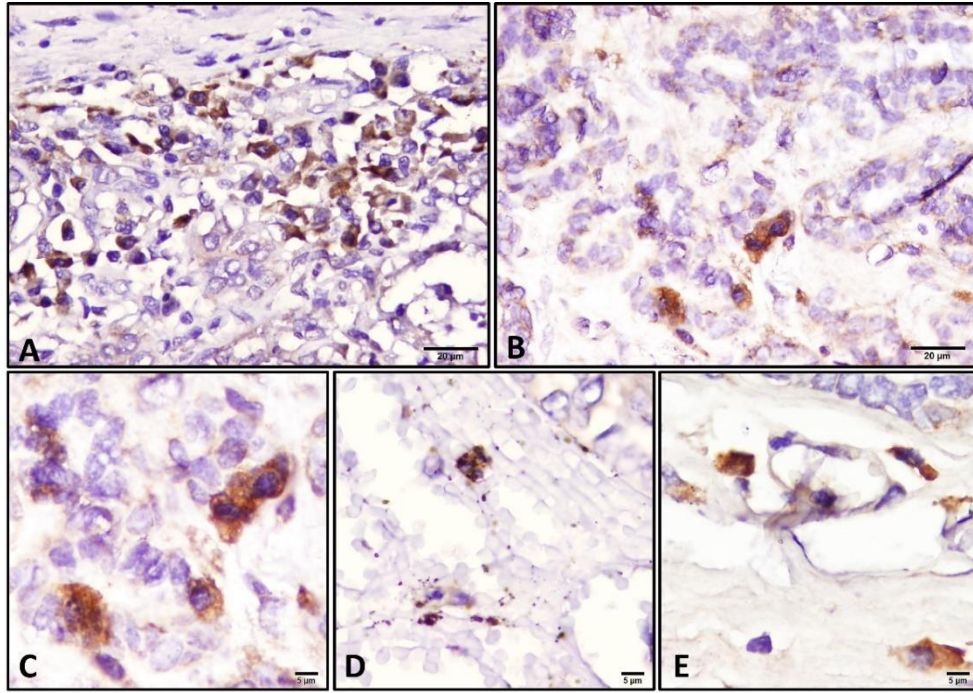
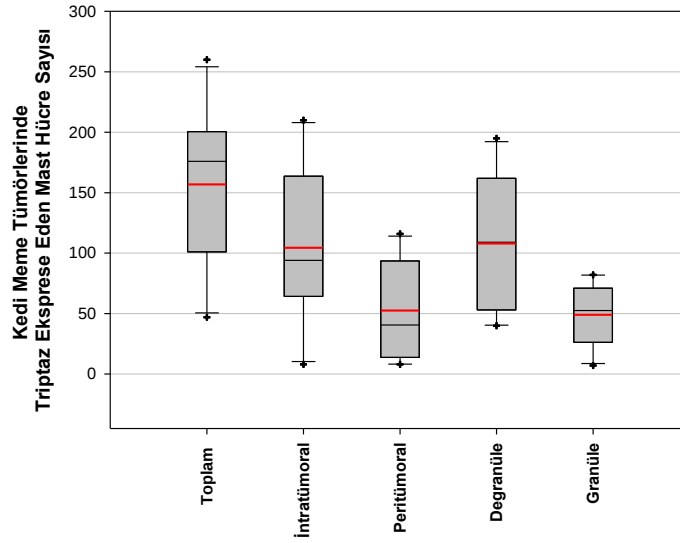
Kedi meme tümörü dokularında, triptaz pozitif mast hücre sayıları, 200x büyütmede toplam 10 alan sayılarak hesaplanmıştır. Meme tümörü dokularında ortalama triptaz pozitif mast hücre sayısı 10,88 olarak sayılmıştır. Bu hücrelerin 6,76 tanesi intratümöral olarak yerleşim gösterirken, 4,12 tanesinde peritümöral olarak yerleşim gösterdiği bulunmuştur. Ortalama degranüle triptaz pozitif mast hücre sayısı 7,4, granüle triptaz pozitif mast hücre sayısı 3,45 olarak hesaplanmıştır (Grafik 4-22).

Grafik 4-22: Kedi meme tümörlerinde triptaz (+) mast hücrelerinin istatistiksel olarak dağılım grafiği. + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.



Kedi meme tümörü örneklerinde triptaz eksprese eden toplam mast hücre sayısı ortalama 15,69 olarak belirlenmiştir. Bu hücrelerin 10,44 tanesi intra-tümöral yerleşim gösterirken 5,25 tanesi peri-tümöral olarak yerleşim göstermişlerdir. Triptaz eksprese eden degranüle mast hücrelerinin ortalaması 10,79 olarak bulunurken granüle mast hücrelerinin sayısı 4,9 olarak bulunmuştur. Kedi meme tümörlerinde triptaz eksprese eden mast hücre sayıları Grafik 4-23'te detaylı olarak verilmiştir.

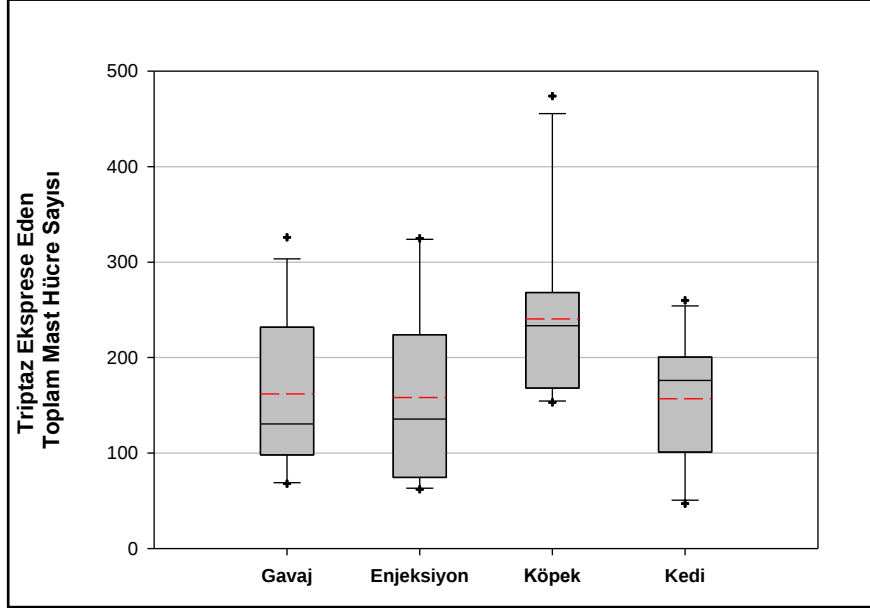
Grafik 4-23: Kedi meme tümörlerinde triptaz eksprese eden mast hücrelerinin istatistiksel olarak dağılım grafiği + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir



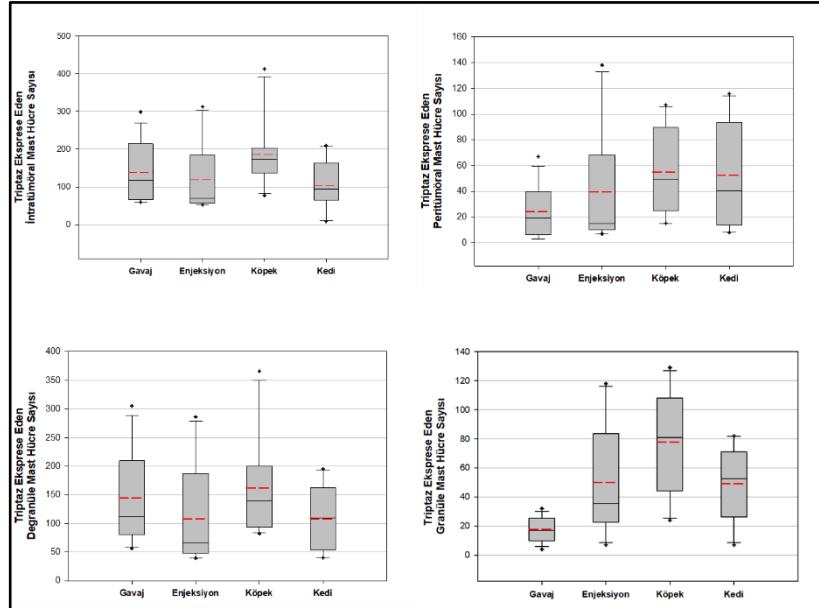
Şekil 4- 30: Kedi triptaz eksprese eden mast hücrelerinin farklı büyütmelerdeki görünümü, *Horseradish Peroksidaz, DAB*

Triptaz eksprese eden toplam mast hücre sayıları, intratümöral ve peritümöral mast hücre sayıları ile degranüle ve granüle mast hücre sayılarının tüm türlerdeki grafiği Grafik 4-24 ve Grafik 4-25'te detaylı olarak verilmiştir.

Grafik 4-24: Triptaz eksprese eden toplam mast hücre sayılarının türler arası karşılaştırma grafiği + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir

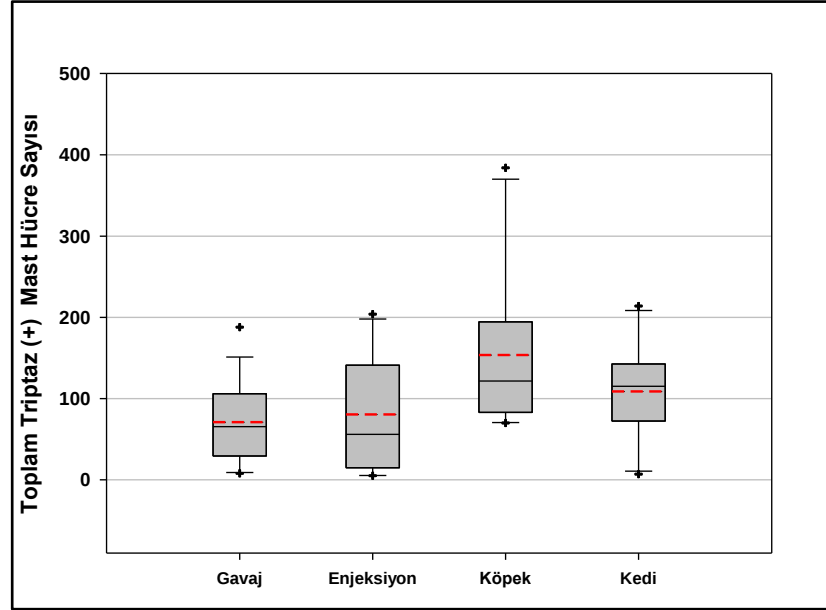


Grafik 25: İntratümöral, peritümöral, degranüle ve granüle triptaz eksprese eden mast hücre sayılarının dağılım grafikleri, + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.

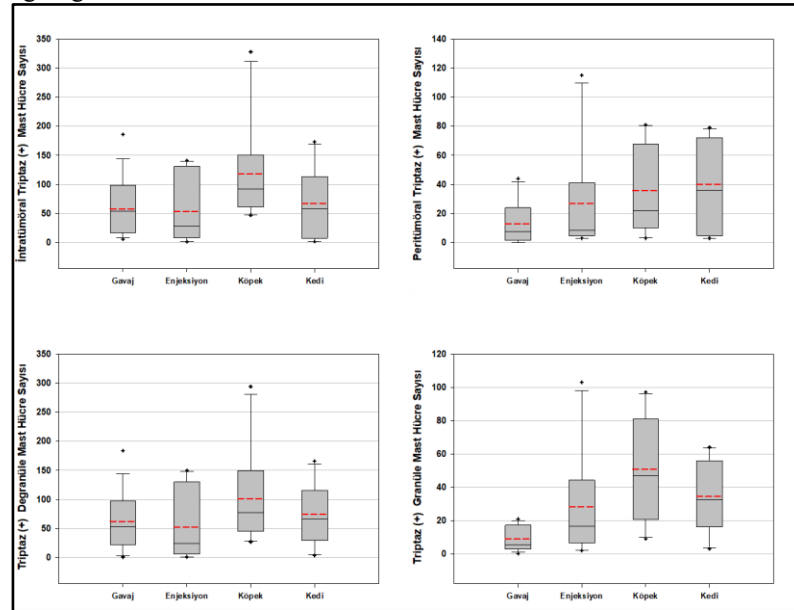


Triptaz pozitif toplam mast hücre sayıları, intratümöral ve peritümöral mast hücre sayıları ile degranüle hücre sayılarının tüm türlerdeki grafiği Grafik 4-26 ve Grafik 4-27’de detaylı olarak verilmiştir.

Grafik 4-26: Toplam Triptaz (+) mast hücre sayısının hayvan türlerine göre dağılım grafiği, + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.



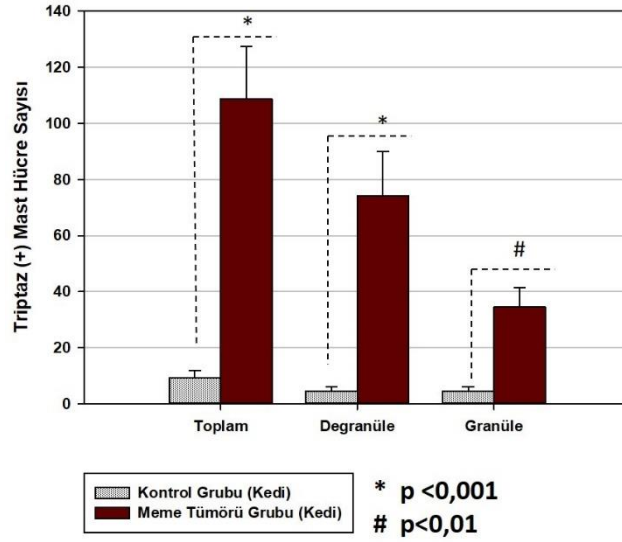
Grafik 27: İntratümöral, peritümöral, degranüle ve granüle triptaz (+) mast hücre sayılarının dağılım grafikleri, + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.



Kontrol meme dokusu ile kedi meme tümörleri toplam triptaz pozitif mast hücre sayısı yönünden istatistiksel olarak karşılaştırıldığında meme tümörü dokularında kontrole göre 11,82 kat arttığı ve bu artışta istatistiksel olarak anlamlı çıktığı gözlenmiştir ($p<0,001$). Granüle triptaz pozitif mast hücreleri kontrol dokusuna kıyasla meme tümörü dokusunda 7,5 kat artış göstermiş ($p:0,001$), degranüle triptaz

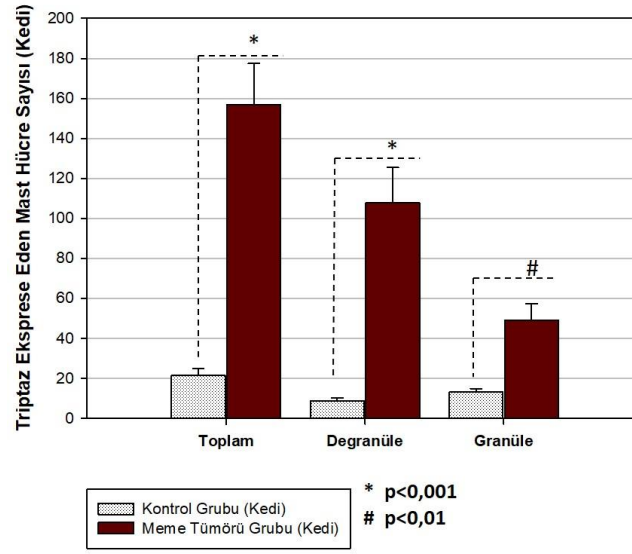
pozitif mast hücre sayısı kontrol dokusu ile kıyaslandığında meme tümörü dokularında 16,08 kat bir artış bulunmuştur ($p<0,001$). Bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Grafik 4-28).

Grafik 4-28: Kedi meme tümörlerinde triptaz (+) mast hücrelerinin istatistik grafiği

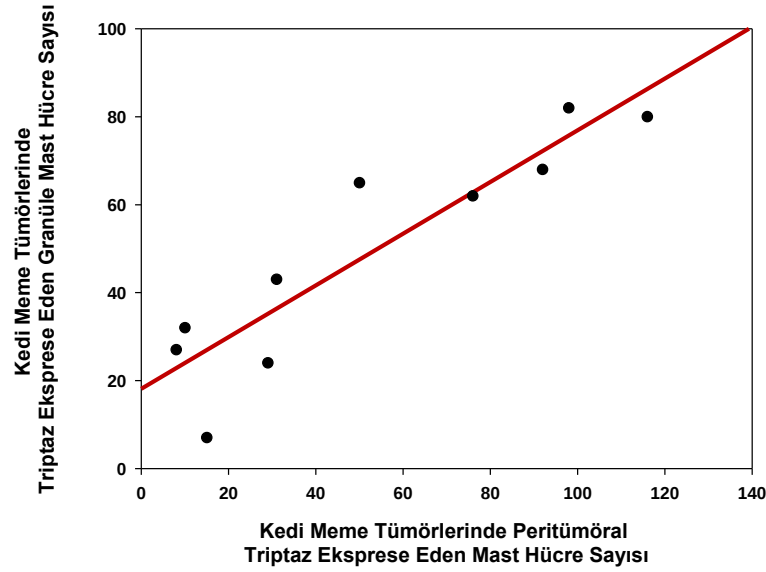


Triptaz eksprese eden mast hücreleri kontrol ile meme tümörü dokuları arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında meme tümörü dokusunda triptaz eksprese eden mast hücreleri kontrol dokusuna göre 7,26 kat artış göstermiş bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Triptaz eksprese eden granüle mast hücre sayısı iki grup arasında karşılaştırıldığında meme tümörlerinde 3,71 kat artış belirlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p: 0,002$). Triptaz eksprese eden degranüle mast hücreleri iki grup arasında karşılaştırıldığında meme tümörlerinde 12,84 kat arttığı gözlenmiş bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Triptaz eksprese eden mast hücre sayılarının istatistiksel grafiği Grafik 4-29’de verilmiştir. Peritümöral mast hücreleri ile granüle mast hücreleri arasında istatistiksel olarak pozitif korelasyon gözlenmiştir ($p<0,001$; $r:0,909$) (Grafik 4-30).

Grafik 4-29: Kedi meme tümörü ile kontrol grubu arasındaki triptaz eksprese eden mast hücreleri istatistik grafiği. (Grafikteki değerler 10 alan toplamı olarak verilmiştir.)



Grafik 4-30: Kedi meme tümörlerinde peritümöral triptaz eksprese eden mast hücresi ile granüle triptaz eksprese eden mast hücresi korelasyon grafiği ($p<0,001$; $r:909$)

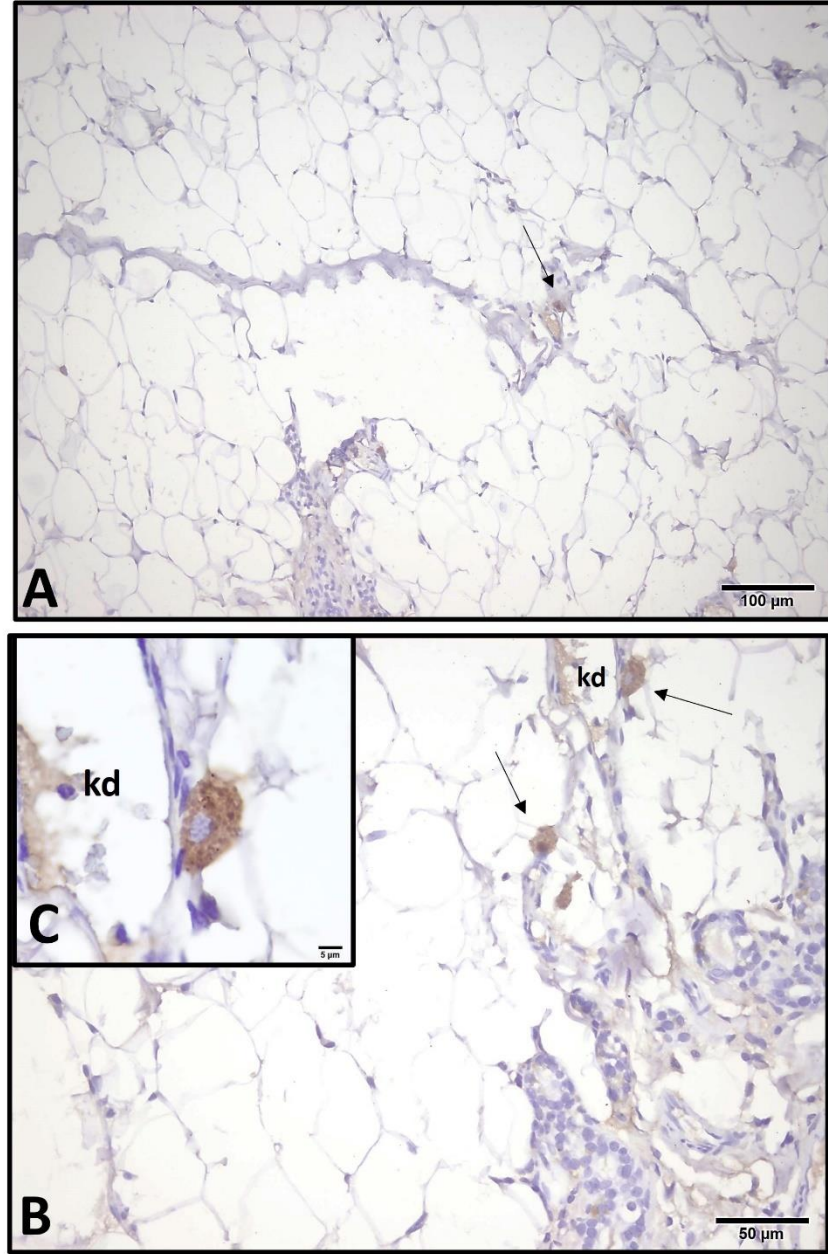


4.3.4.3. Deneysel Olarak Oluşturulan Sıçan Meme Tümörlerinde Kimaz Eksprese Eden Mast Hücre ve Triptaz-Kimaz Pozitif Mast Hücrelerinin Sayıları

Mast hücreleri sınıflandırmasında çoğu araştırmacı tek başına kimaz pozitif mast hücrelerinin sayısının oldukça az ve nadir olduklarını kabul etmesinden ve mast

hücrelerini triptaz pozitif ve triptaz-kimaz pozitif olarak 2 alt tipe ayırmasından dolayı çalışmada kimaz eksprese eden mast hücrelerinin hepsi aynı zamanda triptaz -kimaz pozitif olarak kabul edilmiştir. Bu yüzden metinde triptaz-kimaz pozitif mast hücreleri olarak yazılan kısımlar grafiklerde daha iyi karşılaştırma yapabilmek adına kimaz eksprese eden mast hücre sayısı olarak verilmiş olup aslında iki değerde aynı kabul edilmektedir.

Kontrol sıçan meme dokusunda toplam triptaz-kimaz mast hücre sayısı ortalama 1 iken bunların ortalama 0,64 tanesi granüle triptaz-kimaz mast hücresi, ortalama 0,36 tanesi ise degranüle mast hücresi olarak sayılmıştır (Şekil 4-31).

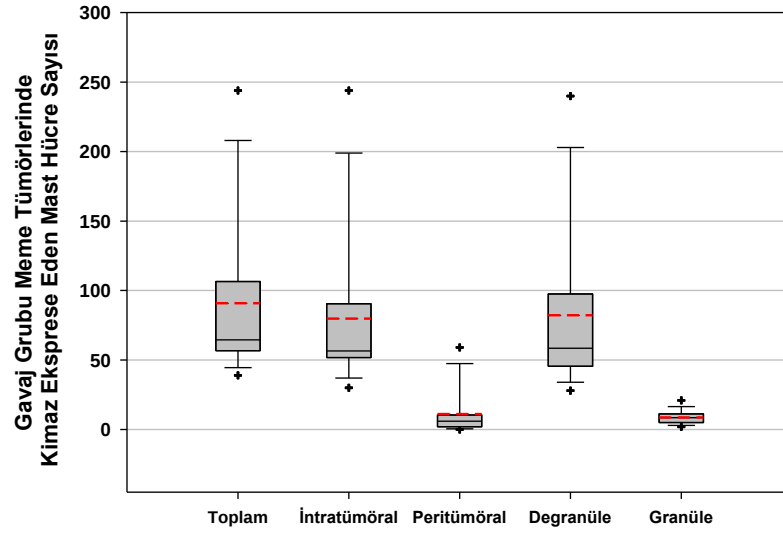


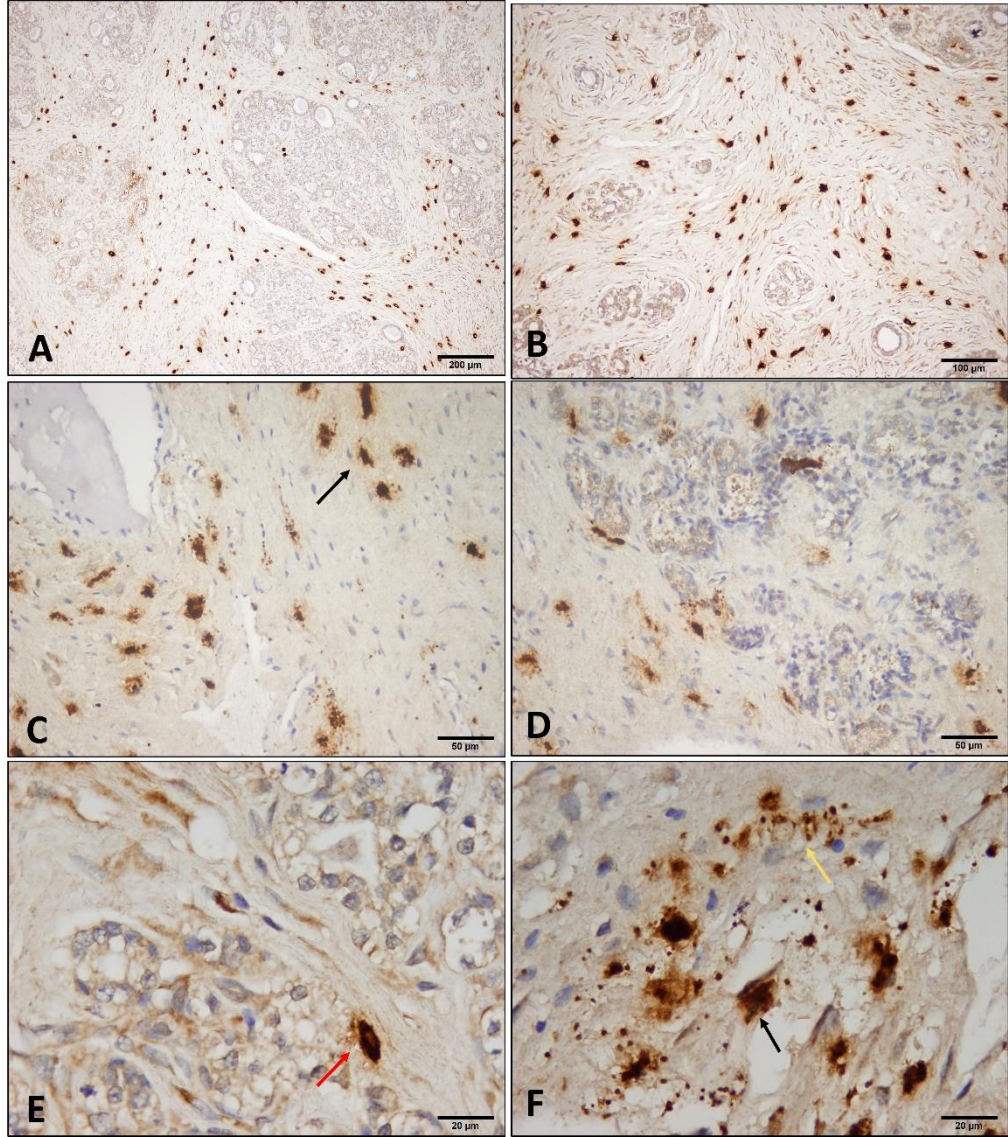
Şekil 4-31: Kontrol sıçan meme bezine ait kimaz pozitif mast hücreleri, *Horseradish Peroksidaz*, *DAB*, (A-B) Kimaz eksprese eden mast hücreleri (Triptaz-kimaz pozitif), (C) Kimaz eksprese eden mast hücrelerinin ve granüllerinin 4000x büyütmedeki görünümü

Sıçanlarda, G grubunda bulunan hayvanlardaki meme tümörü dokusunda toplam triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı ortalama 9,09 olarak sayılmıştır. Bu hücrelerin ortalama 7,97 tanesi intratümöral alanda yerleşim gösterirken ortalama 1,1 tanesi ise peritümöral olarak yerleşim gösterdiği bulunmuştur. G grubunda ortalama degranüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı 8,22 iken granüle triptaz-kimaz

pozitif mast hücre sayısı 0,87 olarak gözlenmiştir (Şekil 4-32). G grubu kimaz eksprese eden mast hücresi sayı grafiği Grafik 4-31’de verilmiştir.

Grafik 4-31: Gavaj grubunda kimaz eksprese eden mast hücre sayılarının görünümü. + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.

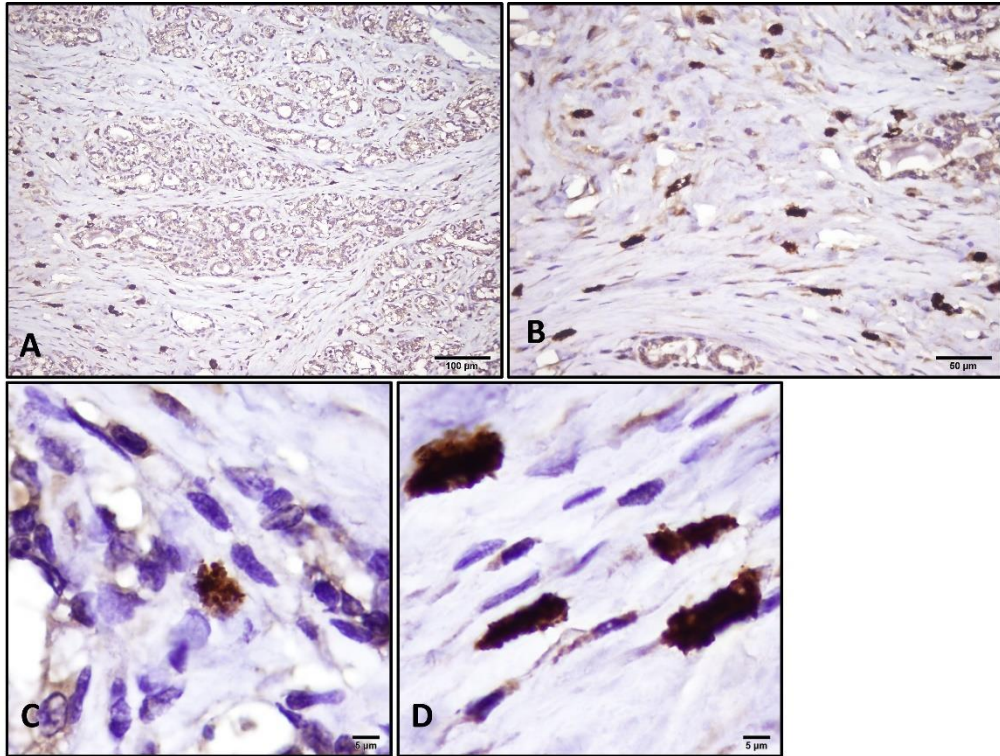
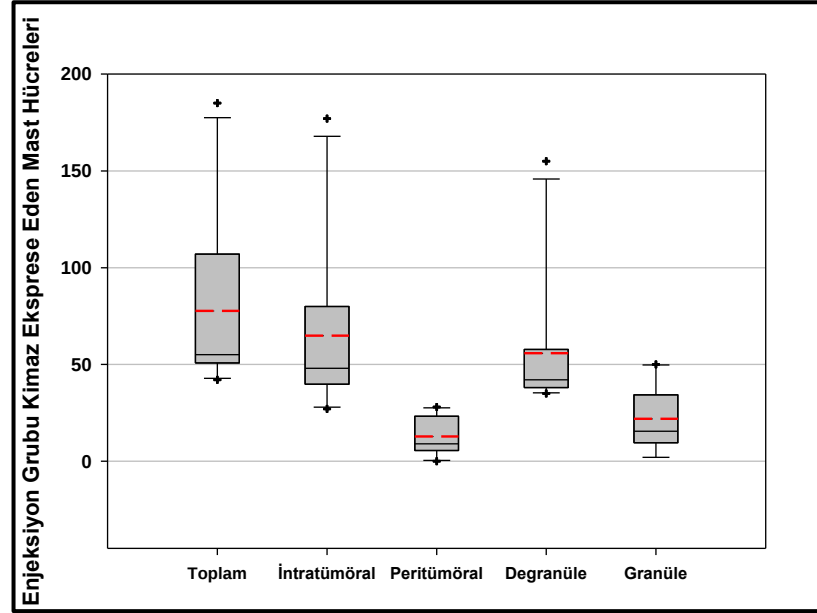




Şekil 4-31: Gavaj grubu sıçan meme tümöründe kimaz eksprese eden (triptaz-kimaz pozitif) mast hücreleri, **(A-B)** Kimaz eksprese eden mast hücrelerinin tümör bölgesine infiltrasyonu, **(C)** Peritümöral kimaz eksprese eden mast hücreleri, **(D)** İntratümöral kimaz eksprese eden mast hücreleri, **(E)** Granüle kimaz eksprese eden mast hücresi, **(F)** Degranüle kimaz eksprese eden mast hücreleri ve granülleri, **siyah ok:** Degranüle kimaz eksprese eden mast hücreleri, **kırmızı ok:** Granüle kimaz eksprese eden mast hücreleri, **sarı ok:** Serbest halde gözlenen kimaz içeren granüller

E grubunda bulunan hayvanlardaki meme tümörü dokusunda toplam triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı ortalama 7,77 olarak gözlenmiştir. Bu hücrelerin 6,49 tanesi intratümöral olarak yerleşim gösterirken 1,28 tanesi peritümöral olarak yerleşim göstermiştir. Ortalama degranüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı 5,58 iken granüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı 2,19 olarak bulunmuştur (Şekil 4-33). E grubu kimaz eksprese eden mast hücre sayıları Grafik 4-32’de verilmiştir.

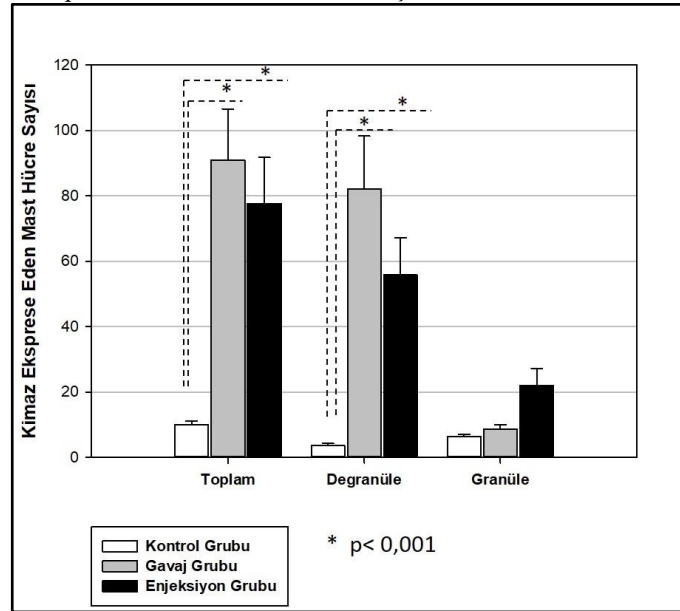
Grafik 4-32: Enjeksiyon grubu kimaz eksprese eden (triptaz-kimaz) mast hücrelerinin istatistiksel dağılım grafiği



Şekil 4-33: Sıçan enjeksiyon meme tümörü grubunda kimaz eksprese eden (triptaz-kimaz mast hücrelerinin) mast hücrelerinin varlığı, *Horseradish Peroksidaz, DAB*, (A-B) Kimaz eksprese eden mast hücrelerinin tümör içindeki infiltrasyonu, (C) İntratümöral degranüle kimaz eksprese eden mast hücreleri, (D) Peritümöral kimaz eksprese eden granüle ve degranüle mast hücreleri

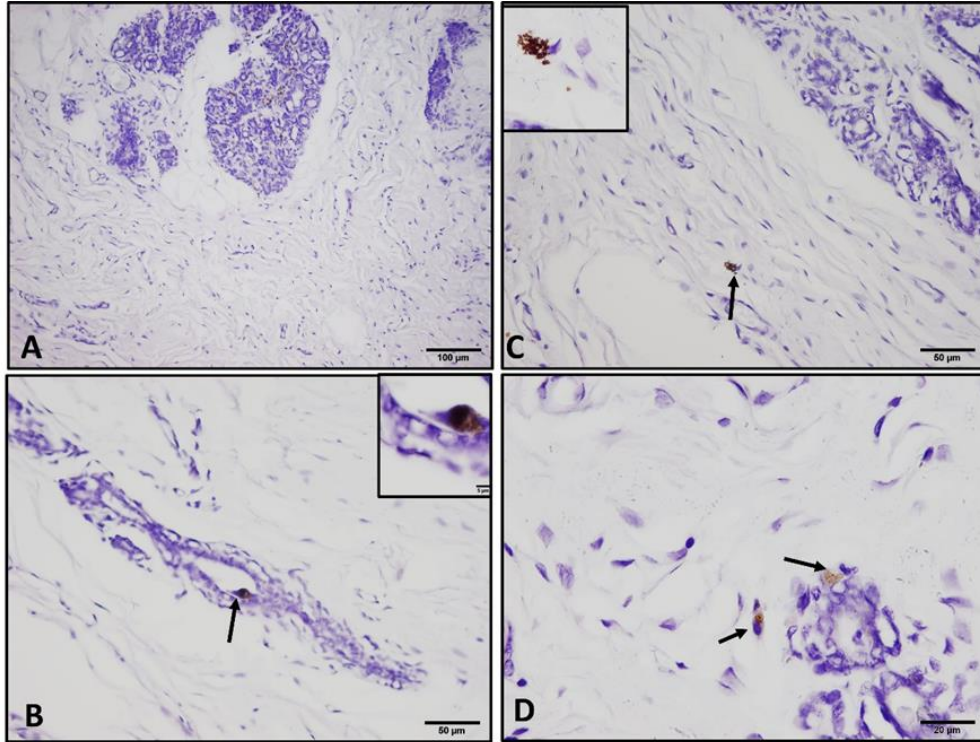
İstatistiksel olarak kontrol grubu ile meme tümörü dokuları toplam triptaz-kimaz mast hücre sayıları açısından karşılaştırıldığında G grubunda 9,09 kat artış ($p<0,001$), E grubunda ise 7,77 kat artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. G ve E grubu kendi içinde triptaz-kimaz pozitif mast hücreleri yönüyle incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,349$). Kontrol sıçan meme dokusu ile G ve E grubundaki meme tümörleri granüle triptaz-kimaz mast hücre sayıları yönüyle kıyaslandığında sırasıyla 1,35 ve 3,42 kat artış gözlenmiş ve her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,343$; $p:0,075$). G ve E grubu kendi içinde granüle triptaz-kimaz mast hücre yönüyle istatistiksel olarak değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı ($p: 0,026$). Degranüle triptaz-kimaz mast hücre sayıları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında G ve E grubunda kontrol meme dokusuna oranla sırasıyla 22,83 ve 15,5 kat artmıştır. Bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$; $p<0,001$). G ve E grubu kendi arasında degranüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre yönünden değerlendirildiğinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,074$) (Grafik 4-33).

Grafik 4-33: Kimaz eksprese eden mast hücrelerinin sıçan meme tümörlerinde istatistik grafiği



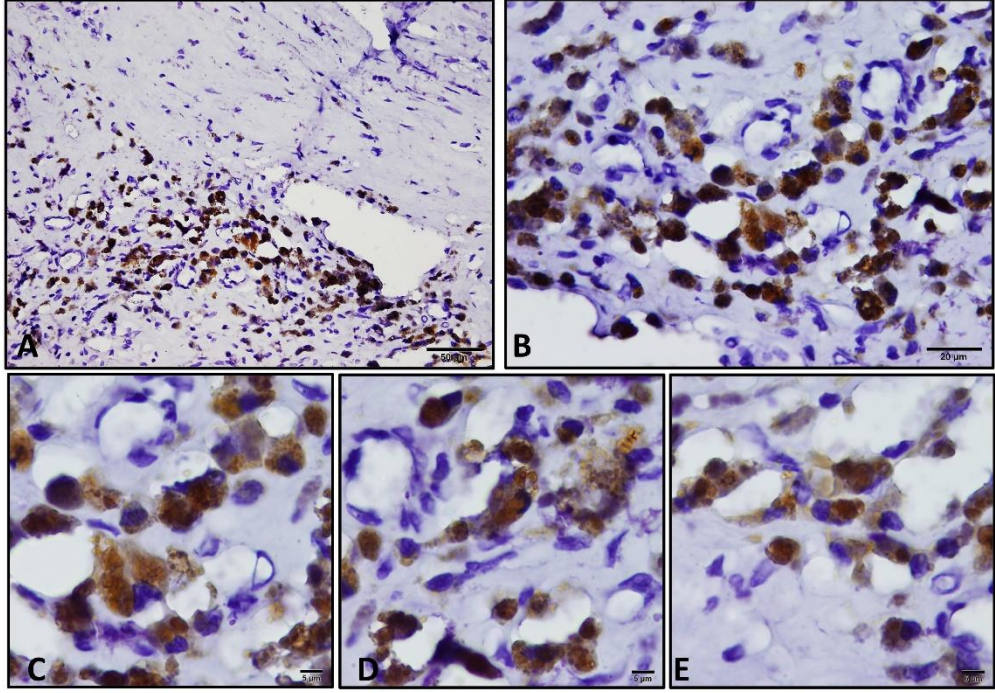
4.3.4.4. Köpek Meme Tümörlerinde Kimaz Eksprese Eden Mast Hücre ve Triptaz-Kimaz Pozitif Mast Hücrelerinin Sayıları

Köpek kontrol meme bezi dokusunda toplam triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı ortalama 1,02, granüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı 0,74 ve degranüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı ise 0,28 olarak sayılmıştır (Şekil 4-34).



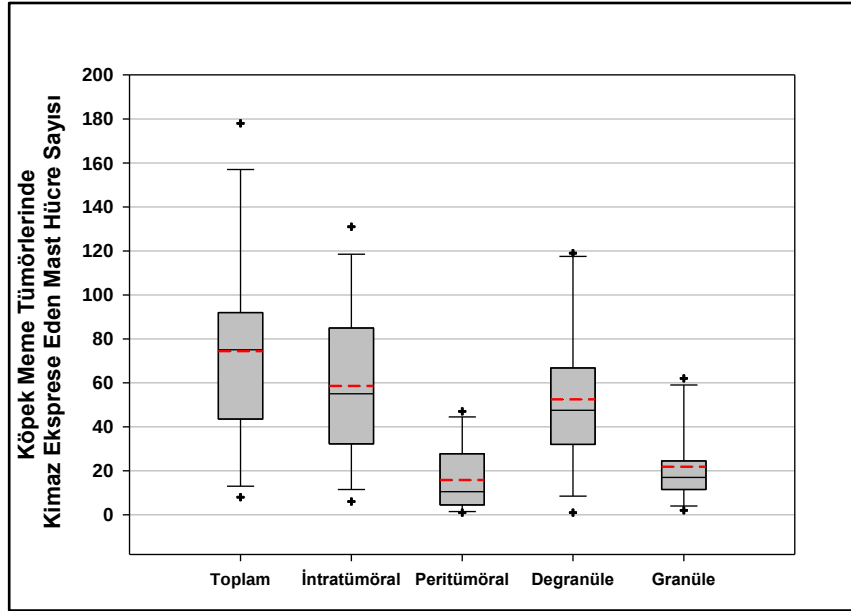
Şekil 4- 34: Köpek sağlıklı meme dokusunda kimaz eksprese eden (triptaz-kimaz mast hücreleri) mast hücreleri, **siyah ok:** Kimaz eksprese eden mast hücreleri, *Horseradish Peroksidaz, DAB*

Köpek meme tümörü olgularında toplam triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı ortalama 8, 61 olarak sayılmıştır. Bu mast hücrelerinin 6,79 tanesi intratümöral olarak yerleşim gösteren triptaz-kimaz pozitif mast hücresi, 1,82 tanesinde peritümöral olarak yerleşim gösteren triptaz-kimaz pozitif mast hücreleri olduğu bulunmuştur. Ortalama degranüle triptaz-kimaz mast hücre sayısı 6 iken granüle triptaz-kimaz mast hücre sayısı 2,61 olarak sayılmıştır (Şekil 4-35). Kimaz eksprese eden mast hücre sayıları detaylı olarak Grafik 4-34'te gösterilmiştir.



Şekil 4-35: Köpek meme tümörlerinde kimaz eksprese eden (triptaz-kimaz) mast hücreleri, *Horseradish Peroksidaz*, DAB, (A-B) Tümör bölgesinde bulunan kimaz eksprese eden mast hücreleri, (C-E) Kimaz eksprese eden mast hücrelerinin köpek meme tümörlerinde 4000x büyütmedeki görünüşleri

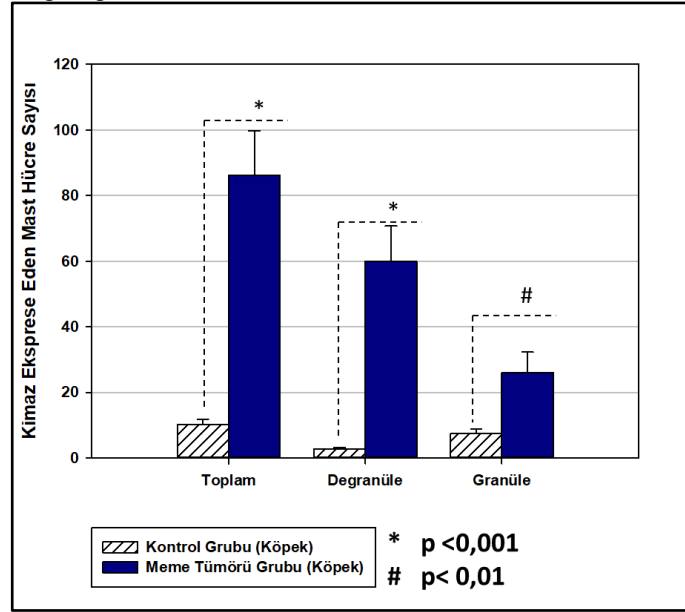
Grafik 4-34: Köpek meme tümörlerinde kimaz eksprese eden mast hücre sayılarının görünümü. + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.



Kontrol meme bezi dokusu ile meme tümörleri arasında toplam triptaz-kimaz mast hücre sayısı arasında 8,44 kat artış gözlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p < 0,001$). Granüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayıları bu iki

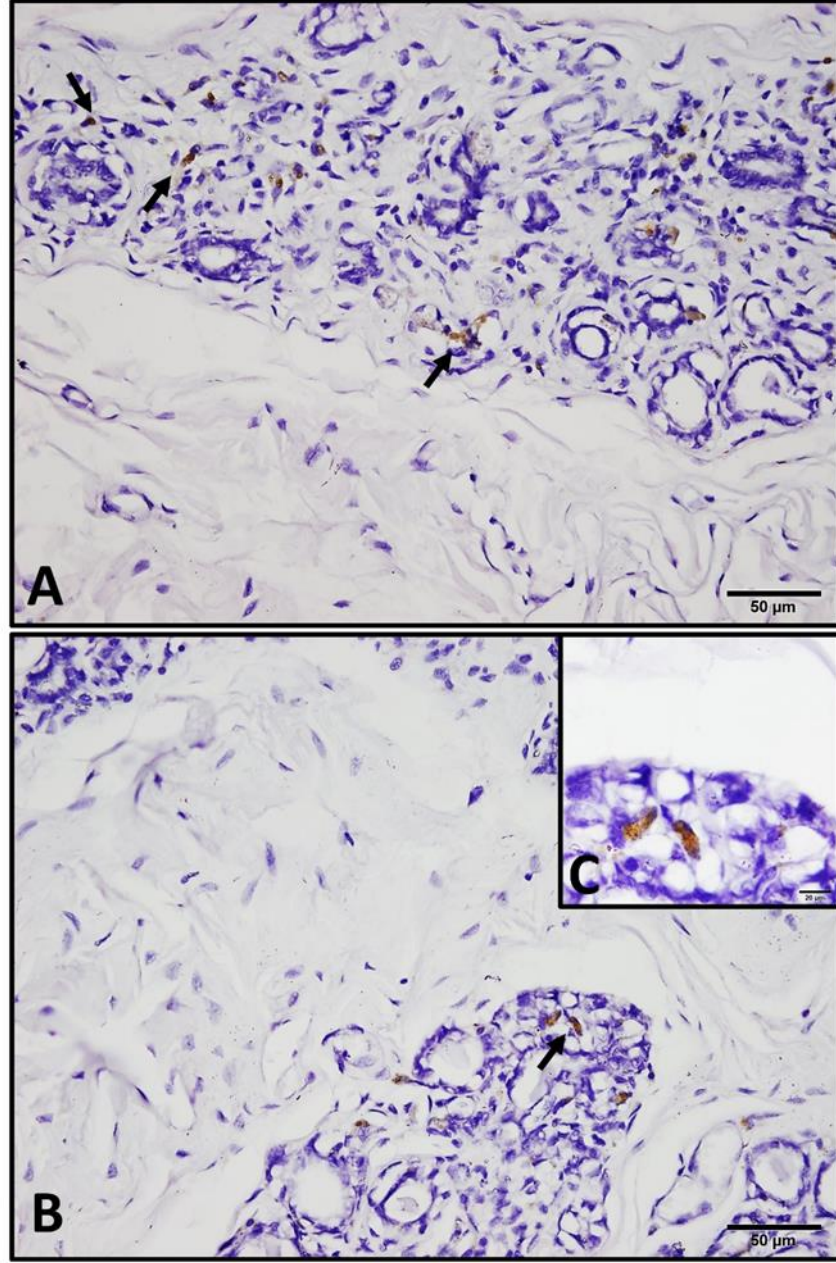
grup arasında karşılaştırıldığında meme tümörü dokularında kontrol meme bezi dokusuna göre 3,52 kat artış göstermiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p: 0,005$). Degranüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayıları kontrol ile tümörlü dokular karşılaştırıldığında 21,42 kat artış gözlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Köpek meme tümörü dokularında triptaz-kimaz pozitif mast hücre istatistik grafiği Grafik 4-35'te detaylı olarak verilmiştir.

Grafik 4-35: Kimaz eksprese eden (Triptaz-kimaz pozitif) mast hücre sayılarının köpek meme tümöründeki istatistik grafiği



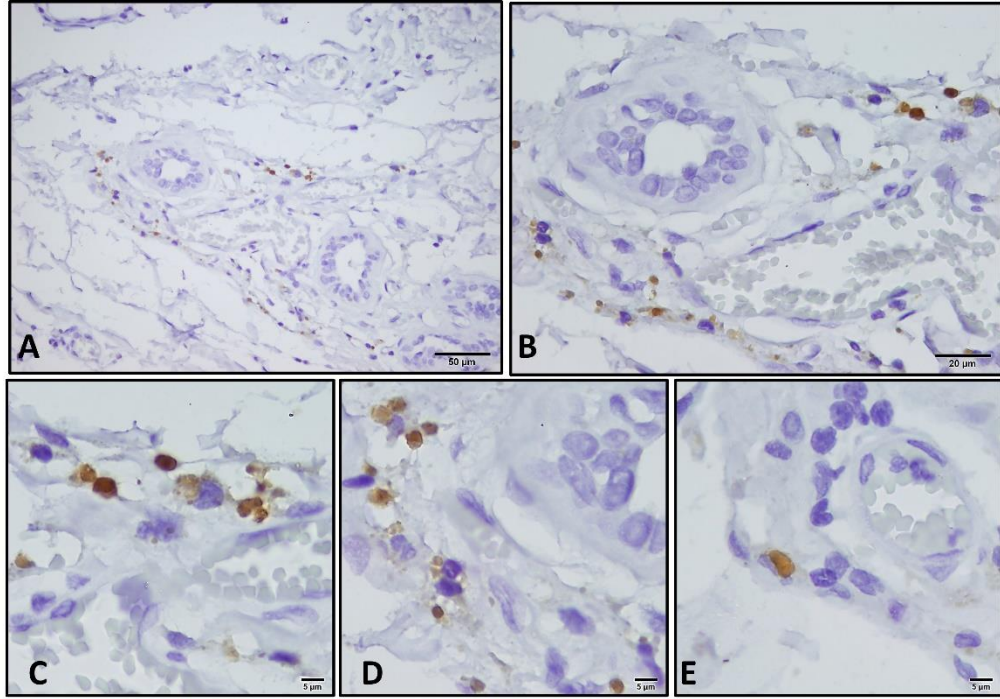
4.3.4.5. Kedi Meme Tümörlerinde Kimaz Eksprese Eden Mast Hücrelerinin ve Triptaz-Kimaz Pozitif Mast Hücrelerinin Sayıları

Kontrol kedi meme bezinde toplam triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayıları ortalama 1,24 olarak sayılırken, granüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı ortalama 0,86, degranüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı ortalama 0,38 olarak sayılmıştır (Şekil 4-36).



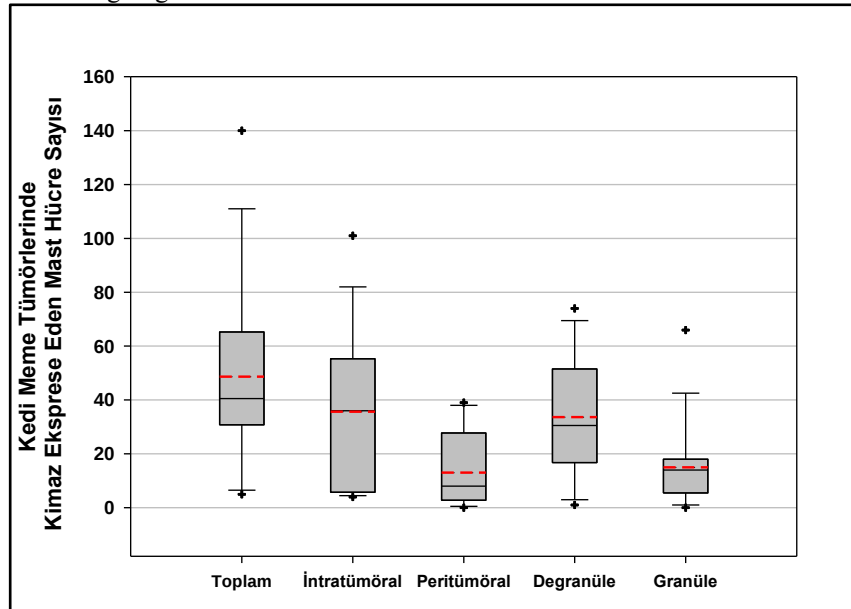
Şekil 4-36: Kedi kontrol meme dokusunda kimaz eksprese eden (triptaz-kimaz) mast hücreleri, *Horseradish Peroksidaz, DAB*, **siyah ok:** Kimaz eksprese eden mast hücreleri

Kedi meme tümörü olgularında toplam triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı ortalama 5,01 olarak bulunmuştur. Bu hücrelerin 3,58 tanesi intratümöral yerleşimli iken 1,43 tanesi ise peritümöral yerleşim göstermektedir. Ortalama degranüle triptaz-kimaz mast hücre sayısı 3,36 iken ortalama granüle triptaz-kimaz mast hücre sayısı 1,65 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-37). Kedi meme tümörlerinde kimaz eksprese eden mast hücre sayıları Grafik 4-36’da detaylı olarak verilmiştir.



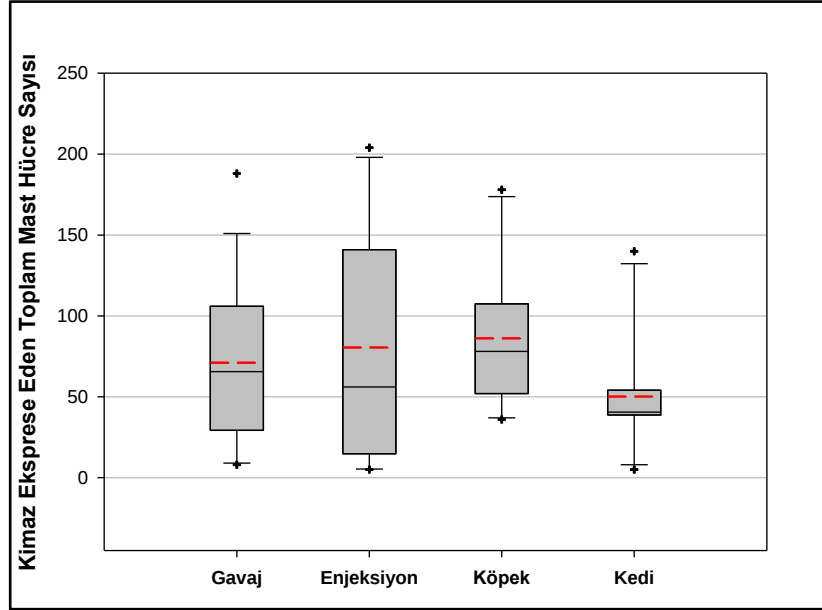
Şekil 4-37: Kedi meme tümörlerinde kimaz eksprese eden (triptaz-kimaz pozitif) mast hücrelerin gösterimi, *Horseradish Peroksidaz, DAB*, (A-B) Tümör bölgesinde kimaz eksprese eden az sayıda mast hücrelerinin varlığı, (C-E) Kimaz eksprese eden mast hücrelerinin 4000x büyütmedeki görüntüleri

Grafik 4-36: Kedi meme tümörlerinde kimaz eksprese eden mast hücre sayılarının istatistiksel dağılım grafiği. + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.

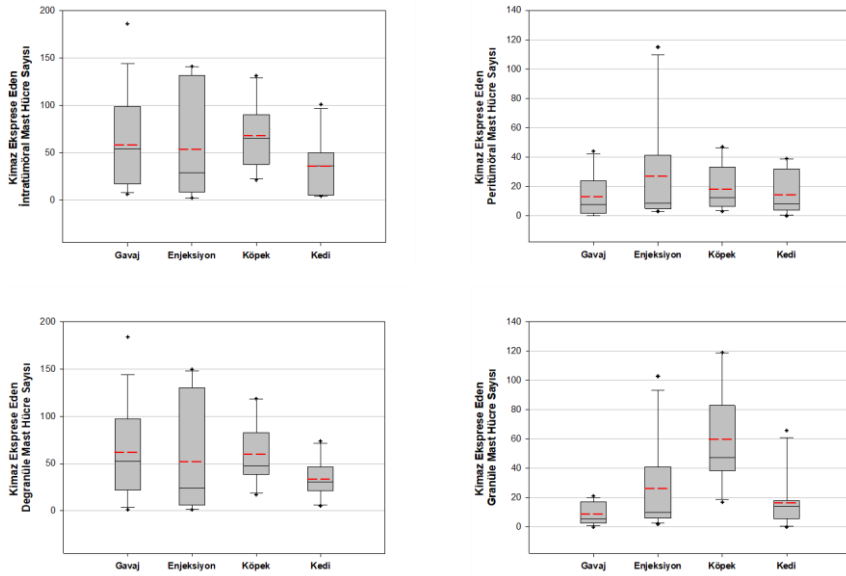


Kimaz eksprese eden mast hücrelerinin hayvan türlerine göre dağılım grafikleri Grafik 4-37 ve Grafik 4-38’de verilmiştir.

Grafik 4-37: Kimaz ksprese eden (triptaz kimaz pozitif) toplam mast hücre sayılarının türlere göre dağılım grafiği, + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.



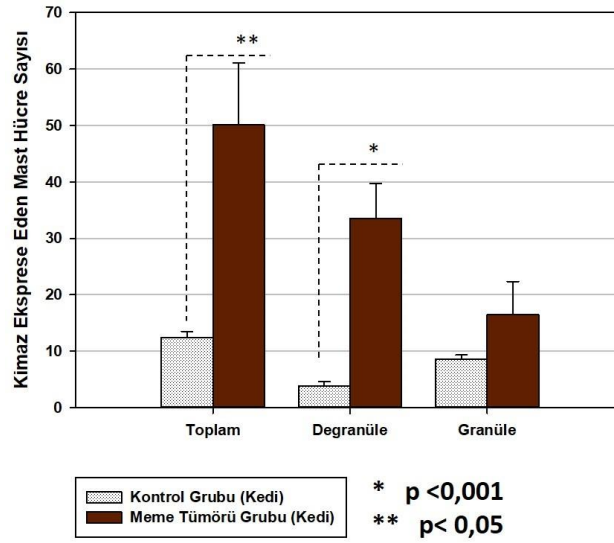
Grafik 4-38: İntratümöral, peritümöral, degranüle ve granüle kimaz eksprese eden (triptaz kimaz pozitif) mast hücrelerinin türlere göre dağılım grafiği, + değer grubun en yüksek ve düşük sayılarını, siyah düz çizgi medyan değerini, kırmızı kesik çizgi ise ortalama değeri göstermektedir.



Kedi kontrol grubu ile meme tümörü grubu toplam triptaz-kimaz mast hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında meme tümörü dokularında kontrol dokularına göre 4,04 kat artış gözlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p: 0,013$). Granüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısı iki grup arasında karşılaştırıldığında meme tümörü dokularında 1,91 kat artış gözlenmiş ve

istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,440$). Degranüle triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayıları iki grup arasında karşılaştırıldığında meme tümörü dokularında 8,84 katlık bir artış gözlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Kedi meme tümörlerinde triptaz-kimaz mast hücre sayısı istatistik grafiği Grafik 4-39’da verilmiştir.

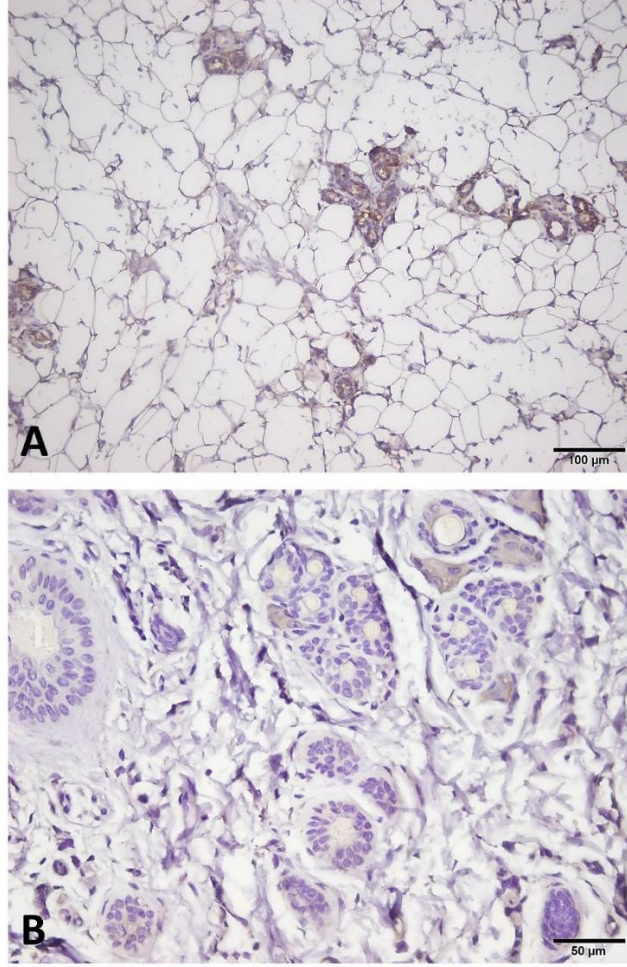
Grafik 4-39: Kimaz eksprese eden mast hücrelerinin istatistik grafiği



4.3.4.6. Deneysel Olarak Oluşturulan Sıçan Meme Tümörlerinde TNF-alfa Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Sıçan meme tümörlerinde TNF-alfa ekspresyonunu değerlendirmek için hücreler, boyanmanın yoğunluğu açısından 0, 1, 2 ve 3 olarak ve boyanan hücre yüzdesi olarak 1: %0 ile 10 arasında pozitif hücre, 2: %10-50 arasında pozitif boyanan hücre, 3: %50-80 arasında pozitif boyanan hücre ve 4: %80-100 arasında pozitif boyanan hücre olarak değerlendirilmiştir. Bunların çarpımı sonucu çıkan değerler 9-12 arasında ise güçlü pozitif reaksiyon, 3-8 arasında ise orta pozitif reaksiyon ve 0-3 arasında ise zayıf pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

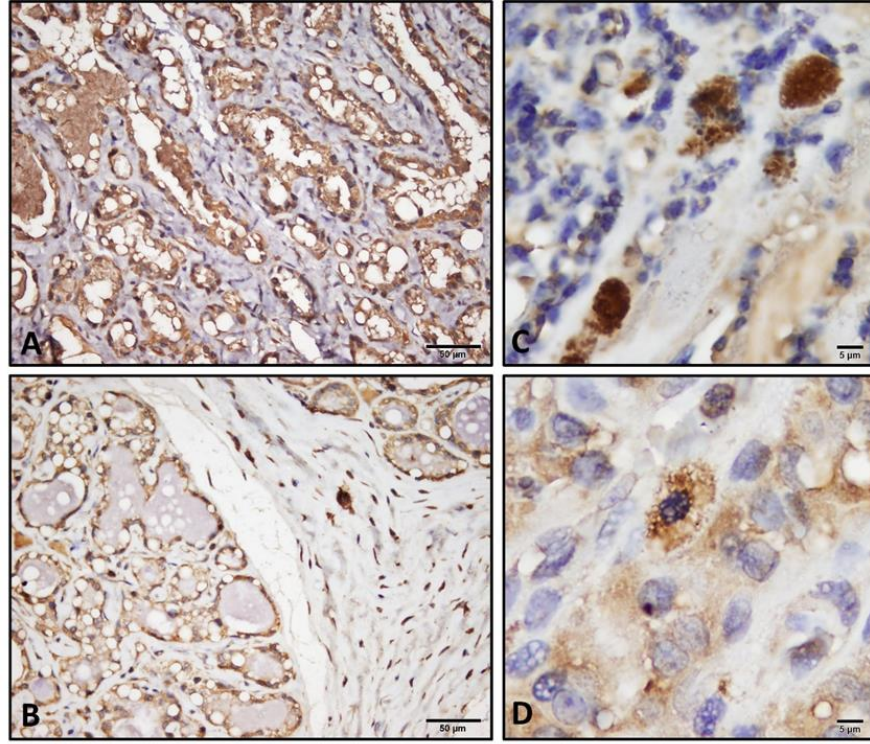
Kontrol sıçan meme bezi dokusunda TNF-alfa değeri en yüksek 3 en düşük 0 bulunurken ortalaması 1,4 olarak hesaplanmış ve zayıf pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-38).



Şekil 4-38: Sıçan kontrol meme bezinde TNF-alfa ekspresyonu

G grubunda, TNF alfa ekspresyonuna bakıldığında 15 adet örneğin 9 tanesi pozitiflik değeri olarak 12, 3 tanesinde 9, 1 tanesinde 8 ve 1 tanesinde de 0 bulunmuş, bir adet vaka değerlendirilememiştir, ortalama değer olarak ise 10,21 bulunmuştur. Bu bulgular sonucunda G grubunun TNF-alfa ekspresyonu güçlü pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

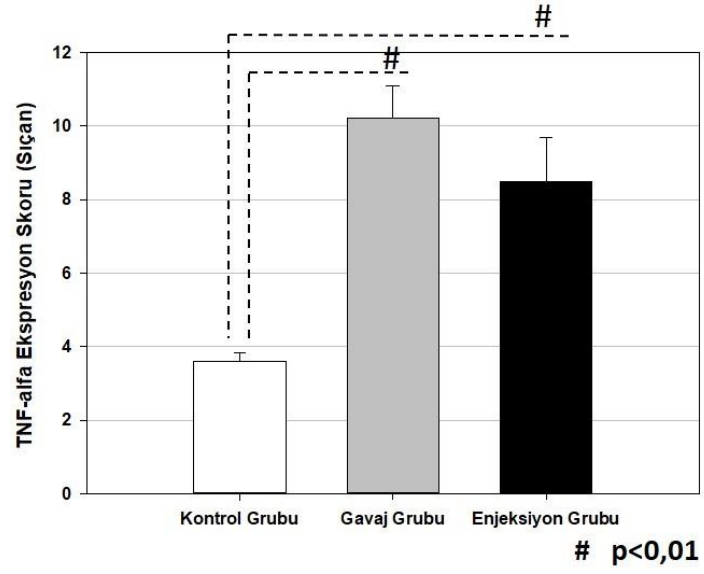
E grubunda, TNF alfa ekspresyonunu incelediğimizde, 10 adet tümör örneğinin 4 tanesinde 12, 2 tanesinde 9, 1'er tane örneklerde ise 8, 6, 2 ve 3 değerleri bulunmuştur. Bu grubun ortalama değeri 8,5 olarak bulunmuş ve güçlü pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-39).



Şekil 4-39: Sıçan meme tümöründe yüksek pozitiflik gösteren TNF-alfa ekspresyonu, **(A)** Neoplastik epitel hücre sitoplazmalarında TNF-alfa ekspresyonu, **(B)** Neoplastik epitel hücre sitoplazmalarında TNF-alfa ekspresyonu ve TNF-alfa pozitif mast hücresi, **(C)** TNF-alfa eksprese eden mast hücreleri, **(D)** TNF-alfa eksprese eden mast hücresi ve hemen yanında TNF-alfa pozitif tümör hücreleri

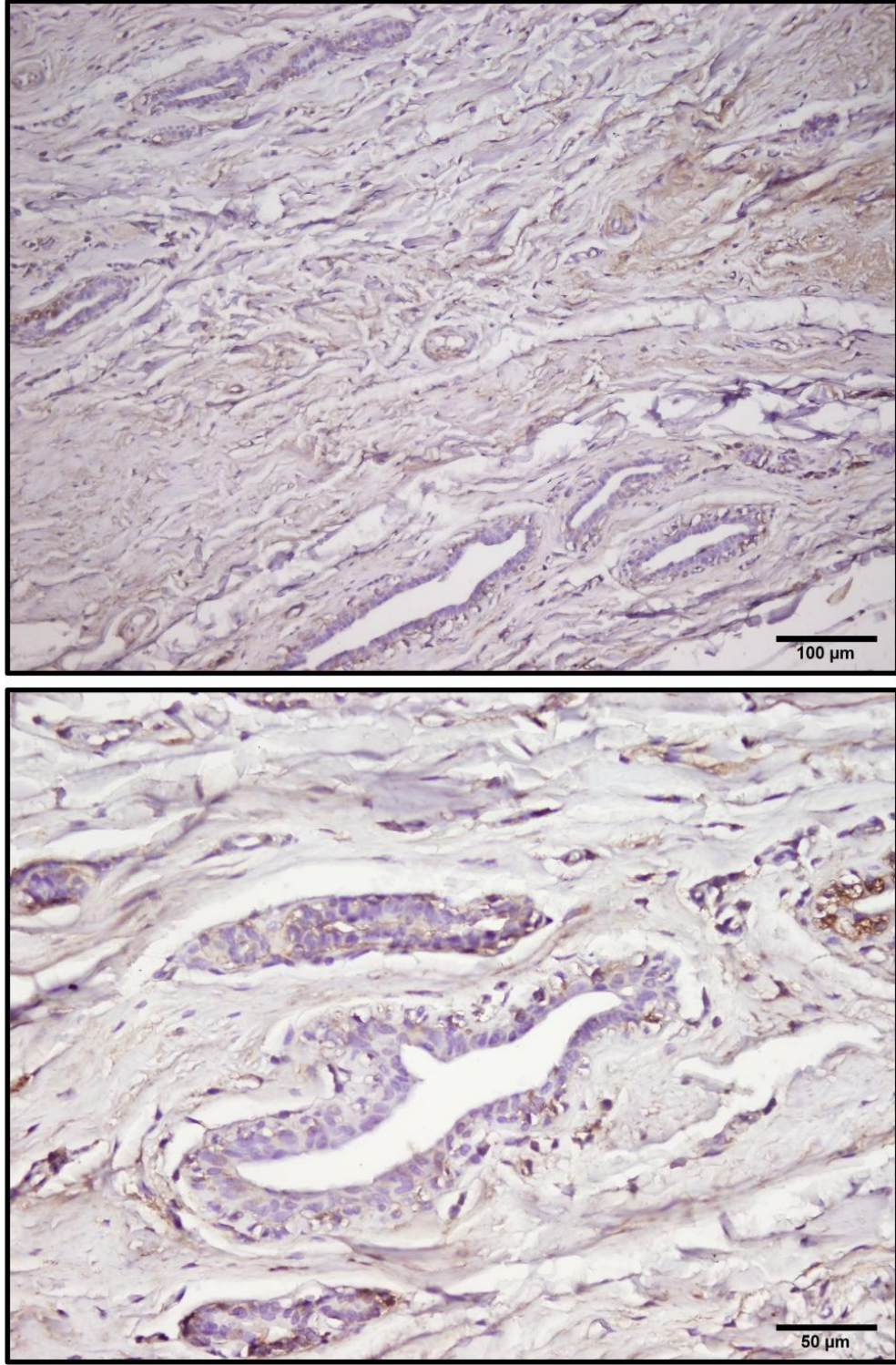
İstatiksel olarak kontrol grubu ile G ve E grubu TNF-alfa yönünden değerlendirildiğinde iki grup arasında kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p: 0,003$, $p: 0,005$). G ve E grubu kendi içinde istatiksel olarak TNF-alfa ekspresyonu yönünden karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p: 0,235$) (Grafik 4-40).

Grafik 4-40: Sıçan meme tümörü dokularında TNF-alfa ekspresyonu istatistik tablosu



4.3.4.7. Köpek Meme Tümörlerinde TNF-alfa Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

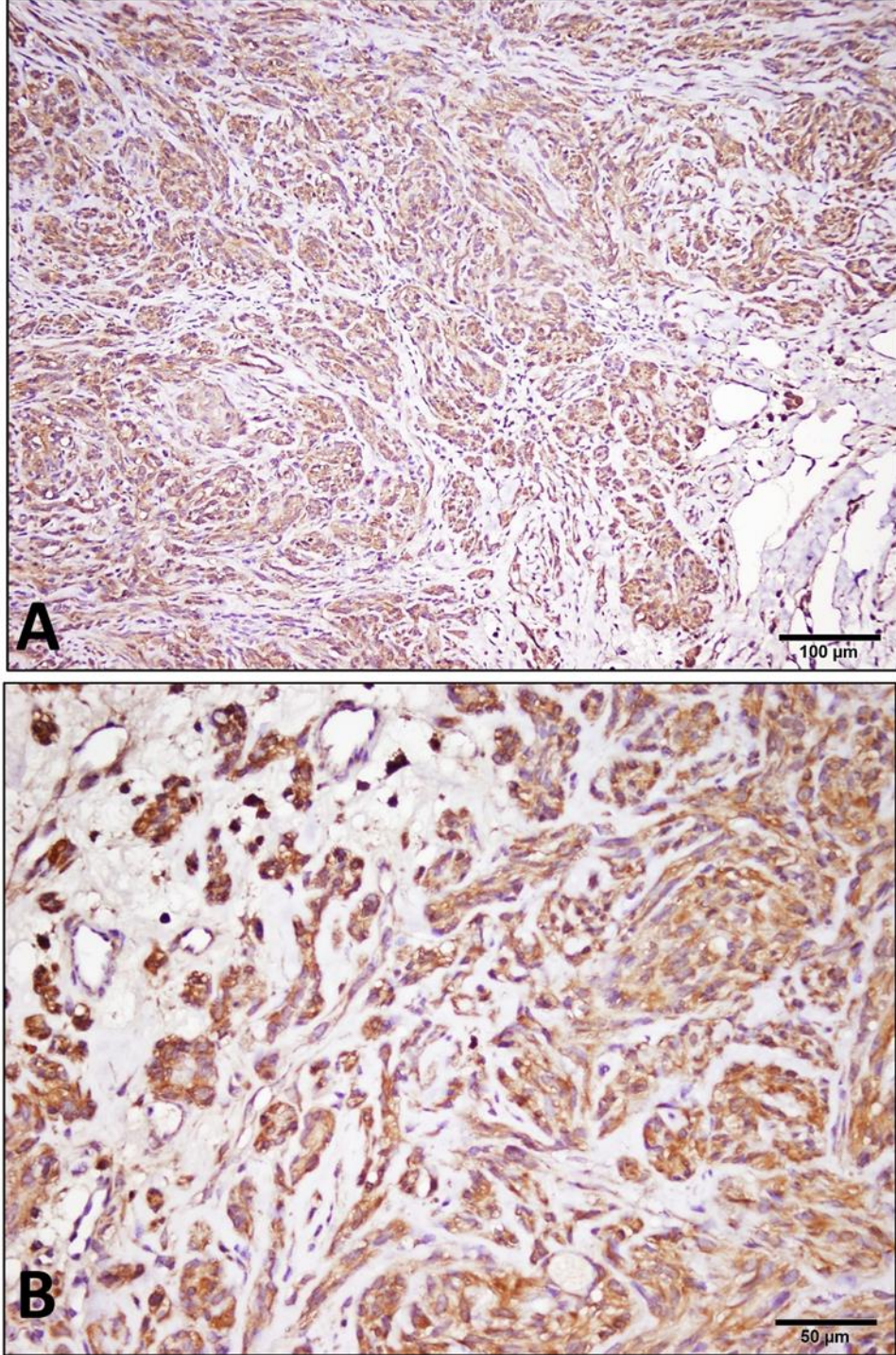
Köpek kontrol dokusu olan sağlıklı meme bezi TNF-alfa ekspresyonu skoru 1 ile 6 arasında değişmektedir ve ortalaması 3,4 bulunmuştur (Şekil 4-40).



Şekil 4-40: Köpek kontrol meme bezinde TNF-alfa ekspresyonu, *Horseradish Peroksidaz*, DAB

Köpeklerdeki meme tümörü preparatlarının TNF-alfa ekspresyonunu incelediğimizde toplam 10 adet örneğin 4 tanesinde 12 değeri, 1 tanesinde 9 değeri, 1 tanesinde 8 değeri, 3 tanesinde 6 değeri ve 2 tanesinde de 4 değeri bulunmuştur. Bu

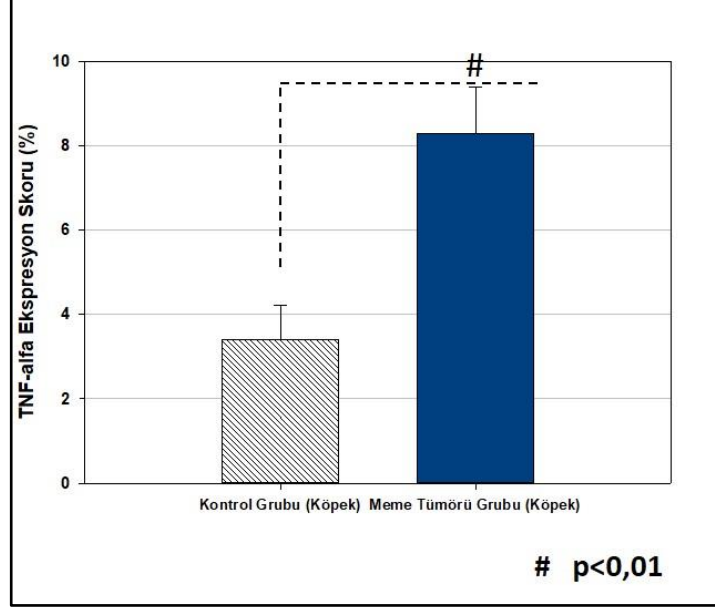
grubun ortalama değeri 8,27 bulunarak orta pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-41).



Şekil 4-41: Köpek meme tumoründe güçlü pozitiflik gösteren TNF-alfa değeri, *Horseradish Peroksidaz, DAB*

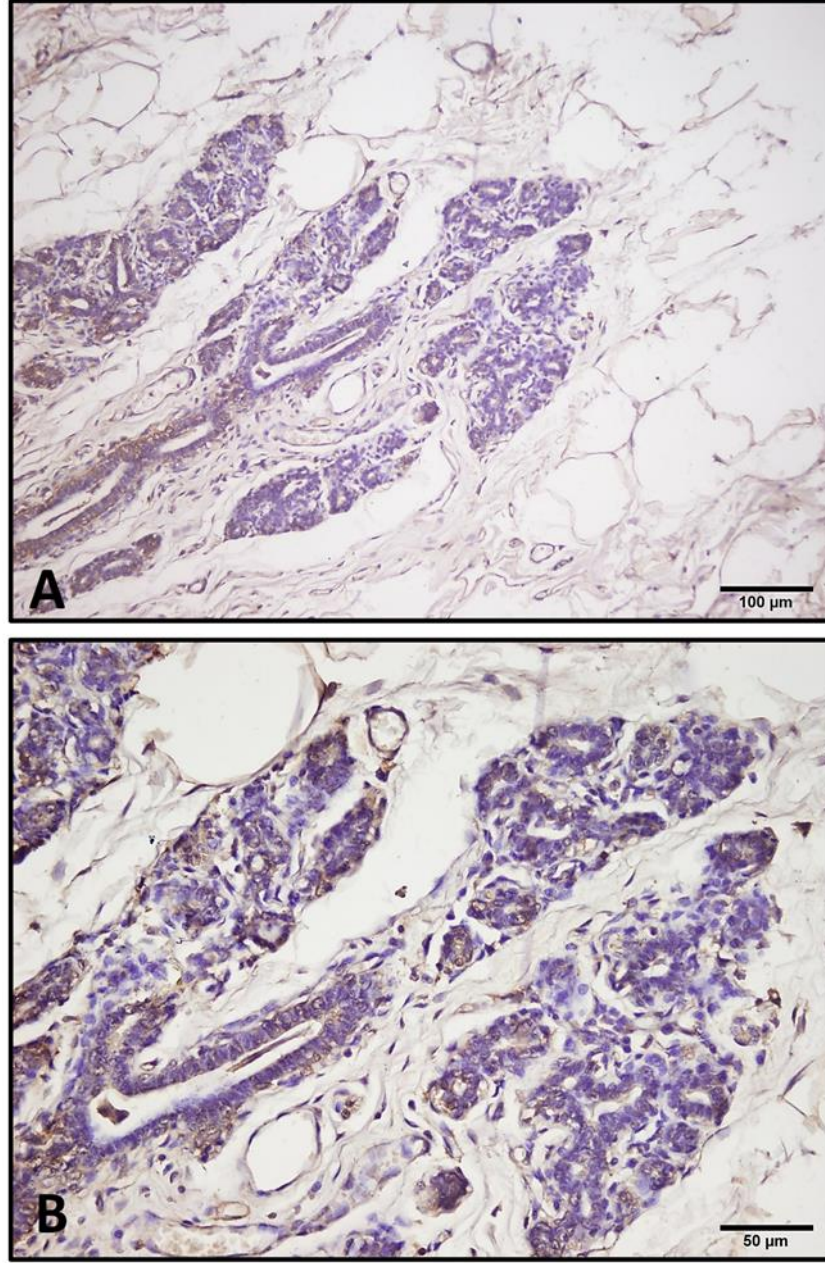
İstatistiksel olarak kontrol ile meme tümörü dokusu TNF-alfa ekspresyonu yönünden değerlendirildiğinde anlamlı bir fark bulunmuştur ($p: 0,008$) (Grafik 4-41).

Grafik 4-41: Köpek meme tümörlerinde TNF-alfa ekspresyonunun istatistik grafiği



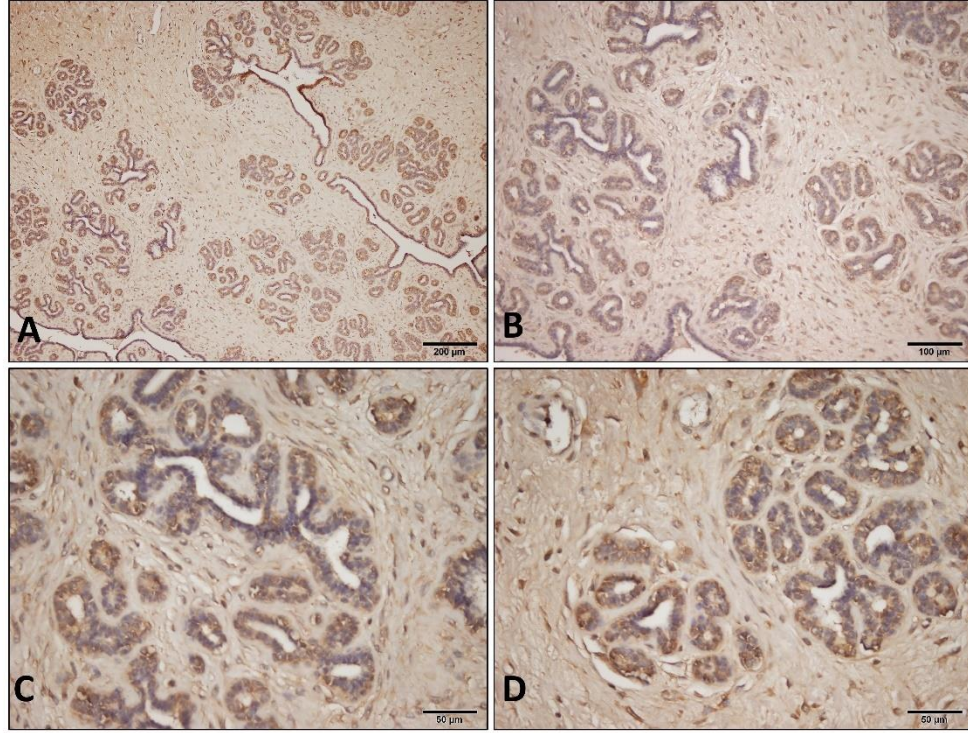
4.3.4.8. Kedi Meme Tümörlerinde TNF-alfa Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Kontrol grubu olarak kullanılan kedi meme bezinde TNF-alfa ekspresyon değeri ortalama 4,4 çıkmış ve orta pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-42).



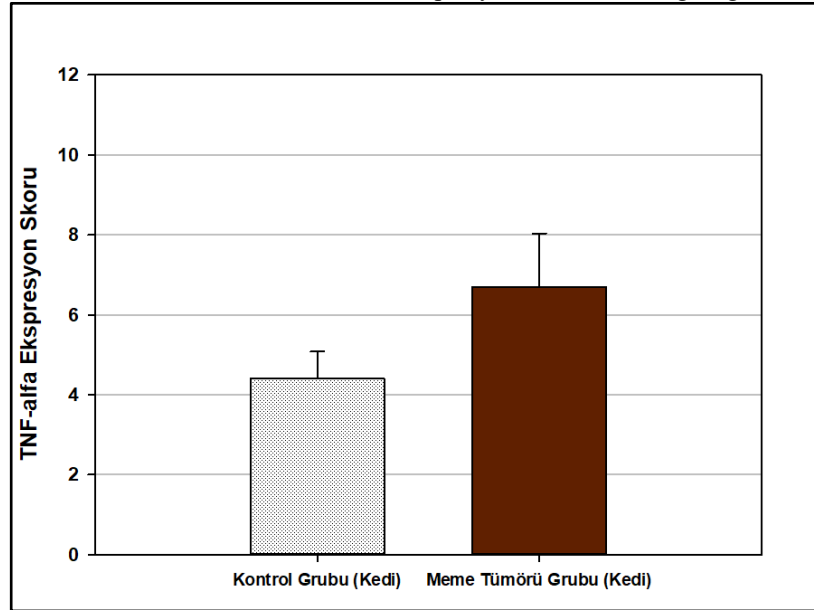
Şekil 4-42: Kedi kontrol meme bezinde TNF-alfa ekspresyonu, *Horseradish Peroksidaz*, *DAB*

Kedi meme tümörü dokularının TNF-alfa ekspresyonu değerlendirildiğinde, 10 tane meme tümörü dokusunun 3 tanesinde 12, 2 tanesinde 8, 2 tanesinde 4, 1 tanesinde 3 ve 2 tanesinde 2 değeri gözlenmiştir. Ortalama TNF-alfa ekspresyonuna bakıldığında ise bu değerin 6,7 olduğu bulunmuştur. Bu bulgular sonucunda ise TNF-alfa ekspresyonunu kedilerde orta pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-43). İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0.513$) (Grafik 4-42).



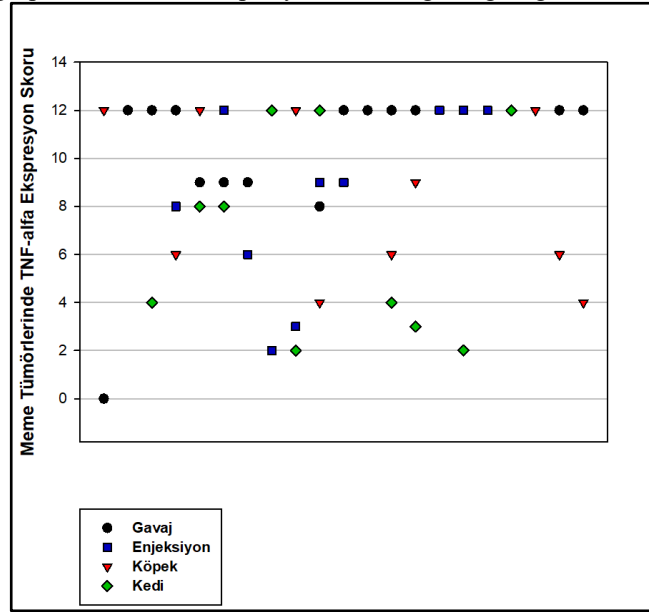
Şekil 4-43: Kedi meme tümörlerinde yüksek pozitiflik gösteren TNF-alfa değeri, Horseradish Peroksidaz, DAB

Grafik 4-42: Kedi meme tümörlerinde TNF-alfa ekspresyonunun istatistik grafiği



Tüm grupların detaylı TNF-alfa ekspresyon skorları skorları Grafik 4-43'te verilmiştir.

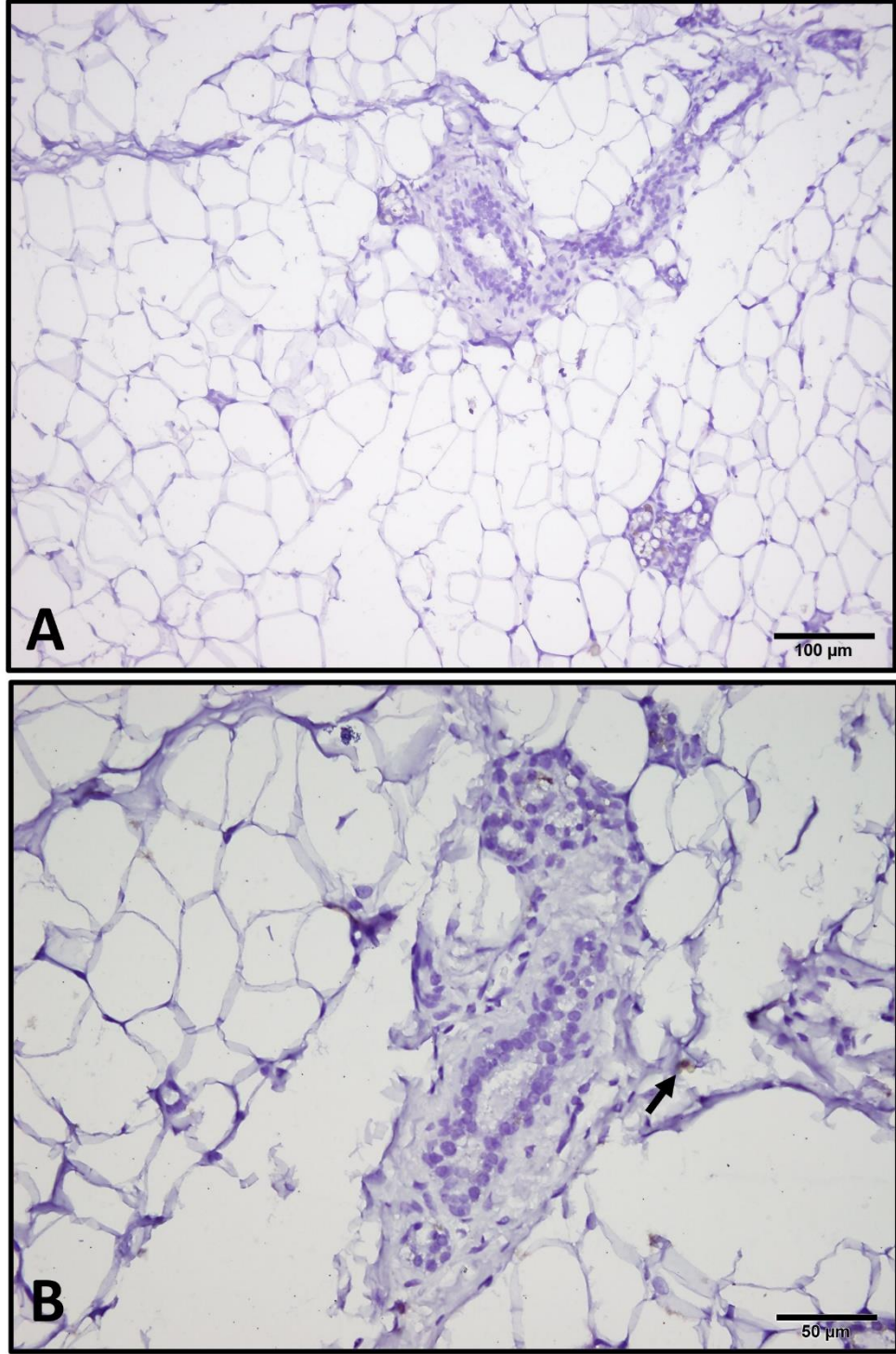
Grafik 4-43: Tüm grupların TNF-alfa ekspresyon skoru dağılım grafiği



4.3.4.9. Deneysel Olarak Oluşturulan Sıçan Meme Tümörlerinde MMP-9 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Sıçan meme tümörlerinde MMP-9 ekspresyonunu değerlendirmek için hücreler, boyanmanın yoğunluğu açısından 0, 1, 2 ve 3 olarak ve boyanan hücre yüzdesi olarak 1: %0 ile 10 arasında pozitif hücre, 2: %10-50 arasında pozitif boyanan hücre, 3: %50-80 arasında pozitif boyanan hücre ve 4: %80-100 arasında pozitif boyanan hücre olarak değerlendirilmiştir. Bunların çarpımı sonucu çıkan değerler 9-12 arasında ise güçlü pozitif reaksiyon, 3-8 arasında ise orta pozitif reaksiyon ve 0-3 arasında ise zayıf pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

Kontrol meme bezi dokusunun MMP-9 ekspresyonu değerlendirildiğinde tüm preparatlarda MMP-9 değeri 0 olarak bulunmuştur (Şekil 4-44).

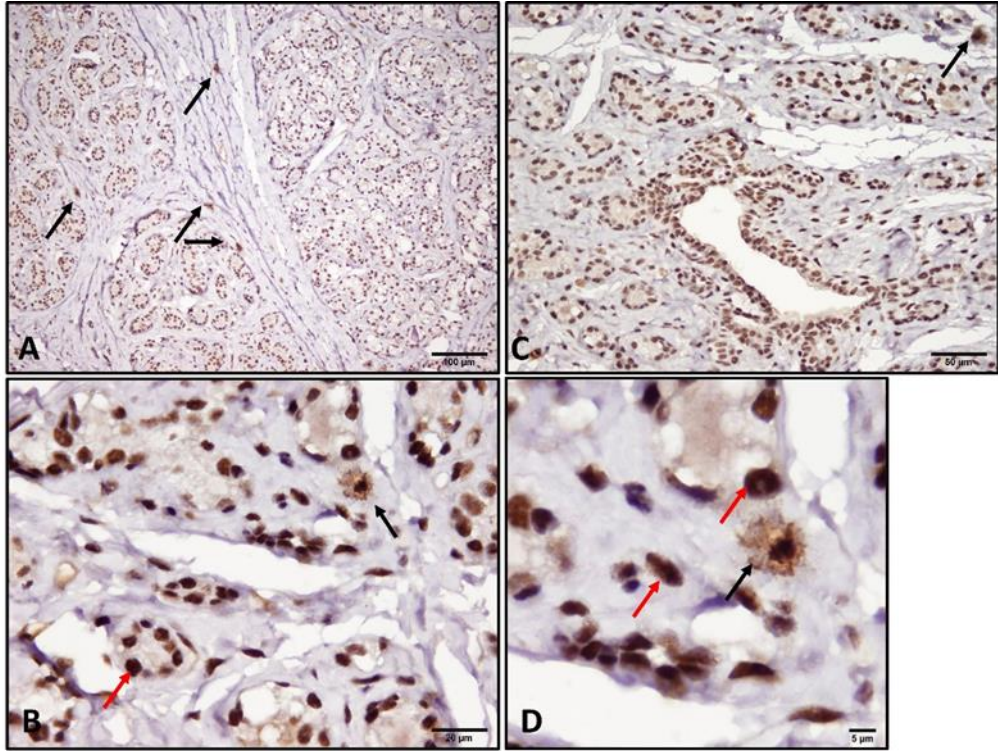


Şekil 44-44: Sıçan kontrol meme bezinde MMP-9 ekspresyonu, *Horseradish Peroksidaz*, DAB

G grubunda MMP-9 ekspresyonuna bakıldığında, 15 adet vakanın 14'ünde değerlendirme yapılabildiği ve bunların 3 tanesinde 12, 2 tanesinde 6 ve 1 tanesinde 4 değeri bulunmuş, toplam 8 tanesinde ise MMP-9 ekspresyonu 0 olarak bulunmuştur. MMP-9 ekspresyonunun ortalama değerine bakıldığında ise bu değer 3,71 olarak

hesaplanmıştır ve bunun sonucunda da orta pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

E grubunda 10 adet meme tümörü olgusunda MMP-9 ekspresyonuna bakıldığında, 3 tane meme tümörü 12 olarak değerlendirilirken 7 tanesi ise 0 olarak değerlendirilmiştir. MMP-9 ekspresyonunun ortalama değeri 3,27 olarak hesaplanmış ve orta pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-45).

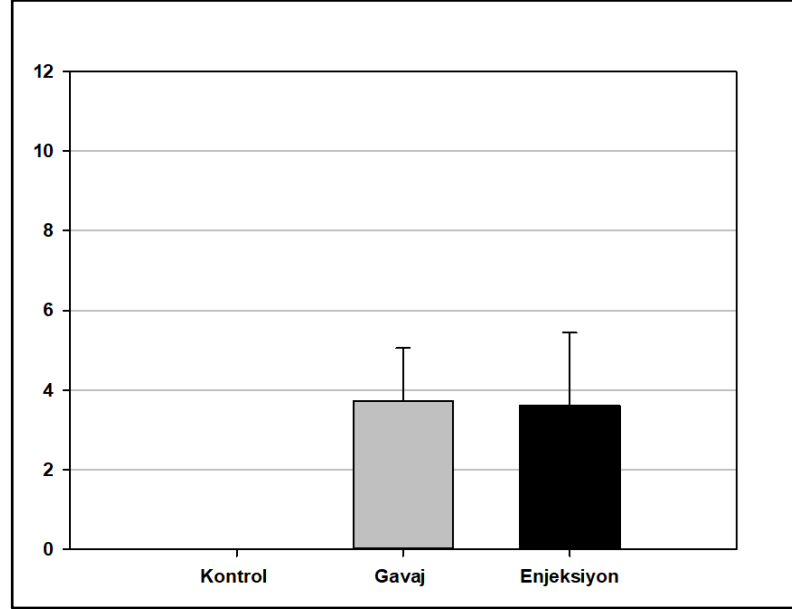


Şekil 4-45: Deneysel olarak oluşturulan sıçan meme tümöründe nükleer lokalizasyon gösteren MMP-9 pozitif neoplastik hücreler, **kırmızı ok:** Nükleer boyanma gösteren MMP-9 pozitif neoplastik hücreler, **siyah ok:** MMP-9 pozitif mast hücresi

G ve E grubu kontrol grubu ile MMP-9 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında hem G grubunda hem de E grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,186$; $p: 0,371$). G ve E grubu birbirleri ile MMP-9

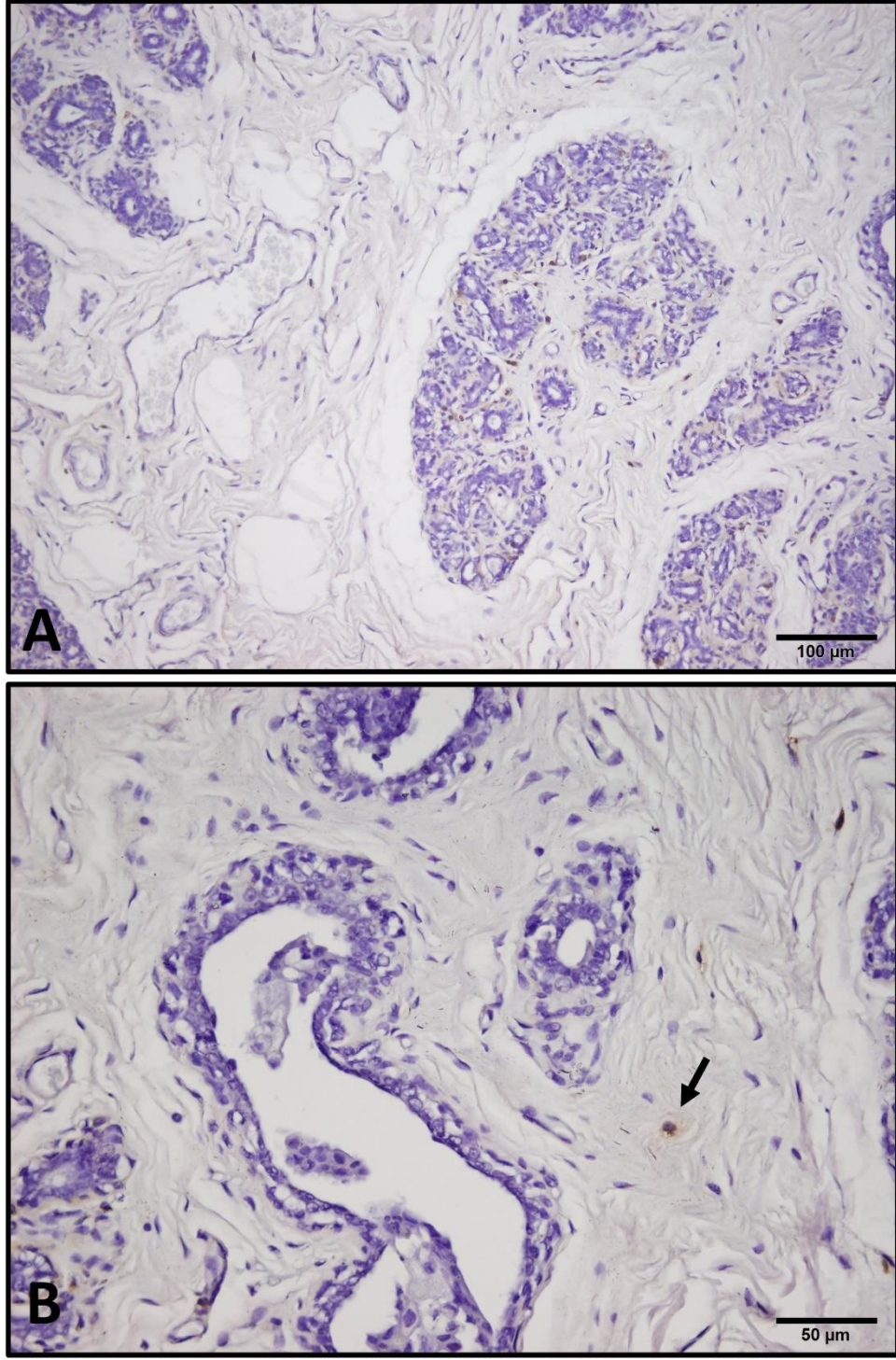
ekspresyonu bakımından kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p:0,796$) (Grafik 4-44).

Grafik 4-44: Sıçan deneysel meme tümörü gruplarının MMP-9 istatistik grafiği



4.3.4.10. Köpek Meme Tümörlerinde MMP-9 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

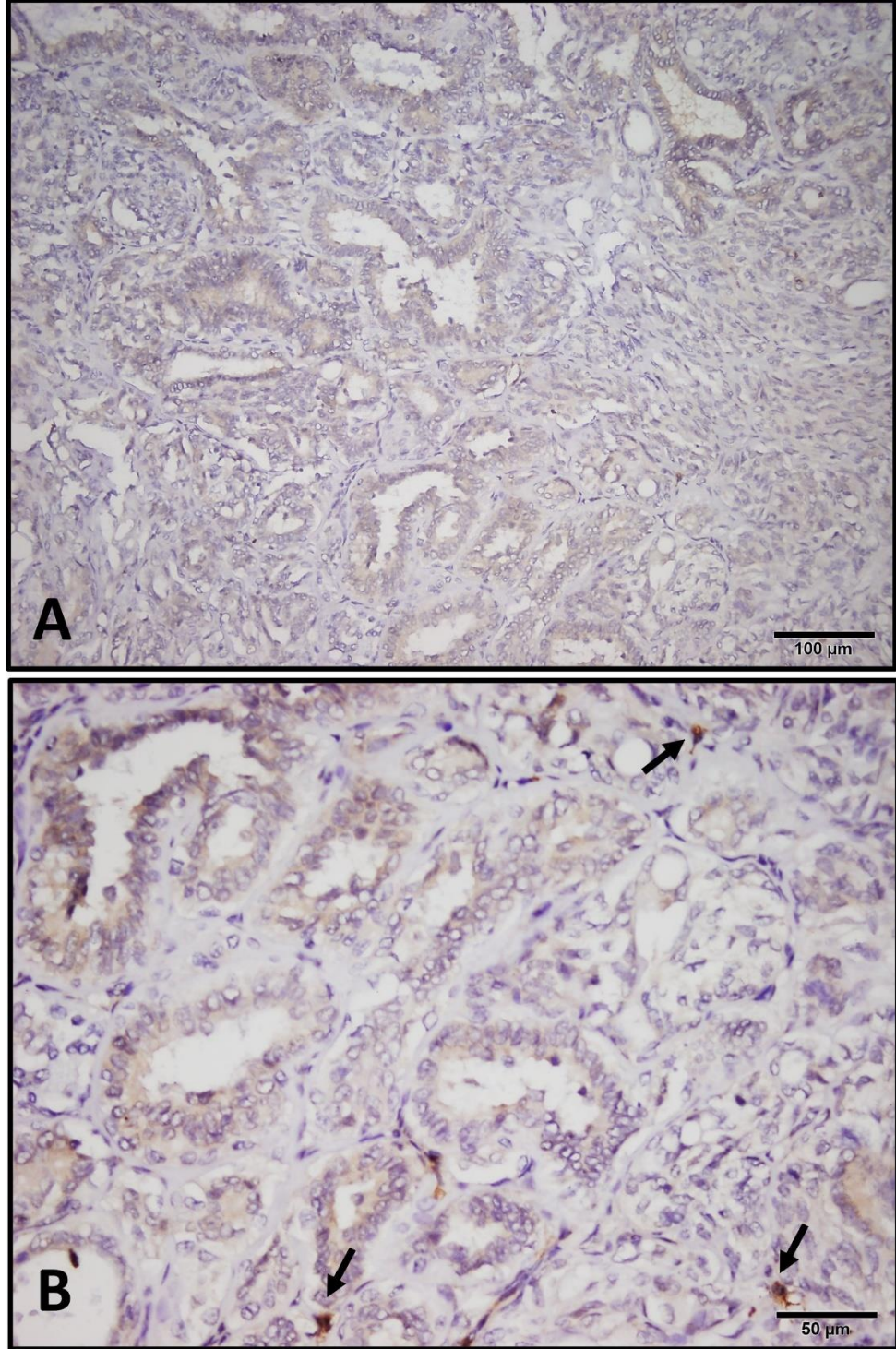
Kontrol meme bezi dokusunda MMP-9 ekspresyon skoru tüm dokularda 0 bulunmuştur (Şekil 4-46).



Şekil 4-46: Köpek kontrol meme bezinde MMP-9 ekspresyonu, *Horseradish Peroksidaz*, DAB

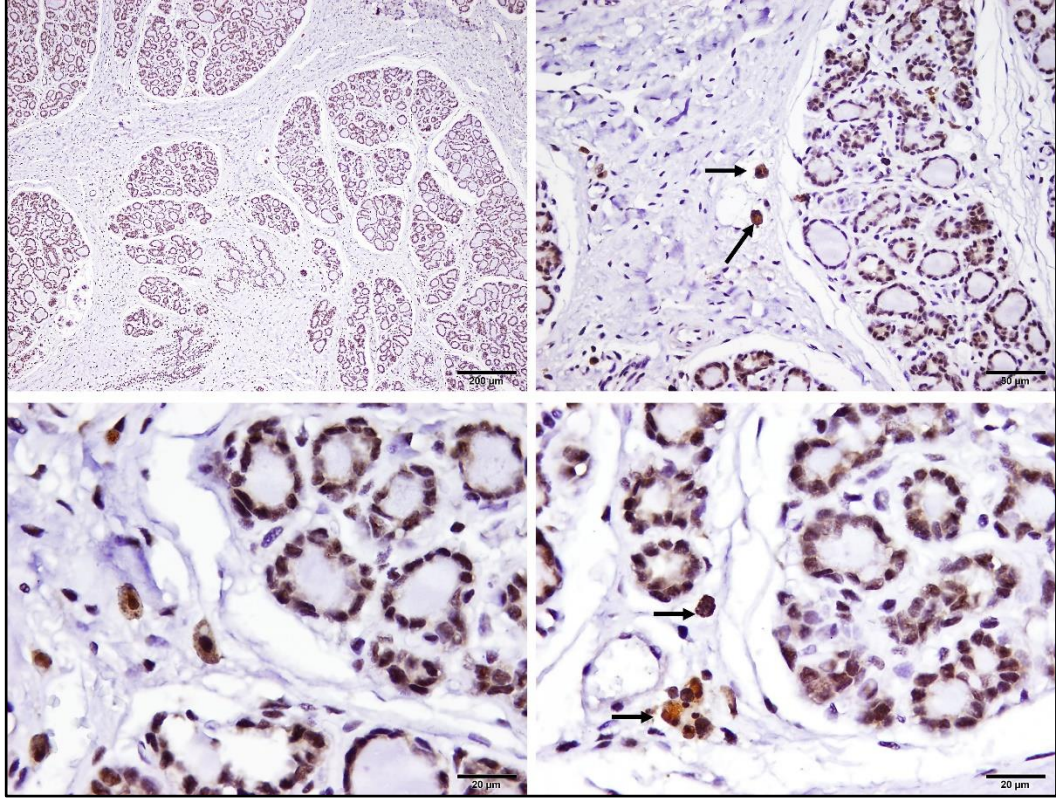
Köpek meme tümörü olgularının MMP-9 ekspresyonuna bakıldığında toplam 10 adet örneğin 2 tanesine 12, 1 tanesine 9, 2 tanesine 8, 1 tanesine 3, 3 tanesine 2 ve 1 tanesine 0 değeri verilmiştir. Bu örneklerin ortalama değeri 5,81 olarak hesaplanmıştır ve orta pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-47). Köpek

meme tümörlerinden 2 tanesinde nükleer MMP-9 ekspresyonu gözlenmiştir (Şekil 4-48).



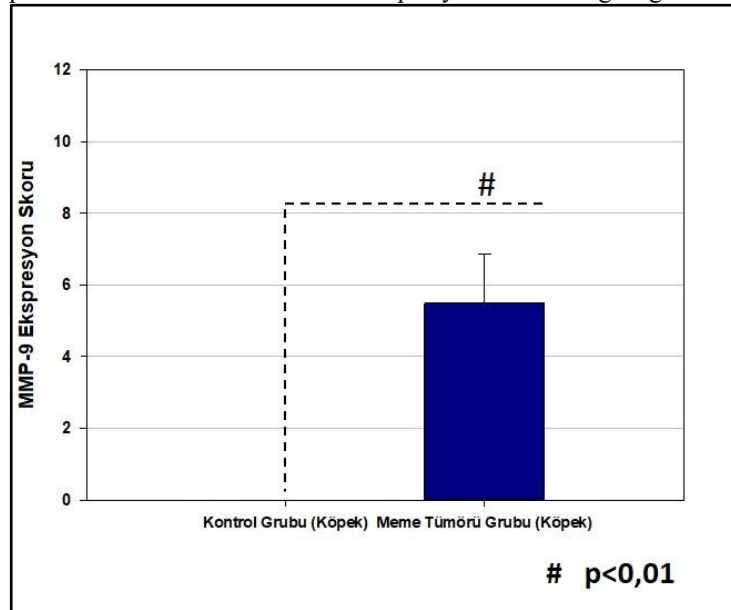
Şekil 44-47: Köpek meme tumoründe düşük MMP-9 ekspresyonu, *Horseradish Peroksidaz*, DAB, siyah ok: MMP-9 pozitif mast hücreleri

İstatistiksel olarak kontrol grubu ile meme tümörü dokusu MMP-9 açısından incelendiğinde anlamlı bir fark bulunmuştur ($p: 0,003$) (Grafik 4-45).



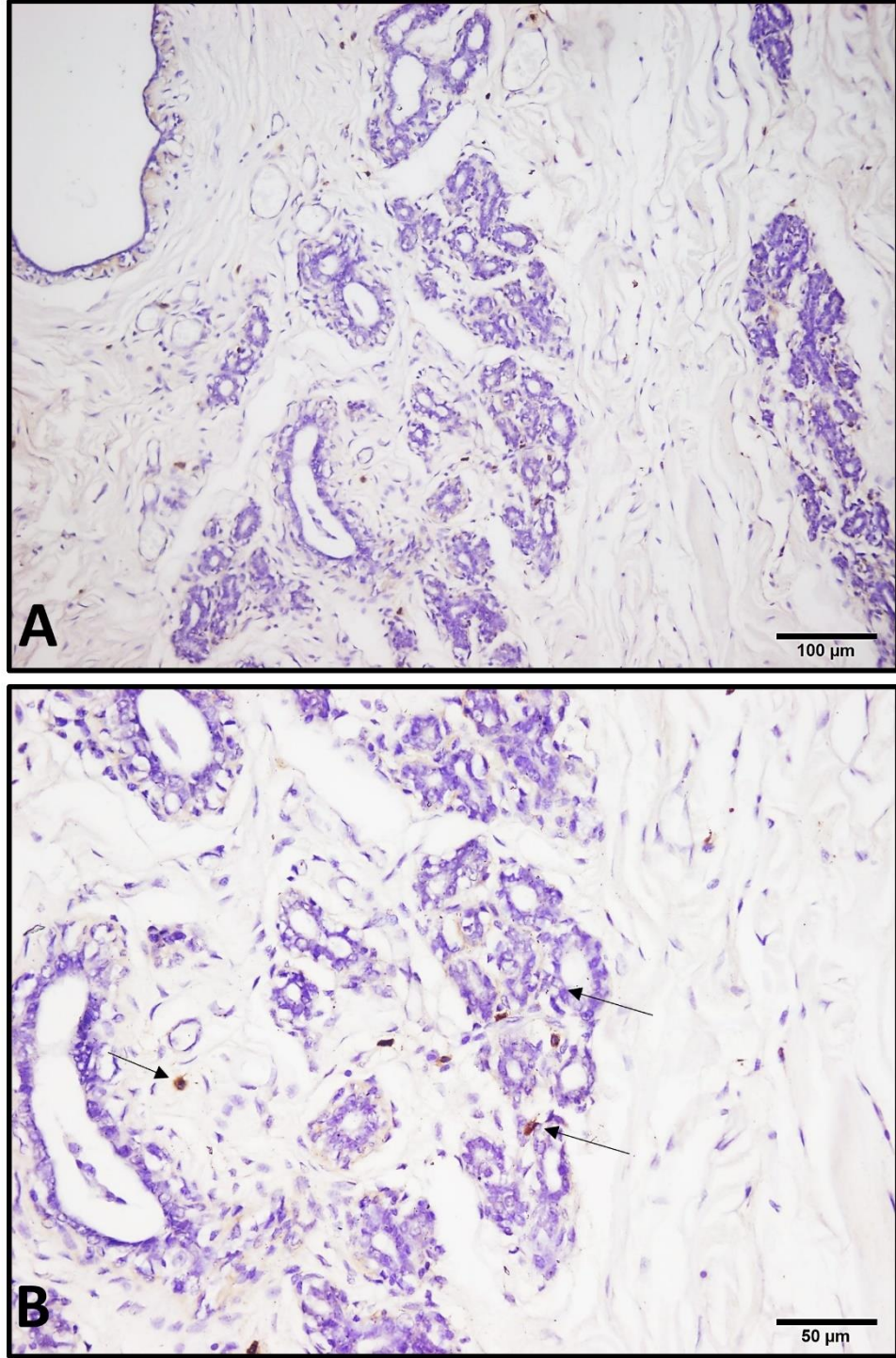
Şekil 4-48: Köpek meme tümörlerinde nükleer MMP-9 ekspresyonu, **siyah ok:** MMP-9 pozitif mast hücreleri

Grafik 4-45: Köpek meme tümörlerinde MMP-9 ekspresyonu istatistik grafiği



4.3.4.11 Kedi Meme Tümörlerinde MMP-9 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

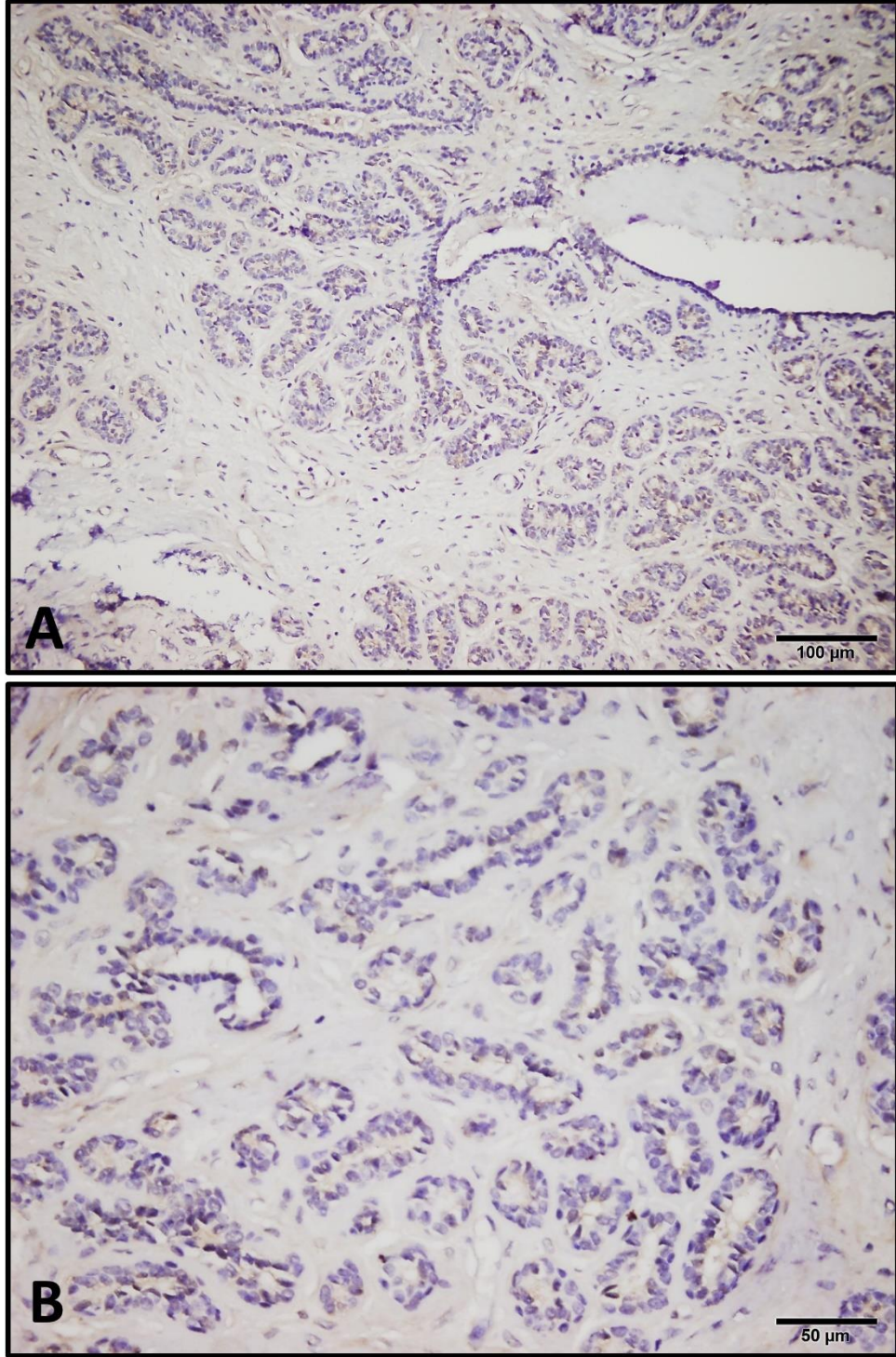
Kedi kontrol grubu sağlıklı meme bezlerinde MMP-9 ekspresyon skoru ortalama 0 değerinde bulunmuştur ve sağlıklı meme bezinde MMP-9 ekspresyonuna rastlanmamıştır (Şekil 4-49).



Şekil 4-49: Kontrol kedi meme bezinde MMP-9 ekspresyonu, *Horseradish Peroksidaz*, *DAB*, **siyah ok:** MMP-9 pozitif mast hücreleri

Kedi MMP-9 ekspresyonu değerlendirmek için toplam 10 adet meme tümörü örneği incelenmiştir. Bu örneklerin 1 tanesinde 9, 1 tanesinde 8, 3 tanesinde 6, 2 tanesinde 4, 2 tanesinde 3 ve 1 tanesinde 2 değeri bulunmuştur. Bu değerlerin

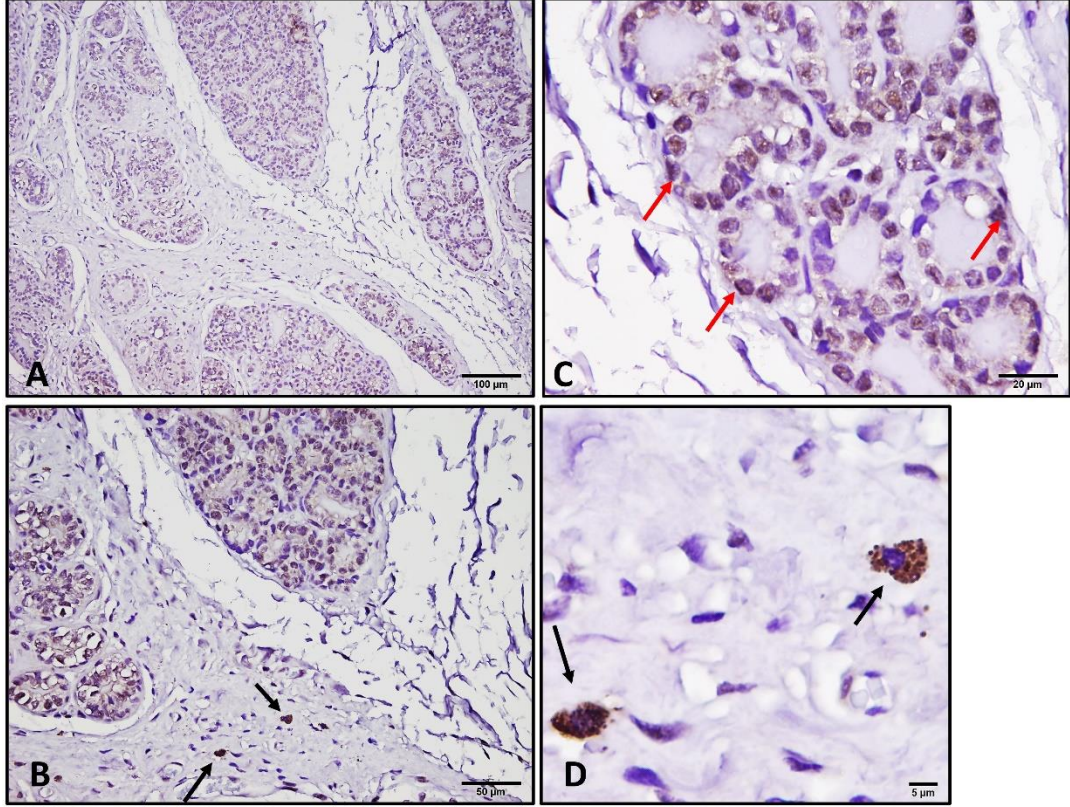
ortalaması alındığında 5,1 olarak hesaplanmıştır orta pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-50). 1 adet kedi meme tümöründe nükleer lokasyon gösteren MMP-9 pozitif hücrelere rastlanmıştır (Şekil 4-51).



Şekil 4-50: Kedi meme tümörü dokusunda düşük MMP-9 ekspresyonu, *Horseradish Peroksidaz*, *DAB*

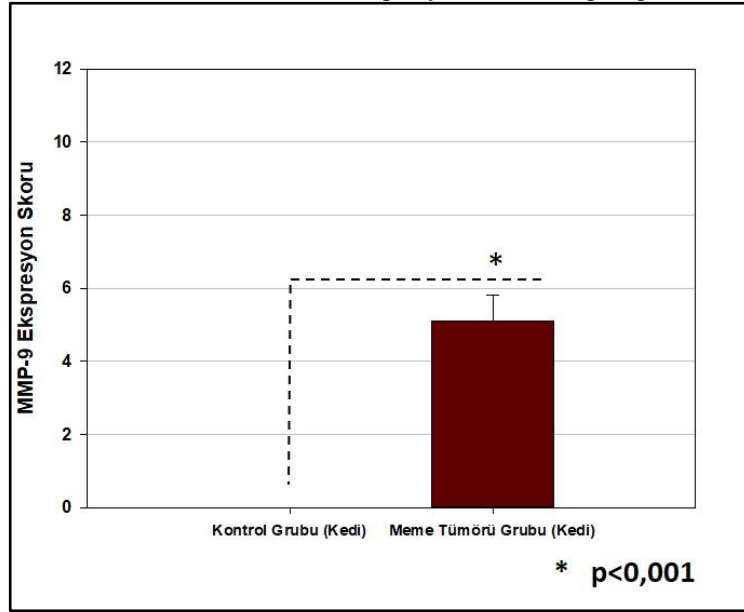
Kedi meme tümörleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MMP-9 skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,001$) (Grafik 4-46).

Tüm grupların MMP-9 ekspresyon skorları Grafik 4-47’de detaylı olarak verilmiştir.

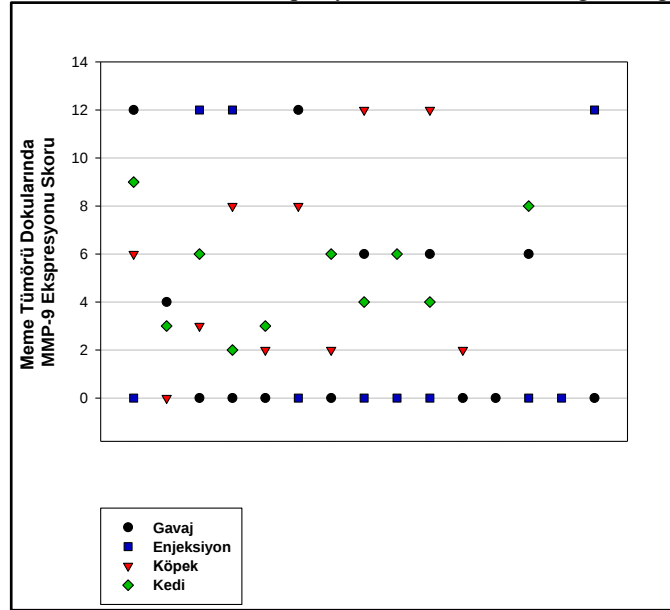


Şekil 4-51: Kedi meme tumoründe nükleer MMP-9 pozitif neoplastik hücreler, **kırmızı ok:** Neoplastik epitel hücre çekirdeklerinde pozitif MMP-9 ekspresyonu, **siyah ok:** MMP-9 pozitif mast hücreleri

Grafik 4-46: Kedi meme tümörlerinde MMP-9 ekspresyonu istatistik grafiği



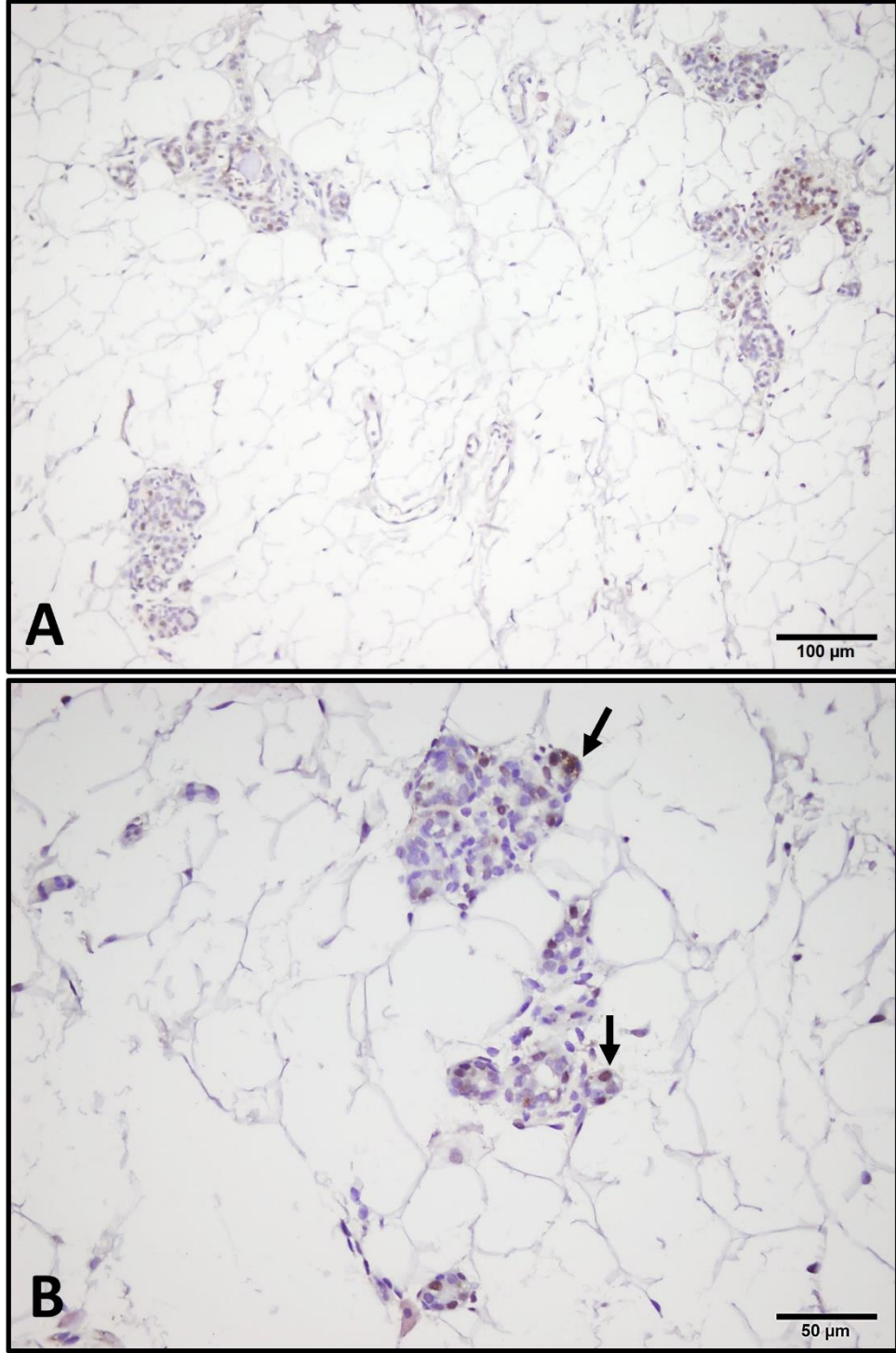
Grafik 4-47: Meme tümörlerinde MMP-9 ekspresyonu skorunun türlere göre dağılım grafiği



4.3.4.12 Deneysel Olarak Oluşturulan Sıçan Meme Tümörlerinde PCNA Pozitif Hücrelerin Değerlendirilmesi

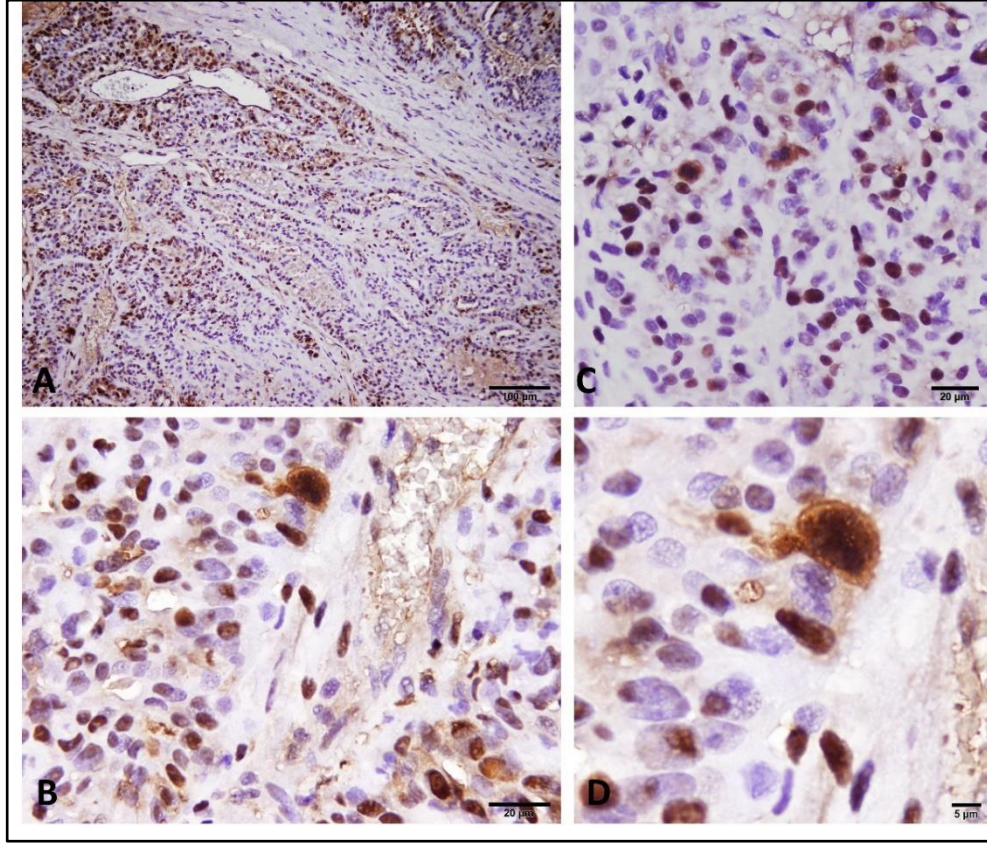
PCNA pozitif hücreler rastgele seçilen alanlardan toplam 1000 adet hücre sayılarak yapılmış ve pozitif hücreler yüzde olarak değerlendirilmiştir.

Kontrol olarak kullanılan sıçan meme bezi dokusunun PCNA değeri en yüksek % 12, en düşük % 6 olarak bulunmuş ortalama % 9 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-52).



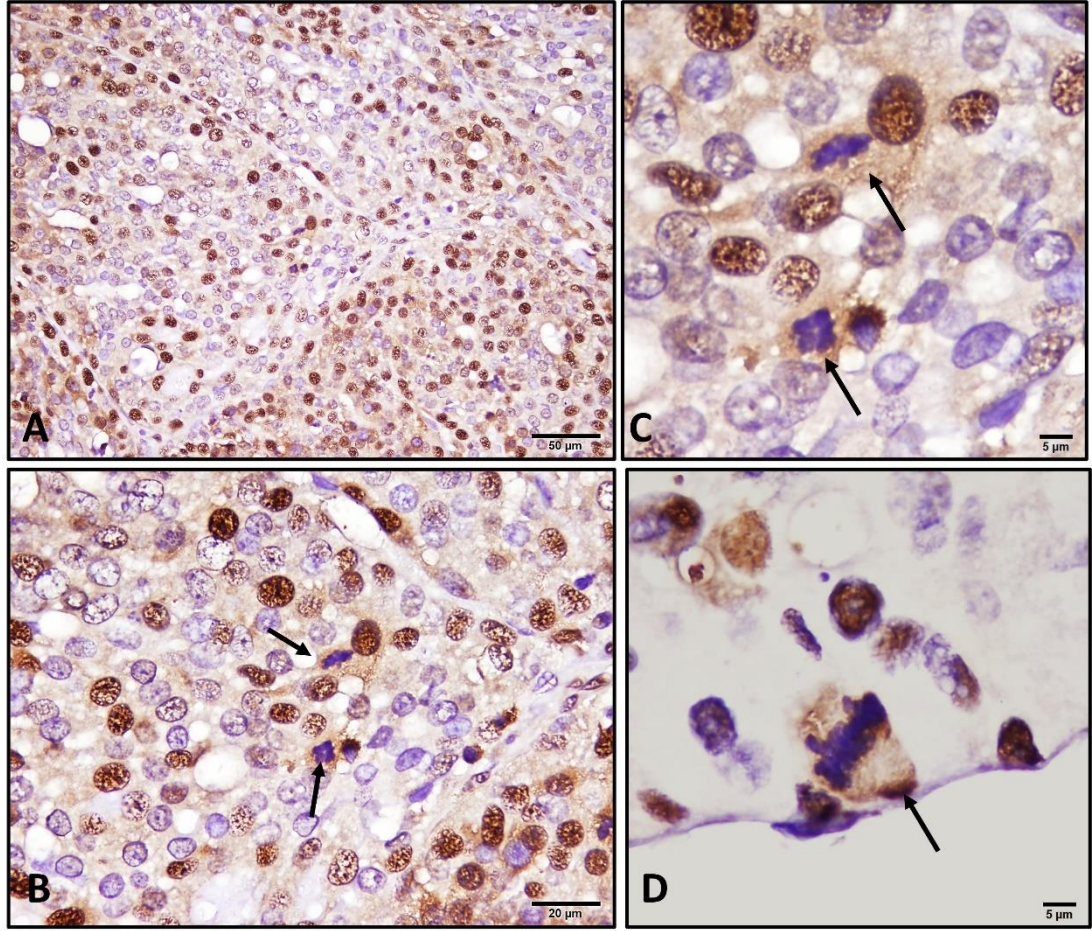
Şekil 4-52: Kontrol sıçan meme bezinde PCNA ekspresyonu, *Horseradish Peroksidaz*, DAB, siyah ok: Pozitif boyanmış çekirdekler

G grubunda, hesaplanan PCNA değeri en düşük % 53 hesaplanırken en yüksek değer %95 olarak hesaplanmıştır. G grubu için ortalama PCNA pozitif hücre yüzdesi ise 71,35 olarak bulunmuştur (Şekil 4-53).



Şekil 4-53: Sıçan meme tümörlerinde düşük pozitif boyanma yoğunluğuna sahip PCNA ekspresyonu, Horseradish Peroksidaz, DAB

E grubunda, hesaplanan en düşük PCNA değeri %52, en yüksek değer ise %85 olarak bulunmuştur. Ortalama PCNA pozitif tümör hücre yüzdesi ise % 68,7 olarak hesaplanmıştır (Şekil-4-54).

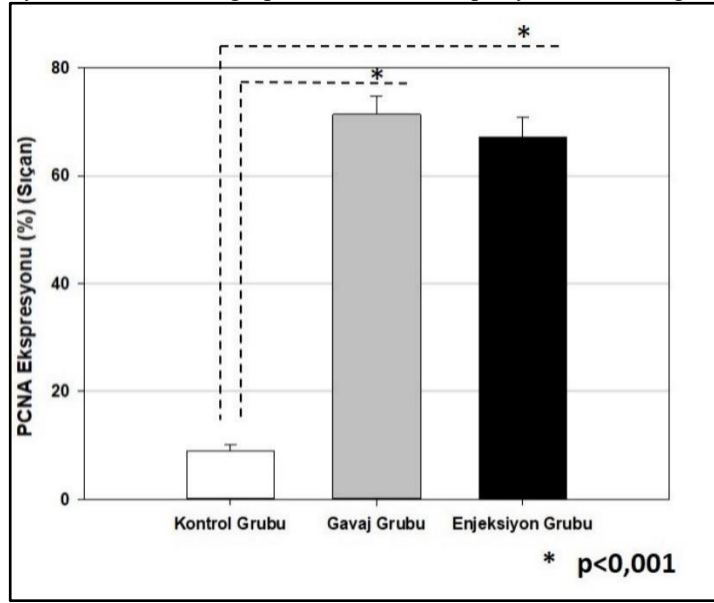


Şekil 4-54: Sıçan meme tümörlerinde yüksek PCNA ekspresyonu, *Horseradish Peroksidaz*, *DAB*, **siyah ok**: Mitotik aktiviteye sahip hücreler

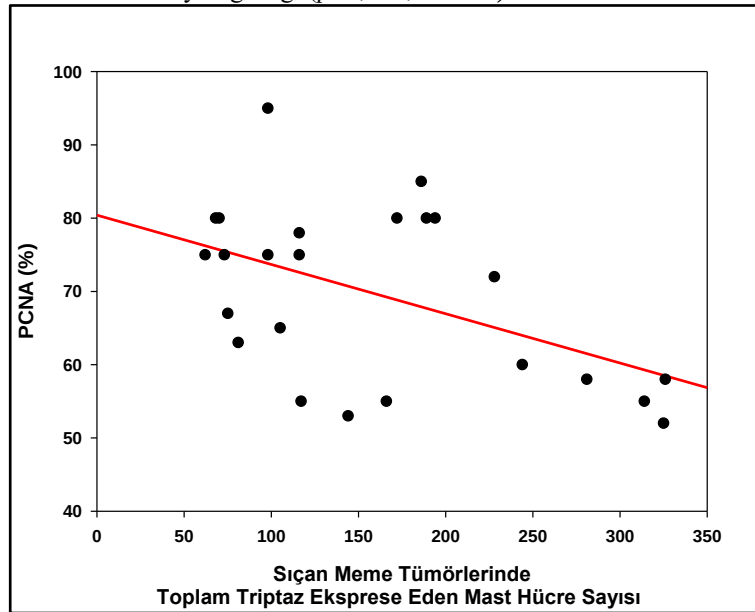
Kontrol grubu ile G ve E grubu PCNA değerleri birbirleri ile karşılaştırıldığında her iki gruba da kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,001$, $p < 0,001$). G ve E grubu PCNA değeri yönüyle birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p: 0,437$) (Grafik 4-48).

Sıçan meme tümörü grupları PCNA ekspresyonu ile intratümöral triptaz eksprese eden mast hücre sayısı arasında istatistiksel olarak negatif korelasyon bulunmuştur ($p: 0,016$; $r: -0,487$) (Grafik 4-49).

Grafik 4-48: Deneyisel meme tümörü gruplarında PCNA ekspresyonu istatistik grafiği

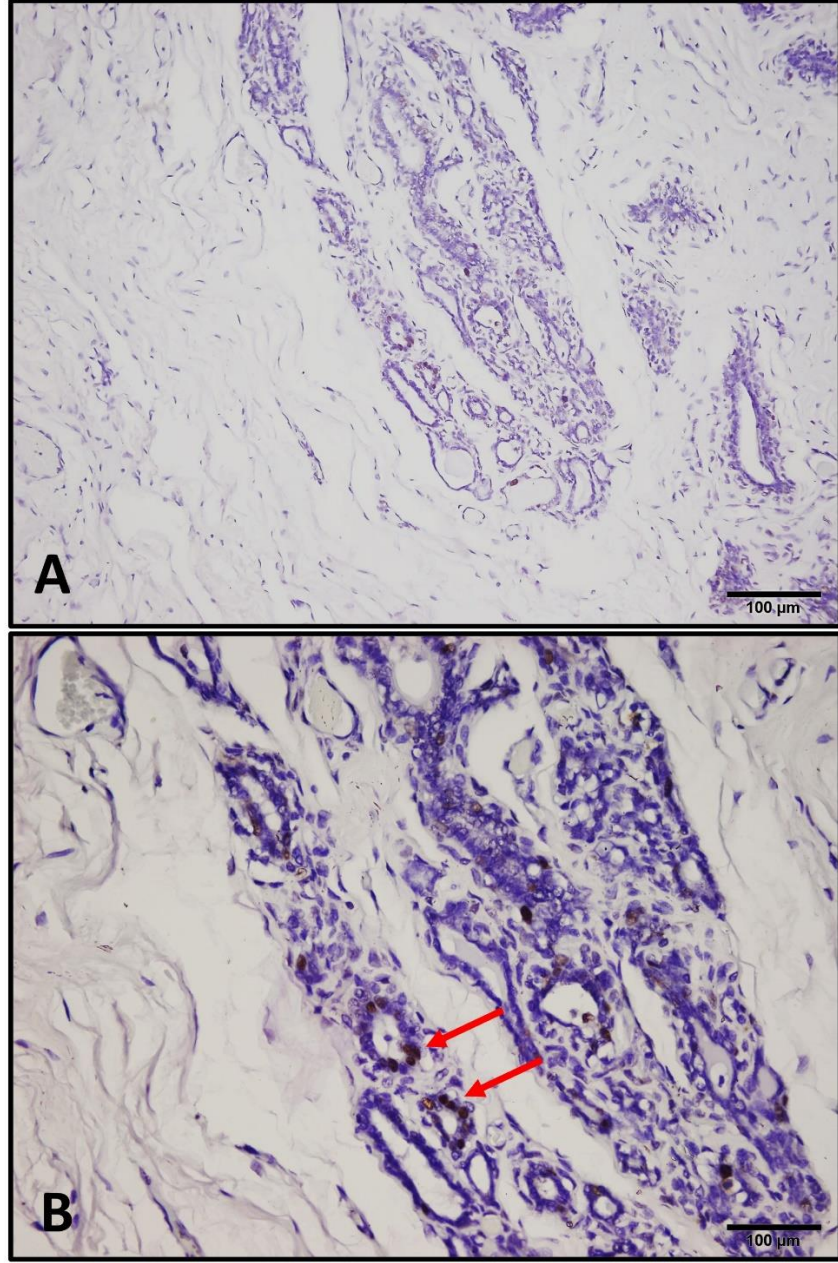


Grafik 4-49: Sıçan meme tümörü gruplarında intratümöral triptaz eksprese eden mast hücreleri ile PCNA değeri arasındaki korelasyon grafiği ($p: 0,016$; $r: -0,487$)



4.3.4.13 Köpek Meme Tümörlerinde PCNA Pozitif Hücrelerin Değerlendirilmesi

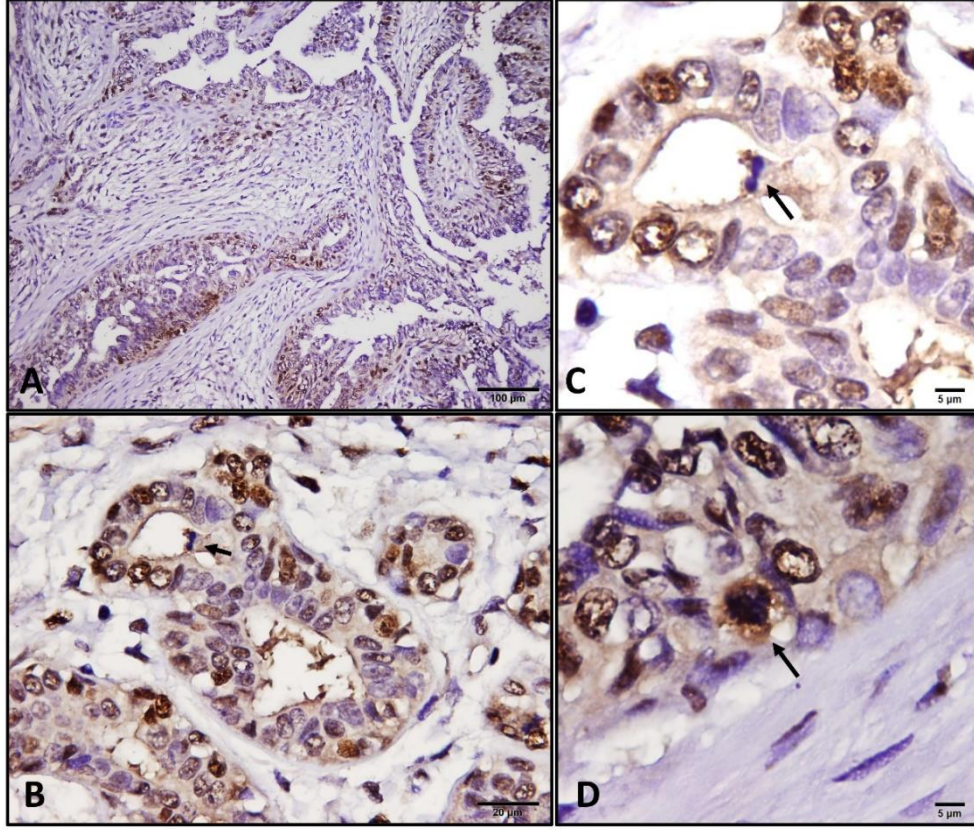
Köpek sağlıklı meme bezinde PCNA değeri en yüksek değer %23, en düşük değer %8, ortalama değer ise % 12 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-55).



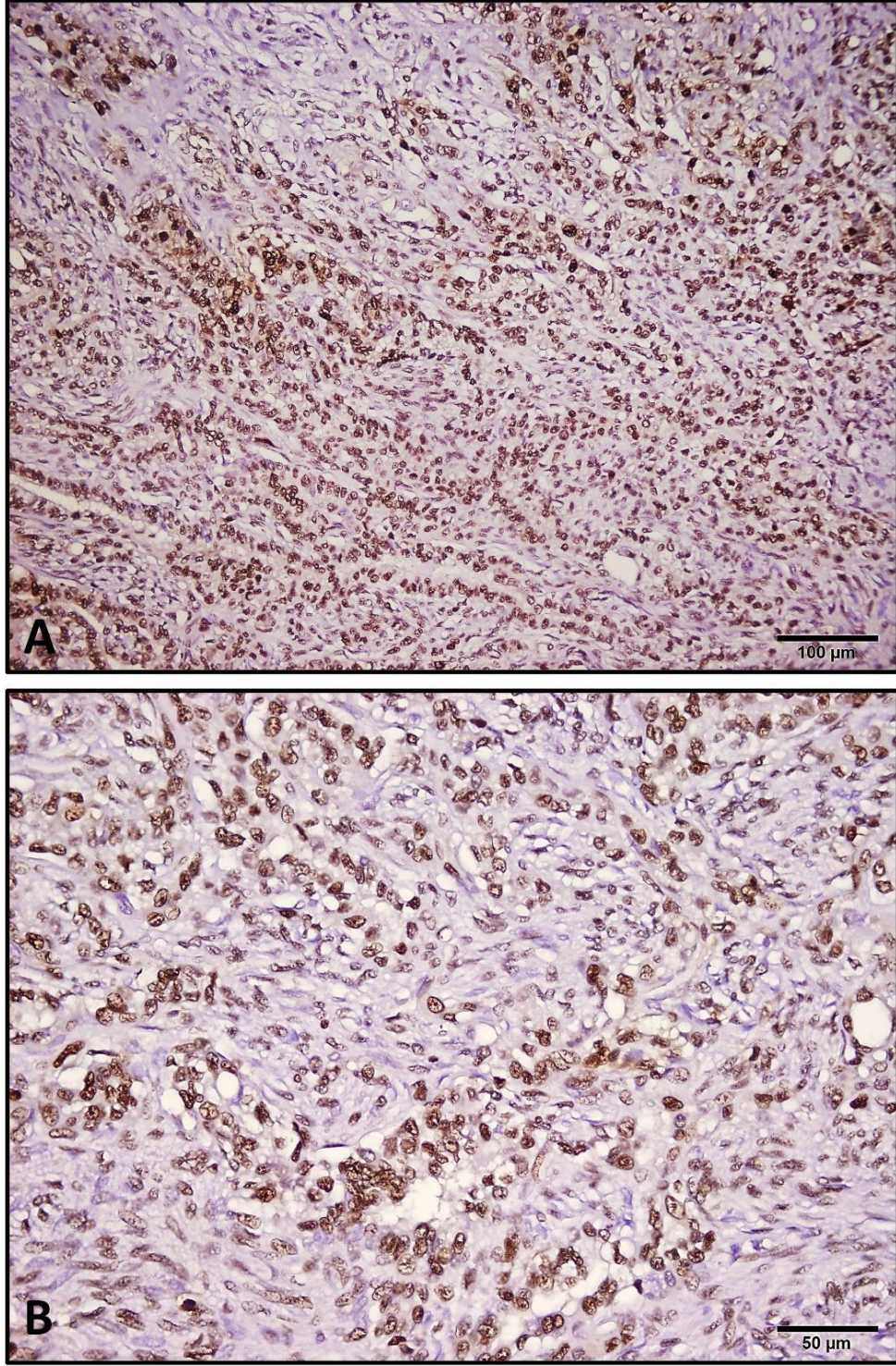
Şekil 4-55: Köpek kontrol meme bezinde PCNA ekspresyonu, **kırmızı ok:** PCNA pozitif hücreler

Köpek meme tümörlerinde hesaplanan en düşük PCNA değeri % 45, en yüksek PCNA değeri ise % 87 olarak bulunmuştur. Köpek meme tümörlerinde hesaplanan ortalama PCNA pozitif hücre yüzdesi % 66,9 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-56, Şekil 4-57 ve Şekil 4-58).

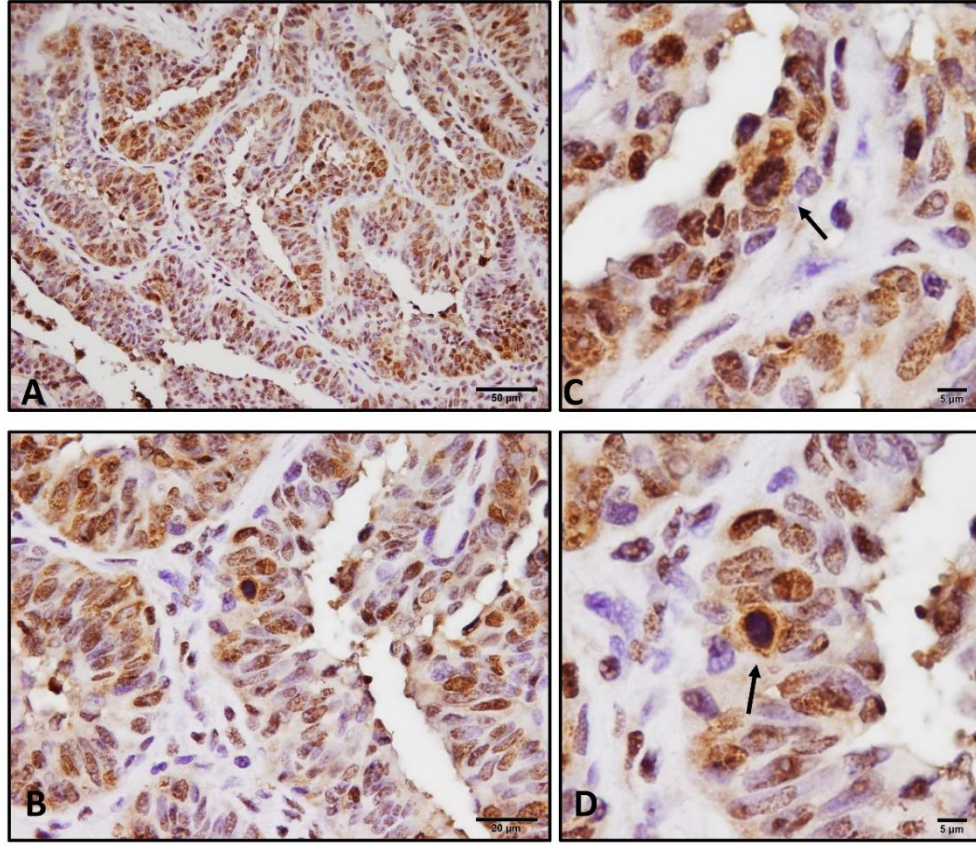
Kontrol meme bezi dokusu ile meme tümörleri PCNA değerleri yönüyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,001$) (Grafik 4-50).



Şekil 4- 56: Köpek meme tümöründe düşük PCNA ekspresyonu, *Horseradish Peroksidaz*, *DAB* siyah ok: Mitotik figürler

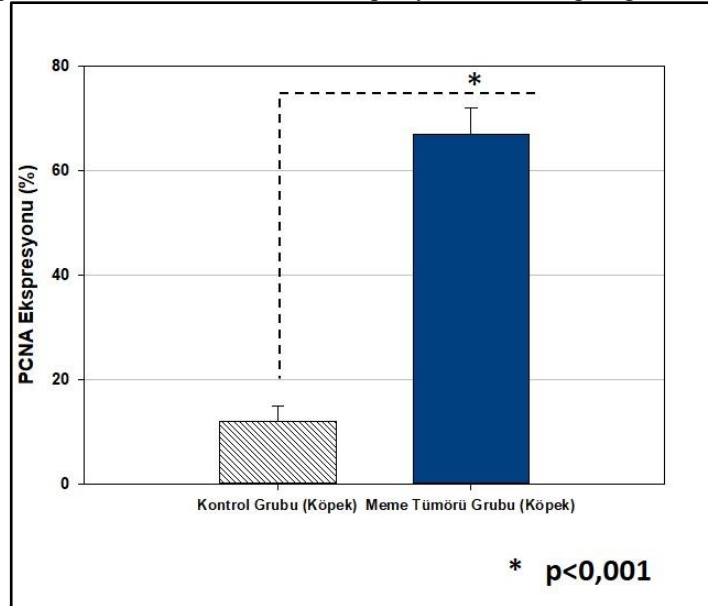


Şekil 4- 57: Köpek meme tümöründe orta PCNA ekspresyonu gösteren neoplastik hücreler, *Horseradish Peroksidaz, DAB*



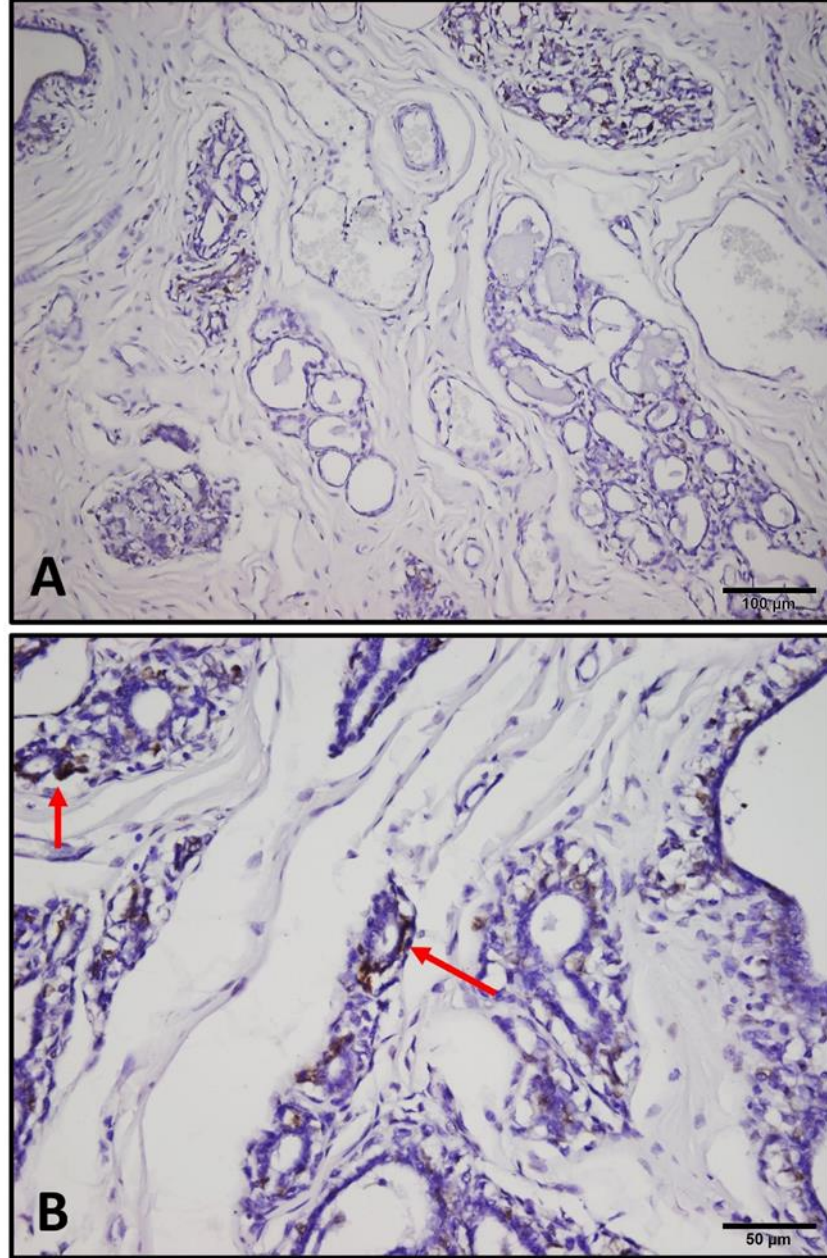
Şekil 4-58: Köpek meme tumoründe yüksek PCNA ekspresyonu gösteren neoplastik hücreler, *Horseradish Peroksidaz*, *DAB siyah ok*: Mitotik aktiviteye sahip tümör hücreleri

Grafik 4-50: Köpek meme tümörlerinde PCNA ekspresyonu istatistik grafiği



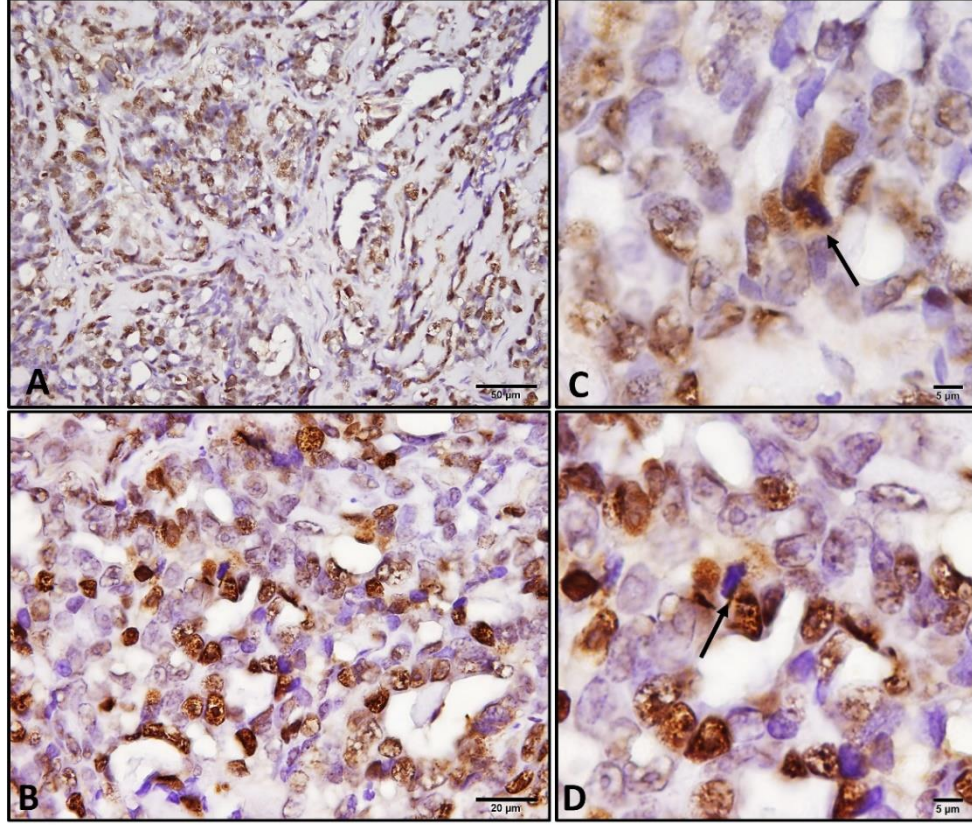
4.3.4.14. Kedi Meme Tümörlerinde PCNA Pozitif Hücrelerin Değerlendirilmesi

Kontrol kedi meme bezi dokusunun PCNA değeri en yüksek % 11 en düşük ise % 4 bulunmuş ortalaması %7,8 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-59).

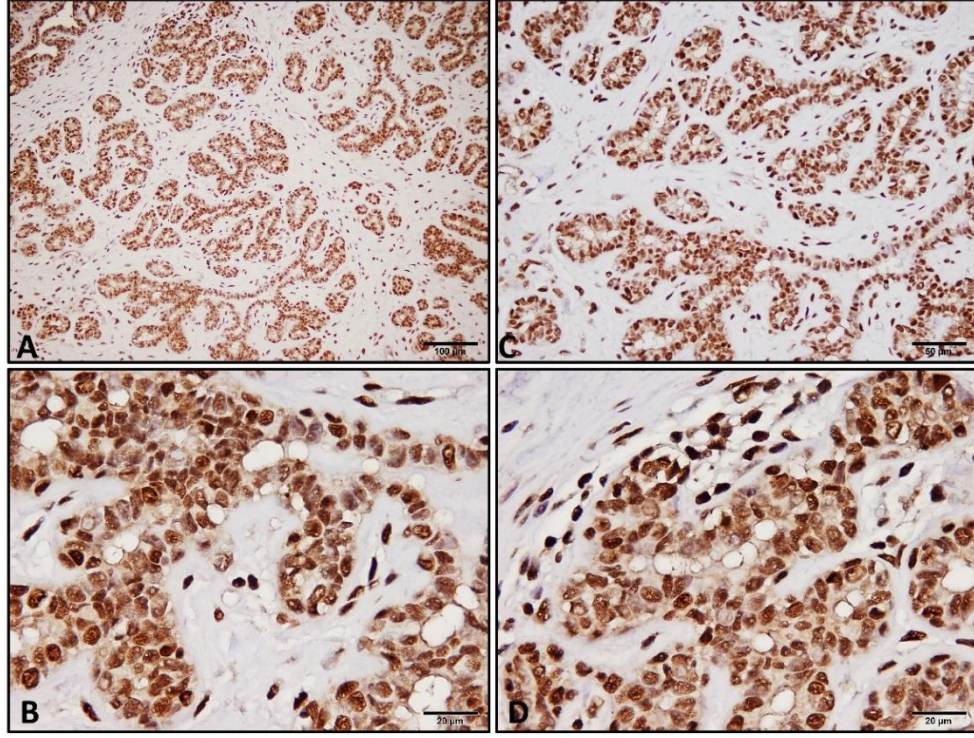


Şekil 4- 59: Kedi kontrol meme dokusunda PCNA ekspresyonu, *Horseradish Peroksidaz*, *DAB*, **kırmızı ok:** Pozitif boyanan hücre çekirdekleri

Kedi meme tümörlerinde hesaplanan en düşük PCNA değeri %50, en yüksek PCNA değeri ise %95 olarak bulunmuştur. Kedi meme tümörlerinde hesaplanan ortalama PCNA pozitif hücre yüzdesi ise % 72,5 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-60 ve Şekil 4-61).



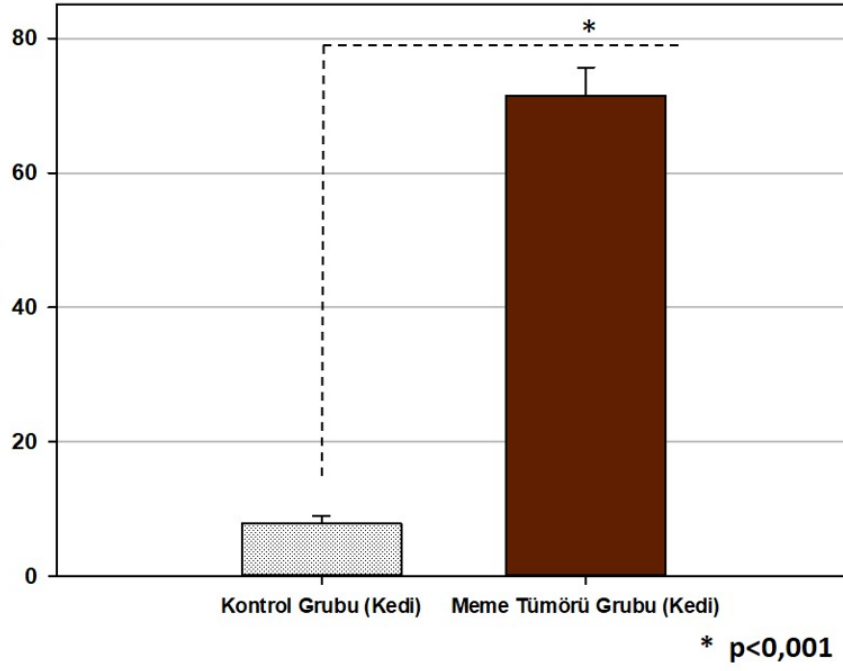
Şekil 44-60: Kedi meme tümöründe düşük pozitiflik yüzdesi, *Horseradish Peroksidaz*, *DAB*, **siyah ok:** Mitotik figür



Şekil 4-61: Kedi meme tümöründe yüksek PCNA pozitif boyanan tümör hücreleri, *Horseradish Peroksidaz, DAB*

Kontrol meme dokusu ile meme tümörleri karşılaştırıldığında PCNA değeri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Grafik 4-51) ($p<0,001$).

Grafik 4-51: Kedi meme tümörlerinde PCNA ekspresyonu istatistik grafiği



Deneysel meme tümörü grubu olan G ve E grubu ile kedi ve köpek meme tümörü olgularında istatistiksel olarak bulunana bütün p değerleri Tablo 4-4, Tablo 4-5 ve Tablo 4-6'da verilmiştir.

Tablo 4-4: Deneysel sıçan meme tümörü dokularında istatistiksel değerlendirme sonuçları

Deneysel Sıçan Meme Dokularında İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları		Kontrol Grubu	Gavaj Grubu	Enjeksiyon Grubu
<u>TB(+) Toplam Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	<.001*	<.001*
	Gavaj Grubu	<.001*	-	.931
	Enjeksiyon grubu	<.001*	.931	-
<u>TB(+) Degranüle Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	<.001*	<.001*
	Gavaj Grubu	<.001	-	.841
	Enjeksiyon grubu	<.001*	.841	-
<u>TB(+) Granüle Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	.070	.206
	Gavaj Grubu	.070	-	.796
	Enjeksiyon grubu	.206	.796	-
<u>Triptaz Ekspres Ede n Toplam Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	<.001	<.001*
	Gavaj Grubu	<.001	-	.709
	Enjeksiyon grubu	<.001*	.709	-
<u>Triptaz Ekspres Ede n Degranüle Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	<.001*	<.001*
	Gavaj Grubu	<.001*	-	.084
	Enjeksiyon grubu	<.001*	.084	-
<u>Triptaz Ekspres Ede n Granüle Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	.298	.013*
	Gavaj Grubu	.298	-	.011*
	Enjeksiyon grubu	.013*	.011*	-
<u>Triptaz Pozitif Toplam Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	.007*	.055
	Gavaj Grubu	.007*	-	.931
	Enjeksiyon grubu	.055	.931	-
<u>Triptaz Pozitif Degranüle Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	.005*	.099
	Gavaj Grubu	.005*	-	.437
	Enjeksiyon grubu	.099	.437	-
<u>Triptaz Pozitif Granüle Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	.964	.075
	Gavaj Grubu	.964	-	.042*
	Enjeksiyon grubu	.075	.042*	-
<u>Kimaz Ekspres Ede n Toplam Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	<.001	<.001
	Gavaj Grubu	<.001*	-	.349
	Enjeksiyon grubu	<.001*	.349	-
<u>Kimaz Ekspres Ede n Degranüle Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	<.001*	<.001*
	Gavaj Grubu	<.001*	-	.334
	Enjeksiyon grubu	<.001*	.334	-
<u>Kimaz Ekspres Ede n Granüle Mast Hücre Sayısı</u>	Kontrol Grubu	-	.298	.013*
	Gavaj Grubu	.298	-	.411
	Enjeksiyon grubu	.013*	.411	-
<u>Doku TNF-alfa ekspresyonu</u>	Kontrol Grubu	-	.003*	.055
	Gavaj Grubu	.003*	-	.235
	Enjeksiyon grubu	.055	.235	-
<u>Doku MMP-9 ekspresyonu</u>	Kontrol Grubu	-	.186	.371
	Gavaj Grubu	.186	-	.796
	Enjeksiyon grubu	.371	.796	-
<u>Doku PCNA ekspresyonu</u>	Kontrol Grubu	-	<.001*	<.001*
	Gavaj Grubu	<.001*	-	.437
	Enjeksiyon grubu	<.001*	.437	-

Tablo 4-5: Köpek meme tümörlerinde istatistiksel değerlendirme sonuçları

Köpek Meme Dokularında İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları		Kontrol Grubu	Meme Tümörü Grubu
TB(+) Toplam Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
TB(+) Degranüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
TB(+) Granüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	.009*
	Meme Tümörü Grubu	.009*	-
Triptaz Eksprese Eden Toplam Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Triptaz Eksprese Eden Degranüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Triptaz Eksprese Eden Granüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Triptaz Pozitif Toplam Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Triptaz Pozitif Degranüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Triptaz Pozitif Granüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Kimaz Eksprese Eden Toplam Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Kimaz Eksprese Eden Degranüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Kimaz Eksprese Eden Granüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	.005*
	Meme Tümörü Grubu	.005*	-
Doku TNF-alfa ekspresyonu	Kontrol Grubu	-	.008*
	Meme Tümörü Grubu	.008*	-
Doku MMP-9 ekspresyonu	Kontrol Grubu	-	.003*
	Meme Tümörü Grubu	.003*	-
Doku PCNA ekspresyonu	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-

Tablo 4-6: Kedi meme tümörü dokularının istatistiksel değerlendirme sonuçları

Kedi Meme Dokularında İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları		Kontrol Grubu	Meme Tümörü Grubu
TB(+) Toplam Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
TB(+) Degranüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
TB(+) Granüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Triptaz Eksprese Eden Toplam Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Triptaz Eksprese Eden Degranüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Triptaz Eksprese Eden Granüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	.002*
	Meme Tümörü Grubu	.002*	-
Triptaz Pozitif Toplam Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Triptaz Pozitif Degranüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Triptaz Pozitif Granüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	.001*
	Meme Tümörü Grubu	.001*	-
Kimaz Eksprese Eden Toplam Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	.003*
	Meme Tümörü Grubu	.003*	-
Kimaz Eksprese Eden Degranüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Kimaz Eksprese Eden Granüle Mast Hücre Sayısı	Kontrol Grubu	-	.440
	Meme Tümörü Grubu	.440	-
Doku TNF-alfa ekspresyonu	Kontrol Grubu	-	.513
	Meme Tümörü Grubu	.513	-
Doku MMP-9 ekspresyonu	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-
Doku PCNA ekspresyonu	Kontrol Grubu	-	<.001*
	Meme Tümörü Grubu	<.001*	-

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme tümörleri insanlarda gözlenen tümörlerin önemli bir bölümünü kapsamakta ve klinikte oldukça sık gözlenmektedir. Köpeklerde en yaygın gözlenen tümör olan meme tümörü kedilerde deri tümörleri ve lenfomalardan sonra en sık gözlenen 3. tümördür. Mast hücreleri, yapılan çalışmalarda insan ve hayvanlarda yangı ve alerjik reaksiyonlardan sorumlu oldukları bilinse de birçok tümör dokusunda sayıca arttıkları bilinmektedir. Meme tümörlerinde, özellikle insan meme kanserlerinde mast hücrelerinin sayıca arttığı bilinmektedir. Ancak artan mast hücre fenotipleri ve bu hücrelerinin artmalarının nedenleri halen kesin ve tam olarak bilinmemektedir. İnsan kanserlerinde mast hücre ilişkili yapılan çalışmalarda bir kısım çalışma mast hücre sayısının artmasının pro-tümörojenik etkisi olduğunu bildirmiş iken bir kısım çalışma ise anti-tümöral etkiye sahip olduğunu düşünmektedir. Köpek ve kedi meme tümörlerinde ise yapılan çalışmalar daha az sayıda olmakla birlikte köpek meme tümörlerinde mast hücre sayısının arttığı bilinmektedir. Fakat bu çalışmalar hem çok yeni hem de çok az sayıdadır. Ayrıca köpek ve kedi meme tümörlerinde artan mast hücrelerin fenotipleri ve hangi amaçla orada bulundukları henüz tam olarak bilinmemektedir.

Kedi ve köpek meme tümörü olgularında, köpeklerde meme tümörü ortalama yaşı birçok araştırmacı tarafından 9-11 iken, kedilerde ortalama meme tümörü yaşı genellikle 9-13 olarak bildirilmiştir (Meuten, 2016; Pastor ve ark., 2018; Sorenmo ve ark., 2009; Viste ve ark., 2002; Zatloukal ve ark., 2005). Çalışmada köpek meme tümörü örnekleri alınan hayvanlarda ortalama yaş 9,72 olarak hesaplanmıştır. Kedi meme tümörü yaşı ise ortalama 9,22 olarak bulunmuştur. Bu bulgular yapılan diğer çalışmalar ile uyumludur. Köpeklerde genelde saf ırkların meme tümörüne yatkın oldukları bilinirken (Dorn, 1968), tez çalışmasında en çok gözlenen ırklar sırasıyla %30 ile melez ırk ve Terrier olarak bulunmuştur. Kısırlaştırma bilgileri elde edilemeyenler olduğundan dolayı kısırlaştırma ve dışardan progesteron alımı ile ilgili net bir bilgi ortaya konamamaktadır. Kedilerde en yatkın ırk olarak genelde domestik shorthair ve Siyam ırkı olduğu bildirilmiştir (Sorenmo 2011; Viste ve ark., 2002) Özellikle Siyam ırkı kedilerde erken yaşta genetik olarak meme tümörü görüldüğü bildirilmiştir (Sorenmo, 2011) Bu çalışmada toplanan kedi meme tümörü

örneklerinin %70'inin Tekir ırkı, %30'unun ise saf ırk kedilerden oluştuğu tespit edilmiştir.

Sıçanlarda deneysel olarak oluşan meme tümörleri 7-12 DMBA gavaj ile verildikten sonra ortalama 90 günde oluştuğu bildirilmektedir. Tümör oluşum süresini hızlandırmak ve daha çok tümör oluşumunu tetiklemek için farklı dozlarda progesteron verilmesi önerilmektedir. 7-12 DMBA verilmesinden yaklaşık 1 ay sonra deri altı olarak uygulanan progesteron ortalama tümör oluşumunu 56 güne çektiği ve oluşan tümör sayısını arttırdığı literatürde bildirilmiştir (Benakanakere ve ark., 2010). Tez çalışmasında sadece gavaj yolu ile 7-12 DMBA uygulanan dişi sıçanların olduğu G grubunda tümör oluşum süresi 4-13 ay arasında değişmiştir ve ortalama 8,5 ayda tümör oluşumu gözlenmiştir. Oral yolla DMBA verilmesini takiben 30 gün sonra deri altı yolla medroksiprogesteron asetat uygulaması yapılan E grubunda tümör oluşum süresi 5-9 ay iken ortalama tümör oluşumu 7 ay sürmüştür. Literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırıldığında tez çalışmasında her iki grup için de tümör oluşumu daha uzun bir sürede gerçekleşmiştir (Benakanakere ve ark., 2010). Bu durum, deney hayvanları yetiştirme ünitesinde hayvanlara 12 saat aydınlık 12 saat karanlık barındırma süresinin sağlanmasındaki aksamadan kaynaklanmıştır. Aydınlatma yetersizliği deneklerin hormonal aktivitelerini etkilemek suretiyle tümör oluşma süresini uzattığını düşündürmüştür. Diğer yandan E grubunda daha hızlı tümör oluşumu görülmesi ve aynı hayvanda daha çok tümör oluşumlarına rastlanması literatür bilgileriyle uyumaktadır.

Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan meme tümörü modellerinde gözlenen malignant karsinomlar papiller, kribriform, komedo, tubüler ve solid olarak sınıflandırılmıştır (Russo & Russo, 2000). Tez çalışmasında 7-12 DMBA ile oluşturulan meme tümörlerinde 3 farklı tipte meme karsinomu gözlenmiştir. Bunlardan solid karsinom ve tubüler karsinom daha önceden sıçanlarda meme tümörü sınıflandırmasında yer almışken, lipidden zengin karsinom sınıflamasına literatürde rastlanmamıştır. Bu yüzden lipidden zengin karsinom tanısı için ek histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalara ihtiyaç duyulmuş ve bu boyamaların sonucunda bu tümörlere lipidden zengin karsinom tanısı konulmuştur.

PCNA, G1 sırasında bölünen hücrelerde eksprese edilen DNA polimerazın yardımcı bir proteindir. PCNA geç dönem G1 safhasında artar, S fazında pik yapar ve

uzun yarı ömrü nedeniyle G2 ve M fazında yüksek kalır (Bravo, Frank, Blundell & Macdonald-Bravo, 1987). Carvalho ve arkadaşlarının 2016 yılında köpek meme tümörleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, intratümöral PCNA pozitif boyanan neoplastik hücre sayısının cut off değeri %39 olarak belirlenmiş ve bu oranın üstünde boyanma gösterenler yüksek proliferatif meme tümörü olarak sınıflandırılmıştır (Carvalho, Pires, Prada, Lobo & Queiroga, 2016). Bu çalışmada 43 adet köpek meme tümörü dokusu incelenmiş ve %39'dan fazla PCNA ile pozitif boyanan hücre gözlenen 21 meme tümörü yüksek proliferatif olarak sınıflandırılırken, 22 meme tümöründe ise %39'dan daha az değerde PCNA ile pozitif boyanan hücreler gözlenmiştir (Carvalho ve ark., 2016). İyi huylu ve kötü huylu meme tümörleri ile PCNA boyanma oranının karşılaştırdığı bir çalışmada ise 57 iyi huylu meme tümöründe PCNA pozitif hücrelerin yüzde değeri % 18,66 iken 32 kötü huylu meme tümöründe ise PCNA pozitif hücrelerin yüzde değeri %42, 59 bulunmuştur (Pena, Nieto, Perez-Alenza, Cuesta & Castano, 1998). Köpek meme tümörlerinde PCNA ekspresyonu ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada, kötü huylu köpek meme tümörlerindeki PCNA pozitif hücre sayısı, iyi huylu köpek meme tümörleri ve normal meme dokusuna göre yüksek pozitiflik gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada PCNA pozitif hücre yüzde değeri meme karsinomlarda %27, malignant mikst tümörde % 15,7 olarak bulunmuştur. İyi huylu meme tümörlerinden meme adenomlarında PCNA pozitif hücre değeri %4,4, benign mikst tümörlerde %5,4, meme bezi hiperplazilerinde %2,1 ve normal meme bezinde %0,9 olarak hesaplanmıştır (Funakoshi ve ark., 2000). Tez çalışmasında 10 adet köpek meme tümöründe PCNA boyanma yüzdesi %66,9 saptanmıştır. Tümörlerin hepsi %39'dan fazla boyanma göstermiş ve yüksek proliferatif meme tümörü olarak sınıflandırılmıştır.

Sprague-Dawley ırkı sıçanlarda DMBA ile oluşturulan meme tümörlerinde PCNA boyanmasının değerlendirildiği bir çalışmada yüksek büyütmelerde 3 alanda immun pozitif hücreler sayılmıştır. Kontrol meme dokusunda PCNA boyanan hücreler için değer $12,3 \pm 4,1$ iken papiller karsinomda bu değer $120 \pm 5,3$, kribriform karsinomda ise bu değer $179,7 \pm 15,1$ bulunmuştur. Buna göre kontrol meme dokusundan papiller karsinomda yaklaşık 10 kat bir artış söz konusu iken kribriform karsinomlarda yaklaşık 15 kat artış saptanmıştır (Al-Dhaheri, Hassouna, Al-salam & Karam, 2008). Kang ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada, kontrol

meme dokusunda PCNA değeri $7,99 \pm 6,20$ bildirilmiş (Kang ve ark, 2004), tez çalışmasında ise bu değer %9 olarak bulunmuştur. Kang ve arkadaşları meme tümörlü dokularda ortalama değeri $12,65 \pm 6,56$ olarak değerlendirmiştir. Tez çalışmasında ise bu değer G grubunda %70,69 iken E grubunda %69 bulunmuştur.

7-12 DMBA ile deneysel meme tümörü oluşturulan gruplarda sadece gavaj uygulaması yapılarak oluşturulan meme tümörlerinde, gavaj uygulaması sonrasında progesteron uygulanan gruplara göre oluşan tümörlerin daha az agresif oldukları ifade edilmektedir (Benakanakere ve ark., 2010). Tez çalışmasında bu iki grup arasında PCNA ekspresyonu karşılaştırıldığında PCNA değerleri birbirine yakın bulunmuştur ve yapılan çalışmaların (Benakanakere ve ark., 2010) aksine çalışmada incelenen tümörler çok yakın proliferatif indekse sahip bulunmuştur.

Glajcar ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada, intratümöral ve peritümöral alanda triptaz ve kimaz eksprese eden mast hücreleri ve olası rolleri incelenmiştir. Bu çalışmaya göre intratümöral alanda peritümöral alana göre hem triptaz eksprese eden hem de kimaz eksprese eden mast hücrelerinin sayısında artış gözlenmiştir (Glajcar ve ark., 2017). Tez çalışmasında da hem intratümöral hem de peritümöral mast hücre sayısında artış gözlenmiş ve sayılan mast hücrelerinin daha çok intratümöral yerleşim gösterdikleri bulunmuştur. Ayrıca bu literatürde luminal A olarak sınıflanan meme kanserlerinde, peritümöral alanda triptaz eksprese eden mast hücrelerinin artması ile lenf kapillar damarları sayısında artış arasında pozitif korelasyon bulunmuş, bunun da metastaz ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Glajcar ve ark, 2017). Tez çalışmasında deneysel olarak oluşturulan meme tümörü olgularında peritümöral triptaz eksprese eden mast hücreleri ortalaması G ve E grubunda sırası ile 2,4 ile 3,96 iken, kedi ve köpek meme tümörlerinde bu sayı sırası ile 5,25, 5,48 olarak bulunmuştur. Deneysel olarak oluşturulan meme tümörlerinde daha az peritümöral triptaz eksprese eden mast hücrelerinin gözlenmesi, DMBA ile oluşturulan meme tümörlerinde metastaza rastlanılmaması ve bu çalışmada da metastazın görülmemiş olması Glajcar ve arkadaşlarının bulgularıyla paralellik göstermektedir. Ki-67 ekspresyonu ile triptaz ve kimaz eksprese eden mast hücreleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur (Glajcar ve ark., 2017). Tez çalışmasında, PCNA ile mast hücre artışı arasında korelasyon yapıldığında ters bir korelasyon olduğu görülse de sadece deneysel olarak oluşturulan meme tümörlerinde mast hücre

sayısı ile PCNA değeri arasında ters korelasyon anlamlı bulunmuş, kedi ve köpek meme tümörlerinde bu değer istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Hem triptaz eksprese eden mast hücrelerinin hem de kimaz eksprese eden mast hücrelerinin daha az agresif meme kanserleri ile ilişkili olduğunu gösterilmiş ve mast hücre alt tiplerinden herhangi birinin artan sayısının daha iyi bir prognoz ile ilişkili olduğunu bulunmuştur (Glajcar ve ark., 2017). Tez çalışmasında, meme karsinomlarının agresif olup olmadığı yönünde bir değerlendirme yapılmamıştır. Hem PCNA değerleri ile mast hücre artışı arasında negatif korelasyonun bulunmuş olması hem de TNF-alfa ekspresyonundaki artış meme tümörlerinde mast hücrelerinin bulunmasının iyi prognozdan sorumlu olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

İnsan prostat kanserlerinde intratümöral olarak mast hücrelerinin artmasının tümör büyümesini engellediği, peritümöral mast hücre artışının ise büyümeyi arttırdığı belirtilmiştir (Varricchi ve ark., 2017). Tez çalışmasında sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan meme karsinomlarında intratümöral mast hücrelerinde peritümöral mast hücrelerine göre belirgin bir artış saptanmıştır. İntratümöral alanda mast hücre sayısında gözlenen bu artış kedi ve köpeklerde mast hücrelerinin meme tümörlerinde anti-tümörojenik etkiye sahip olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Shikotra ve arkadaşları (2016) tarafından küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri ile mast hücreleri arasındaki ilişki hakkında yapılan bir çalışmada, tümör stromasında triptaz pozitif mast hücresi sayısının triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısına göre 4 kat daha fazla bulunduğu bildirilmiştir. Tümör stromasında triptaz pozitif mast hücrelerinin fazla bulunmasının da TNF-alfa ekspresyonu ile ilişkilendirilerek, diğer yangı hücrelerini bölgeye çektiği ve tümör gelişimini engellediği vurgulanmıştır (Shikotra, Ohri, Green, Waller & Bradding, 2016). Tez çalışmasında toplam triptaz pozitif mast hücre sayısı triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısına oranlandığında sıçanlarda G grubunda 0,7, E grubunda 0,97, kedilerde 1,90 ve köpeklerde 1,79 olarak bulunmuştur. Özellikle, kedi ve köpeklerde hem TNF-alfa değerlerinin hem de triptaz pozitif mast hücre sayısının triptaz-kimaz pozitif mast hücre sayısına göre daha fazla olması nedeniyle mast hücrelerinin tümör bölgesinde olması anti-tümörojenik etkiye sahip olduklarının göstergesi olarak yorumlanmıştır.

Tümör bölgesindeki mast hücrelerinin anti-tümör etkisinden bahseden çok az çalışma bulunmaktadır (Birbrair, 2018). della Rovere ve arkadaşlarının (2007) yaptığı

bir çalışmada peritümöral alanda yerleşim gösteren mast hücrelerinin tümör hücrelerine karşı sitolitik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (della Rovere ve ark, 2007). Başka bir çalışmada, akciğer kanserlerinde tümör bölgesinde bulunan mast hücrelerinin prostoglandin D₂ (PGD₂) sentezini arttırarak damar oluşumunu ve damar geçirgenliğini azalttığı bildirilmiştir (Murata ve ark., 2011). Ayrıca, mast hücrelerinden köken alan TNF-alfanın dentritik hücreler ve sitotoksik T hücrelerini olgunlaştırmadan ve tümör bölgesine göçünden ve aktivasyonundan sorumlu olduğu bilinmektedir (Birbrair, 2018, Oldford ve ark., 2010). Tez çalışmasında TNF-alfa ekspresyonu yüksek bulunmuştur. Ayrıca TNF-alfa pozitif mast hücreleri tümör bölgesinde sayıca arttıkları dikkati çekmiş fakat sayılarak değerlendirme yapılamamıştır. Sadece TNF-alfa ekspresyonu değerinin yüksek olması mast hücrelerinin kedi ve köpek meme tümörlerinde anti-tümöral etkiden sorumlu olduklarını düşündürmüştür.

Tümör bölgesinde mast hücre artışının anti-tümörojenik etkisi kadar pro-tümörojenik etkilerinden de bahsedilmekte ve özellikle meme kanserlerinde mast hücrelerinin rollerinin anti-tümöral ya da pro-tümöral oldukları henüz tam olarak bilinmemektedir. Mast hücrelerinin pro-tümöral olası etkilerinin tümör hücre üremelerini arttırarak, tümör bölgedeki immun hücreleri baskılayarak, kan ve lenf damarı oluşumlarını, invazyon ve metastazı arttırarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Birbrair, 2018)

Yapılan bir çalışmada özellikle mast hücre triptazının insan kanserlerinde yeni damar oluşumlarını tetikleyen en güçlü bileşen olduğu bildirilmektedir (Ribatti & Crivellato, 2012). Yine Marech ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir çalışmada meme kanserlerinde serum triptaz seviyesinin arttığı bu artışın kapillar damar artışlarıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Marech ve ark, 2014).

Keser ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, metastatik nodüllerde mast hücreleri Toluidin Blue boyamada gösterilmiş ve sayıca arttıkları bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada bu bulgular mast hücrelerinin metastazı arttırdığı yönünde değerlendirilmiş ve meme kanserlerinde mast hücrelerinin metastazdan ve pro-tümörojenik etkisinden sorumlu oldukları belirtilmiştir (Keser ve ark., 2017). Tez çalışmasında mast hücre artışı MMP-9 ile ilişkilendirilmiş fakat anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Hatta mast hücre sayısı çok olan olgularda MMP-9 ekspresyonu 0

değerinde bulunmuştur. Sıçan meme tümörlerinde MMP-9 ekspresyonu çok düşük çıkmasına rağmen mast hücre sayıları hem Toluidin Blue boyamada hem de triptaz, kimaz eksprese eden mast hücre sayımlarında oldukça yüksek çıkmıştır. Çalışmada meme tümörlü sıçanlarda metastaza rastlanmamıştır.

Faustino-Rocha ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada deneysel sıçan meme tümörü modelinde MNU ile meme tümörü oluşturulmuş ve ketotifen uygulanarak mast hücre degranülasyonu engellenmiş, tümör üzerindeki etkisi incelenmiştir (Faustino-Rocha ve ark., 2017). Bu çalışmada, Ki-67 ile proliferasyon indeksi ve tümör oluşumu incelenmiş ve mast hücrelerinin degranülasyonu engellendiğinde daha düşük proliferasyon indeksine sahip ve daha az sayıda tümörler olduğu gözlenmiştir (Faustino-Rocha ve ark., 2017). Tez çalışmasında da proliferasyon indeksine bakılmıştır ve sıçanlarda PCNA yüzdesi artan tümörlerde daha az mast hücre sayısı, PCNA yüzdesi azalan tümörlerde ise daha fazla mast hücresi olduğu ve olgu bazında korelasyon yapıldığında anlamlı olarak zayıfta olsa ters korelasyon olduğu gözlenmiştir. Faustino-Rocha ve arkadaşlarının tersine proliferasyon indeksi artanlarda mast hücre sayısının azaldığı, proliferasyon indeksi düşük olanlarda ise mast hücrelerinin arttığı gösterilmiştir. Kedi köpek meme tümörlerinde yine aynı korelasyon uygulandığında PCNA ile mast hücre sayısı arasındaki ilişki ters orantılı gibi gözükse de istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir.

Kankkunen ve arkadaşları (1997) tarafından yapılan bir çalışmada iyi huylu ve kötü huylu meme kanserlerinde triptaz eksprese eden ve kimaz eksprese eden mast hücreleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya göre iyi huylu meme tümörlerinde triptaz eksprese eden mast hücreleri ile kimaz eksprese eden mast hücreleri eşit iken kötü huylu meme kanserlerinde triptaz eksprese eden mast hücrelerinin 2-3 kat artış gösterdiği bildirilmiştir (Kankkunen ve ark., 1997). Yine bu çalışmaya göre triptaz eksprese eden mast hücrelerinin tümör invazyon bölgesi olarak adlandırılan tümör sınırında arttığı, kimaz eksprese eden mast hücrelerinin ise bu bölgede gözlenmediği belirtilmiştir (Kankkunen ve ark., 1997). Tez çalışmasında da hem sıçan meme tümörlerinde G ve E gruplarında, hem de kedi ve köpek meme tümörlerinde triptaz eksprese eden mast hücrelerinin sayısı kimaz eksprese eden mast hücrelerine göre sırasıyla 1,7, 1,97, 2,9 ve 2,79 kat arttığı gözlenmiştir. Yine çalışmada triptaz eksprese

eden mast hücreleri intra-tümöral alanda peri-tümöral alana göre sıçanlarda G grubunda 5, 72 kat, E grubunda 2,99 kat kedilerde 1,98 kat ve köpeklerde 3,39 kat daha fazla arttıkları gözlenmiştir. Kankunen ve arkadaşları (1997) tümör invazyon bölgesindeki triptaz eksprese eden mast hücrelerinin artışının ve bu bölgede kimaz eksprese eden mast hücre sayısının düşük oluşunu pro-tümörojenik etki olarak değerlendirmişler ve tümörün büyümesini ve gelişmesini sağlayabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, triptaz eksprese eden mast hücre sayısı intra-tümöral alanda peri-tümöral alana göre daha fazla bulunmuştur. TNF-alfa'nın artışı ve PCNA ile negatif korelasyon bulunması meme tümörlerinde mast hücrelerinin intratümöral olarak yerleşim göstermiş olması bu hücrelerin anti-tümörojenik etkiye sahip olduklarını düşündürmüştür.

Veteriner hekimlik alanında meme tümörleri ve mast hücreleri çalışmaları oldukça azdır. 2022 yılında köpek meme tümörleri ve mast hücre ilişkisi ile yapılan çalışmada intratümöral mast hücrelerinin meme tümörlerinin büyüüp gelişmesinde önemli rol aldığı bildirilmiş, fakat yine aynı çalışmada peritümöral yerleşim gösteren mast hücrelerinin herhangi bir etkisine rastlanmamıştır (Sakalauskaite ve ark., 2022). Bu çalışmada, mast hücreleri Giemsa ile boyanmış ve peritümöral alanda intratümöral alana göre daha fazla mast hücrelerine rastlandığı bildirilmiştir. Tez çalışmasında köpek meme tümörlerinin Toluidin Blue boyamalarında intratümöral alanda peritümöral alana oranla daha fazla mast hücreleri sayılmış olsa da bu fark çok fazla değildir. Fakat hem Toluidin Blue boyamalarında hem de triptaz ve kimaz eksprese eden mast hücrelerine bakıldığında intratümöral alanda daha fazla mast hücreleri bulunduğu tespit edilmiştir.

Im ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan köpeklerde triptaz pozitif mast hücreleri ve yeni damar oluşumları ile ilişkili makalede mast hücrelerinin tümör stroması veya tümörün etrafındaki bağ dokuda daha çok gözlendiği belirtilmiş ve triptaz eksprese eden mast hücreleri yeni damar oluşumları ile ilişkilendirmiştir. Tez çalışmasında da benzer bulgular gözlenmiş, triptaz eksprese eden mast hücrelerinin köpeklerde arttığı bulunmuştur. Çalışmada, triptaz eksprese eden mast hücre sayısındaki artış intratümöral alanda daha fazla gözlenmiştir.

Xiang ve arkadaşlarının (2010) tarafından meme kanserleri üzerine yapılan bir araştırmada, triptaz eksprese eden mast hücrelerinin peritümöral bölgede

artmasının MMP'lerde artışa sebep olarak kanser invazyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Tez çalışmasında, triptaz eksprese eden mast hücreleri sayılarının tümör grubunda hem intratümöral hem de peritümöral alanda arttığı bulunmuş, intratümöral alana göre peritümöral alanda çok daha fazla oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, intratümöral alandakiler daha çok degranüle iken peritümöral alanda olanlar daha fazla granüle olarak gözlenmiştir. Peritümöral alanda mast hücrelerinin artması bu hücrelerin tümöre herhangi bir etkisinin olmadığını düşündürmüştür.

Dyduch ve arkadaşları (2012) mast hücrelerinden salgılanan TNF-alfa, IL-1 ve IL-6 gibi mediyatörlerin tümör büyümesi ve yeni damar oluşumları üzerinde inhibe edici etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir (Dyduch, Kaczmarezyk & Okon, 2012). Bizim çalışmamızda da TNF-alfa ekspresyonu, MMP-9 ekspresyonu ile karşılaştırıldığında, tümör dokularında yüksek çıkmıştır ve bu bulgu tümör bölgesinde mast hücre artışının anti-tümöral etkisinden kaynaklandığını düşündürmüştür.

Carlini ve arkadaşlarının (2010) küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri ve mast hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada, intratümöral mast hücrelerinin daha az granül içerdikleri yani degranüle oldukları bildirilmiştir (Carlini ve ark., 2010). Tez çalışmasında degranüle mast hücreleri ile intratümöral mast hücreleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bu bulgular Carlini ve arkadaşlarının bulgularını destekler niteliktedir.

Tez çalışmasında özellikle kedilerde kimaz eksprese eden mast hücreleri kontrol meme dokusuna göre artışı anlamlı olsa bile diğer türlere göre hem daha az sayıda hem de morfolojik özellikleri farklı bulunmuştur. Mast hücre çalışmalarında genellikle Carnoy fiksatifinin kullanılması ve özellikle kimaz eksprese eden mast hücrelerinin diğer fiksatiflerle çok iyi tespit edilememesi nedeniyle kedilerde kimaz eksprese eden az sayıda mast hücre sayılmış olmasının sebebi fiksatif kullanımına bağlı olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmada, toplam mast hücre sayısına bakıldığında triptaz eksprese eden mast hücrelerinin kimaz eksprese edenlere oranla daha fazla gözlemlendiği bulunmuştur. Kimaz eksprese eden mast hücrelerinin bölgede bulunmasının yüksek damar yoğunluğu ile ilişkili olduğu, bu bulgunun sadece kimaza özgü olmayıp hem kimaz hem de triptaz eksprese eden mast hücreleri ile aynı olduğu belirtilmiştir (Carlini ve ark., 2010).

MMP ailesinin bir üyesi olan MMP-9, proinflamatuvar bir faktör olarak kategorize edilir. Mast hücreleri, ekstraselüler matriks bileşenlerini sentezleyebilir ve fibroblastlarla adeziv etkileşimleri, MMP-9 salınımına neden olur. Ayrıca MMP-9, sitokinlerin ve kemokinlerin salınmasını indükleyerek, bağışıklık hücrelerinin yangı bölgesine girmesini kolaylaştırır (Gauchotte ve ark., 2013; Purwar ve ark., 2008). Mast hücrelerinden salgılanan kimaz, pro-MMP-9 ve pro-MMP-2'nin aktivasyonunda yer alırken ve triptaz ise, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonu ile ilişkilendirilebilmektedir (Tchougounova ve ark., 2008; Abel M & Vliagoftis 2005). Wu ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı bir çalışmada 60 meme kanserli hastanın 46 tanesinde (%77) MMP-9 güçlü veya çok güçlü boyanma göstermiştir. Bu çalışmada, sıçan meme tümörü dokularında MMP-9 ekspresyonu değeri 12 üzerinden G grubunda 3,53 E grubunda ise 3,27 olarak bulunmuş ve iki grupta da orta derecede pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kedi ve köpek meme tümörü dokularında MMP-9 ekspresyonu ile kıyaslandığında deneysel olarak oluşturulan meme tümörü olgularında MMP-9 ekspresyonu düşük bulunmuştur. Tez çalışmasında meme tümörlü sıçanların hiçbirinde metastaza rastlanmamış olması MMP-9 ekspresyonunun düşük olması ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Nükleer olarak gözlenen MMP'lerin aşırı ekspresyonunun iskemik hasar, kas hasarından sonra gözlenen kas rejenerasyonu ve tümör gelişimi ile ilişkili oldukları gösterilmiştir (Sun, Mu & Zhang, 2014, Xie ve ark., 2018). Örneğin nükleer olarak boyanan MMP-3'ün ekspresyonu nükleer matrikste ciddi hasarlara ve bu nedenle de genetik hasara yol açtığı bildirilmiştir (Sun ve ark., 2014). Nükleer MMP-1 ekspresyonu, insanlarda meme kanserlerinde stromal hücrelerde gözlenmiş ve nükleer olarak ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Boström ve ark., 2011). Bu nedenle nükleer MMP ekspresyonunun gözlenmesinin kanserin daha agresif olduğunu ve daha az hayatta kalım süresi ile ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür (Xie ve ark., 2018). Bu çalışmada kedi ve köpek meme tümörü olgularının 4 tanesinde MMP-9 ekspresyonunun nükleer lokasyonda olduğu gözlenmiştir. Deneysel olarak oluşturulan meme tümörlerinde ise sadece bir olguda nükleer MMP-9 lokasyonu tespit edilmiştir. Kedi ve köpek meme tümörü olgularında operasyon sonrası hasta ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Bu hastalarda prognoza yönelik sağlıklı bir yorum yapılamamış olmakla birlikte muhtemelen kötü prognoza sahip olduğu düşünülmüştür.

Tez çalışması, 7-12 DMBA ile oluşturulan deneysel meme tümörü modeli ile kedi ve köpek meme tümörlerinde mast hücrelerinin immunhistokimyasal metodlarla mast hücre fenotipinin, degranülasyonunun, tümör dokusundaki konumunun değerlendirildiği ve doku sitokin düzeyinin araştırıldığı ilk çalışmalardan biri olması yönüyle özgün bir çalışma niteliğindedir. Tez çalışması, hem pro- hem de anti-tümör aktivitesi açısından mast hücrelerinin iki rollü analizine dayanmaktadır. Tez çalışmasında kedi ve köpek meme tümörlerinde hem triptaz hem de kimaz eksprese eden mast hücrelerinin sağlıklı meme dokusuna göre arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, aynı tümörlerin PCNA ekspresyonuna bakılarak proliferasyon indeksi belirlenmiş, kedi ve köpeklerde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da PCNA değeri düştükçe mast hücre sayısının arttığı gözlenmiştir. Bu korelasyon anlamlı olmasa da mast hücrelerinin meme tümörlerinde artmasının anti-tümörojenik etkiye sahip olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, çalışmanın en önemli bulgularından bir tanesi de daha önceden literatürde bildirilmeyen intratümöral mast hücreleri ile degranüle mast hücrelerinin, peritümöral mast hücreleri ile granüle mast hücrelerinin pozitif korelasyon göstermiş olmasıdır. Sakalauskaite ve arkadaşlarını (2022) tarafından köpek meme tümörleri üzerine yapılan çalışmada, peritümöral mast hücrelerinin meme tümörlerinde herhangi bir görevinin bulunmadığı bildirmişse de bu durum herhangi bir bulguya dayandırılmamıştır. Tez çalışmasında, belirtilen granüle mast hücreleri ile peritümöral mast hücreleri arasındaki pozitif korelasyon, peritümöral mast hücrelerinin köpek meme tümörlerinde herhangi bir etkisinin olmadığını düşündürmüş olsa da olası etkilerin ortaya konması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmada, neoplastik epitel hücrelerinde MMP-9 ve TNF-alfa ekspresyonları değerlendirilmiştir. İmmunohistokimyasal boyamaların değerlendirilmesi sırasında hem TNF-alfa eksprese eden mast hücrelerinin hem de MMP-9 eksprese eden mast hücrelerinin tümör bölgesindeki çokluğu dikkati çekmiştir. Bu yüzden bir başka çalışmada TNF-alfa ve MMP-9 pozitif mast hücrelerinin de sayılarak değerlendirilmesinin çalışmaya artı bir değer katabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, tez çalışmasında, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan meme karsinomları ve kedi ve köpek meme tümörleri, kontrol meme dokusu ile

karşılaştırıldığında hem intratümöral hem de peritümöral mast hücrelerinin sayıca arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, çalışmada TNF-alfa ve MMP-9 ekspresyonları değerlendirilerek mast hücrelerinin olası rolleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Hem TNF-alfa ekspresyonunun yüksekliği hem de PCNA değeri ile mast hücre arasındaki negatif korelasyon sonucuna bakıldığında, meme tümörlerinde mast hücrelerinin artması, bu artışın anti-tümörojenik etkiye sahip olduğunu düşündürmüştür. Tez çalışması, veteriner hekimlik alanında meme tümörlerinde mast hücrelerinin gösterilmesi, mast hücrelerinin tümörlerdeki yerleşimleri ve degranülasyon durumunun değerlendirilmesi bakımından ilk çalışma olmakla birlikte immunfenotipleri ve olası rollerinin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, meme tümörlerinde mast hücre artışının anti-tümörojenik etki olarak yorumlanması ve değerlendirilmesi, prognostik araç olarak kullanılmasına ya da mast hücre hedeflenerek ilaç kullanımı gibi çalışmalara kaynak sağlaması açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abel, M. & Vliagoftis, H: (2008) Mast cell-fibroblast interactions induce matrix metalloproteinase-9 release from fibroblasts: Role for IgE-mediated mast cell activation. *Journal of Immunology*. 180:3543–3550.
- Abraham, S. N., & St John, A. L. (2010). Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, 10(6), 440–452. <https://doi.org/10.1038/nri2782>
- Agarwala, S. S., Glaspy, J., O'Day, S. J., Mitchell, M., Gutheil, J., Whitman, E., ... Naredi, P. (2002). Results from a randomized phase III study comparing combined treatment with histamine dihydrochloride plus interleukin-2 versus interleukin-2 alone in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(1), 125–133. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.1.125>
- Aggarwal B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews. Immunology*, 3(9), 745–756. <https://doi.org/10.1038/nri1184>
- Ahmed, M. I., Salahy, E. E., Fayed, S. T., El-Hefnawy, N. G., & Khalifa, A. (2001). Human papillomavirus infection among Egyptian females with cervical carcinoma: relationship to spontaneous apoptosis and TNF-alpha. *Clinical Biochemistry*, 34(6), 491–498. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(01\)00243-0](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(01)00243-0)
- Albrektsen, G., Heuch, I., Hansen, S., & Kvåle, G. (2005). Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *British Journal of Cancer*, 92(1), 167–175. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602302>
- Al-Dhaheri, W. S., Hassouna, I., Al-Salam, S., & Karam, S. M. (2008). Characterization of breast cancer progression in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1138, 121–131. <https://doi.org/10.1196/annals.1414.018>
- Al-Dhaheri, W. S., Hassouna, I., Al-Salam, S., & Karam, S. M. (2008). Characterization of breast cancer progression in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1138, 121–131. <https://doi.org/10.1196/annals.1414.018>
- Alvarado, A., Faustino-Rocha, A. I., Ferreira, R., Mendes, R., Duarte, J. A., Pires, M. J., Colaço, B., & Oliveira, P. A. (2016). Prognostic Factors in an Exercised Model of Chemically-induced Mammary Cancer. *Anticancer Research*, 36(5), 2181–2188.
- Amini, R. M., Aaltonen, K., Nevanlinna, H., Carvalho, R., Salonen, L., Heikkilä, P., & Blomqvist, C. (2007). Mast cells and eosinophils in invasive breast carcinoma. *BMC Cancer*, 7, 165. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-165>
- Ammendola, M., Leporini, C., Marech, I., Gadaleta, C. D., Scognamillo, G., Sacco, R., Sammarco, G., De Sarro, G., Russo, E., & Ranieri, G. (2014). Targeting mast cells tryptase in tumor microenvironment: a potential antiangiogenetic strategy. *BioMed Research International*, 2014, 154702. <https://doi.org/10.1155/2014/154702>
- Ammendola, M., Sacco, R., Donato, G., Zuccalà, V., Russo, E., Luposella, M., Vescio, G., Rizzuto, A., Patruno, R., De Sarro, G., Montemurro, S., Sammarco, G., & Ranieri, G. (2013). Mast cell positivity to tryptase correlates with metastatic

- lymph nodes in gastrointestinal cancer patients treated surgically. *Oncology*, 85(2), 111–116. <https://doi.org/10.1159/000351145>
- Aponte-López, A., Fuentes-Pananá, E. M., Cortes-Muñoz, D., & Muñoz-Cruz, S. (2018). Mast Cell, the Neglected member of the tumor microenvironment: role in breast cancer. *Journal of Immunology Research*, 2018, 2584243. <https://doi.org/10.1155/2018/2584243>
- Arendt, L. M. & Kuperwasser, C. (2015). Form and function: how estrogen and progesterone regulate the mammary epithelial hierarchy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 20(0), 9-25. <https://doi.org/10.1007/s10911-015-9337-0>.
- Bancroft, J. D. & Cook, H. C. (1984): *Manuel of Histological Techniques*. Churchill Livingstone Inc, New York.
- Barnes P. J. (1991). Histamine receptors in the lung. *Agents and Actions. Supplements*, 33, 103–122. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7309-3_9
- Bauchet, A. L., Elies, L., Maliver, P., Fouque, M. C., Balme, E., Château-Joubert, S., Schorsch, F., & Fontaine, J. J. (2008). A mammary gland adenomyoepithelioma in a C57BL/6 mouse. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 60(4-5), 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.02.008>
- Bazzoni, F., & Beutler, B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *The New England journal of Medicine*, 334(26), 1717–1725. <https://doi.org/10.1056/NEJM199606273342607>
- Benakanakere, I., Besch-Williford, C., Carroll, C. E., & Hyder, S. M. (2010). Synthetic progestins differentially promote or prevent 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in sprague-dawley rats. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 3(9), 1157–1167. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0064>
- Benavente, M. A., Bianchi, C. P. & Aba, M. A. (2016). Canine mammary tumors: Risk factors, prognosis and treatments. *Journal of Veterinary Advances*, 6(8), 1291-1300. <https://doi.org/10.5455/jva.20160916045115>
- Berkel, H., Birdsell, D. C., & Jenkins, H. (1992). Breast augmentation: a risk factor for breast cancer?. *The New England Journal of Medicine*, 326(25), 1649–1653. <https://doi.org/10.1056/NEJM199206183262501>
- Bernstein L. (2002). Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(1), 3–15. <https://doi.org/10.1023/a:1015714305420>
- Birbrair, A. (2018). Tumor Microenvironment (Hematopoietic Cells-PArt B). 6330 Cham, Switzerland, ISSN 0065-2598, sayfa: 172-184. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-49270-0>
- Blackshear P. E. (2001). Genetically engineered rodent models of mammary gland carcinogenesis: an overview. *Toxicologic Pathology*, 29(1), 105–116. <https://doi.org/10.1080/019262301301418919>
- Bostock D. E. (1986). Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *The British Veterinary Journal*, 142(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(86\)90002-3](https://doi.org/10.1016/0007-1935(86)90002-3)
- Bostock, D. E. (1986). Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *BritishVeterinaryJournal*, 142, 1-19. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(86\)90002-3](https://doi.org/10.1016/0007-1935(86)90002-3)

- Boström, P., Söderström, M., Vahlberg, T., Söderström, K. O., Roberts, P. J., Carpen, O., & Hirsimäki, P. (2011). MMP-1 expression has an independent prognostic value in breast cancer. *BMC Cancer*, 11, 348. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-348>
- Brand K. G. & Brand, I. (1980). Risk assessment of carcinogenesis at implantation sites. *Plastic Reconstruction Surgery*, 66:591–595.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A., & Macdonald-Bravo, H. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 326(6112), 515–517. <https://doi.org/10.1038/326515a0>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brodey, R. S., Fidler, I. J & Howson, A. E. (1966). The relationship of estrus irregularity, pseudopregnancy and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 149, 1047-1049.
- Brodey, R. S., Goldschmidt M. A. & Roszel, J. R. (1983). Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 19, 61–90.
- Broerse, J. J., Hennen, L. A., Klapwijk, W. M., & Solleveld, H. A. (1987). Mammary carcinogenesis in different rat strains after irradiation and hormone administration. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*, 51(6), 1091–1100. <https://doi.org/10.1080/09553008714551381>
- Bryson, G., & Bischoff, F. (1967). Silicate-induced neoplasms. *Progress in Experimental Tumor Research*, 9, 77–164.
- Bulfone-Paus, S., & Bahri, R. (2015). Mast Cells as Regulators of T Cell Responses. *Frontiers in Immunology*, 6, 394. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00394>
- Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiological Reviews*, 83(2), 581–632. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2002>
- Burrari, G. P., Gabrieli, A., Moccia, V., Zappulli, V., Porcellato, I., Brachelente, C. ... Antuofermo, E. (2020). A statistical analysis of risk factors and biological behavior in canine mammary tumors: A multicenter study. *MDPI Animals*, 10(19), 1687. <https://doi.org/10.3390/ani10091687>
- Byrne, C., Ursin, G., Martin, C. F., Peck, J. D., Cole, E. B., Zeng, D., ... Pisano, E. D. (2017). Mammographic Density Change With Estrogen and Progestin Therapy and Breast Cancer Risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(9), dx001. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx001>
- Canadas, A., França, M., Pereira, C., Vilaça, R., Vilhena, H., Tinoco, F., Silva, M. J., Ribeiro, J., Medeiros, R., Oliveira, P., Dias-Pereira, P., & Santos, M. (2019). Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study. *Veterinary Pathology*, 56(2), 208–219. <https://doi.org/10.1177/0300985818806968>
- Cardiff, R. D. (2007). Epilog: comparative medicine, one medicine and genomic pathology. *Breast Disease*; 28, 107-110. <https://doi.org/10.3233/bd-2007-28110>. PMID: 18057547.
- Carlini, M. J., Dalurzo, M. C., Lastiri, J. M., Smith, D. E., Vasallo, B. C., Puricelli, L. I., & Lauría de Cidre, L. S. (2010). Mast cell phenotypes and microvessels in

- non-small cell lung cancer and its prognostic significance. *Human Pathology*, 41(5), 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.04.029>
- Carmichael A. R. (2006). Obesity and prognosis of breast cancer. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 7(4), 333–340. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2006.00261.x>
- Carpenco, E., Ceaușu, R. A., Cimpean, A. M., Gaje, P. N., Șaptefrați, L., Fulga, V., David, V., & Raica, M. (2019). Mast Cells as an Indicator and Prognostic Marker in Molecular Subtypes of Breast Cancer. *In vivo (Athens, Greece)*, 33(3), 743–748. <https://doi.org/10.21873/invivo.11534>
- Carvalho, M. I., Pires, I., Prada, J., Lobo, L., & Queiroga, F. L. (2016). Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary Glands: Prognostic Impact by a Multivariate Survival Analysis. *Veterinary Pathology*, 53(6), 1138–1146. <https://doi.org/10.1177/0300985816646429>
- Carvalho, M. I., Pires, I., Prada, J., Lobo, L., & Queiroga, F. L. (2016). Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary Glands: Prognostic Impact by a Multivariate Survival Analysis. *Veterinary Pathology*, 53(6), 1138–1146. <https://doi.org/10.1177/0300985816646429>
- Castagnaro, M., Casalone, C., Bozzetta, E., De Maria, R., Biolatti, B., & Caramelli, M. (1998). Tumour grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Journal of Comparative Pathology*, 119(3), 263–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(98\)80049-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(98)80049-2)
- Castagnaro, M., De Maria, R., Bozzetta, E., Ru, G., Casalone, C., Biolatti, B., & Caramelli, M. (1998). Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Research in Veterinary Science*, 65(3), 223–226. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(98\)90147-3](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(98)90147-3)
- Caughey G. H. (2002). New developments in the genetics and activation of mast cell proteases. *Molecular Immunology*, 38(16-18), 1353–1357. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(02\)00087-1](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(02)00087-1)
- Caughey, G. H., Raymond, W. W., & Wolters, P. J. (2000). Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1480(1-2), 245–257. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00076-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00076-5)
- Cavalieri, E. L., & Rogan, E. G. (2010). Depurinating estrogen-DNA adducts in the etiology and prevention of breast and other human cancers. *Future Oncology (London, England)*, 6(1), 75–91. <https://doi.org/10.2217/fon.09.137>
- Cavalieri, E. L., & Rogan, E. G. (2016). Depurinating estrogen-DNA adducts, generators of cancer initiation: their minimization leads to cancer prevention. *Clinical and Translational Medicine*, 5(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0088-3>
- Chandrasekharan, U. M., Sanker, S., Glynnias, M. J., Karnik, S. S., & Husain, A. (1996). Angiotensin II-forming activity in a reconstructed ancestral chymase. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5248), 502–505. <https://doi.org/10.1126/science.271.5248.502>
- Chang, C. C., Tsai, M. H., Liao, J. W., Chan, J. P., Wong, M. L., & Chang, S. C. (2009). Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of the*

- American Veterinary Medical Association*, 235(4), 391–396.
<https://doi.org/10.2460/javma.235.4.391>
- Chen, J., & Hu, X. Y. (2018). Inhibition of histamine receptor H3R suppresses prostate cancer growth, invasion and increases apoptosis via the AR pathway. *Oncology Letters*, 16(4), 4921–4928. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9310>
- Ch'ng, S., Wallis, R. A., Yuan, L., Davis, P. F., & Tan, S. T. (2006). Mast cells and cutaneous malignancies. *Modern Pathology : an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 19(1), 149–159. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800474>
- Chocteau, F., Boulay, M. M., Besnard, F., Valeau, G., Loussouarn, D., & Nguyen, F. (2019). Proposal for a Histological Staging System of Mammary Carcinomas in Dogs and Cats. Part 2: Feline Mammary Carcinomas. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 387. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00387>
- Cleary, M. P., & Grossmann, M. E. (2009). Minireview: Obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology*, 150(6), 2537–2542. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0070>
- Clemente, M., Pérez-Alenza, M. D., Illera, J. C., & Peña, L. (2010). Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Veterinary Pathology*, 47(2), 265–274. <https://doi.org/10.1177/0300985809353167>
- Collington, S. J., Williams, T. J. & Weller, C. L. (2011). Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. *Trends in Immunology*, 32(10), 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.08.002>
- Cotroneo, M. S., Haag, J. D., Zan, Y., Lopez, C. C., Thuwajit, P., Petukhova, G. V., ... Gould, M. N. (2007). Characterizing a rat Brca2 knockout model. *Oncogene*, 26(11), 1626–1635. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209960>
- Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D., & Werb, Z. (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, 103(3), 481–490. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00139-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00139-2)
- Currier, N., Solomon, S. E., Demicco, E. G., Chang, D. L., Farago, M., Ying, H., Dominguez, I., Sonenshein, G. E., Cardiff, R. D., Xiao, Z. X., Sherr, D. H., & Seldin, D. C. (2005). Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. *Toxicologic Pathology*, 33(6), 726–737. <https://doi.org/10.1080/01926230500352226>
- da Silva, E. Z., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *The journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 62(10), 698–738. <https://doi.org/10.1369/0022155414545334>
- Dabiri, S., Huntsman, D., Makretsov, N., Cheang, M., Gilks, B., Bajdik, C., Gelmon, K., Chia, S., & Hayes, M. (2004). The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis. *Modern Pathology : an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 17(6), 690–695. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800094>
- Dagher, E., Abadie, J., Loussouarn, D., Campone, M., & Nguyen, F. (2019). Feline Invasive Mammary Carcinomas: Prognostic Value of Histological Grading. *Veterinary Pathology*, 56(5), 660–670. <https://doi.org/10.1177/0300985819846870>

- Dawson, M. A., Kouzarides, T., & Huntly, B. J. (2012). Targeting epigenetic readers in cancer. *The New England Journal of Medicine*, 367(7), 647–657. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1112635>
- de Las Mulas, J. M., Millán, 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. *Veterinary Pathology*, 42(2), 200–212. <https://doi.org/10.1354/vp.42-2-200>
- de las Mulas, J. M., van Niel, M., Millán, Y., Blankenstein, M. A., van Mil, F., & Misdorp, W. (2000). Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay. *Domestic Animal Endocrinology*, 18(1), 111–125. [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(99\)00067-3](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(99)00067-3)
- de Souza Junior, D. A., Santana, A. C., da Silva, E. Z. M., Oliver, C. & Jamur, M. C. (2015). The Role of Mast Cell Specific Chymases and Trypsases in Tumor Angiogenesis. *BioMed Research International*, 16, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2015/142359>
- della Rovere, F., Granata, A., Familiari, D., D'Arrigo, G., Mondello, B., & Basile, G. (2007). Mast cells in invasive ductal breast cancer: different behavior in high and minimum hormone-receptive cancers. *Anticancer Research*, 27(4B), 2465–2471.
- Déry, R. E., Lin, T. J., Befus, A. D., Milne, C. D., Moqbel, R., Ménard, G., & Bissonnette, E. Y. (2000). Redundancy or cell-type-specific regulation? Tumour necrosis factor in alveolar macrophages and mast cells. *Immunology*, 99(3), 427–434. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00982.x>
- DeSantis, C. E., Ma, J., Gaudet, M. M., Newman, L. A., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2019). Breast cancer statistics, 2019. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 69(6), 438–451. <https://doi.org/10.3322/caac.21583>
- Destexhe, E., Lespagnard, L., Degeyter, M., Heymann, R., & Coignoul, F. (1993). Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 30(2), 146–154. <https://doi.org/10.1177/030098589303000207>
- Ding, L., Zhao, Y., Warren, C. L., Sullivan, R., Eliceiri, K. W., & Shull, J. D. (2013). Association of cellular and molecular responses in the rat mammary gland to 17 β -estradiol with susceptibility to mammary cancer. *BMC Cancer*, 13, 573. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-573>
- Dobson, J. M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. & Wood, J. L. N. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43(6), 240–246. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00066.x>
- Doctores, A., Martínez, J., Merchán, J., Sala, L., Renedo, G., ... Bullón, A. (1974) Carcinogenesis y nitrosoamidas, *Patologia (Mex)*. 7, 225–230.
- Donnay, I., Rauis, J., Devleeschower, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G. & Verstegen, J. (1995). Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and mammary tissues from dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 56, 1188–1194.

- Dorn, C. R., Taylor, D. O. N., Schneider H. H., Hibbard, H. H. & Klauber, M. R. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California, II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute*, 40, 307-318.
- Dundar, E., Oner, U., Peker, B. C., Metintas, M., Isiksoy, S., & Ak, G. (2008). The significance and relationship between mast cells and tumour angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *The Journal of International Medical Research*, 36(1), 88–95. <https://doi.org/10.1177/147323000803600112>
- Dunning, W. F., & Curtis, M. R. (1952). The incidence of diethylstilbestrol-induced cancer in reciprocal F hybrids obtained from crosses between rats of inbred lines that are susceptible and resistant to the induction of mammary cancer by this agent. *Cancer Research*, 12(10), 702–706.
- Dutra, A. P., Granja, N. V., Schmitt, F. C., & Cassali, G. D. (2004). c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 37(11), 1673–1681. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004001100013>
- Dvorak A. M. (2005). Ultrastructural studies of human basophils and mast cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 53(9), 1043–1070. <https://doi.org/10.1369/jhc.5R6647.2005>
- Dwinell, M. R., Lazar, J., & Geurts, A. M. (2011). The emerging role for rat models in gene discovery. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 22(7-8), 466–475. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9346-2>
- Dwivedy, I., Devanesan, P., Cremonesi, P., Rogan, E., & Cavalieri, E. (1992). Synthesis and characterization of estrogen 2,3- and 3,4-quinones. Comparison of DNA adducts formed by the quinones versus horseradish peroxidase-activated catechol estrogens. *Chemical Research in Toxicology*, 5(6), 828–833. <https://doi.org/10.1021/tx00030a016>
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews. Cancer*, 2(3), 161–174. <https://doi.org/10.1038/nrc745>
- Egenvall, A., Bonnett, B. N., Häggström, J., Ström Holst, B., Möller, L., & Nødtvedt, A. (2010). Morbidity of insured Swedish cats during 1999-2006 by age, breed, sex, and diagnosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12(12), 948–959. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.08.008>
- Egenvall, A., Bonnett, B. N., Öhagen, P., Olson, P., Hedhammar, Å. & Euler, H. von. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69(1–2), 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.014>
- El-Bayoumy, K., Ji, B. Y., Upadhyaya, P., Chae, Y. H., Kurtzke, C., Rivenson, A. ... Hecht, S. S. (1996). Lack of tumorigenicity of cholesterol epoxides and estrone-3,4-quinone in the rat mammary gland. *Cancer Research*, 56(9), 1970–1973.

- Evans, H. E & Christensen, G. C. (1993) The urogenital system. In Evans HE, editor: Miller's anatomy of the dog, ed 3, Philadelphia, 1993, Saunders, with permission.
- Fakhrjou, A., Naghavi-Behzad, M., Montazeri, V., Karkon-Shayan, F., Norouzi-Panahi, L., & Piri, R. (2016). The relationship between histologic grades of invasive carcinoma of breast ducts and mast cell infiltration. *South Asian Journal of Cancer*, 5(1), 5–7. <https://doi.org/10.4103/2278-330X.179699>
- Faustino-Rocha, A. I., Gama, A., Oliveira, P. A., Alvarado, A., Vala, H., Ferreira, R. & Ginja, M. Expression of estrogen receptors- alpha and beta in chemically induced mammary tumours, *Virchows Archive*, 467 (2015) S51 (ISI:000359056400189).
- Ferrajoli, A., Keating, M. J., Manshouri, T., Giles, F. J., Dey, A., Estrov, Z., Koller, C. A., Kurzrock, R., Thomas, D. A., Faderl, S., Lerner, S., O'Brien, S., & Albitar, M. (2002). The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100(4), 1215–1219.
- Ferreira, E., Bertagnolli, A. C., Cavalcanti, M. F., Schmitt, F. C., & Cassali, G. D. (2009). The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(4), 230–235. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00193.x>
- Flister, M. J., Joshi, A., Bergom, C., & Rui, H. (2019). Mapping Mammary Tumor Traits in the Rat. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2018, 249–267. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9581-3_12
- Forabosco, F., Löhmus, M., Rydhmer, L. & Sundström, L. F. (2013). Genetically modified farm animals and fish in agriculture: a review. *Livestock Science*, 153, 1–9, <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.01.002>.
- Funakoshi, Y., Nakayama, H., Uetsuka, K., Nishimura, R., Sasaki, N., & Doi, K. (2000). Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Veterinary Pathology*, 37(2), 177–183. <https://doi.org/10.1354/vp.37-2-177>
- Gama, A., Alves, A., & Schmitt, F. C. (2008). Clinicopathologic features of mammary invasive micropapillary carcinoma (IMC) in dogs. *Veterinary Pathology*, 45(4), 600–601. <https://doi.org/10.1354/vp.45-4-600>
- García-Tuñón, I., Ricote, M., Ruiz, A., Fraile, B., Paniagua, R., & Royuela, M. (2006). Role of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in human benign breast lesions and tumors (in situ and infiltrative). *Cancer Science*, 97(10), 1044–1049. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00277.x>
- Gauchotte G, Marie B, Gallet P, Nguyen DT, Grandhay M, Jankowski R and Vignaud JM: Respiratory epithelial adenomatoid hamartoma: A poorly recognized entity with mast cell recruitment and frequently associated with nasal polyposis. *Am J Surg pathol*. 37:1678–1685. 2013. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
- Gauchotte, G., Marie, B., Gallet, P., Nguyen, D. T., Grandhay, M., Jankowski, R., & Vignaud, J. M. (2013). Respiratory epithelial adenomatoid hamartoma: a poorly recognized entity with mast cell recruitment and frequently associated with nasal polyposis. *The American Journal of Surgical Pathology*, 37(11), 1678–1685. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000092>

- Giménez, F., Hecht, S., Craig, L. E., & Legendre, A. M. (2010). Early detection, aggressive therapy: optimizing the management of feline mammary masses. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12(3), 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.01.004>
- Glajcar, A., Szpor, J., Pacek, A., Tyrak, K. E., Chan, F., Streb, J., Hodorowicz-Zaniewska, D., & Okoń, K. (2017). The relationship between breast cancer molecular subtypes and mast cell populations in tumor microenvironment. *Virchows Archiv : an International Journal of Pathology*, 470(5), 505–515. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2103-5>
- Goffredo, V., Gadaleta, C. D., Laterza, A., Vacca, A., & Ranieri, G. (2013). Tryptase serum levels in patients suffering from hepatocellular carcinoma undergoing intra-arterial chemoembolization: Possible predictive role of response to treatment. *Molecular and Clinical Oncology*, 1(2), 385–389. <https://doi.org/10.3892/mco.2013.59>
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 117–131. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>
- Graf, R., Grüntzig, K., Boo, G., Hässig, M., Axhausen, K. W., Fabrikant, S., ... Pospischil, A. (2016). Swiss Feline Cancer Registry 1965-2008: the Influence of Sex, Breed and Age on Tumour Types and Tumour Locations. *Journal of Comparative Pathology*, 154(2-3), 195–210. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.01.008>
- Guiraldelli, M. F., França, C. N., de Souza, D. A., da Silva, E. Z., Toso, V. D., Carvalho, C. C., ... Oliver, C. (2013). Rat embryonic mast cells originate in the AGM. *PLoS One*, 8, e57862.
- Gurish, M. F. & Austen, K. F. (2012). Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity*, 37(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.003>
- Hanahan & Weinberg, 2000 D. Hanahan, R.A. Weinberg The Hallmarks of Cancer Cell, 100 (2000), pp. 57-70
- Hartveit F. Mast cells and metachromasia in human breast cancer: their occurrence, significance and consequence: a preliminary report. *J Pathol.* 1981; 134: 7-11.
- Harvell, D. M. E., Strecker, T. E., Xie, B., Pennington, K. L., McComb, R. D. & Shull, J. D. (2002). Dietary energy restriction inhibits estrogen-induced mammary, but not pituitary, tumorigenesis in the ACI rat, *Carcinogenesis*, 23(1), 161–169. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.1.161>
- Hawkes, S. P., Li, H., & Taniguchi, G. T. (2010). Zymography and reverse zymography for detecting MMPs and TIMPs. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 622, 257–269. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-299-5_16
- Hayden, D. W., & Nielsen, S. W. (1971). Feline mammary tumours. *The Journal of Small Animal Practice*, 12(12), 687–698. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1971.tb06197.x>
- Hayes, A. A., & Mooney, S. (1985). Feline mammary tumors. *The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice*, 15(3), 513–520. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(85\)50054-6](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(85)50054-6)
- Hayes, H. M., Jr, Milne, K. L., & Mandell, C. P. (1981). Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *The Veterinary Record*, 108(22), 476–479. <https://doi.org/10.1136/vr.108.22.476>

- Hellmén, E., Bergström, R., Holmberg, L., Spångberg, I. B., Hansson, K., & Lindgren, A. (1993). Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary Pathology*, 30(1), 20–27. <https://doi.org/10.1177/030098589303000103>
- Herrera, V. L., Ponce, L. R. & Ruiz-Opazo, N. (2013). Multiple Susceptibility Loci for Radiation-Induced Mammary Tumorigenesis in F2[Dahl S x R]-Intercross Rats. *PLOS One*, 8(8), e72143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072143>
- Hill S. J. (1992). Multiple histamine receptors: properties and functional characteristics. *Biochemical Society Transactions*, 20(1), 122–125. <https://doi.org/10.1042/bst0200122>
- Hoenerhoff, M. J., Shibata, M. A., Bode, A., & Green, J. E. (2011). Pathologic progression of mammary carcinomas in a C3(1)/SV40 T/t-antigen transgenic rat model of human triple-negative and Her2-positive breast cancer. *Transgenic Research*, 20(2), 247–259. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9406-5>
- Hoenerhoff, M. J., Shibata, M. A., Bode, A., & Green, J. E. (2011). Pathologic progression of mammary carcinomas in a C3(1)/SV40 T/t-antigen transgenic rat model of human triple-negative and Her2-positive breast cancer. *Transgenic Research*, 20(2), 247–259. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9406-5>
- Holtzman, S., Stone, J. P., & Shellabarger, C. J. (1982). Radiation-induced mammary carcinogenesis in virgin, pregnant, lactating, and postlactating rats. *Cancer Research*, 42(1), 50–53.
- Howell J. S. (1963). Studies on chemically induced breast tumours in the rat. *Acta - Unio Internationalis Contra Cancrum*, 19, 762–764. <https://doi.org/10.1097/00006534-198010000-00015>.
- Huggins, C., Briziarelli, G., & Sutton, H. (1959). Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. *The Journal of Experimental Medicine*, 109(1), 25–42. <https://doi.org/10.1084/jem.109.1.25>
- Hvid, H., Thorup, I., Sjögren, I., Oleksiewicz, M. B., & Jensen, H. E. (2012). Mammary gland proliferation in female rats: effects of the estrous cycle, pseudo-pregnancy and age. *Experimental and Toxicologic Pathology = Official Journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 64(4), 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.09.005>
- Imada, A., Shijubo, N., Kojima, H., & Abe, S. (2000). Mast cells correlate with angiogenesis and poor outcome in stage I lung adenocarcinoma. *The European Respiratory Journal*, 15(6), 1087–1093. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.01517.x>
- Irani, A. A., Schechter, N. M., Craig, S. S., DeBlois, G., & Schwartz, L. B. (1986). Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), 4464–4468. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4464>
- Isaacs J. T. (1986). Genetic control of resistance to chemically induced mammary adenocarcinogenesis in the rat. *Cancer research*, 46(8), 3958–3963.
- Ito, T., Kadosawa, T., Mochizuki, M., Matsunaga, S., Nishimura, R., & Sasaki, N. (1996). Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. *The Journal of*

- Veterinary Medical Science*, 58(8), 723–726.
<https://doi.org/10.1292/jvms.58.723>
- Ito, T., Smrž, D., Jung, M. Y., Bandara, G., Desai, A., Smržová, Š., Gilfillan, A. M. (2012). Stem cell factor programs the mast cell activation phenotype. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 188(11), 5428–5437.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103366>
- Itoh, T., Uchida, K., Ishikawa, K., Kushima, K., Kushima, E., Tamada, H. ... Shii, H. (2005). Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 67(3), 345–347. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.345>
- Jamur, M. C., & Oliver, C. (2011). Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Frontiers in Bioscience (Scholar edition)*, 3(4), 1390–1406.
<https://doi.org/10.2741/231>
- Jeong, H., Oh, H., Nam, S. Y., Han, N.R., Kim, Y. S. Kim, J. H., ... Oh, H. A. (2013). The critical role of mast cell-derived hypoxia-inducible factor-1 α in human and mice melanoma growth. *International Journal of Cancer*, 132, 2492–2501.
<https://doi.org/10.1002/ijc.27937>
- Jerry, D. J., Shull, J. D., Hadsell, D. L., Rijnkels, M., Dunphy, K. A., Schneider, S. S., Vandenberg, L. N., Majhi, P. D., Byrne, C., & Trentham-Dietz, A. (2018). Genetic variation in sensitivity to estrogens and breast cancer risk. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 29(1-2), 24–37. <https://doi.org/10.1007/s00335-018-9741-z>
- Jerry, D. J., Shull, J. D., Hadsell, D. L., Rijnkels, M., Dunphy, K. A., Schneider, S. S. ... Trentham-Dietz, A. (2018). Genetic variation in sensitivity to estrogens and breast cancer risk. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 29(1-2), 24–37. <https://doi.org/10.1007/s00335-018-9741-z>
- Jindal, S., Gao, D., Bell, P., Albrechtsen, G., Edgerton, S. M., Ambrosone, C. B., Thor, A. D., Borges, V. F. & Schedin, P. (2014). Postpartum breast involution reveals regression of secretory lobules mediated by tissue-remodeling. *Breast Cancer Research*, 16, 31. <https://doi.org/10.1186/bcr3633>
- Jitpean, S., Hagman, R., Ström Holst, B., Höglund, O. V., Pettersson, A., & Egenvall, A. (2012). Breed variations in the incidence of pyometra and mammary tumours in Swedish dogs. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 6, 347–350. <https://doi.org/10.1111/rda.12103>
- Johansson, A., Rudolfsson, S., Hammarsten, P., Halin, S., Pietras, K., Jones, J.... Bergh, A. (2010). Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. *The American Journal of Pathology*, 177(2), 1031–1041. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100070>
- K. Maeda, S. Ohkura, H. Tsukamura, Physiology of reproduction, in: G. Krinke (Ed.), *Laboratory Rat*, Academic Press, UK 2000, pp. 145–176.
- Kang, J. S., Jung, N. J., Kim, S., Kim, D. J., Jang, D. D., & Yang, K. H. (2004). Downregulation of estrogen receptor alpha and beta expression in carcinogen-induced mammary gland tumors of rats. *Eksperimental'naia Onkologiya*, 26(1), 31–35.
- Kankkunen, J. P., Harvima, I. T., & Naukkarinen, A. (1997). Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. *International Journal of Cancer*, 72(3), 385–388.

[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19970729\)72:3<385::aid-ijc1>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19970729)72:3<385::aid-ijc1>3.0.co;2-l)

- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T. C., & Dessiris, A. (2005). Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology*, 133(4), 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.05.003>
- Keser, S. H., Kandemir, N. O., Ece, D., Gecmen, G. G., Gul, A. E., Barisik, N. O., Senu, S., Buyukuysal, C., & Barut, F. (2017). Relationship of mast cell density with lymphangiogenesis and prognostic parameters in breast carcinoma. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 33(4), 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2017.01.005>
- Khanna, C., & Hunter, K. (2005). Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis*, 26(3), 513–523. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh261>
- Kim, J. B., O'Hare, M. J., & Stein, R. (2004). Models of breast cancer: is merging human and animal models the future?. *Breast Cancer Research : BCR*, 6(1), 22–30. <https://doi.org/10.1186/bcr645>
- Kitamura, Y., Oboki, K., & Ito, A. (2006). Molecular mechanisms of mast cell development. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 26(3), 387–405. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2006.05.004>
- Korsh, J., Shen, A., Aliano, K., Davenport, T. (2015) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Breast Cancer: A Review of the Literature. *Breast Care*, 10:316-318. doi: 10.1159/000436956
- Köhrmann, A., Kammerer, U., Kapp, M., Dietl, J., & Anacker, J. (2009). Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC cancer*, 9, 188. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-188>
- Lavalle, G. E., Bertagnolli, A. C., Tavares, W. L., & Cassali, G. D. (2009). Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*, 46(6), 1275–1280. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0226-C-FL>
- Lee, C. H., Kim, W. H., Lim, J. H., Kang, M. S., Kim, D. Y., & Kweon, O. K. (2004). Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, 5(1), 63–69.
- Lee, H. H., Zhu, Y., Govindasamy, K. M., & Gopalan, G. (2008). Downregulation of Aurora-A overrides estrogen-mediated growth and chemoresistance in breast cancer cells. *Endocrine-related Cancer*, 15(3), 765–775. <https://doi.org/10.1677/ERC-07-0213>
- Lee, H. J., Lee, Y. J., Kang, C. M., Bae, S., Jeoung, D., Jang, J. J., Lee, S. S., Cho, C. K., & Lee, Y. S. (2008). Differential gene signatures in rat mammary tumors induced by DMBA and those induced by fractionated gamma radiation. *Radiation Research*, 170(5), 579–590. <https://doi.org/10.1667/RR1106.1>
- Lee, H. N., Kim, C. H., Song, G. G., & Cho, S. W. (2010). Effects of IL-3 and SCF on Histamine production kinetics and cell phenotype in rat bone marrow-derived mast cells. *Immune network*, 10(1), 15–25. <https://doi.org/10.4110/in.2010.10.1.15>
- Lim, H. Y., Seung, B. J., Cho, S. H., Kim, S. H., Bae, M. K., & Sur, J. H. (2022). Canine mammary cancer in overweight or obese female dogs is associated with

- intratumoral microvessel density and macrophage counts. *Veterinary Pathology*, 59(1), 39–45. <https://doi.org/10.1177/03009858211040481>
- Loretti, A. P., Ilha, M. R. S., Breitsameter, I. & Faraco, C. S. (2004). Clinical and pathological study of feline mammary fibroadenomatous change associated with depot medroxyprogesterone acetate therapy. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 56(2), 270–274. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000200020>
- Lu, J., Jiang, C., Mitrenga, T., Cutter, G., & Thompson, H. J. (1998). Pathogenic characterization of 1-methyl-1-nitrosourea-induced mammary carcinomas in the rat. *Carcinogenesis*, 19(1), 223–227. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.1.223>
- Lucas, J. N., Rudmann, D. G., Credille, K. M., Irizarry, A. R., Peter, A., & Snyder, P. W. (2007). The rat mammary gland: morphologic changes as an indicator of systemic hormonal perturbations induced by xenobiotics. *Toxicologic Pathology*, 35(2), 199–207. <https://doi.org/10.1080/01926230601156260>
- Macias, H. & Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(4), 533–557. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>
- Mahdavi, M., Nassiri, M., Kooshyar, M. M., Vakili-Azghandi, M., Avan, A., Sandry, ... Gopalan, V. (2019). Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5741–5750. <https://doi.org/10.1002/jcp.27464>
- Majorini ve ark., 2020 Infiltrating Mast Cell–Mediated Stimulation of Estrogen Receptor Activity in Breast Cancer Cells Promotes the Luminal Phenotype
- Malfettone, A., Silvestris, N., Saponaro, C., Ranieri, G., Russo, A., Caruso, S., Popescu, O., Simone, G., Paradiso, A., & Mangia, A. (2013). High density of tryptase-positive mast cells in human colorectal cancer: a poor prognostic factor related to protease-activated receptor 2 expression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(8), 1025–1037. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12073>
- Manoharan, S., Muneeswaran, M. & Baskaran N. (2010). Chemopreventive efficacy of berberine in 7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 521–529.
- Marech, I., Ammendola, M., Gadaleta, C., Zizzo, N., Oakley, C., Gadaleta, C. D., & Ranieri, G. (2014). Possible biological and translational significance of mast cells density in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(27), 8910–8920. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i27.8910>
- Marech, I., Ammendola, M., Sacco, R., Capriuolo, G. S., Patruno, R., Rubini, R., Luposella, M., Zuccalà, V., Savino, E., Gadaleta, C. D., Ribatti, D., & Ranieri, G. (2014). Serum tryptase, mast cells positive to tryptase and microvascular density evaluation in early breast cancer patients: possible translational significance. *BMC Cancer*, 14, 534. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-534>
- Marech, I., Ammendola, M., Sacco, R., Capriuolo, G. S., Patruno, R., Rubini, R., Luposella, M., Zuccalà, V., Savino, E., Gadaleta, C. D., Ribatti, D., & Ranieri, G. (2014). Serum tryptase, mast cells positive to tryptase and microvascular density evaluation in early breast cancer patients: possible translational significance. *BMC Cancer*, 14, 534. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-534>

- Marino, G., Pugliese, M., Pecchia, F., Garufi, G., Lupo, V., Di Giorgio, S., & Sfacteria, A. (2021). Conservative treatments for feline fibroadenomatous changes of the mammary gland. *Open Veterinary Journal*, 11(4), 680–685. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i4.19>
- Marshall J. S. (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, 4(10), 787–799. <https://doi.org/10.1038/nri1460>
- Martín de las Mulas, E., Ordás, J., Millán, M. Y., Espinosa de los Monteros, A., & Reymundo, C. (2002). Spontaneous basaloid adenomas of the mammary gland in four dogs: clinicopathologic and immunohistochemical features. *Veterinary Pathology*, 39(6), 739–743. <https://doi.org/10.1354/vp.39-6-739>
- Martín De Las Mulas, J., Millán, Y., Bautista, M. J., Pérez, J., & Carrasco, L. (2000). Oestrogen and progesterone receptors in feline fibroadenomatous change: an immunohistochemical study. *Research in Veterinary Science*, 68(1), 15–21. <https://doi.org/10.1053/rvsc.1999.0327>
- Martin de las Mulas, J., Ordás, J., Millán, Y., Fernández-Soria, V., & Ramón y Cajal, S. (2003). Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 80(3), 363–367. <https://doi.org/10.1023/a:1024929730165>
- Martín de las Mulas, J., Van Niel, M., Millán, Y., Ordás, J., Blankenstein, M. A., Van Mil, F., & Misdorp, W. (2002). Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Research in Veterinary Science*, 72(2), 153–161. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2001.0542>
- Martin, P. M., Cotard, M., Mialot, J. P., André, F., & Raynaud, J. P. (1984). Animal models for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 12(1), 13–17. <https://doi.org/10.1007/BF00255902>
- Martinel Lamas, D. J., Nicoud, M. B., Sterle, H. A., Cremaschi, G. A., & Medina, V. A. (2015). Histamine: a potential cytoprotective agent to improve cancer therapy?. *Cell Death & Disease*, 6(12), e2029. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.378>
- Massari, N. A., Nicoud, M. B., & Medina, V. A. (2020). Histamine receptors and cancer pharmacology: an update. *British Journal of Pharmacology*, 177(3), 516–538. <https://doi.org/10.1111/bph.14535>
- Matos, A. J., Baptista, C. S., Gärtner, M. F., & Rutteman, G. R. (2012). Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: the need for standardized procedures. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 193(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.12.019>
- McDonald, J. A., Goyal, A. & Terry, M. B. (2013) Alcohol Intake and Breast Cancer Risk: Weighing the Overall Evidence. *Current Breast Cancer Reports*, 5, 208–221. <https://doi.org/10.1007/s12609-013-0114-z>
- Mceuen C. S. (1938). Occurrence of cancer in rats treated with oestrone. *The American Journal of Cancer*, 34, 184–195.
- McGregor, H., Land, C. E., Choi, K., Tokuoka, S., Liu, P. I., Wakabayashi, T., & Beebe, G. W. (1977). Breast cancer incidence among atomic bomb survivors,

- Hiroshima and Nagasaki, 1950-69. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(3), 799–811. <https://doi.org/10.1093/jnci/59.3.799>
- McHale, C., Mohammed, Z., & Gomez, G. (2019). Human Skin-Derived Mast Cells Spontaneously Secrete Several Angiogenesis-Related Factors. *Frontiers in Immunology*, 10, 1445. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01445>
- McMahon, B. (1970). Age at first birth and breast cancer risk. *Bulletin World Health Organ*, 43, 209-221
- McNeil, H. P., Shin, K. & Campbell I. K. (2008). The mouse mast cell-restricted tetramer-formation tryptase mouse mast cell protease 6 and mouse mast cell protease 7 are critical mediators in inflammatory arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 58(8), 2338–2346.
- Medina, V. A., Brenzoni, P. G., Lamas, D. J., Massari, N., Mondillo, C., Nunez, M. A., Pignataro, O., & Rivera, E. S. (2011). Role of histamine H4 receptor in breast cancer cell proliferation. *Frontiers in Bioscience (Elite edition)*, 3(3), 1042–1060. <https://doi.org/10.2741/e310>
- Meier-Abt, F., & Bentires-Alj, M. (2014). How pregnancy at early age protects against breast cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 20(3), 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.11.002>
- Meuten D. J. (2016). Tumors in Domestic Animals. Fifth Edition, syf: 723-766, Oxford, Iowa, USA.
- Mialot, J. P., Andre, F., Martin, P. M., Cotard, D. M. & Raynaud, J. P. (1982). Etude de receptores des hormones steroïdes dans les tumeurs mammaires de la chienne II: correlations avec quelques caracteristiques cliniques. *Recueil Medicine Veterinaire*, 158, 513-521.
- Michel, E., Feldmann, S.K., Kowalewski, M.P., Bley, C. R., Boos, A., Guscetti, F. & Reichler, I. M. (2012) Expression of prolactin receptors in normal canine mammary tissue, canine mammary adenomas and mammary adenocarcinomas. *BMC Veterinary Research*, 8, 72. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-72>
- Mil, F. N., Rutteman, G. R., ... Radaeckers, F. C. S. (1993). Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary glands: benign tumours and duct ectasias. *Vet Q*, 15:89–96.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I., & Poli, A. (2005). Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, 79(3), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.02.002>
- Millanta, F., Calandrella, M., Vannozzi, I., & Poli, A. (2006). Steroid hormone receptors in normal, dysplastic and neoplastic feline mammary tissues and their prognostic significance. *The Veterinary Record*, 158(24), 821–824. <https://doi.org/10.1136/vr.158.24.821>
- Millanta, F., Silvestri, G., Vaselli, C., Citi, S., Pisani, G., Lorenzi, D., & Poli, A. (2006). The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Research in Veterinary Science*, 81(3), 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.01.007>
- Miller, J. L., Bartlett, A. P., Harman, R. M., Majhi, P. D., Jerry, D. J., & Van de Walle, G. R. (2022). Induced mammary cancer in rat models: pathogenesis, genetics,

- and relevance to female breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 27(2), 185–210. <https://doi.org/10.1007/s10911-022-09522-w>
- Misdorp W, Else R, Hellmén E, Lipscomb TP (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. In: World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals, 2nd Edn. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.
- Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP: Histologic Classification
- Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J. F., Jabara, A. G., & Von Sandersleben, J. (1973). Canine malignant mammary tumors. 3. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. *Veterinary Pathology*, 10(3), 241–256. <https://doi.org/10.1177/030098587301000307>
- Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J. F., Jabara, A. G., & von Sandersleben, J. (1972). Canine Malignant Mammary Tumours II. Adenocarcinomas, Solid Carcinomas and Spindle Cell Carcinomas. *Veterinary Pathology*, 9(6), 447–470. <https://doi.org/10.1177/030098587200900605>
- Mitry, E., Hammel, P., Deplanque, G., Mornex, F., Levy, P., Seitz, J. F., ... Raymond, E. (2010). Safety and activity of masitinib in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 66(2), 395–403. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1299-8>
- Mogren, I., Stenlund, H., & Högberg, U. (2001). Long-term impact of reproductive factors on the risk of cervical, endometrial, ovarian and breast cancer. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 40(7), 849–854. <https://doi.org/10.1080/02841860152703481>
- Monlux, A. W., Roszel, J. F., MacVean, D. W., & Palmer, T. W. (1977). Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. *Veterinary Pathology*, 14(3), 194–217. <https://doi.org/10.1177/030098587701400303>
- Moon, T. C., Befus, A. D., & Kulka, M. (2014). Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Frontiers in Immunology*, 5, 569. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00569>
- Moriyama, H., Daino, K., Ishikawa, A., Imaoka, T., Nishimura, M., Nishimura, Y., ... Kakinuma, S. (2021). Exome of Radiation-induced Rat Mammary Carcinoma Shows Copy-number Losses and Mutations in Human-relevant Cancer Genes. *Anticancer Research*, 41(1), 55–70. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14751>
- Morris J. (2013). Mammary tumours in the cat: size matters, so early intervention saves lives. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(5), 391–400. <https://doi.org/10.1177/1098612X13483237>
- Mulero, I., Sepulcre, M. P., Meseguer, J., García-Ayala, A., & Mulero, V. (2007). Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19434–19439. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704535104>
- Mullins, L. J., Brooker, G. & Mullins, J. J. Transgenesis in the rat, in: Clarke A. R. (Ed.), *Transgenes Technic Principle Protocol*, Humana Press, Cardiff 2002, pp. 255–270.
- Murphy, S. (2008), Mammary tumours in dogs and cats. *In Practice*, 30: 334-339. <https://doi.org/10.1136/inpract.30.6.334>

- Murray, T. J., Ucci, A. A., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2009). Histological analysis of low dose NMU effects in the rat mammary gland. *BMC Cancer*, 9, 267. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-267>
- Murtaugh, M. P., Baarsch, M. J., Zhou, Y., Scamurra, R. W., & Lin, G. (1996). Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 54(1-4), 45–55. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(96\)05698-x](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(96)05698-x)
- Nandi, S., Guzman, R. C., & Yang, J. (1995). Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9), 3650–3657. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3650>
- Navarrete, M. A., Maier, C. M., Falzoni, R., Quadros, L. G., Lima, G. R., Baracat, E. C. & Nazario, A. C. (2005). Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Breast Cancer Research*, 7, 306–313. <https://doi.org/10.1186/bcr994>
- Nerurkar, V. R., Sehadri, R., Mulherkar, R., Ishwad, C. S., Lalitha, V. S. & Naik, S. N. (1987). Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *International Journal of Cancer*, 40, 230-232.
- Nico, B., Marzullo, A., Corsi, P., Vacca, A., Roncali, L., & Ribatti, D. (2004). A possible role of tryptase in angiogenesis in the brain of mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuroscience*, 123(3), 585–588. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.11.006>
- Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M. D., Sánchez, M. A., Flores, J. M., & Castaño, M. (2000). Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Veterinary Pathology*, 37(3), 239–247. <https://doi.org/10.1354/vp.37-3-239>
- Nishimura, M., Daino, K., Fukuda, M., Tanaka, I., Moriyama, H., Showler, K., ... Shimada, Y. (2021). Development of mammary cancer in γ -irradiated F1 hybrids of susceptible Sprague-Dawley and resistant Copenhagen rats, with copy-number losses that pinpoint potential tumor suppressors. *PloS One*, 16(8), e0255968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255968>
- Norrby K. (2002). Mast cells and angiogenesis. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 110(5), 355–371. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2002.100501.x>
- Odefrey, F., Stone, J., Gurrin, L. C., Byrnes, G. B., Apicella, C., Dite, ... Australian Twins and Sisters Mammographic Density Study (2010). Common genetic variants associated with breast cancer and mammographic density measures that predict disease. *Cancer Research*, 70(4), 1449–1458. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3495>
- Oftedal, O. T. (2002). The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(3), 225-252. <https://doi.org/10.1023/a:1022896515287>
- Okada, H., Nishijima, Y., Yoshino, T., Grone, A., Capen, C. C. & Rosol, T. J. (1997). Immunohistochemical localization of parathyroid hormone related protein in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 34, 356-359.

- Okayama, Y., & Kawakami, T. (2006). Development, migration, and survival of mast cells. *Immunologic Research*, 34(2), 97–115. <https://doi.org/10.1385/IR:34:2:97>
- Oldford, S. A., & Marshall, J. S. (2015). Mast cells as targets for immunotherapy of solid tumors. *Molecular immunology*, 63(1), 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.02.020>
- Oliveira, P. A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz., L. & Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 79(4), 593-616.
- Ordás, J., Millán, Y., de los Monteros, A. E., Reymundo, C., & de las Mulas, J. M. (2004). Immunohistochemical expression of progesterone receptors, growth hormone and insulin growth factor-I in feline fibroadenomatous change. *Research in Veterinary Science*, 76(3), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2003.11.006>
- Overley, B., Shofer, F. S., Goldschmidt, M. H., Sherer, D., & Sorenmo, K. U. (2005). Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(4), 560–563. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2005\)19\[560:aboafm\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2005)19[560:aboafm]2.0.co;2)
- Paleolog, E. M., Delasalle, S. A., Buurman, W. A., & Feldmann, M. (1994). Functional activities of receptors for tumor necrosis factor-alpha on human vascular endothelial cells. *Blood*, 84(8), 2578–2590.
- Pastor, N., Caballé, N. C., Santella, M., Ezquerro, L. J., Tarazona, R., & Duran, E. (2018). Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 50(3), 143–147. <https://doi.org/10.4067/S0719-81322018000300143>
- Patnaik, A. K., Liu, S. K., Hurvitz, A. I., & McClelland, A. J. (1975). Nonhematopoietic neoplasms in cats. *Journal of the National Cancer Institute*, 54(4), 855–860.
- Pejler, G., Rönnberg, E., Waern, I., & Wernersson, S. (2010). Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood*, 115(24), 4981–4990. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-257287>
- Peña, L. L., Nieto, A. I., Pérez-Alenza, D., Cuesta, P., & Castaño, M. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 10(3), 237–246. <https://doi.org/10.1177/104063879801000303>
- Pena, L., Gama, A., Goldschmidt, G. H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., ... de las Mulas, J. M. (2014). Canine mammary tumors: a review and
- Perez Alenza, M. D., Peña, L., del Castillo, N., & Nieto, A. I. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *The Journal of Small Animal Practice*, 41(7), 287–291. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2000.tb03203.x>
- Pérez Alenza, M. D., Peña, L., Nieto, A. I., & Castaño, M. (1997). Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 33(4), 581–585.

- Perez Alenza, M. D., Rutteman, G. R., Pena, L., Beynen, A. C. & Cuesta, A. P. (1998). Relation between habitual diet and canine mammary tumours in a case control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12, 132-139.
- Pérez-Alenza, M. D., Jiménez, A., Nieto, A. I., & Peña, L. (2004). First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Research : BCR*, 6(4), R300–R307. <https://doi.org/10.1186/bcr790>
- Platet, N., Cathiard, A. M., Gleizes, M., & Garcia, M. (2004). Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 51(1), 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.02.001>
- Potten, C. S., Watson, R. J., Williams, G. T., Tickle, S., Roberts, S A., Harris, M. & Howell, A. (1988). The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast. *British Journal of Cancer*, 58, 163-170. <https://doi.org/10.1038/bjc.1988.185>
- Pulley L. T. (1973). Ultrastructural and histochemical demonstration of myoepithelium in mixed tumors of the canine mammary gland. *American Journal of Veterinary Research*, 34(12), 1513–1522.
- Purwar R, Kraus M, Werfel T and Wittmann M: Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: A possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation. *J Invest Dermatol*. 128:59–66. 2008. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
- Purwar, R., Kraus, M., Werfel, T., & Wittmann, M. (2008). Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: a possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(1), 59–66. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700940>
- Queiroga, F. L., Pérez-Alenza, M. D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C. S., & Illera, J. C. (2008). Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumours. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 110(1-2), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.02.005>
- Queiroga, F. L., Pérez-Alenza, M. D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C., & Illera, J. C. (2005). Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94(1-3), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.014>
- Queiroga, F. L., Pires, I., Lobo, L., & Lopes, C. S. (2010). The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science*, 88(3), 441–445. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.10.009>
- Radisky, D. C., Hirai, Y., & Bissell, M. J. (2003). Delivering the message: epimorphin and mammary epithelial morphogenesis. *Trends in Cell Biology*, 13(8), 426–434. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(03\)00146-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(03)00146-6)
- Rajput, A. B., Turbin, D. A., Cheang, M. C., Voduc, D. K., Leung, S., Gelmon, K. A., Gilks, C. B., & Huntsman, D. G. (2008). Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: a study of 4,444 cases. *Breast Cancer Research and Treatment*, 107(2), 249–257. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9546-3>

- Rasotto, R., Berlato, D., Goldschmidt, M. H., & Zappulli, V. (2017). Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Veterinary Pathology*, 54(4), 571–578. <https://doi.org/10.1177/0300985817698208>
- Ravoori, S., Vadhanam, M. V., Sahoo, S., Srinivasan, C., & Gupta, R. C. (2007). Mammary tumor induction in ACI rats exposed to low levels of 17 β -estradiol. *International Journal of Oncology*, 31(1), 113–120.
- Reddy ve ark., 2019 Poor Response to Neoadjuvant Chemotherapy Correlates with Mast Cell Infiltration in Inflammatory Breast Cancer
- Reddy, S. M., Reuben, A., Barua, S., Jiang, H., Zhang, S., Wang, L., Gopalakrishnan, V., Hudgens, C. W., Tetzlaff, M. T., Reuben, J. M., Tsujikawa, T., Coussens, L. M., Wani, K., He, Y., Villareal, L., Wood, A., Rao, A., Woodward, W. A., Ueno, N. T., Krishnamurthy, S., ... Mittendorf, E. A. (2019). Poor Response to Neoadjuvant Chemotherapy Correlates with Mast Cell Infiltration in Inflammatory Breast Cancer. *Cancer Immunology Research*, 7(6), 1025–1035. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0619>
- Regua, A. T., Arrigo, A., Doheny, D., Wong, G. L., & Lo, H. W. (2021). Transgenic mouse models of breast cancer. *Cancer letters*, 516, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.05.027>
- Rehm, S., Stanislaus, D. J. & Williams, A. M. (2007). Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Research*, 80, 233–245. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20121>
- Ressel, L., Puleio, R., Loria, G. R., Vannozzi, I., Millanta, F., Caracappa, S., & Poli, A. (2013). HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Research in Veterinary Science*, 94(2), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.016>
- Ribatti 2013 D. Ribatti Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis *Immunology Letters*, 152 (2013), pp. 83-88
- Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(1), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.11.010>
- Ribatti, D., Ennas, M. G., Vacca, A., Ferrel, F., Nico, B., Orru, S., & Sirigu, P. (2003). Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *European Journal of Clinical Investigation*, 33(5), 420–425. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2003.01152.x>
- Ribatti, D., Guidolin, D., Marzullo, A., Nico, B., Annese, T., Benagiano, V., & Crivellato, E. (2010). Mast cells and angiogenesis in gastric carcinoma. *International Journal of Experimental Pathology*, 91(4), 350–356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00714.x>
- Ribatti, D., Molica, S., Vacca, A., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, A. M., & Dammacco, F. (2003). Tryptase-positive mast cells correlate positively with bone marrow angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 17(7), 1428–1430. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402970>
- Ringvall, M., Rönnerberg, E., Wernersson, S., Duelli, A., Henningsson, F., Abrink, M., ... Pejler, G. (2008). Serotonin and histamine storage in mast cell secretory

- granules is dependent on serglycin proteoglycan. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(4), 1020–1026. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.11.031>
- Rothschild, A. M., & Schayer, R. W. (1959). Characterization of histidine decarboxylase from rat peritoneal fluid mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 34, 392–398. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(59\)90291-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(59)90291-4)
- Rudolph, A., Chang-Claude, J., & Schmidt, M. K. (2016). Gene-environment interaction and risk of breast cancer. *British Journal of Cancer*, 114(2), 125–133. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.439>
- Russo, I. H., & Russo, J. (1996). Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environmental Health Perspectives*, 104(9), 938–967. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104938>
- Russo, I. H., & Russo, J. (1998). Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3(1), 49–61. <https://doi.org/10.1023/a:1018770218022>
- Russo, J., & Russo, I. H. (1996). Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Research and Treatment*, 39(1), 7–20. <https://doi.org/10.1007/BF01806074>
- Russo, J., & Russo, I. H. (2000). Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 5(2), 187–200. <https://doi.org/10.1023/a:1026443305758>
- Russo, J., Hasan Lareef, M., Balogh, G., Guo, S., & Russo, I. H. (2003). Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 87(1), 1–25. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(03\)00390-x](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(03)00390-x)
- Russo, J., Tay, L. K., & Russo, I. H. (1982). Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2(1), 5–73. <https://doi.org/10.1007/BF01805718>
- Rutteman, G. R. (1990). Hormones and mammary tumour disease in the female dog. An update. *In Vivo*, 4, 33–40.
- Rutteman, G. R., & Misdorp, W. (1993). Hormonal background of canine and feline mammary tumours. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 47, 483–487.
- Rutteman, G. R., Foakens, J. A., Blankstein, M. A., Vos, J. H. & Misdorp, W. (1990). EGF receptors in non affected and tumours dog mammary tissues. *European Journal of Cancer*, 26, 182–186.
- Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., & Romero, L. (2015). Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PloS one*, 10(5), e0127381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127381>
- Samoszuk, M., & Corwin, M. A. (2003). Mast cell inhibitor cromolyn increases blood clotting and hypoxia in murine breast cancer. *International Journal of Cancer*, 107(1), 159–163. <https://doi.org/10.1002/ijc.11340>
- Sang, J., Yi, D., Tang, X., Zhang, Y., & Huang, T. (2016). The associations between mast cell infiltration, clinical features and molecular types of invasive breast cancer. *Oncotarget*, 7(49), 81661–81669. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13163>

- Sano, D. & Myers, J.N. (2009). Xenograft models of head and neck cancers. *Head Neck Oncology* 1, 32 <https://doi.org/10.1186/1758-3284-1-32>
- Santos, A. A., Lopes, C. C., Ribeiro, J. R., Martins, L. R., Santos, J. C., Amorim, I. F., ... Matos, A. J. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research*, 9, 1. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-1>
- Santos, M., Marcos, R. & Faustino, A. M. R. (2010). Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 146-154. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01536.x>
- Sarli, G., Brunetti, B., & Benazzi, C. (2006). Mammary mucinous carcinoma in the cat. *Veterinary Pathology*, 43(5), 667–673. <https://doi.org/10.1354/vp.43-5-667>
- Schneider, R., Dorn, C. & Taylor, D. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of National Cancer Institute*, 43(6): 1249-1261.
- Schwartz L. B. (2006). Analysis of MC(T) and MC(TC) mast cells in tissue. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 315, 53–62.
- Schwartz, L. B. (1990). Tryptase, a mediator of human mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86(4), 594-598. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(05\)80222-2](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(05)80222-2)
- Schwartz, L. B., Lewis, R. A. & Austen, K. F. (1981). Tryptase from human pulmonary mast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(22), 11939-11943.
- Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M. A., & Lopes, C. (2007). Mammary invasive micropapillary carcinoma in cats: clinicopathologic features and nuclear DNA content. *Veterinary Pathology*, 44(6), 842–848. <https://doi.org/10.1354/vp.44-6-842>
- Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M. A., & Lopes, C. (2007). Mammary invasive micropapillary carcinoma in cats: clinicopathologic features and nuclear DNA content. *Veterinary Pathology*, 44(6), 842–848. <https://doi.org/10.1354/vp.44-6-842>
- Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M. A., & Lopes, C. (2008). Are complex carcinoma of the feline mammary gland and other invasive mammary carcinoma identical tumours? Comparison of clinicopathologic features, DNA ploidy and follow up. *Research in Veterinary Science*, 84(3), 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.06.005>
- Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M. A., Bento, M. J., & Lopes, C. (2011). Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 187(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.10.030>
- Seixas, F., Pires, M. A., & Lopes, C. A. (2008). Complex carcinomas of the mammary gland in cats: pathological and immunohistochemical features. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 176(2), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.01.029>
- Selman, P. J., Mol, J. A., Rutteman, G. R., van Garderen, E., & Rijnberk, A. (1994). Progesterin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*, 134(1), 287–292. <https://doi.org/10.1210/endo.134.1.7506206>

- Sengupta P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), 624–630.
- Shikotra, A., Ohri, C. M., Green, R. H., Waller, D. A., & Bradding, P. (2016). Mast cell phenotype, TNF α expression and degranulation status in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, 6, 38352. <https://doi.org/10.1038/srep38352>
- Shull, J. D., Dennison, K. L., Chack, A. C., & Trentham-Dietz, A. (2018). Rat models of 17 β -estradiol-induced mammary cancer reveal novel insights into breast cancer etiology and prevention. *Physiological Genomics*, 50(3), 215–234. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00105.2017>
- Shull, J. D., Spady, T. J., Snyder, M. C., Johansson, S. L., & Pennington, K. L. (1997). Ovary-intact, but not ovariectomized female ACI rats treated with 17 β -estradiol rapidly develop mammary carcinoma. *Carcinogenesis*, 18(8), 1595–1601. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.8.1595>
- Silver, I. A. (1966). The anatomy of the mammary gland of the dog and cat.
- Skorupski, K. A., Overley, B., Shofer, F. S., Goldschmidt, M. H., Miller, C. A., & Sørenmo, K. U. (2005). Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(1), 52–55. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2005\)19<52:ccomci>2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2005)19<52:ccomci>2.0.co;2)
- Sleeckx, N., de Rooster, H., Veldhuis Kroeze, E. J. B., Van Ginneken, C. V. & Van Brantegem, L. (2011). Canine mammary tumors, an overview. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 1112-1131. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x>
- Smits, B. M. G., Cotroneo, M. S., Haag, J. D., Gould, M. N. (2007). Genetically engineered rat models for breast cancer. *Breast Disease*, 28, 53–61.
- Soares-Maia, R., Faustino-Rocha, A., Teixeira-Guedes, C., Pinho-Oliveira, J., Talhada, D., Rema, ... Lopes, C. (2013). MNU-induced rat mammary carcinomas: immunohistology and estrogen receptor expression. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 32(2), 157–163. <https://doi.org/10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.2013007541>
- Soffritti, M., Minardi, F. & Maltoni, C. Known Physical Carcinogens. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
- Sonnenschein, E. G., Glickman, L. T., Goldschmidt, M. H., & McKee, L. J. (1991). Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *American Journal of Epidemiology*, 133(7), 694–703. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115944>
- Sørenmo, K. (2003). Canine mammary gland tumors. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 33(3), 573-596. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(03\)00020-2](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(03)00020-2)
- Sørenmo, K. U., Rasotto, R., Zappulli, V. & Goldschmidt, M. H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48(1), 85-97. <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>
- Spady, T. J., Harvell, D. M., Snyder, M. C., Pennington, K. L., McComb, R. D., & Shull, J. D. (1998). Estrogen-induced tumorigenesis in the Copenhagen rat: disparate susceptibilities to development of prolactin-producing pituitary

- tumors and mammary carcinomas. *Cancer Letters*, 124(1), 95–103. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(97\)00455-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(97)00455-2)
- Starkey, J. R., Crowle, P. K., & Taubenberger, S. (1988). Mast-cell-deficient W/W^v mice exhibit a decreased rate of tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 42(1), 48–52. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910420110>
- Sukumar, S., McKenzie, K., & Chen, Y. (1995). Animal models for breast cancer. *Mutation Research*, 333(1-2), 37–44. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00129-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00129-8)
- Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanca, D., & Barbacid, M. (1983). Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature*, 306(5944), 658–661. <https://doi.org/10.1038/306658a0>
- Sun, P., Mu, Y., & Zhang, S. (2014). A novel NF-κB/MMP-3 signal pathway involves in the aggressivity of glioma promoted by Bmi-1. *Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(12), 12721–12727. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2597-2>
- Swerdlloff, R. S. & Ng, C. M. Gynecomastia: Etiology, Diagnosis, and Treatment. [Updated 2019 Jul 7]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279105/>
- Szlosarek, P. W., Grimshaw, M. J., Kulbe, H., Wilson, J. L., Wilbanks, G. D., Burke, F., & Balkwill, F. R. (2006). Expression and regulation of tumor necrosis factor alpha in normal and malignant ovarian epithelium. *Molecular cancer Therapeutics*, 5(2), 382–390. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0303>
- Tamimi, R. M., Spiegelman, D., Smith-Warner, S. A., Wang, M., Pazaris, M., Willett, W. C., Eliassen, A. H., & Hunter, D. J. (2016). Population Attributable Risk of Modifiable and Nonmodifiable Breast Cancer Risk Factors in Postmenopausal Breast Cancer. *American Journal of Epidemiology*, 184(12), 884–893. <https://doi.org/10.1093/aje/kww145>
- Tanabe, S., Nakadai, T., Furuoka, H., Oomachi, T., Kobayashi, Y., Omata, Y., ... Dorf, M.E. (2002), Expression of mRNA of chemokine receptor CXCR4 in feline mammary adenocarcinoma. *Veterinary Record*, 151: 729-733. <https://doi.org/10.1136/vr.151.24.729>
- Tateyama, S., Uchida, K., Hidaka, T., Hirao, M., & Yamaguchi, R. (2001). Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors. *Veterinary Pathology*, 38(6), 703–709. <https://doi.org/10.1354/vp.38-6-703>
- Taverna, G., Giusti, G., Seveso, M., Hurle, R., Colombo, P., Stifter, S., & Grizzi, F. (2013). Mast cells as a potential prognostic marker in prostate cancer. *Disease Markers*, 35(6), 711–720. <https://doi.org/10.1155/2013/478303>
- Tchougounova E, Lundequist A, Fajardo I, Winberg JO, Abrink M and Pejler G: A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *J Biol Chem*. 280:9291–9296. 2005. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI
- Theoharides, T. C., Alysandratos, K. D., Angelidou, A., Delivanis, D. A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A.,

- & Kalogeromitros, D. (2012). Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.12.014>
- Thielen, G. H. & Madewell, B. R. (1987): Tumors of the genital system Part II. In: Veterinary cancer medicine. Lea&Febiger, Philadelphia. 583-600.
- Thordarson, G., Lee, A. V., McCarty, M., Van Horn, K., Chu, O., Chou, Y. C., Yang, J., Guzman, R. C., Nandi, S., & Talamantes, F. (2001). Growth and characterization of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumors in intact and ovariectomized rats. *Carcinogenesis*, 22(12), 2039–2047. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.12.2039>
- Tikoo, S., Barki, N., Jain, R., Zulkhernain, N. S., Buhner, S., Schemann, M. & Weninger, W. (2018). Imaging of mast cells. *Immunological Reviews*, 282(1), 58-72. <https://doi.org/10.1111/imr.12631>
- Trentham-Dietz, A., Newcomb, P. A., Egan, K. M., Titus-Ernstoff, L., Baron, J. A., Storer, B. E., ... & Willett, W. C. (2000). Weight change and risk of postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer Causes & Control*, 11(6), 533-542.
- Tselepis, C., Perry, I., Dawson, C., Hardy, R., Darnton, S. J., McConkey, C., Stuart, R. C., Wright, N., Harrison, R., & Jankowski, J. A. (2002). Tumour necrosis factor-alpha in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene*, 21(39), 6071–6081. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205731>
- Tuna, B., Yorukoglu, K., Unlu, M., Ugur Mungan, M. & Kirkali, Z. (2006).
- Turan, V. K., Sanchez, R. I., Li, J. J., Li, S. A., Reuhl, K. R., Thomas, P. E., Conney, A. H., Gallo, M. A., Kauffman, F. C., & Mesia-Vela, S. (2004). The effects of steroidal estrogens in ACI rat mammary carcinogenesis: 17beta-estradiol, 2-hydroxyestradiol, 4-hydroxyestradiol, 16alpha-hydroxyestradiol, and 4-hydroxyestrone. *The Journal of Endocrinology*, 183(1), 91–99. <https://doi.org/10.1677/joe.1.05802>
- Urata, H., Kinoshita, A., Misono, K. S., Bumpus, F. M., & Husain, A. (1990). Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(36), 22348–22357.
- Vail, D. M., & MacEwen, E. G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Investigation*, 18(8), 781–792. <https://doi.org/10.3109/07357900009012210>
- van Garderen, E., de Wit, M., Voorhout, W. F., Rutteman, G. R., Mol, J. A., Nederbragt, H., & Misdorp, W. (1997). Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *The American Journal of Pathology*, 150(3), 1037–1047.
- Vargo-Gogola, T., & Rosen, J. M. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews. Cancer*, 7(9), 659–672. <https://doi.org/10.1038/nrc2193>
- Varricchi, G., Galdiero, M. R., Loffredo, S., Marone, G., Iannone, R., Marone, G., & Granata, F. (2017). Are Mast Cells MASTers in Cancer?. *Frontiers in immunology*, 8, 424. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00424>
- Vascellari, M., Baioni, E., Ru, G., Carminato, A., & Mutinelli, F. (2009). Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous

- tumours in dogs and cats. *BMC Veterinary Research*, 5, 39. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-39>
- Vascellari, M., Capello, K., Carminato, A., Zanardello, C., Baioni, E. & Mutinelli, F. (2016). Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. *Preventive Veterinary Medicine*, 126, 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.02.008>
- Viste, J. R., Myers, S. L., Singh, B., & Simko, E. (2002). Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. *The Canadian Veterinary Journal = La revue veterinaire canadienne*, 43(1), 33–37.
- vol. 7. Armed Force Institute of Pathology and World Health
- Vos, J. H., Van den Ingh, T. S. G. A. M., Misdorp W., Molenbeek, F. R., Van Wakui, S., Muto, T., Yokoo, K., Yokoo, R., Takahashi, H., Masaoka, T., Hano, H., & Furusato, M. (2001). Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. *Anticancer Research*, 21(1B), 611–616.
- Wang, X., & Lin, Y. (2008). Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(11), 1275–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00889.x>
- Weijer, K., Head, K. W., Misdorp, W., & Hampe, J. F. (1972). Feline malignant mammary tumors. I. Morphology and biology: some comparisons with human and canine mammary carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 49(6), 1697–1704. <https://doi.org/10.1093/jnci/49.6.1697>
- Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews. Immunology*, 14(7), 478–494. <https://doi.org/10.1038/nri3690>
- Westerberg, C. M., Ulleras, E. & Nilsson, G. (2012). Differentiation of mast cell subpopulations from mouse embryonic stem cells. *Journal of Immunological Methods*, 382(1-2), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.05.020>
- Wilkins, pp 348-378, 489-504, 506–523.
- Woessner J. F., Jr (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5(8), 2145–2154.
- Xia, H. Z., Kepley, C. L., Sakai, K., Chelliah, J., Irani, A. M. A. & Schwartz, L. B. (1995). Quantitation of tryptase, chymase, FcεR1α, and FcεR1γ mRNAs in human mast cells and basophils by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Immunology*, 154(10), 5472–5480.
- Xie, Y., Mustafa, A., Yerzhan, A., Merzhakupova, D., Yerlan, P., N Orakov, A., Wang, X., Huang, Y., & Miao, L. (2017). Nuclear matrix metalloproteinases: functions resemble the evolution from the intracellular to the extracellular compartment. *Cell Death Discovery*, 3, 17036. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.36>
- Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., & Sugiyama, M. (1996). Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 58(11), 1079–1083. https://doi.org/10.1292/jvms.58.11_1079
- Yang, N., Huang, B., Tsinkalovsky, O., Brekkå, N., Zhu, H., Leiss, L., ... Wang, J. (2014). A novel GFP nude rat model to investigate tumor-stroma interactions. *Cancer Cell International*, 14(1), 541. <https://doi.org/10.1186/s12935-014-0146-0>

- Yong L. C. (1997). The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Experimental and toxicologic pathology: Official Journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 49(6), 409–424. [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(97\)80129-7](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(97)80129-7)
- Zan, Y. H., Haag, J. D., Chen, K. S., Shepel, L. A., Wigington, D., Wang, Y. R., Hu, R., ... Gould, M. N. (2003). Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *National Biotechnology*, 21, 645–651.
- Zanninovic, P. & Simcic, V. (1994). Epidemiology of mammary tumors in dogs. *European Journal of Companion Animal Practice*, 4, 67-76.
- Zappulli, V., Caliarì, D., Rasotto, R., Ferro, S., Castagnaro, M., & Goldschmidt, M. (2013). Proposed classification of the feline "complex" mammary tumors as ductal and intraductal papillary mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 50(6), 1070–1077. <https://doi.org/10.1177/0300985813488894>
- Zappulli, V., De Zan, G., Cardazzo, B., Bargelloni, L., & Castagnaro, M. (2005). Feline mammary tumours in comparative oncology. *The Journal of Dairy Research*, 72, 98–106. <https://doi.org/10.1017/s0022029905001263>
- Zappulli, V., Rasotto, R., Caliarì, D., Mainenti, M., Peña, L., Goldschmidt, M. H., & Kiupel, M. (2015). Prognostic evaluation of feline mammary carcinomas: a review of the literature. *Veterinary Pathology*, 52(1), 46–60. <https://doi.org/10.1177/0300985814528221>
- Zatloukal, J., Lorenzová, J., Tichý, F., Nečas, A., Kecova, H., & Kohout, P. (2005). Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brno*, 74, 103-109. <https://doi.org/10.2754/AVB200574010103>
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., André, F., Tesniere, A., & Kroemer, G. (2008). The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success?. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 1991–2001. <https://doi.org/10.1172/JCI35180>
- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Smyth, M. J., & Kroemer, G. (2013). Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity*, 39(1), 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.014>

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
+	: artı
°	: derece
7-12 DMBA	: 7-12 Dimetilbenzantrasen
AB	: Alveolar tomurcuk
ACI	: August Copenhagen Irish
AGM:	: Aorta-gonad-mezonefroz
AhR	: Aril hidrokarbon reseptörü
ARNT	: Nükleer translokasyon proteini
BRCA-1	: Breast Cancer-1 (Meme Kanseri-1)
BRCA-2	: Breast Cancer-2 (Meme Kanseri-2)
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CTMC	: Bağ dokusu mast hücresi
CXCL16	: Chemokine (C-X-C motif) ligand 16 (Kemokin ligand)
CXCL8	: Chemokine (C-X-C motif) ligand 8 (Kemokin ligand 8)
CYP1A1	: Sitokrom p4501A1
CYP1B1	: Sitokrom p4501B1
DAB	: 3,3'diaminobenzidine
DES	: Dietilstilbestrol
ECM	: Extra cellular matrix (Hücre dışı matriks)
EGF	: Epidermal büyüme faktör
GH	: Growth hormone (Büyüme hormonu)
GM-CSF	: Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör
H1R	: Histamin reseptör 1
H2R	: Histamin reseptör 2
H3R	: Histamin reseptör 3
H4R	: Histamin reseptör 4
HDC	: Histidin dekarboksilaz
H-E	: Hematoksilen-Eozin
HER-2	: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü-2
IGF-I	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL	: İnterlökin
MCP	: Mast hücre progenitörleri
MC-T	: Triptaz pozitif mast hücresi
MC-TC	: Triptaz-kimaz pozitif mast hücresi
MIMC	: İnvazif mikropapiller meme karsinomu
MMC	: Mukozal mast hücresi
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MNU	: N-metil-N-nitrozur
NGF	: Noron growth factor (Sinir büyüme faktörü)
NK	: Natural killer (Doğal öldürücüler)
Non-MIMC	: İnvazif olmayan mikropapiller meme karsinomu

PAH	:	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PAS	:	Periyodik Asit Schiff
PBS	:	Phosphate Buffer Saline
PCNA	:	Proliferating cell nuclear antigen
Pg	:	pikogram
PGD ₂	:	Prostoglandin D-2
SCF	:	Stem cell factor (Kök hücre faktörü)
TACE	:	TNF-dönüştürücü enzim
TB	:	Toluidin Blue
TEB	:	Terminal uç tomurcukları
TGF	:	Transforme edici büyüme faktör
TNF	:	Tümör nekrosis faktör
TNFR-1	:	TNF reseptörü-1
TNFR-2	:	TNF reseptörü-2
VEGF	:	Damar endoteli büyüme faktörü

8. EKLER

EK 1

Etik Kurul Kararı

T.C. BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU Görüle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI						
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan meme kansinomu ile kedi ve köpek meme tümörü olgularında mast hücrelerinin ve rollerinin incelenmesi				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ	Prof. Dr. Gürsel SÖNMEZ				
	KURUMU	BUÜ Veteriner Fakültesi Patoloji AD				
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Dokt. Öğr. Özkan YAVAŞ				
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Özkan YAVAŞ'ın Doktora Tez Projesi				
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	30.09.2020 – 30.09.2022				
	KULLANILACAK HAYVAN TURU VE SAYISI	60 Adet Dişi Sıçan				
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER		Belge Adı		Tarihi		
		ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU		20.02.2020		
KARAR BİLGİLERİ		Karar No : 2020 - 04 / 03				
		Tarih : 25.02.2020				
Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gereke, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılar değişikliği olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.						
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÜYELER						
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY Başkan	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. Erdoğan ŞENDEMİR Üye	Tıp- Anatomi	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H			
Dr. Öğr. Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. Murat YALÇIN Üye	Veteriner-Fizyoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ☒ H			
Doç. Dr. Özgür ÖZYİĞİT Üye	Veteriner-Patoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. Aydın IPEK Üye	Ziraat- Zootekni	Ziraat Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. Nilüfer ÇINKILIÇ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ☒ H			
Asiye İşıl SEZER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Diş Hekimi	☐ E ☒ H			
Filiz KUNLAR Üye	Sivil Üye	Emekli	☐ E ☒ H			
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	BUÜ-DEHYUAM	☐ E ☒ H			

9. TEŞEKKÜR

Doktora öğrenim sürem boyunca benim her daim yanımda olan, tez çalışmam boyunca bana akademik tecrübesi ve değerli tavsiyeleri ile destek olan, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, sonsuz saygı duyduğum tez ve doktora danışmanım Sayın Prof. Dr. Gürsel SÖNMEZ hocama en içten teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim boyunca bana her konuda destek olan akademik anlamda her çıkmaza girdiğimde bana desteğini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan her daim çok mutlu olduğum, tez izleme komitemde bulunan Sayın Prof. Dr. Ahmet AKKOÇ hocama çok teşekkür ederim. Ana Bilim Dalı'nda bana her daim yardımlarını esirgemeyen, her projede çalışmaktan büyük zevk duyduğum, Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. M. Özgür ÖZYİĞİT hocama, bilimsel anlamda bana yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, birlikte çalışmaktan büyük bir zevk duyduğum, Sayın Doç. Dr. İ. Taci CANGÜL'e ve birlikte çalışma fırsatı yakaladığım Sayın Prof. Dr. M. Müfit KAHRAMAN'a en içten teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışması boyunca materyal toplama konusunda bize desteklerini esirgemeyen, tez izleme komitemde ve doktora tez savunma jürimde bulunan Doğum ve Jinekoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. R. Gözde ÖZALP'e ve aynı Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi olan Veteriner hekim Yeşim KORLU'ya çok teşekkür ederim.

Patoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine devam eden, çok değer verdiğim Dok. Öğr. Ezgi YUMUŞAK'a ve tez çalışmam sırasında her türlü desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı'mızın değerli teknisyeni Esra KARA TANIŞ'a çok teşekkür ederim. Beraber çalıştığımız arkadaşlarım Dok. Öğr. Zehra AVCI KÜPELİ, Dok. Öğr. Aysun SARIÇETİN ve Dr. Ayşe Meriç MUTLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana laboratuvarlarını açan Tıp Fakültesi Histoloji&Embriyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Semiha ERSOY ve Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Özhan EYİGÖR'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam sırasında benden hiçbir desteğini esirgemeyen kardeşim Özcan YAVAŞ'a, Veteriner Hekim Elif Rana YILDIZ, Veteriner Teknisyeni Emrah YILDIZ ve her iki ailemede en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması boyunca tüm stresimi benden daha çok yaşayan, görüşleri her konuda benim için çok kıymetli olan değerli eşim aynı zamanda Tıp Fakültesi Histoloji&Embriyoloji Anabilim Dalı Dok. Öğr. Veteriner Hekim Senem Esin YAVAŞ'a ve tez çalışmam boyunca her saniye aklımda olan küçük kızım Melisa YAVAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının gerçekleştirilebilmesi için akademik ve maddi destek sağlayan Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne (Proje No: TDK-2021-354) teşekkürü bir borç biliriz.

10. ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta öğrenimimi Ali Durmaz İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi Turhan Tayan Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2009 yılında başladığım Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2015 yılında dönem ikincisi olarak yüksek onur derecesi ile mezun oldum. Daha sonra 2016 yılının kasım ayına kadar özel bir veteriner kliniğinde veteriner hekim olarak görev yaptım. 2017 yılı şubat ayında Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım.