

**Farklı Histopatolojik Derecelerdeki Kedi Meme Tümörlerinde Oksidatif Stres ve
Antioksidan Seviyelerinin Değerlendirilmesi**

Fatma CANSIZ

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Fatih BOZKURT

Tez no: 2023-005

Afyonkarahisar

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**Farklı Histopatolojik Derecelerdeki Kedi Meme
Tümörlerinde Oksidatif Stres ve Antioksidan Seviyelerinin
Değerlendirilmesi**

Hazırlayan

Fatma CANSIZ

Danışman

**Doç. Dr. Mehmet Fatih
BOZKURT**

Tez No: 2023-005

AFYONKARAHİSAR

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK)
Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: 20.SAĞ.BİL.18**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji **Anabilim Dalı'nda** Fatma CANSIZ tarafından hazırlanan “Farklı Histopatolojik Derecelerdeki Kedi Meme Tümörlerinde Oksidatif Stres ve Antioksidan Seviyelerinin Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca 09/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir

Başkan

Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ

Üye

Prof. Dr. Hikmet KELEŞ

Üye

Doç. Dr. Volkan İPEK

Üye

Prof. Dr. Cenker Çağrı CINGI

Üye

Doç. Dr. M. Fatih BOZKURT

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

...../...../.....

Fatma CANSIZ

ÖZET

Farklı Histopatolojik Derecelerdeki Kedi Meme Tümörlerinde Oksidatif Stres ve Antioksidan Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, Kuşulu Veteriner Polikliniği'ne teşhis ve tedavi amaçlı getirilen kedilere ait meme tümörü operasyon malzemelerine ait parafin doku kesitlerinde tümör mikro çevresi, immunohistokimyasal yöntemle belirlenerek oksidatif stresle ilişkisi araştırıldı. Organizmanın antioksidan cevap değerlendirildi ve bu sonuçların her bir derece tümörle ilişkisinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla tümör mikro çevresi CD3, nükleer faktör kappa beta (NF-K β), CD31, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 alfa (HIF-1 α), tümör nekrotik faktör alfa (TNF- α) ve 8 hidroksiguanozin (8OHdG) antikoları kullanılarak immunohistokimyasal metot ile değerlendirilirken, total antioksidan statü (TAS), total oksidan statü (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI), redükte glutatyon (GSH), melondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve katalaz (CAT) analizleri kan serumundan biyokimyasal olarak yapıldı.

Çalışmaya 17 meme tümürlü kedi dahil edildi. Kedilerin 6'sı derece 1, 5'i derece 2 ve 6'sı derece 3 tümör olarak teşhis edildi. Tümörlerin 11'i tubuler adenokarsinom, 3'ü tubulopapillar karsinom, 1'i papillar karsinom, 2'si solid karsinom olarak teşhis edildi. Vakaların yaş ortalaması 10,7 olup, en çok etkilenen ırk tekirdi (n=12).

İmmunohistokimyasal analizlerde tüm antikolar derece 3 tümörlerde daha yoğun olarak boyandı. Bu antikoların birbirleriyle olan ilişkileri derece 3 tümörlerde belirgin şekilde ortaya konuldu. Her bir antikor için derece 1 ve 2 tümörler arasında yoğun bir farklılık görülmedi. CD31 hariç diğer antikolar açısından ise derece 3 ve 1 tümörler arasında boyanma yoğunluğu açısından önemli farklılık olduğu belirlendi. CD31 ise tüm kesitlerde hemen hemen eşit derecede boyandı.

Biyokimyasal analizlerde oksidatif stres belirteçleri sadece NO değerinde kontrol grubu ile tümör grupları arasında fark görülmezken, TOS, OSI ve MDA değerlerinde gruplar arasında fark belirlendi. MDA analizinde kontrol grubu ile derece 3 tümörler arasında belirgin fark olduğu görüldü. Organizmanın oksidatif stresle savaşıma sistemi olan antioksidanlar açısından ise CAT, GSH ve TAS analizlerinde total antioksidan kapasitesinin kontrol grubu ile derece 3 tümörler, CAT analizinde kontrol grubu ile derece 1 tümörler arasında fark bulundu. GSH analizinde gruplar arasında fark olmadığı görüldü. Kimyasal analizlerde parametrelerin dereceler arasında anlamlı değişkenlik göstermediği bulundu.

Çalışma, oksidatif stresin tümör ve tümör mikro çevresini etkilemesi, tümör ve tümör mikro çevresinde birbiri ile ilişkili parametrelerin değerlendirilmesi açısından önemlidir. Çalışmada bakılan parametrelerin daha malign tümörlerde daha yoğun boyandığı belirlenmiştir. Bu çalışma Türkiye'de kedi meme tümörü ve tümör mikro çevresi ile ilgili yapılan en kapsamlı çalışmalardan biridir. Değerlendirilen parametrelerin artışı kötü prognozla ilişkili olmakla birlikte, bu parametreler kedi meme

tümörlerinde hastalığa henüz tam olarak entegre edilememiştir. Hastalığın prognozu ve tedavi seçeneklerini etkilemeleri açısından çok daha geniş örneklem büyüklükleri ile çalışılmalı ve bu hastaların hepsi operasyon sonrasında da takip edilmelidir.

Anahtar kelimeler: antioksidan, kedi meme tümörü, tümör mikro çevresi, oksidatif stres

SUMMARY

Evaluation of Oxidative Stress and Antioxidant Levels in Cats with Mammary Tumors of Different Histopathological Grades

In this study, the tumor microenvironment was determined by immunohistochemical method in paraffin tissue sections of mammary tumor operation materials belonging to cats brought to Kuğulu Veterinary Outpatient Clinic for diagnostic and therapeutic purposes and its relationship with oxidative stress was investigated. The antioxidant response of the organism was evaluated and it was aimed to investigate the relationship of these results with each degree of tumor. For this purpose, the tumor microenvironment was evaluated by immunohistochemical method using CD3, nuclear factor kappa beta (NF- κ B), CD31, vascular endothelial growth factor (VEGF), inducible nitric oxide synthase (iNOS), hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α), tumor necrotic factor alpha (TNF- α) and 8 hydroxyguanosine (8OHdG) antibodies, while the total antioxidant status (TAS), total oxidative status (TOS), oxidative stress index (OSI), reduced glutathione (GSH), melondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and catalase (CAT) analyses were performed biochemically from blood serum.

Seventeen cats with mammary tumor were included in the study. Six of the cats were diagnosed as grade 1, 5 as grade 2 and 6 as grade 3 tumors. Eleven of the tumors were diagnosed as tubular adenocarcinoma, 3 as tubulopapillary carcinoma, 1 as papillary carcinoma, 2 as solid carcinoma. The average age of the cases was 10.7 and the most affected breed was tekir (n=12).

In immunohistochemical analyses, all antibodies were stained more intensively in grade 3 tumors. The relationships of these antibodies to each other were clearly revealed in grade 3 tumors. There was no significant difference between grade 1 and 2 tumors for each antibody. In terms of antibodies other than CD31, it was determined that there was a significant difference in staining intensity between grade 3 and 1 tumors. CD31, on the other hand, was stained almost equally in all sections.

In biochemical analyzes, there was no difference between the control and tumor groups in oxidative stress markers only in NO values, but there was a difference between the groups in TOS, OSI and MDA values. In MDA analysis, there was a significant difference between the control group and grade 3 tumors. In terms of antioxidants, which are the body's system for fighting oxidative stress, a difference was found between the control group and grade 3 tumors of total antioxidant capacity in CAT, GSH and TAS analyses, and between the control group and grade 1 tumors in CAT analysis. There was no difference between the groups in GSH analysis. In chemical analysis, it was found that the parameters did not show significant variability between grades.

The study is important in terms of the effect of oxidative stress on the tumor and tumor microenvironment, and the evaluation of interrelated parameters in the tumor and tumor microenvironment. It was determined that the parameters examined in the study were stained more intensely in more malignant tumors. This study is one of the most comprehensive studies on feline mammary tumors and tumor microenvironment in Turkey. Although increased parameters evaluated are associated with poor prognosis, these parameters have not yet been fully integrated into the disease in feline mammary tumors. They should be studied with much larger sample sizes in terms of their impact on the prognosis of the disease and treatment options, and all of these patients should be followed up after the operation.

Key Words: antioxidant, feline mammary tumor, immunohistochemistry, tumor microenvironment, oxidative stress

ÖNSÖZ

Kanser küresel bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü'nün verileri kanser vakalarının her yıl arttığını göstermektedir. İnsanlarda olduğu gibi hayvanlarda da kanser vakaları artış göstermektedir. Tümör oluşumunu tetikleyen şeylerin başında mutasyonlara sebep olan etmenler gelmektedir ve hücrelerde oluşan oksidatif stres de bu etmenlerin başında gelmektedir. Meme tümörü hem insan hem de kedi ve köpek hekimliğinde çok önemli bir yeri olan, yüksek oranda mortaliteye sahip ve dünya genelinde problem oluşturan bir hastalıktır. Hastalıkla ilgili son zamanlarda yapılan çalışmalar hem insanlarda hem de kedilerde sebebe yönelik tedavileri içermektedir. Bu yüzden de çalışmalar tümör mikro çevresi ve immunohistokimyasal analizlere odaklanmaktadır.

Bu çalışmada her yıl onlarca kedinin ölümüne sebep olan meme tümörü vakaları üzerine oksidatif stresin etkisini ve organizmanın antioksidan cevabını araştırmak amaçlandı. Bu da kan serumundan kimyasal analizler ve doku kesitlerinden immunohistokimyasal boyamalar yapılarak ölçüldü.

Tez projemi 20.SAĞ.BİL.18 kodlu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) Koordinatörlüğü'ne, doktora öğrenimim boyunca benden yardım, destek ve emeğini esirgemeyen, her türlü sorunda yanımda olan danışman hocam Doç Dr. Mehmet Fatih BOZKURT olmak üzere Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Hikmet KELEŞ hocama, Afyon Kocatepe Üniversitesi Kimya Bölümü'nün değerli hocası Prof. Dr. Ömer HAZMAN ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet BÜYÜKBEN hocama, meslektaşlarım Veteriner Hekim Erkan TÜFEKÇİ, Veteriner Hekim Muhammed Nasır BHAVA, Veteriner Hekim Talat ERGÜN, Veteriner Hekim adayı Ezgi ÇELİK, Kuşulu Veteriner Polikliniği'nde beraber çalıştığım tüm arkadaşlarım ve özellikle Veteriner Hekim Seda HORUM METE'ye, Veteriner Hekim Emre Sunay GEBEŞ'e, Veteriner Hekim Görkem OZANSOY CENGİZ'e, Veteriner Hekim Görkem CENGİZ'e ve en önemlisi bu uzun ve zorlu yolda beni asla yalnız bırakmayıp, manevi ve maddi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Fatma CANSIZ

Afyonkarahisar

2023-005

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
SUMMARY	vii
ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1.GİRİŞ	19
1.1.Kedilerde Meme Tümörü	19
1.2.Risk Faktörleri	19
1.3.Klinik Görünüm	20
1.4.Tanı	22
1.5.Tedavi	23
1.5.1.Cerrahi	23
1.5.2.Sistemik Tedavi	24
1.6.Kedilerde Memenin Normal Anatomi, Histoloji ve İmmunohistokimyası	25
1.6.1.Histoloji	28
1.7.Meme Dokusunun Nöral İnnervasyon, Vaskülarizasyon ve Lenf Drenajı	30
1.8.Hücre Farklılaşma Belirteçleri	32
1.9.Hormonlar ve Büyüme Faktörleri	33
1.9.1.Kedi Meme Tümörlerinde Steroid Hormon Reseptörleri	33
1.9.2.İnsülin ve Büyüme Hormonu (IGF)	34
1.9.3.Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve Reseptörleri	34
1.9.4.İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2 (HER2)	35

1.9.5.Vasküler Endotelial Büyüme Faktörleri (VEGF)	35
1.9.6.Siklooksijenaz (COX) 2	36
1.10.Kedi Meme Tümörlerinin Moleküler Sınıflandırılması	37
1.11.Kedi Meme Tümörlerinin Sınıflandırılması	37
1.11.1.Hiperplazi ve Displazi	37
1.11.2.Benign Neoplazmalar	38
1.11.3.Malignat Epitelial Neoplazmalar	39
1.11.4.Malignant Epitelial Neoplazmalar (Özel tipler)	40
1.11.5.Malignant Mezenşimal Neoplazmalar	41
1.12.Prognostik Faktörler	41
1.12.1.Epidemiyolojik Prognostik Faktörler	41
1.12.2.Klinik ile İlgili Prognostik Faktörler	42
1.12.3.Histolojik Prognostik Faktörler	43
1.12.4.İmmunohistokimyasal Prognostik Faktörler	43
1.13.Tümör ve Tümör Mikro Çevresi	45
1.13.1.Stroma	48
1.13.2.Ekstraselüler Matriks (ECM)	51
1.13.3.Yangı ve Tümör Gelişimi	51
1.14. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	54
2. MATERYAL ve METOT	63
2.1.Materyal	63
2.2. Metot	64
2.2.1. Doku Takibi ve Histopatolojik Metot	64
2.2.2. İmmunohistokimyasal Metot	65
2.2.3. Biyokimyasal Metot	67
2.2.4. İstatiksel Metot	70

3. BULGULAR	71
3.1. Histopatolojik Bulgular	72
3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	76
3.2.1. CD3 Skorlaması	76
3.2.2. Her Bir Tümör Derecesine Göre NF-K β Skorlaması	77
3.2.3. Her Bir Tümör Derecesine Göre VEGF Skorlaması	79
3.2.4. Her Bir Tümör Derecesine Göre CD31 Skorlaması	80
3.2.5. Her Bir Tümör Derecesine Göre iNOS Skorlaması	82
3.2.6. Her Bir Tümör Derecesine Göre HIF1- α Skorlaması	83
3.2.7. Her Bir Tümör Derecesine Göre 8OHdG Skorlaması	85
3.2.8. Her Bir Tümör Derecesine Göre TNF- α Skorlaması	86
3.2.9. Patoloji Bulgularının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	87
3.3. Biyokimyasal Bulgular	88
3.4. Histopatolojik, İmmunohistokimyasal ve Biyokimyasal Analizler Arasındaki İlişki	89
4. TARTIŞMA	90
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	96
6. KAYNAKLAR	98
7. EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl: Mikrolitre

8- OHdG: 8 hidroksideoksi guanozin

ANOVA: Varyans analizi

BRCA: Meme kanseri

CAF: Kanser ilişkili fibroblast

CAT: Katalaz

CK: Sitoketarin

cm: Santimetre

COX: Siklooksijenaz

CT: Bilgisayarlı tomografi

DNA: Deoksiribonükleik asit

DTNB: Dithiobis nitrobenzoik asit

ECM: Ekstraselüler matriks

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ER: Östrojen reseptör

ETC: Elektron transport zinciri

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

FMC: Kedi meme karsinomu

FSH: Folikül stimüle edici hormon

GFAP: Glial fibriler asidik protein

GH: Büyüme hormonu

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

GST: Glutasyon s transferaz

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HE: Hematoksilen eozin

HER 2: İnsan epidermal büyüme faktörü 2

HIF1- α : Hipoksi ile indüklenbilir faktör 1 α

ICAM: Hücre içi adezyon molekülü

IGF: İnsülin büyüme faktörü

IHC: İmmunohistokimya

IL: İntelökin

IMC: Mikropapillar invaziv karsinoma

iNOS: İndüklenbilir nitrik oksit sentaz

LH: Luteinleştirici hormon

MDA: Melondialdehit

ml: Mililitre

mm: Milimetre

mmol: Milimol

MMP: Matriks metalloproteinaz

mRNA: Mesajcı Ribonükleik asit

MVD: Mikro damar dansitesi

NF- κ B: Nükleer faktör kapa β

nm: Nanometre

NO: Nitrik oksit

OH: Hidroksil radikali

OHE: Ovariohisterektomi

OSI: Oksidatif stres indeksi

PBS: Fosfat bufer salin

PDGF: Platelet kaynaklı büyüme faktörü

PIGF: Plasental büyüme faktörü

PR: Progesteron reseptör

RNS: Reaktif nitrojen türleri

RON: Makrofaj stimüle eden protein reseptörü

ROS: Reaktif oksijen türleri

Sd: Standart sapma

SH: Sülfhidril

SMA: Düz kas aktini

SOD: Süperoksit dismutaz

SPSS: Sosyal bilimler için istatistik programı

TAM: Tümör ilişkili makrofaj

TAS: Total antioksidan statüsü

TBA: Tiyobarbitürik asit

TBS: Tris bufer salin

TILs: Tümörü infiltre eden lenfositler

TMÇ: Tümör mikro çevresi

TNBC: Triple negatif meme kanseri

TNF: Tümör nekroz faktör

TOS: Total oksidan statüsü

USG: Ultrasonografi

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Meme tümörünün makroskopik görünümü	21
Şekil 1.2. Yüzeyinde ülser bulunan meme tümörünün makroskopik görünümü	22
Şekil 1.3. Meme tümörünün radyolojik görünümü	23
Şekil 1.4. Malign meme tümöründen alınan ince iğne aspirasyonun sitolojik görünümü	23
Şekil 1.5. Meme tümörü operasyon malzemesi ve total mastektomi görüntüsü	24
Şekil 1.6. Kedilerde meme loblarının yerleşimi ve anatomik lokasyonu	27
Şekil 3.1. Adenokarsinom, kedi. Boz beyaz renkli kitle	72
Şekil 3.2. Kedi meme adenokarsinomunun küçük büyültmede mikroskopik görünümü	74
Şekil 3.3. Derece I meme adenokarsinomunun mikroskopik görünümü	74
Şekil 3.4. Derece II meme adenokarsinomunun mikroskopik görünümü	75
Şekil 3.5. Derece III meme adenokarsinomunun mikroskopik görünümü	75
Şekil 3.6. CD3 ve NF-KB'nın tümör derecelerine göre IHC görünümü	78
Şekil 3.7. CD31 ve VEGF'in tümör derecelerine göre IHC görünümü	81
Şekil 3.8. iNOS ve HIF1- α 'nın tümör derecelerine göre IHC görünümü	84
Şekil 3.9. 8OHdG'nin tümör derecelerine göre IHC görünümü	86
Şekil 3.10. TNF- α 'nın tümör derecelerine göre IHC görünümü	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Olguların cinsiyet, yaş, ırk ve kısırlaştırma durumları	63
Çizelge 2.2. Meme tümörlerinin derecelendirme metodu	65
Çizelge 2.3. IHC için kullanılan antikor panelleri	66
Çizelge 3.1. Olguların ırk, yaş, kısırlaştırma durumuna göre dağılımı ve histopatolojik teşhisleri	72
Çizelge 3.2. Tümör derecelerine göre CD3 skorlaması	76
Çizelge 3.3. Tümör derecelerine göre NF- κ B skorlaması	77
Çizelge 3.4. Tümör derecelerine göre VEGF skorlaması	79
Çizelge 3.5. Tümör derecelerine göre CD31 skorlaması	80
Çizelge 3.6. Tümör derecelerine göre iNOS skorlaması	82
Çizelge 3.7. Tümör derecelerine göre HIF1- α skorlaması	83
Çizelge 3.8. Tümör derecelerine göre 8OHdG skorlaması	85
Çizelge 3.9. Tümör derecelerine göre TNF- α skorlaması	87
Çizelge 3.10. Patolojik analizlerinin istatistiksel sonuçları	88
Çizelge 3.11. Biyokimyasal analizlerin istatistiksel sonuçları	89

1.GİRİŞ

1.1. Kedilerde Meme Tümörü

Meme tümörü, meme dokusundan köken alan tümör tipidir (Nordin vd., 2017). Meme tümörleri kadınlarda en çok bildirilen tümör tipidir (Nordin vd., 2017; Nascimento vd., 2020). Dişi kedilerde ise deri ve hematopoietik sistem tümörlerinden sonra en çok bildirilen üçüncü tip tümördür ve tüm kedi tümörlerinin %17'sini oluşturur (Dorn vd., 1968; Hayes vd., 1981; Nordin vd., 2017; Nascimento vd., 2020; Rosen vd., 2020; Zheng vd., 2020; Manoel vd., 2021; Moraes ve Borges, 2021). Her yıl 100.000 dişi kedinin % 25.4'ünde hastalık bildirilmektedir (Dorn vd., 1968; Egenvall vd., 2010). Kedi meme tümörlerinin yaklaşık olarak %90'ı malign karakterli olup sıklıkla karsinomlardır (Cassali vd., 2020; Manoel vd., 2021). Tümör insidensi yaş, ırk, hormon seviyesi ve kısırlaştırma durumu ile yakından ilişkili olup, metastaz oranı yüksek, prognozu ise zayıftır. En yaygın görülen metastaz bölgeleri; lenf nodları, akciğer, karaciğer ve plöradır (Hahn ve Adams, 1997; Cassali vd., 2020; Zheng vd., 2020).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar karsinom gelişiminde rol oynayan faktörlere yoğunlaşmıştır (Zheng vd., 2020). Hastalığın etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte yaş, ırk, reproduktif durum ile östrojen ve progesteron hormonlarına maruz kalmanın etiyojide rol oynadığı düşünülmektedir (Dorn vd., 1968; Johnston vd., 2001; Kustritz, 2007). Bazı çalışmalar hem kedi meme tümörlerinin hem de insan meme kanserlerinin etiyojisinde viral etkenlerin rol oynayabileceğini ve kedi meme tümörlerinin zoonotik potansiyeli olabileceğinden bahsetmektedir (Soares vd., 2016). Meme tümörleri en çok orta yaş ve yaşlı kedilerde görülür. Ortalama yaş 10-12'dir (Dorn vd., 1968; Johnston vd., 2001; Kustritz, 2007). Irk predispozisyonu çeşitlilik gösterir. Siyam ve evcil kısa tüylü kedilerde hastalık daha fazla bildirilmiştir. Siyam ırkı kedilerde hastalık diğer ırklara göre daha erken yaşlarda görülebildiği ifade edilmektedir (Hayes ve Mooney, 1985; Ito vd., 1996).

1.2.Risk Faktörleri

Meme tümörlerinde risk faktörleri tam olarak bilinmemekle birlikte (Nordin vd., 2017) diğer türlerde olduğu gibi en büyük risk faktörünün endojen dişil hormonlara maruziyet olduğu düşünülmektedir. Dişi kedilerde hastalık riski çok yüksektir ve kısırlaştırılmamış kedilerde tümör oluşum riski kısırlaştırılanlara göre yedi kat fazladır (Misdorp vd.,

1991; Overley vd., 2005). Köpeklerde olduğu gibi kedilerde de ovaryum hormonlarına uzun süre maruz kalınması meme tümörü gelişim riskini artırırken, ilk bir yaşında yapılan ovariohisterektomi (OHE) operasyonları bu riski önemli oranda düşürmektedir. Yapılan çalışmalarda kısırlaştırılmamış kedilerle kıyaslandığında, meme tümörünün görülmesi 6 aydan önce kısırlaştırılmış kedilerde %9, 6-12 aylık yaşta kısırlaştırılanlarda %14 olarak belirlenmiştir (Overley vd., 2005; Nordin vd., 2017).

Gebeliği önlemek, bazı deri hastalıklarının tedavisi ya da agresyonu kontrol etmek için kullanılan eksojen hormonların (örneğin megestrol, medroksiprogesteron asetat) uzun süreli kullanımı da kedilerde meme tümörü oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Progestinlerin meme dokusunda değişiklikler yaptığı ve bu ilaçların kısa süreli kullanımlarında en sık karşılaşılan glandular değişikliğin fibroepitelyal hiperplazi olduğu gösterilmiştir (Loretta vd., 2005). Yapılan bir çalışmada progestin tedavisi alan kedilerin almayanlara oranla hastalığa yakalanma riskinin 3,4 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Misdorp vd., 1991).

Aynı zamanda meme tümörlerinin büyük bir kısmı dişi kedilerde görülürken, yaklaşık olarak %3'ü eksojen progestinlere maruz kalma anamnezi olan erkek kedilerde görülmektedir (Hayes vd., 1981; Skorupski vd., 2005). Progestin hikayesi olan 22 erkek kediden 8'inde hastalığın bildirildiği bir çalışma mevcuttur (Skorupski vd., 2005). Uzun süreli progesteron kullanan 9 erkek kedide fibroepitelyal hiperplazi bildirilmiştir (Küçükbekeir vd., 2020).

Hem insan hem de hayvanlarda yapılan çalışmalar BRCA 1 ve BRCA 2 genlerindeki değişikliklerin meme kanseri riskini arttırdığını göstermiştir (Nordin vd., 2017).

1.3.Klinik Görünüm

Klinik olarak meme tümörleri sert, nodüler, tek ya da çoklu kitleler şeklindedir (Moraes ve Borges, 2021). Tümörler genellikle meme dokusuyla birlikte yuvarlaktırlar (Şekil 1.1.) ve kedilerin % 60'ında birden fazla kitle görülür (Hayes ve Mooney, 1985). Erken dönemde hareketli, palpe edilebilir ve ayırık kitlelerdir (Gameiro vd., 2021). Kitleyle ilişkili meme başı genellikle şişkindir ve bazen temiz ya da bulanık eksudat gözlenebilir. Büyük tümörler yangılı ve sekonder travma ya da tümör nekrozundan dolayı ülserli olabilir (Şekil 1.2.) (Little, 2016; Cassali vd., 2020; Gameiro vd., 2021).

Gerçek yangılı meme karsinomları kedilerde nadir olarak görülür (Little, 2016). Hastalar ödem, şişkinlik, femoral arterlerde bulunan tümör trombüsü ve femoral venlerden venöz dönüşün azalmasına bağlı olarak ortaya çıkan rahatsızlıklar ortaya çıkabilir (Gimenez vd., 2010). Benign ya da malign tümörlerde fiziksel muayene bulguları spesifik değildir fakat meme ucuyla ilişkili olması, tümör ülserasyonu ya da lenf nodlarının büyümesi özellikle de yaşlı hayvanlarda maligniteyi düşündürür (Little, 2016).

Yapılan bir çalışmada hastalığın klinik seyrinin erkek ve dişi kedilerde benzer olduğu görülmüştür (Skorupski vd., 2005).



Şekil 1.1: Meme tümörünün makroskobik görünümü.



Şekil 1.2: Yüzeyinde ülser bulunan meme tümörünün makroskobik görünümü.

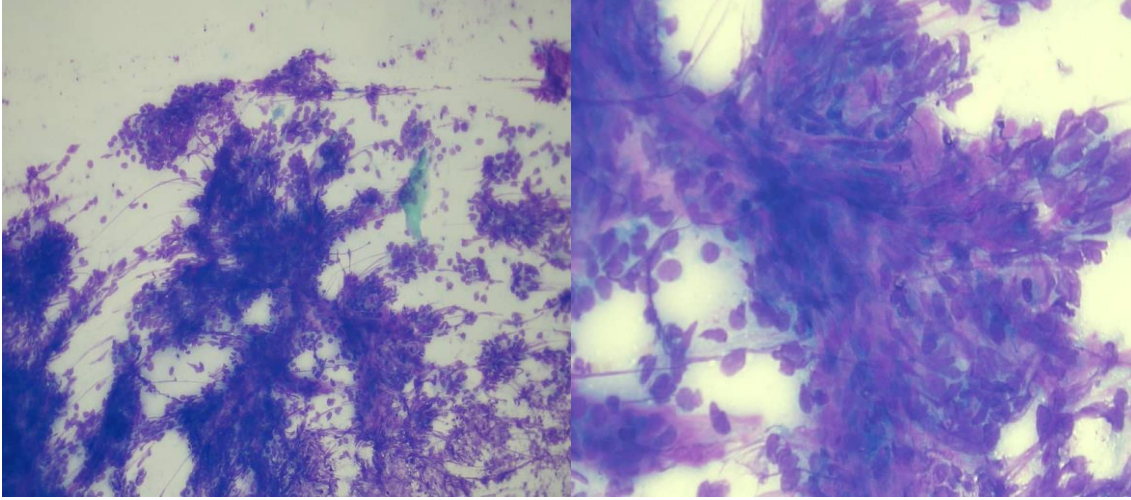
1.4.Tanı

Tümörün tanısı sitolojik muayene ya da biyopsi ile konulabilir. Cerrahide meme zincirinin tamamının alınması önerilse bile kesin tanı ve tedavi için ensizyonel biyopsi ya da sitoloji ile malignite belirlenmelidir (Gimenez vd., 2010). Sitolojik muayene meme bezi tümörlerinin tanısında hızlı teşhis için kullanılabilen bir yöntem olmakla birlikte (Şekil 1.4.) kitlelerin ayrıntılı sınıflandırılması için histopatoloji ve evreleme gerekir (Simeonov, 2022). Çoğunlukla büyük kitleler halindeki (2-3 cm çapından daha büyük) malignant tümörlerde ya da yüksek dereceli tümörlerde evrelemeyi yapmak mecburidir. Evreleme, fiziksel muayene, tam kan sayımı, serum biyokimyasal değerler, idrar analizi, tüm kitlelerin sitolojik ve/veya histolojik değerlendirmesi, lenf nodlarının palpasyon ve torakal radyoloji (Şekil 1.3.) ya da bilgisayarlı tomografi (CT)'yi içerir. Abdominal organlardaki olası metastazları değerlendirmek için abdominal ultrasonografi (USG) de önerilmektedir (Little, 2016).



Şekil 1.3: Meme tümörünün radyolojik görünümü.

Beşeri hekimlikte tanıdaki en büyük problem benign lezyonlar ile karsinomların ayrımı ve ayrıca karsinomların da kendi içindeki ayrımını yapmaktır. Bunun için de immunohistokimyasal (IHC) boyamalardan yararlanır (Zaha, 2014).



Şekil 1.4: Malign meme tümöründen alınan ince iğne aspirasyonun sitolojik görünümü (Giemsa, 40x).

1.5.Tedavi

Tedavi seçenekleri tümörün evresine bağlıdır ve cerrahi, radyasyon terapisi, kemoterapi ya da bu tedavilerin kombinasyonunu içerir (Nordin vd., 2017).

1.5.1.Cerrahi

Uzak metastazı olmayan meme tümörü (FMC) bulunan kedilerde önerilen primer tedavi yöntemi cerrahidir (Şekil 1.5.). Tavsiye edilen cerrahi prosedür hastalığın boyutuna bağlı olarak ya unilateral ya da bilateral zincir mastektomisidir (MacEwen vd., 1984). Çalışmalar zincir mastektomisinin hastalıksız sağ kalıma önemli oranda etki ettiğini ve tekrarlayan cerrahi müdahaleleri önlediğini göstermiştir (MacEwen vd., 1984; Little, 2016). Bilateral zincir mastektomisi 2 aşamalı olarak yapılır. Tek seferde her iki zincirinde alınması için yeterli doku bulunmalıdır. Böyle büyük cerrahilerde ilişkili lenf nodu da alınmalı ve histopatolojik olarak incelenmelidir (Little, 2016).



Şekil 1.5: Meme tümörü operasyon malzemesi ve total mastektomi görüntüsü.

1.5.2.Sistemik Tedavi

Kemoterapi uzun zamandır insan meme kanseri hastalarında kullanılan bir tedavi yöntemidir. Erken dönem meme kanserli hastalarda adjuvan tedavi olarak uygulanan

kemoterapinin genel sağ kalım üzerinde belirgin iyileşme sağladığı gösterilmiştir (Joseph, 2002).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, 2 cm çapından küçük, düşük dereceli, negatif evrenmiş tümörlerin, cerrahi ile birlikte ek tedavi yapıldığında sağ kalımı arttırdığını göstermektedir (MacEwen vd., 1984; Little, 2016). Fakat FCM için henüz standardize edilmiş bir tedavi bulunmamaktadır (Little, 2016).

Hormonal ve hedefe yönelik tedaviler insan hekimliğinde kullanılmaya başlanmıştır. Fakat bu yöntemler kedilerde henüz iyi bir şekilde irdelenmemiştir. Çünkü östrojen, progesteron reseptörleri ve insan epidermal büyüme faktörü 2'nin (HER) aşırı ekspresyonu rutin olarak FMC'nin laboratuvar testlerine entegre olmamıştır. Aynı zamanda FMC'ler bu reseptörler yönünden çoğunlukla negatif olduğu için kedi pratiğinde hedefe yönelik tedaviler çok uygun olmamaktadır. Bu yüzden birçok çalışma geleneksel kemoterapötiklere yönelmektedir (Little, 2016).

Doksorubisin FMC tedavisinde en sık kullanılan ilaçtır. Fakat çalışmalar ek tedavilerden alınan yararın sonuçlarını tam olarak gösterememektedir. Bu durum faydası olmamasından da kaynaklanabileceği gibi konuyla ilgili yapılan çalışmaların yetersizliğinden de kaynaklanabilir. Doksorubisin ve meloksikam kullanılarak yapılan bir çalışma, evre 3 tümörlü, 23 kedinin cerrahi müdahale ile birlikte ortalama sağ kalım süresini 460 gün olarak göstermiştir. Fakat bu çalışmada kontrol grubunun olmaması çalışmayı sağlıklı değerlendirmeye olanak sağlamamaktadır (Borrego vd., 2009). Yine kontrol grubu olmayan bir çalışmada ortalama sağ kalım süresi 448 olarak verilmiştir (Novosad vd., 2006). Yetmiş üç kedi ile yapılan başka bir çalışmada doksorubisin ile tedavi olan ve olmayan kedilerin sağ kalım sürelerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır (Little, 2016).

1.6.Kedilerde Memenin Normal Anatomi, Histoloji ve İmmunohistokimyası

Meme bezi, glandular doku (glandular paransim) ve ilişkili kanal sistemi (periferden meme başına boşalan), bağ doku (intersitisyum), sinir lifleri, damarlar ve gevşek bağ dokuyu birleştiren (Liebich, 2019), vaskularizasyon ve nöral innervasyonu lokal kutanöz sistemlerden sağlanan ve deriden köken alan (Silver, 1966), sadece memelilerde bulunan modifiye subkutan apokrin bir bezdir (Ghosh, 2013; Gültiken,

2016). Meme bezinin yeni doğanlarda pasif immunité ve beslenmenin sağlanmasında önemli rolü vardır. Meme dokusu kollara ayrılmış, komşu fibrovasküler ve yağ dokuya gömülmüş duktal yapıları olan bir bezdir. Kanal sistemi meme başının toplayıcı (papillar) kanalları ile başlar ve bez tamamen farklılaştığında sekretorik alveoller ile sonlanır. Doğumda bezin gelişimi tamamlanmamıştır. Gelişimi puberta ile başlar ve bu gelişimi östrus siklusunda morfolojik değişiklikler takip eder. Gelişimin son aşaması sadece gebelik sırasında olur (Ghosh, 2013; Meuten, 2017).

Kedilerde meme bezinin erken embriyonik dönemlerindeki gelişimi iki linear kalınlık olarak görülür (Silver, 1966; Ghosh, 2013; Meuten, 2017). Bu kalınlaşmalar ventrolateral ektoderimde belirlenir ve özelleşmiş mezoderm tarafından desteklenir. Bu kalınlaşma aksillardan inguinal bölgeye doğru (Meuten, 2017) meme çizgisi boyunca uzanır (Silver, 1966). Bu devam eden çıkıntı birkaç tane ayrık parçanın içine doğru bölünür. Bunların her biri zamanla tek bir bez olur (Silver, 1966; Meuten, 2017). Herhangi bir türdeki bez sayısı ve pozisyonu genetik olarak kodlanmıştır (Silver, 1966). Plakaların ektodermal hücreleri solid kordonlardan proliferer olur ve bunlar dallanmış yapılar olarak temel mezodermin içine filizlenir. Ektoderm ve mezoderm hücreleri arasında kompleks bir sinyal yolu vardır. Filizlerin sayısı papiller kanal delik sayısını belirler. Bunlar da her bir meme başı kılıfına gelişir ki meme başı kılıfı özel epiteli olan bir bölgedir. Kedilerde her bir meme genellikle 4-7 papiller kanal deliğine sahiptir. Bu kanalların her biri dallanır ve yetişkin bezlerinde birer lob şekillenir. Bu her bir lob bağımsız fonksiyonel bir birim gibi davranır (Meuten, 2017).

Kedilerde genelde her bir bölgede 4 (toplam 8) meme bezi vardır (Şekil 1.6.). Bunlar aksillar (M1), torasik (M2), abdominal (M3) ve inguinal (M4)'tür. Aynı zamanda kranial (T1), kaudal (T2) torasik ve kranial (A1) ve kaudal (A2) abdominal olarak da adlandırılabilirler. Bazı kedilerde inguinal (M1) beşinci bez de bulunabilir (Silver, 1966; Raharison ve Sautet, 2006; Gültiken, 2016; Meuten, 2017).



Şekil 1.6: Kedilerde meme loblarının yerleşimi ve anatomik lokasyonu.

Epitelyal tomurcuklar dermal bağ doku içine doğru oyuklar açmaktadır. Bunların başlangıçtaki formları hücrelerin solid kordonları şeklindedir. Bu kordonlar daha sonra tüpler şeklinde, kör sonlanmış olarak yeniden düzenlenir ve bu aşamada bu epitelyal tomurcuklar bir meme başı formu alır. Her kanal sonunda yetişkinlerdeki bezin tam bir lobunu oluşturur, ancak kendi içinde, kendi bezi içindeki diğer kanal sistemleriyle veya aslında bitişik bezlerle bağlantısız, eksiksiz bir işlevsel birimdir (Silver, 1966).

Prepubertal dönemde meme dokusunun gelişimi vücudun genel yüzey alanının gelişimi ile ilgilidir ve kanallar meme dokusunun tabanından sadece kısa bir mesafede dairesel bir fan içinde uzanır. Kan tedariki genel kutanöz damarlaşmayla benzerdir fakat meme başındaki deride ter bezi yetersiz olduğu için sinir beslenmesinde bazı özelleşmeler vardır (Silver, 1966).

Siklik ovaryum aktivitesi başladığında basit meme kanalları hızlı gelişime maruz kalırlar. Bu gelişim de hormonal değişiklikler ile kontrol edilir. Gelişim genel vücut yüzeyine göre daha hızlı olur. Gelişim kanal sisteminin deri ve pannikulus kasları arasında hızlı genişlemesi ve dallanması şeklinde görülür. Bu faz östrus başladıktan 30-40 gün arasında tamamlanır ve yaklaşık olarak bu zamanlarda alveolar epitelde belirgin sekretorik aktivite başlar. Bu sekresyon doğuma kadar yavaşça devam eder. Postpartum 10 günde sistemin alveolar parçası regrese olmaya başlar ve 40 gün civarında genişçe dejenere olur. Böylece sadece kanallar kalır. Emzirme tamamlandığında bez basit kanal

sistemine döner. Meme bezindeki bu değişiklikler yalancı gebelikte de gerçek gebelikte benzer olur. Sadece geç sekretorik faz çok belirgin değildir (Silver, 1966).

Doğumda sadece büyük kanal gelişir. Puberta ile birlikte kanalların terminal sonlarında östrojen salgılanır. Diöstrus ve gebelik sırasında progesteronun artan seviyeleri kanalların bir sonraki gelişimini, lobul ve alveollerin (lobul ve alveolar birim) formasyonunu indükler. Gestasyonel prolaktin etkisi altında presekretorik alveolar hücreler sekretorik alveolar hücrelere farklılaşır. Böylece doğumda meme bezleri sekretorik duktal lobular alveolar yapılar ile karakterizedir (Meuten, 2017).

Emzirmeme tubulo alveolar sistemin distensiyonu ve kapıllarların kapanması ile sonuçlanır. Sekresyonun birçoğunun lenfatikler aracılığı ile ani rezorpsiyonu şekillenir ve kapıllarlar glandular dokunun yeniden yapılanma periyodu boyunca yeniden açılır. Bu aşama boyunca süt ya da indirgenmiş süt ürünleri dejenere olmuş kanal sistemine hapsolmuştur ve karsinojenik materyaller kist içinde gelişebilir (Silver, 1966).

1.6.1.Histoloji

Meme bezi tubuloalveolar bir bezdir. Tubuloalveolar salgı birim grupları bağ doku ile ayrılan lobüller oluşturur (Eurell ve Frappier, 2006).

- Meme başı: Meme başı, meme dokusu sekretorik sisteminin son kısmıdır (Meuten, 2017). Laktiferöz sinüs meme başı sinüsü ile (meme başı boşluğu) devam eder ve çok katlı küboidal epitel ile çevrilidir. Düz kas demetleri meme başının uzun aksisine paralel doğrultudadır. Dermisteki vasküler tabakayı birçok kan damarı oluşturur (Eurell ve Frappier, 2006). Meme başı epidermis ile çevrilidir. Kedilerde kıl folikülleri, geniş sebasöz ve apokrin bezler bulunur. Bazal epidermal keratinositlerin arasında melanositler bulunabilir. Deri altı ve yumuşak dokudakilerle kıyaslandığında epidermis, adneksa ve melanositlerin tümörleri çok nadirdir ve meme tümörü olarak sınıflandırılmazlar (Meuten, 2017).
- Kanallar: Kanal sistemi intralobuler kanal ile başlar. Bu kanallar interlobular kanala açılır. İnterlobular kanal bir laktiferöz kanala drene olur. Laktiferöz kanal her bir lob için primer eksretorik kanaldır.

Multiple papillar kanallar (meme ya da toplayıcı kanallar) kedilerde 2-3 major papiller orifis apekse açılır. Memenin dermisi ile birlikte ve daha büyük kanal sistemleri boyunca longitudinal ve transversal düz kas lifleri ve elastin lifleridir. Meme kanalı çok katlı sküamöz epitelle örtülüdür ve sirküler düz kas sfinkteri tarafından çevrelenmiştir. Her bir meme kanalı meme sinusunun içine açılır ve bu da bunlar da iki katmanlı küboidal-kolumnar epitel ile örtülmüştür. Kanalın dışında miyoepitel hücreler vardır (Eurell ve Frappier, 2006; Meuten, 2017). Kanallardan ve meme sinüsünden köken alan neoplazmalar nadirdir fakat sınıflandırma sisteminde ayrı bir başlık olarak tartışılır (Meuten, 2017).

Büyük interlobuler kanallar (laktiferus kanalları) distal meme sinusunun içine boşalır. Bu interlobuler kanallar bilayerdir. Küboidal epitelle örtülüdürler. Dış katmanda fusiform miyoepitel hücreler vardır. Distaldeki daha küçük interlobuler kanallar az miktarda miyoepitel hücresi ile birlikte tek katmanlı küboidal epitel ile örtülüdür. Terminal interlobuler kanallar intralobuler kanalların içine devam eder. Bunlar da tek katmanlı epitelial hücreler ile örtülüdür. Onların etrafını da iğsi şekilli miyoepitelial hücreler çevreler (Gültiken, 2016; Meuten, 2017).

- Alveoli: Alveoli tek katlı epitel hücresi ile örtülüdür ve dışarı doğru yıldız şekilli miyoepitel hücreleri sekretorik alveolar epitel uzun, küboidalden kolumnara içinde intrastoplazmik lipid damlacıkları olan ki bu damlacıklar da alveolar lüminada akumule olan hücrelerle kaplıdır. Duktal büyüme sırasında epitelial hücrelerin proliferasyonu ile uzanma ve dallanma sağlanır. Bu epiteller de miyoepitelial hücreler arasındaki boşluklar boyunca penetre olur (Eurell ve Frappier, 2006; Meuten, 2017). Süt üretimi devam ettikçe lümen büyür ve komşu alveoller parsiyal olarak birleşir. Süt üretiminde çok kısa bir süre sonra yeni salgı siklusu başlar. Lümen kısmen kollabe olur ve dışa doğru düzensiz olur. Alveol kümeleri bez içinde lobüller oluşturur ve her lobul aynı anda aynı sekretorik fazda olmayabilir. Alveol epiteli sekretorik aktivite aşamasına göre değişir (Eurell ve Frappier, 2006).
- İntertisyum: Meme bezinin intertisyum dokusu kan ve lenf damarları, sinir ağlarını içeren ve salgı birimlerine önemli destek sağlayan yapıdır. Kolajen tip 4,

lamini ve heparin sülfat proteoglikan içerir. Her bir salgı birimini geniş bir kan ve lenf damarları, kılcal damar pleksusu ile birlikte gevşek bağ dokusu sarmalar (Eurell ve Frappier, 2006; Meuten, 2017). Özelleşmiş mezodermden köken alır. Bu intersitisyel doku histiyosit, plazma hücresi ve küçük lenfositleri içerebilir ve iki farklı parçaya ayrılır;

1. İntralobuler stroma; daha gevşektir, ince kolajen demetlerden
2. İntralobuler bağ dokusu; lobullere ayrılır ve daha kalın ve daha sıkı organize kolajenden oluşur (Zappulli vd., 2005; Meuten, 2017) .

Meme dokusunun yağ dokunun miktarı değişkenlik gösterir.

Dişi kedilerin reproduktif fizyolojisi diğer türlere göre farklıdır. Dört, on iki aylık zaman aralığında pubertaya girerler. Bazı ırklarda bu süre 20 aya kadar uzayabilir. Mevsimsel poliöstritler ve bu da luteinleştirici hormon (LH) üretmeyi indükler. Spontan ovulasyon da görülebilir. Eksojen stimulanlar hipotalamo-hipofiz-gonadal aksisi etkiler ve folikül stimüle edici hormon (FSH)'dan LH sentezine değişimi sağlar. FSH sitümülayon altında ovaryumda folikül formasyonu östrojen üretir (östrus) fakat ovulasyon ve korpus luteum formasyonu ile birlikte progesteron sentezlenir. Çiftleşmemiş kedilerde interöstrus aralığı 10-15 gün, çiftleşmiş fakat gebe kalmamış kedilerde 35-75 gündür. Meme dokusu histolojisi bu reproduktif değişikliklerden etkilenir. Fakat bunun doğruluğunu kanıtlayacak yeterli çalışma yoktur (Meuten, 2017).

1.7.Meme Dokusunun Nöral İnnervasyon, Vaskülarizasyon ve Lenf Drenajı

Meme bezleri segmental kutanöz sinirlerin ventral bölümleri ile innerve edilir. Meme başının ve bezin paransiminin zengin bir sensorik beslenmesi vardır. Acı, dokunma ve sıcaklık hissinin yanında bu sinirler esneme reseptörlerinin liflerini de içerir. Bezde kemoreseptörler de olabileceği bildirilmiştir. Meme dokusunda sekretor-motor sinirler belirlenmemiştir fakat bezin kan damarlarına fazla miktarda sempatik lif desteği vardır. Düz kas sfinkterleri innerve edilirken miyoepitel hücreler edilmez (Silver, 1966).

Genitofemoral ve interkostal sinirlerin dalları meme bezini innerve eder. Bunlar primer olarak arter ve arteriollerle ve ağırlıklı olarak peptiderjik sinirlerle ilişkilidir. Ki bunlar lokal kan akışının regülasyonunu da içerir. Meme başında nöradrenerjik ve peptiderjik lifler dermiste, düz kas demetleri ile sıkı ilişkidedir. Süt ejeksiyon refleksinin aferent

yolu ile ilişkili olabilir. Fakat sekretorik paransimin büyük kısmının innervasyonu yoktur, özellikle alveoli ve kanalların etrafında peptiderjik sinir lifleri yoktur (Pinho ve Gulbenkian, 2007).

Meme bezlerinin hematik ve lenfatik iletimi tümör metastazının gelişimini anlamak için çok önemlidir (Zappulli vd., 2005).

Meme bezlerinin vaskularizasyonu yoğundur ve venler arterlere göre daha yaygındır (Meuten, 2017). Kedi ve köpeklerde temel damarlaşma ve kan akımının yönü laktasyondaki ve laktasyonda olmayan meme dokusunda aynıdır (Silver, 1966).

Torasik bezlerin arteriyal beslenmesi;

a. internal torasik arterlerin delici kolları

b. kaudalde T7'den gelen interkostal arterlerin kutanöz kolları

c. lateral torasik arterler tarafından sağlanır.

Kranial abdomendeki bezler kranial süperfisial epigastrik arterler ve kaudal interkostal arterlerin kutanöz kollarından, kaudal abdominal ve inguinal bezler kaudal süperfisial epigastrik arterler (eksternal pudental arterin kolları) tarafından beslenir. Bunlar laterale doğru freniko abdominal arterlerin kutanöz dalları tarafından abdominal bezlere ve kaudalde derin sirkümfleks iliakın kutanöz dalları ile güçlendirilmişlerdir. Umbilikusun etrafında 2 epigastrik arter anastomoz yapar, az sayıda damar orta hatta bir bezden bezin çiftine çapraz yapabilir. Küçük venlerin çaprazlanması arterlerden daha sıktır (Silver, 1966; Crouch ve Lackey, 1969; Nickel vd., 1986; Zappulli vd., 2005; Gültiken, 2016). Bu çaprazlama çift olan bezlerde metastatik yayılmaya izin verir (Zappulli vd., 2005).

Lenfatik sistemin anatomisi tümör hücrelerinin yayılması açısından önemlidir. Her bir bez memede subkutis ve paransimdeki ağla benzer lenf damarları ağına sahiptir. Bunlar daha büyük kanallarla ya bitişik bez ağlarına ya da doğrudan lokal lenf düğümüne bağlanır (Silver, 1966). Her meme bezi kendi lenfatik pleksusuna sahiptir. Bu pleksuslar anastomozlaşır ve memenin tabanını çevreleyerek diğer pleksuslar ile birlikte paransime uzanır. Kedilerde 2 ayrı lenfatik ağ vardır. Bunlar 2 anterior bez (aksillar ve torasik) ve 2 posterior bez (abdominal ve inguinal) ile bağlantılıdır (Zappulli vd., 2005; Meuten, 2017). Kranial ve kaudal torasik ve kranial abdominal bezler her zaman kendi

tarafındaki aksillar lenf noduna drene olur. Diğer iki bezin drenajı genellikle üst üste gelir. İnguinal ve kaudal abdominal bezler ortak bir ağ aracılığı ile ipsilateral süperfisial inguinal noda drene olur. Fakat bazen abdominal bezlerin kranial ve kaudal çiftlerinin lenfatikleri arasında bağlantı olabilir. Bu durum muhtemel tümör dokusunun torasikten inguinal bölgeye ya da tersi yönde retrograd lenfatik yayılımına sebep olabilmektedir. Bazen kranial abdominal bez sadece inguinal noda drene olur. Lenfatikler kan damarları gibi orta hatta çaprazlanabilir (Deome, 1959; Silver, 1966; Zappulli vd., 2005).

Meme lezyonu olan kediler üzerinde yapılan bir Doppler mod ve normal USG çalışmasında periferik neovaskülarizasyon ya da meme tümörü ve lenf nodu dokusunun mix patterni belirlenebilmiştir (Moraes ve Borges, 2021).

1.8.Hücre Farklılaşma Belirteçleri

Normal meme bezinde kanal ve alveoli olmak üzere 2 farklı hücre popülasyonu vardır. Bu hücre popülasyonlarının morfolojisi ve fonksiyonu lokasyon ve hormonal duruma göre değişiklik gösterir. Genel olarak poligonal şekilli olan luminal epitelyal hücrelerin protektif-sekretorik fonksiyonları vardır. Bu hücreler iç tabakadadırlar. Dış tabakada bazal/miyoepitelyal hücreler hem epitelyal hem de düz kas hücrelerinin immun fenotipini sergiler. Bunlar genellikle iğsi-uydu morfolojidedir ve kontraktıl fonksiyonları vardır (Meuten, 2017).

Kedilerde luminal epitelyal hücreler koruyucu fonksiyonları ya da hormonal olarak indüklenmiş sekretorik aktivitesine göre özel belirteçleri eksprese etmektedir. Bazal/miyoepitelyal hücreler hem epitelyal hem de düz kas hücrelerinin dual fenotipine sahiptir. Dolayısıyla bunlar miyoepitelyum olarak adlandırılabilir. α smooth muscle actin (α -SMA), calponin, vimentin, p63, sınıf 2 β tubulin, maspin, nötral endopeptitaz (CD10), P-cadherin, caveolin-1, GFAP, S100 ve 14-3-3 protein belirteçleri için pozitiftirler (Sorenmo vd., 2011). CD44 pozitif hücreler (tümörijenik potansiyeli olan) spontan kedi meme karsinomlarında belirlenmiştir (Barbieri vd., 2012).

Luminal Tümörler; östrojen reseptör (ER) veya progesteron reseptör (PR) reseptörleri vardır. Luminal sitokeratinler (CK7, CK8, CK18, CK19) yönünden pozitiftirler.

Bazal-benzeri Tümörler; hormon reseptörü negatiftirler. Bazal belirteçler (CK5, CK6, CK14, CK17, SMA, calponin, HER2) pozitifler ve bu durum insanlarda ER, PR ve HER2 meme tümörlerini alt tiplerine ayırmaya imkan sağlar (Nielsen vd., 2004).

Bu alt tiplendirme farklı klinik görünüş ile ilişkilidir. Luminal grup tümörlerin prognozu daha iyiyken bazal-benzeri meme tümörlerinininki daha kötüdür (Melchor ve Benitez, 2008). Pansitokeratin belirteçleri (AE1-AE3) kullanılarak bölgesel lenf nodları değerlendirilip mikrometastazlar belirlenebilir (Matos vd., 2006).

1.9.Hormonlar ve Büyüme Faktörleri

Ovaryum ve eksojen steroid hormonlar (genellikle kontraseptif olarak kullanılan) meme tümörü oluşumu için risk faktörleri olduğu bilinmektedir. Hayvanların cinsiyet hormonlarına mümkün olan minimal maruziyeti meme kanseri riskini önemli derecede düşürür (Meuten, 2017).

Dişil cinsiyet hormonlarının meme tümörü tümörigenezindeki rolü tam olarak bilinmemektedir (Withrow vd., 2013). Memeli türleri arasında dişil hormonlar meme bezi dokusunun gelişimi için gereklidir ve bu hormonlar mitojen gibi davranarak duktal epitelyumun proliferasyonunu etkiler (Russo ve Russo, 2006; Okoh vd., 2011). Diğer türlerde yapılan çalışmalarda östrojen ve östrojen metabolitlerinin meme dokusunun üzerine direkt genotoksik etkili olduğu ve progesteronun, meme tümörigenezinde rol oynayan büyüme hormonu ve büyüme hormonu reseptörlerinin meme bezi üretimini arttırdığı gösterilmiştir (Russo ve Russo, 2006). Muhtemelen her iki hormona maruziyet ve büyüme faktörleri yolağı kedi meme tümörlerinin gelişiminde de rol oynar (Little, 2016).

1.9.1.Kedi Meme Tümörlerinde Steroid Hormon Reseptörleri

Steroid hormonların kedi meme tümörlerindeki yeri hakkındaki bilgiler hala sınırlıdır. ER ve PR reseptörleri normal, displastik ve neoplastik luminal epitelyal hücreler, suprabazal ya da epitelyal ve stroma hücrelerinin çekirdeğinde yer alırken, miyoepitelyal hücrelerin boyanması negatif ya da şüphelidir. Bazı preinvaziv epitelyal lezyonlarda (Burrai vd., 2010) ER ya da PR immun reaktivitesi belirlenmemiş olmasına rağmen displastik ve benign lezyonlarda hem ER hem de PR (de las Mulas vd., 2000) aktivitesi mevcuttur.

Çalışmalar köpek ve insan meme kanserlerinin aksine kedilerde hormon reseptörü ekspresyonunun daha az olduğunu göstermiştir (Goldschmidt vd., 2017). İnsan meme kanserlerinde östrojen ve progesteron reseptörleri, vakaların %70-80'in de pozitif olarak bildirilirken, kedilerde ise bu oran ER için %7-22, PR için ise %33'tür (de las Mulas vd., 2000; Goldschmidt vd., 2017). İnvaziv kedi meme karsinomlarında bu hormon reseptörlerinin diğer histolojik parametreler ya da genel sağ kalım ile paralel olmadığı belirlenmiştir. Bu hormonların ekspresyonu kedi meme tümörlerinde belirgin bir prognostik değer taşımaz (Hughes ve Dobson, 2012).

Kedilerdeki fibroadenomatöz değişikliklerin tamamının PR aktivitesi yüksekken, sadece yarısının ER aktivitesi belirlenmiştir (de las Mulas vd., 2000). Birçok karsinom ER negatifken, ER aktivitesi varsa düşük derece karsinom olarak düşünülür. Birçok karsinom PR pozitifdir fakat PR aktivitesi lenfatik invazyon ile ilişkili değildir (Millanta vd., 2005).

1.9.2.İnsülin ve Büyüme Hormonu (IGF)

IGF ailesi birçok hormonal aktivite ile ilişkili proteinleri içerir. Kedi ve köpeklerde progesterinler meme bezinde büyüme hormonu (GH)'nin lokal üretimini stimüle eder. Memede üretilen GH/IGF'nin tümörigenezis ve malignitede rolü vardır. Bu durum diğer hormonlar ve faktörlerle ilişkilidir (van Garderen vd., 1999).

1.9.3.Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve Reseptörleri

EGF ailesi proteinleri normal ve neoplastik proliferasyonu etkileyebilir. Bunu bağımsız olarak ya da steroid ve peptid hormonlarla ilişki içinde de yapabilir. Böylece meme bezi büyümesini regüle ederler. Progesteron EGF'in etkilediği büyümeyi artırabilir (Modiano vd., 1991) ve köpek meme tümörlerinde EGF ile progesteron, östradiol ve androjenler arasında kuvvetli bir korelasyon vardır. İnsanlardaki meme kanserinde EGF reseptörlerinin aşırı ekspresyonu zayıf prognoz ile ilişkilidir. EGF reseptör ailesi 4 sıkı ilişkili tirozin kinaz reseptör içerir (EGFR ya da HER1 ya da c-erbB1, HER2 ya da HER2/neu ya da c-erbB2, HER3 ya da cerbB3 ve HER4 ya da c-erbB4) (Queiroga vd., 2009).

Epidermal büyüme faktör reseptörlerinin IHC ekspresyonu benign meme tümörlerinden malign olanlara ve tümör büyüklüğüne göre artar (Gama vd., 2009).

1.9.4.İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör 2 (HER2)

İnsan meme tümörlerinin yaklaşık olarak %25-30'unda HER2 aşırı üretilir ve bu üretim metastaz gelişimi ve zayıf prognoz ile ilişkilidir. HER2 üretimi kedi ve köpek meme tümörlerinde tam olarak anlaşılamamıştır (Zappulli vd., 2015; Meuten, 2017).

Kedi tümörleri ER ve PR zayıf olduğu için karşılaştırmalı çalışmalar, hormon negatif olan insan meme kanserlerinin alt tiplerine odaklanmıştır. Hormon negatif insan tümörleri genellikle HER2 yönünden de negatiftir. Bu tümörler oldukça agresif karakterlidir ve triple negatif meme kanseri (TNBC) olarak bilinirler. Hormon reseptör değerlendirmesine ek olarak karşılaştırmalı çalışmalar kedi meme tümörlerinde HER2 ekspresyonunu da değerlendirmiş ve sonuçların oldukça değişken olduğunu ve insandaki gibi kedi meme tümörlerinin karsinogenezisi ve prognozunda önemli rol oynamadığını göstermiştir (Rasotto vd., 2011). Yapılan bir çalışma değerlendirilen kedi meme karsinomlarının %58'inin insanlardaki TNBC ile benzer olduğunu göstermiştir (Wiese vd., 2013).

HER2 kedi meme tümörlerinde IHC ile belirlenmiş fakat sonuçlar birbirinden çok farklı bulunduğu için düzgün yorumlanamamıştır (Pena vd., 2014).

Son yapılan çalışmalar ise HER2'nin prognostik değerinin düşük olduğunu göstermiştir (Hughes ve Dobson, 2012).

1.9.5.Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörleri (VEGF)

Veteriner onkolojide meme tümörünün biyolojik karakteri ile anjiogenezisin korelasyonu tam olarak bilinmemektedir. Fakat mikrodamar dansite değerinin (MVD) malign tümörlerde benign olanlara göre önemli oranda arttığı bildirilmiştir ve bu değer anaplastik histolojik tiplerde daha da artmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar malign meme karsinomlarında artmış VEGF oranı ile MVD parametresi arasında pozitif bir korelasyon belirlemiştir (Restucci vd., 2002). Kedi meme karsinomları ve artmış VEGF, tümör anaplazisi ve daha kısa sağ kalımla ilişkilidir. Kırk sekiz meme karsinomlu kedi üzerinde yapılan bir çalışmada tümör derecesi ve sağ kalım ile VEGF arasında belirgin bir korelasyon görülmüştür (Millanta vd., 2006).

VEGF'in aşırı salınması kedi ve köpeklerdeki malign tümörlerde görülmüştür. Meme karsinomlu kediler üzerinde yapılan bir çalışmada HER2 pozitif ve TN Normal benzeri meme karsinomlu kedilerde VEGF-A'nın tümörlü dokularda tümörlü olmayanlara göre önemli ölçüde yüksek olduğu görülmüştür (Nascimento vd., 2021).

1.9.6.Siklooksijenaz (COX) 2

Siklooksijenaz (COX) enzimleri (COX-1 ve COX-2) arahidonik asitten prostoglandin formasyonunu katalize eder (Sayasith vd., 2009). COX-1 temel olarak bütün dokularda bulunurken COX-2 birçok kanserin oluşumuna dahil olmaktadır (Millanta vd., 2014). COX-2 tümörjenik sürecin farklı basamaklarında bulunabilmektedir (Williams vd., 1999; Sayasith vd., 2009). Bunlara metastaz ve invazyon, tümör proliferasyonu, apoptozis inhibisyonu ve tümör anjiogenezisi örnek verilebilir. Kedi meme tümörlerinde COX-2'nin etkisiyle ilgili bilgiler sınırlıdır. Kedilerdeki meme karsinomlarında arttığı ve aşırı salınımının ER- negatif, artmış PR ve VEGF ile ilişkili olduğu (Sayasith vd., 2009) ve salınımının hem kedi hem de köpeklerde daha kısa sağ kalımı gösterdiği (Lavalle vd., 2009; Sayasith vd., 2009) bilinmektedir. Yine yapılan bir çalışmada malign kedi meme tümörlerinde ekspresyonu yüksek bulunmuştur (Millanta vd., 2014).

Altmış üç malignant meme tümörlü köpek ile yapılan ve CD3 T lenfositler ve COX-2 arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada CD3 T lenfosit ve COX-2 ekspresyonunun agresif tümörlerde daha fazla ve bu iki parametrenin pozitif korelasyonu olduğu belirlenmiştir (Carvalho vd., 2015).

Köpek meme tümörleri üzerinde yapılan bir çalışma, hem benign hem de malign tümörlerde indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS), COX-2 ve VEGF seviyelerinin yüksek olduğunu göstermiştir (Anadol vd., 2017).

Yüksek COX-2 seviyesi kısa sağ kalım süresi ile ilişkilidir. Fakat değişik tümör tipleri olan kediler üzerinde yapılan bir çalışmada, 9 meme tümörlü kedinin hiçbiri COX-2 pozitifliği vermemiştir (Beam vd., 2003). Meme karsinomalı 40 kedi üzerinde yapılan bir çalışmada ise vakaların %87'sinin COX-2 eksprese ettiğini göstermiştir (Sayasith vd., 2009).

1.10.Kedi Meme Tümörlerinin Moleküler Sınıflandırılması

Kedi meme tümörlerinin moleküler alt tiplendirmesini yapmak için IHC panelleri kullanılmaktadır. Bu paneller 5 fenotipi kimliklendirmek için birçok molekül belirteci içerir. Bu fenotipler; luminal A, luminal B, bazal-benzeri tip (triple negatif), HER2 aşırı salınımı ve normal fenotiptir. Kedilerde IHC kullanılarak primer meme karsinomlarının sadece 3 tipi ve bunlarla ilişkili lenf nodu metastazları belirlenmiştir. Bunlar; luminal B, HER2-aşırı salınımı ve bazal-benzeridir (Brunetti vd., 2013).

Meme tümörlerinin histolojik derecelendirmesi çok önemlidir. İnsanlarda en çok Elston ve Ellis metodu kullanılmaktadır. Bu metod veteriner sahaya da uyarlanmıştır. Tübül formasyonu, çekirdek pleomorfizmi ve mitotik indekse göre tümörler derecelendirilir (Meuten, 2017). Fakat bu derecelendirme sistemi derece 1 ve 3 tümörler için iyi olduğu bilinirken, derece 2 tümörler için çok uygun değildir (Dagher vd., 2019). Son zamanlarda klasik EE derecelendirme sistemi güncellenerek yeni bir sistem geliştirilmiştir. Bu sistemde lenfovasküler invazyon, çekirdek formu ve mitotik indeks değerlendirilmektedir (Mills vd., 2015).

1.11.Kedi Meme Tümörlerinin Sınıflandırılması

Kedi meme tümörleri Dünya Sağlık Örgütünün diagnostik kriterleri temel alınarak histolojik olarak sınıflandırılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü 1999 yılında kedi meme tümörlerinin histolojik sınıflandırmasını revize etmiştir. Bunların birçoğunda da köpeklerdeki meme tümörleri temel alınmıştır. Fakat kedilerdeki meme tümörleri köpeklerdekilere göre daha homojendir. Bu yüzden de daha az alt tip vardır. Kedi meme tümörleri 3 ana grupta toplanmıştır. Bunlar; meme hiperplazi/displazileri, benign tümörler, malign tümörlerdir (Meuten, 2017).

1.11.1.Hiperplazi ve Displazi

Kedi meme bezindeki değişiklikler köpeklerdekilere çok benzerdir. Ek olarak kanal papillomatozisi ve fibroadenomatöz değişiklikleri içerir.

Kanal ektazisi

Lobuler hiperplazi (Adenozis)

Düzenli

Sekretorik aktivitesi olan

Fibrozisli

Atipik

Epiteliozis

Kanal papillomatozisi

Bu değişiklikler kedilerde çok yaygın olarak görülür ve genellikle buna kanal ektazisi ve lobuler hiperplazi eşlik eder. Papillomatozis çiçek şeklinde olabilir. Etkilenmiş interlobuler kanal memenin komşu dokusundaki neoplastik lezyonda olabilir.

Fibroadenomatöz değişiklikler

Genellikle kedi meme hipertrofisi ve fibroepiteliyel hipotrofi olarak adlandırılan bu durum klinik olarak memenin fibroadenomatöz hiperplazisi olarak tanımlanır. Genellikle siklus gösteren genç dişilerde karşılaşılır fakat gebelik sırasında da görülebilir. Dişi ve erkek kedilerde bu lezyonlar hormon tedavisi (örneğin; megestrol asetat, medroksiprogesteron asetat) ile de ilişkilidir. Özellikle progesteron olmak üzere hormonların lezyon gelişimi üzerindeki rolü, hormon stimülasyonunun sonlandırılması ya da OHE'yi takiben lezyonların regrese olmasından dolayı iyi anlaşılmıştır (Hayden vd., 1989; Loretti vd., 2005).

Jinekomasti

1.11.2.Benign Neoplazmalar

Kedilerde benign meme neoplazmaları çok nadir görülmektedir.

İntraduktal papillar adenoma (Duktal papilloma)

Kedilerde çok nadir görülen bu alttıpte (Zappulli vd., 2013) neoplazma multinodular tiptedir. Minimal düzeyde anizozitoz ve anizokaryozis görülürken mitoz nadiren rastlanır (Meuten, 2017).

Duktal adenoma

Önceki sınıflandırma sistemlerinde kompleks adenoma (Misdrop vd., 1999) olarak sınıflandırılan bu kitleler tek ya da multinodüler, iyi sınırlanmış kitlelerdir. Ektatik kanaldan köken alırlar. Fibröz stromadan çok az destek alır.

Fibroadenoma

1.11.3.Malignat Epitelyal Neoplazmalar

Karsinomalar vakaların yaklaşık olarak %80-90'nı oluşturarak en sık görülen kedi meme tümörü tipleridir. Biyolojik olarak yüksek oranda agresiflik gösterirler ve prognozları zayıftır (Seixas vd., 2007).

Karsinoma- in situ

Karsinoma

Tubuler

Tubulopapillar

Kistik-Papillar

Kribriform

Mikropapillar İnvaziv Karsinoma (IMC)

Hem dişi hem de erkek kedilerde bildirilmiş bir tümör tipidir (Seixas vd., 2007). IMC'ler stromasız ya da küçük kümeler yapmış küçük papillar yapılar içeren tümörler olarak tanımlanır. Histopatolojik yapısı kendine hasdır (Cassali vd., 2002).

Solid Karsinom

Komedokarsinom

Hızlı büyüyen malignant kedi meme tümörlerinde yeterli kan akımı sağlanamadığından geniş nekroz alanları görülebilmektedir. Neoplastik doku küçük, multiple, iyi tanımlanmış nekroz alanları içerdiği zaman komedokarsinom olarak adlandırılır. Nekrotik alan neoplastik hücre nodülünün merkezinde yer alır. Nekrotik materyal değişken şekilde eozinofiliktir ve genellikle piknotik debris, makrofaj ve az miktarda diğer yangı hücreleri ile ilişkilidir. Nötrofil infiltrasyon odağı komedokarsinom teşhisi

ile uyumlu değildir fakat neoplastik süreçte akut ya da subakut/kronik mastitis indikatörü olabilir.

Anaplastik Karsinoma

Kedilerde çok nadir olarak görülen bu meme tümörü çeşidi köpeklerde de sık görülmemekle birlikte en agresif meme tümörü tipidir. Kedilerde sadece 2 kez bildirilmiştir (Della vd., 1993; Soares vd., 2021).

İntraduktal Papillar Karsinoma

Kedilerde çok nadir olarak görülür. İntraduktal papillar adenoma (kanal papilloması)'nın malignant varyantıdır. Adenom ile kıyaslandığında daha düzensiz bir papillar desen izlenmektedir. Çekirdek ve hücre pleomorfizmi ve mitoz artmıştır (Zappulli vd., 2013).

Duktal Karsinoma

Feline kompleks karsinoma olarak da adlandırılan bu tümör tipi duktal adenomun malignant olanıdır (Sexias vd., 2008). Neoplastik hücreler kordonlar, tubuller ve daha solid yarık benzeri lumina ile birleşmiştir. Adenomlara göre bazal hücre sayısı, mitoz artmıştır. Orta derecede kollajenöz matrikse gömülüdürler ve hücresel atipi vardır. Skuamöz farklılaşma ve keratinizasyonun olduğu fokal ya da multifokal alanlar olabilir. Prognozu zayıf bir tümör tipidir.

1.11.4.Malignant Epiteliyal Neoplazmalar (Özel tipler)

Skuamöz Hücreli Karsinom

Adenoskuamöz Karsinoma

Bu tümör, herhangi bir tipte karsinom ve skuamöz farklılaşma alanları olan, multifokal skuamöz alanların karsinom içinde serpiştirilmiş gibi bulunan bir tiptir.

Müsinöz Karsinoma

Bu nadir görülen tümör tipinin en önemli özelliği histopatolojisindeki neoplastik epitel hücrelerini çevreleyen fazla miktarda mukoid matrikstir (Sarli vd., 2006).

Lipid Zengin Karsinoma

İğsi Hücreli Karsinom

Skvamöz Hücreli Karsinom – iğsi hücre varyantı

Karsinom – iğsi hücre varyantı

Yangısal Karsinom

1.11.5.Malignant Mezenşimal Neoplazmalar

Kedilerde nadir olarak görülürler ve subkutisten köken aldıkları için meme tümörü olarak sınıflandırılmamalıdır.

Fibrosarkom

Diğer sarkomlar

1.12.Prognostik Faktörler

Prognostik belirteçler, hastanın ya da hastalığın klinik, patolojik ya da moleküler karakteristikleri ile ilgili, klinik sonucu etkileyen durumlardır (Webster vd., 2011). Kedi meme tümörlerinde hastanın klinik durumunu etkileyen birçok epidemiyolojik, klinik ve histolojik prognostik faktör bulunmuştur (Hughes ve Dobson, 2012). “Veteriner onkolojisinde prognostik çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi için önerilen kılavuzlar” da metastaz, nüks, hastalısız sağ kalım ve genel sağ kalım prognostik çalışmalar için altın standart noktaları olarak belirlenmiştir (Webster vd., 2011).

1.12.1.Epidemiyolojik Prognostik Faktörler

Yaş: Yaşlı kedilerde prognoz zayıftır. Hastalığın görüldüğü ortalama yaş 10-12 olarak bildirilmiştir. On dört yaşından sonra risk artmaktadır. Yaşın erkek kediler için önemli bir prognostik belirteç olmadığı bilinmektedir (Zappulli vd., 2015).

İrk: Siyam ırkı kediler hastalığa daha yatkındır (Goldschmidt vd., 2017). Bu ırkta hastalık diğerlerine göre daha erken yaşta (ortalama 9) görülebilmektedir (Zappulli vd., 2015). Uzun tüylü kedi ırkları diğerleriyle karşılaştırıldığında genel sağ kalımları daha kısadır (Goldschmidt vd., 2017). Erkek kedilerde ırk predispozisyonu bildirilmemiştir (Zappulli vd., 2015).

Reproduktif durum ve cinsiyet: Kısırlaştırma hastalığa yakalanma riskini düşürse bile, hastalığa yakalanmış kısır ve kısır olamayan kediler arasında hayatta kalma süresi

ve hastalığın klinik karakteri ile ilgili fark yoktur (Zappulli vd., 2015). Dişi kedilerin hastalığa yakalanma riski erkeklere göre daha fazla olsa bile hastalığın seyri ve prognozunun her iki cinsiyette de benzer olduğu görülmüştür (Goldschmidt vd., 2017).

1.12.2.Klinik ile İlgili Prognostik Faktörler

Prognoz kediden kediye değişmekle birlikte ölüm, lokal hastalığın sekonder gelişimi ya da vital organlara şekillenen metastazdan dolayı gerçekleşir. Tümörün diagnozu ile ölüme kadar ortalama 10-12 ay geçmektedir (Lana vd., 2007).

Klinik evreleme: Kedi meme tümörlerinde klinik evreleme sistemi TNM sisteminden köken almaktadır. Evreleme çok önemli bir prognostik indikatördür. Genel sağ kalım evreler arasında, I ve II (12–29 ay), III (6–9 ay) ve IV (1 ay) olarak belirlenmiştir (Zappulli vd., 2015; Goldschmidt vd., 2017).

Tümör büyüklüğü: En önemli prognostik faktörlerden biridir. Hem hastalıksız görülmediği süreyi hem de genel sağ kalım süresini etkiler (MacEwen vd., 1984; Cassali vd., 2020). Tümör büyüklüğü negatif prognostik değerdir. İki santimetreden küçük tümörlerde operasyondan sonra ortalama hayatta kalma süresi 54 ay, 3 santimetreden küçüklerde operasyon sonrası hayatta kalma süresi ortalama 9 ay, 3 santimetreden büyükler için ise ortalama 5 ay olarak verilmektedir (MacEwen vd., 1984). Meme adenokarsinomlu kedilerle yapılan bir çalışmada tümör büyüklüğü prognostik indikatör olarak değerlendirilmiş ve tümör büyüklüğü 3 cm'den fazla olan kedilerin sağ kalım süresinin 4-12 ay olduğu, 3 cm'den küçük olanların 54 aya kadar uzayabildiği bulunmuştur (Viste vd., 2002). Başka bir çalışmada 2 cm'den küçük tümörlerin ortalama sağ kalım süresi 12 ay, 2-3 cm olanların 6-8 ay ve 3 cm'den büyük olanların ise 4 ay olduğu bildirilmiştir (Cassali vd., 2020).

Lenf nodları ve bölgesel metastaz: Lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı kötü prognoza işaret eder (Goldschmidt vd., 2017). Lenf nodu metastazının sağ kalımı düşürdüğü belirlenmiştir (Cassali vd., 2020).

Klinik ilişkili diğer prognostik faktörler: Cerrahi yaklaşım tipi; total ya da parsiyal mastektomi prognozu etkilemektedir (Goldschmidt vd., 2017). Metastatik olmayan meme tümörlerinde radikal mastektomi hastalıksız sağ kalımı arttırdığı bilinirken

(Zappulli vd., 2015), meme karsinomlu 53 dişi, 27 erkek kedi ile yapılan bir çalışmada cerrahi yaklaşımın genel sağ kalımı etkilemediği belirlenmiştir.

1.12.3.Histolojik Prognostik Faktörler

Malignant tümör tipi: Anaplastik karsinoma en kötü prognoza sahip tiptir. Solid karsinomlar tubuler adenokarsinomlarla kıyaslandığında daha kötü prognoza sahiptir (Shofer vd., 1989; Philibert vd., 2003). Periferal dokunun neoplastik infiltrasyonu ve artmış mikrovasküler yoğunluk da kötü prognozun habercisidir (Milanta vd., 2006; Lavallo vd., 2009).

Derecelendirme: Üçüncü derece tümörlerin prognozu diğerlerine göre daha kötüdür (Goldschmidt vd., 2017).

Yapılan bir çalışma iyi diferansiye meme karsinomlarında operasyondan sonraki 1 yılda ölüm oranının %0, zayıf diferansiye olanlarda ise %100 olduğunu göstermiştir (Castagnaro vd., 1998). Başka bir çalışmada hem tümör derecelendirmesi hem de hastalısız aralık ve sağ kalım süresi arasında değerlendirme yapılmış ve bu çalışmada 1 yıllık süreçte tümör ilişkili ölümlerin derece 1’de %0, derece 2’de %30 ve derece 3’te %90 olduğu görülmüştür. Bir yılda progresyonsuz sağ kalım oranı derece 1 tümörlerde %100, derece 2 olanlarda %50 ve derece 3 tümörlerde %6 olarak belirlenmiştir. Derece 3 tümörlü kedilerde ortalama sağ kalım 6 ayken bu süre derece 1 tümörlüler için 36 aydır. Derecelendirme hastanın yaşı ve tümör büyüklüğü ile kuvvetli bir ilişki içindedir (Seixas vd., 2011). Lenfatik invazyon, damar invazyonu ve mitotik indeks de sağ kalım ile ilişkilidir (Castagnaro vd., 1998; Seixas vd., 2011).

Diğer morfolojik parametreler: Prognostik indikatör olarak düşünülen diğer histopatolojik özellikler; nekroz, infiltratif büyüme, tümör çevresinde kronik yangı, tamamlanmamış cerrahi sınırlar ve çevreleyen deri dokusundaki yangı olarak sıralanabilir (Goldschmidt vd., 2017).

1.12.4.İmmunohistokimyasal Prognostik Faktörler

Östrojen ve progesteron reseptörleri: İnsanlardakinin aksine ER ve PR reseptörlerinin kedi meme tümörlerinde rutin olarak kullanılan prognostik bir değeri yoktur. Aynı zamanda normalde meme tümörlü hayvanlara hormon tedavisi yapılmamaktadır. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalar bu hormon reseptörlerinin

prognostik olarak kullanılabilirliklerini ve birçok kedi meme tümörünün ER negatif, PR pozitif olduğunu göstermiştir (Hamilton ve Else, 1976; Johnston vd., 1984).

Otuz dört meme tümörlü kedi ile yapılan bir çalışmada ise kedilerin yarısının ER pozitif olduğu belirlenmiştir (de las Mulas vd., 2002).

Östrojen reseptör pozitif kedi meme tümörlerinin prognozu negatif olanlara göre daha yüksektir. Fakat progesteron ile hayatta kalma süresi arasında korelasyon bulunmamıştır (Goldschmidt vd., 2017).

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2): İnsanlarda yüksek HER2 seviyeleri düşük prognozu gösterir. Kedilerdeki analogunun benign kitlelerde yükseldiği ve karsinomalarda seviyesinin ileri olduğu belirlenmiştir (Ordas vd., 2007). İnsanlardakine benzer şekilde, yapılan bazı çalışmalarda yüksek HER2 seviyelerinin kedilerde de düşük hayatta kalma ile ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. Bu parametre ve kedilerde meme tümör arasında ilişkiye yönelik çalışmalar yapılmış fakat prognoz ile net bir şekilde ilişkilendirilememiştir (Goldschmidt vd., 2017).

Proliferasyon belirteçleri: Ki67 sadece bölünen ve büyüyen dokularda olduğu bilinen bir proteindir. G0 (dinlenme) fazı hariç tüm hücre döngüsü aşamalarında eksprese edilir. İnsan meme kanserinde proliferasyonun iyi bir belirteci olduğu bilinmektedir. Yüksek Ki67 seviyeleri düşük prognozu göstermektedir (Soares vd., 2016). Veteriner hekimlikte de Ki67 proliferasyon belirteci olarak kullanılmaktadır fakat düşük sağ kalımla ilişkisi tam olarak bilinmemektedir (Preziosi vd., 2002). Yapılan bir çalışmada Ki67'nin kedi meme tümörlerinde prognostik değer olarak da kullanılabilirliği gösterilmiştir. Yüksek değerler düşük sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (Soares vd., 2016). Başka bir çalışmada karsinomlarda benign lezyonlara göre belirgin artış görülmüştür (Zappulli vd., 2015).

Siklooksijenaz (COX-2)

Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF): VEGF (>72% VEGF+ neoplastik hücreler) direkt olarak 2 yıldan kısa hayatta kalma süresi ile ilişkilendirilmiştir.

Siklin A: Hücre siklusunu regüle eden genlerden biridir. Kedilerde meme tümörlerinde tümörigenezis ile ilişkisi olabileceği bildirilmiştir (Gimenez vd., 2010).

Protein P53: Tümör süpresör olarak hücre siklusunda görev yapan bir proteindir. İnsanlardaki kanserlerin nerdeyse yarısında bu genin mutasyonu söz konusudur. Aktivitesinin kedi meme adenomlarında adenokarsinomalara göre daha düşük olduğu görülmüştür (Horvath vd., 2007).

Makrofaj stimule eden protein reseptörü (RON): İnsan meme kanserlerinde miktarı artmaktadır. Aynı şekilde kedi meme karsinomlarında da artmış olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (de Maria vd., 2002).

Nötrofil-lenfosit oranı: Bu oran insanlardaki birçok tümörde prognostik indikatör olarak kullanılmaktadır. Meme tümörlü 34 kedide yapılan bir çalışmada da operasyondan önce periferal kandan ölçüm yapılmış ve bu oranın yüksek olduğu, bu hayvanların tümör büyüklüğünün de fazla olduğu ve kısa sağ kalımla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Naito vd., 2021).

1.13. Tümör ve Tümör Mikro Çevresi

Kanser, DNA'daki değişimler sonucunda ortaya çıkan bir genom hastalığıdır ve bu değişimlerin gen yapısı ya da fonksiyonunu bozduğu bilinmektedir (Meuten, 2017). Kanser hücreleri apoptozdan kaçabilen, kontrolsüz çoğalabilme yeteneğine sahip hücrelerdir ve adım adım ilerleyen karmaşık bir yapının parçasıdırlar (Thakkar vd., 2020). İnsanlarda yapılan çalışmalar sigara dumanı, UV ışını, kronik doku hasarları ve bazı viral enfeksiyonlar gibi tekrarlayan maruziyetlerin genetik ve epigenetik değişimlerden sorumlu olduğunu ve eninde sonunda kanserin başlaması, ilerlemesi ve metastazlara sebebiyet verdiğini göstermiştir (Sounni ve Nobel, 2013). Güncel kanser istatistikleri kanser vakalarının dünya çapında artış gösterdiği, insan ve hayvanlar arasında başlıca ölüm sebeplerinden biri olduğunu göstermektedir (Roy ve Li, 2016).

Tümör mikro çevresi (TMC), tümör ve kanser kök hücrelerini içeren hücresel çevreye verilen addır ve aynı zamanda tümör davranışını sadece tümör hücrelerinin genetiği ile değil, tümörü çevreleyen ortamı da içererek açıklayan ve gelişmekte olan bir kavramdır (Weber ve Kuo, 2012). TMC sadece primer tümör kitlesini çevreleyen ortamı değil aynı zamanda metastatik hedef noktasını da içerir. TMC tümörigeneziste ve özellikle de tümör gelişiminde çok önemli bir faktördür ve kanser patogenezi mikro çevredeki bileşenler ile olan interaksiyona çok sıkı bir şekilde bağlıdır (Witz, 2009). Tümör

hücresi ve mikro çevre bağlantısı tümör hücreleri ve intersitisyel stromal bileşenler arasında sinyal köprüsü gibi çalışır (Mizejewski, 2019). Bu sinyalizasyon aktiviteleri; tümörün beslenmesi ve tümöre besin temini, büyümesi, hayatta kalması, anjiogenezis, hücre adezyonu, migrasyon ve metastazı içerir (Weber ve Kuo, 2012; Mizejewski, 2019). Tümör mikro çevresi kanser hücreleri, stromal doku (immün hücreler, fibroblast, miyofibroblast, sitokinler ve damarsal doku) ve tümörü çevreleyen ekstraselüler matriks (ECM)'i içeren dinamik bir kavramdır (Witz ve Levy, 2006; Lorusso ve Rüegg, 2008; Spill vd., 2016; Del Prete vd., 2017). Bu yapı Paget'in 1880'lerde ortaya attığı "Tohum ve Toprak Hipotezi"ne dayanır. Bu hipotez sadece kanser hücrelerine (tohum) değil aynı zamanda onlara besin ve oksijen sağlayan, büyüme ve gelişme için sinyal oluşturan yapılara (toprak) odaklanmaktadır (Witz, 2009). Tümör hücreleri kanser gelişiminden tek başlarına sorumlu değildir. Stromal hücreler tümör gelişimine aktif katılımcılardır. Tümör gelişimi için 6 nitelik belirtilmiştir ve bunlar da tümör mikro çevresi ile ilişkilidir. Bunlar; devam eden proliferasyon sinyalleri, hücre ölüm yolaklarından kaçış, anjiogenezis, büyüme supresörlerinden kaçınma, metastazın aktivasyonu ve replikatif ölümsüzlüktür (Thakkar vd., 2020).

Yapılan çalışmalar, kanser hücrelerini çevreleyen ortamın oksijenden yetersiz, düşük besin ve glikoz seviyelerine sahip olduğunu göstermiştir ve aynı zamanda bu çevrenin pH'sı genellikle düşüktür (Cuvier vd., 1997; Witz ve Levy, 2006). Bu asidik ekstraselüler pH metastaza yatkınlığı ve kanser hücrelerinin çeşitli anti kanser ilaçlara direncini arttırdığı bilinmektedir (Bailey vd., 2012). Başlangıçta, hızlı gelişmekte olan bu hücrelerin, bu zor koşullarda hayatta kalabilmesi ve gelişmesi çok zor gibi görülmektedir. Fakat çalışmalar kanser hücrelerinin bu koşullara adapte olduklarını ve hatta bu zor koşulları kendi yararlarına (örneğin aerobik metabolizmayı anaerobik metabolizmaya çevirerek) kullanabildiklerini göstermiştir (Weber ve Kuo, 2012). Aerobik metabolizmanın anaerobik metabolizmaya dönüşümünü sağlayan gen transkripsiyonundan hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF)-1 α isimli, hipoksik koşullarda aktive edilen bir transkripsiyon faktörü sorumludur (Goonewardene vd., 2002; Brahimi-Horn vd., 2011). HIF-1 α 'nın hedefinde olan 70'ten fazla gen vardır ve bunların hepsi hipoksik koşullarda tümör proliferasyonunu teşvik eder (Weber ve Kuo, 2012). VEGF, eritropoietin ve NOS, HIF-1 tarafından aktive edilir. Böylece HIF-1 anjiogenezise de katılmış olur (Hanahan ve Folkman, 1996; Ruan vd., 2009; Finger ve

Giaccia, 2010). Bu faktörlere ek olarak HIF-1, trombospondin gibi anjiogenik inhibitörlerin aktivitesini azaltmak için de çalışarak pro-anjiogenik ortam oluşturmaktadır (Keith vd., 2000). Aynı zamanda HIF-1'in hipoksik koşullarda besini korumak amacıyla otofajiyi indüklediği bilinmektedir (Brahimi-Horn vd., 2011). İnvaziv meme kanserlerinde yapılan çalışmalar, bu kanserlerin hipoksik belirteçlere % 25-40 oranında pozitiflik verdiklerini göstermiştir. Özellikle de östrojen reseptör 1 (ER1) ekspresyonunun hipoksik koşullar altında bastırıldığı belirlenmiştir. Östrojen reseptörlerinin kaybı meme kanserini daha agresif karakterli yapmaktadır (Weber ve Kuo, 2012). Aynı şekilde insan meme kanserlerinde Caveolin-1'in tükenmesi de tümör mikro çevresinde HIF-1 α 'yı aktive ederek laktattan zengin bir çevre oluşturur. HIF-1 α fonksiyonunun tümör mikro çevresindeki lokasyonuna bağlı olduğu yaygın olarak kabul edilmiş bir görüştür. Kanser ilişkili fibroblastlar üzerinde tümörü destekleyen etkisi varken kanser hücreleri üzerinde ise tümör supresör olarak davranır. Meme kanseri hücreleri tarafından oluşturulan oksidatif stres, HIF-1 α ve nükleer faktör kappa β 'yı (NF-K β) fibroblastlarda aktive eder ve otofajiye öncülük yapar (Drutel vd., 2013). Lenf nodu metastazı olmayan meme kanserli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, HIF-1 α 'nın yüksek olduğu durumlarda sağ kalımın aynı oranda düşük olduğu gösterilmiştir (Bos vd., 2003). Yine veteriner onkolojide yapılan çalışmalar meme tümörlü kedilerde VEGF'nin prognostik bir faktör olduğunu, HIF-1 α 'nın tümör hücre çekirdeğinde fonksiyonel aktivitesi bulunduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada yüksek HIF-1 α seviyelerinin genel sağ kalımı düşürdüğünü belirlenmiştir (Chen vd., 2020).

Mikro çevrenin çeşitli özellikleri, kanser hücrelerinde genetik ve epigenetik kararsızlığı indüklemektedir. Bunlardan birisi mikro çevrenin hipoksi ve yeniden oksijenlenme periyodu ile karakterize oksijen tansiyonudur. Bu hipoksi ve yeniden oksijenlenme silsilesine reaktif oksijen türlerinin formasyonu öncülük eder. Hipoksik koşullarda aynı zamanda DNA'nın hasara karşı onarım mekanizmaları da düzgün çalışmaz (Bindra ve Glazer, 2005). Tüm bu değişimlerin sonunda çok daha agresif tipte tümörler oluşur (Weber ve Kuo, 2012).

Mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) çoklu sinyal yollarını stimüle edebilmektedir. Bunlardan en önemlisi de hipoksik koşullar altında HIF-1 α 'nın stabilizasyonudur (Wang vd., 1995; Chandel vd., 2000). Bunun sonucunda da daha

önceden de belirtildiği gibi VEGF ekspresyonu ve sonrasında endotelial hücre proliferasyonu aktive olur (Ferrara, 2009).

1.13.1.Stroma

Stroma TMC'nin bağ ve destek dokusudur. Fibroblast, miyofibroblast, vasküler ve lenfovasküler endotelial hücreler ve makrofajlar gibi bağışıklık sistemi hücrelerini içerir. Son yapılan çalışmalar, stromal dokunun kanser gelişimi ve ilerlemesinde aktif bir rolü olduğunu göstermiştir. Kanser hücreleri ve stroma arasında çift yönlü ve dinamik bir etkileşim vardır (Liotta ve Kohn, 2001). Meme tümörünün atipik hiperplaziden invaziv karsinomaya dönüşümü tümör stromasındaki progresif değişimlere bağlıdır. Bazal membran kaybolur ve ekstraselüler matriks fibrotik yapı haline gelir. Epitelial yapılar bozulur ve tümör hücreleri çevre dokulara doğru invaze olur (Radisky ve Radisky, 2007).

Normal yangısal ve yara iyileşme cevabı aynı zamanda tümör gelişim ve oluşumunu da içerir. Tümör stroması kronik yangı ile ilişkilidir. Bu değişiklikler uykudaki tümörü aktif ve proliferatif yapabilir (Radisky ve Radisky, 2007).

Meme bezi gelişimini sağlayan birçok stromal-epitelial interaksiyon meme kanseri gelişimini de kolaylaştırır. Meme dokusunun dallanma mekanizması invaziv meme kanseri gelişiminde de benzerdir. Örneğin primer matriks metalloproteinaz (MMP3) yan dalların oluştuğu alanlarda eksprese olur. Meme bezindeki fazla ekspresyonu epitelial hiperplazi, anormal dallanma ve sonunda da neoplazi ile sonuçlanır. Benzer şekilde birçok epitelial-stromal sinyal yolağı da tümör gelişimini kolaylaştırır (Radisky ve Radisky, 2007).

Özellikle fibroblastlar olmak üzere stromal hücreler, tümörün daha agresif olmasına sebep olan parakrin ya da otokrin gibi davranan faktörler üretirler. Tümör hücreleri ile bu şekilde sıkı ilişkide olan fibroblastlara kanser ilişkili fibroblastlar (CAFs) adı verilmektedir (Weber ve Kuo, 2012).

Hangi doku olursa olsun hayatta kalmak için besin ve oksijene ihtiyaç duyar. Tümör hücrelerinde de durum benzerdir. Besin ve oksijen desteği için daha önceden var olan damarlardan yeni damarlar oluşturulmasına anjiyogenezis adı verilir (Ribatti ve Vacca, 2008). Tüm hücrelerin gelişimi düzenli bir şekilde besin desteğine bağlıdır. Bu yüzden

anjiogenezis kanser gelişiminin en önemli parçalarından biridir (Maimela vd., 2019). Solid ve hematolojik tümörlerin anjiogenez kapasitesi olduğu ve bu tümörlerin büyüme, invazyon ve metastaz yetenekleri de yine anjiogenez yeteneklerine bağlı olduğu bilinmektedir (Ribatti ve Vacca, 2008). Anjiogenezis pozitif ve negatif regülatör aktivitesi olan moleküller arasındaki denge ile kontrol edilir (Ribatti vd., 2007). Patolojik koşullarda anjiogenezis sadece proanjiogenik faktörlerin fazla salınımı ile değil aynı zamanda inhibitörük faktörlerin de ters regülasyonu ile başlatılabilir. Tümör proliferasyonun bu çok önemli aşamasında birçok hücre tipi görev yapar. Örneğin tümör ilişkili makrofajlar (TAMs), VEGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve EGF sekrete eder. Bunların hepsi anjiogeneziste rol oynayan sinyal molekülleridir (Ribatti ve Vacca, 2008).

1.13.1.1.Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

VEGF, 1980 yılında heparin afinite kromatografisi ile keşfedilen ve hemodimerik protein ailesi olan bir moleküldür (Ferrara ve Henzel, 1989). VEGF-A (VEGF olarak da bilinir), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve PlGF (plasental büyüme faktörü) bu aileye aittir (Nascimento vd., 2021). En önemli indükleyicilerinden biri hipoksi (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005) ve asidoz diğer indükleyicileri FGF, EGF, Tümör Nekrotik Faktör Alfa (TNF- α), IL-1, Transforming Büyüme Faktör β gibi büyüme faktörleri (Carmeliet, 2005) olan bu molekül endotelyal hücreleri direkt ve kolaylıkla etkiler. İnsanlarda (yara iyileşmesi ve kadınların reproduktif döngüsü hariç) VEGF aracılı anjiogenezis nadirdir (Ferrara, 2005). VEGF birçok tümör hücre hattında salınmaktadır (Senger, 2010). VEGF'in anjiogenezis ile sonuçlanan işlevleri multifaktöriyeldir. Endotelyal hücrelerin bölünme ve proliferasyonunu stimüle eder. Vasküler geçirgenliği artırır (Carmeliet, 2005) ve intersitisyel ödeme sebep olur. ECM'deki tüm bu değişimler yeni kan damarlarının formasyonu ile sonuçlanır. Fakat bu yeni damarlar konağın kendi damarları ile birebir aynı değildir. Hem fonksiyonel hem de yapısal olarak farklılık gösterirler. Kan akışı istikrarlı değildir ve bu da tümör gelişimi ve metastaza katkıda bulunan hipoksi ve yeniden oksijenlenme periyodu ile sonuçlanır. Aynı zamanda anjiogenezis ile oluşan kapillar damarlarda da permeabilite artmıştır ve bu da metastaza yardımcı bir faktör olarak karşımıza çıkar. Tümörlerin hem damarlaşması artmış hem de nekrotik ve vasküler desteği az alanlarla karakterize olduğu bilinmektedir (Nolz vd., 2011; Weber ve Kuo, 2012). Yeterli vasküler destek olmazsa solid tümörlerin sadece 1-

2 mm kadar (ya da yaklaşık olarak 10^6 hücre) büyüdüğü bilinmektedir. Bu yüzden VEGF ve VEGF ilişkili angiogenesis tümör büyümesi ile ilişkili önemli faktördür (Carmeliet, 2005).

İnsan tümörlerinde yapılan çalışmalar bu protein ailesinin prognozu kötü etkilediği, hastalısız ve genel sağ kalımı düşürdüğü bilinmektedir (Nascimento vd., 2021) VEGF ve tirozin kinaz reseptörleri (VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3) kedi meme tümörlerinde daha yeni çalışılan konulardır. VEGF kedi ve köpek meme tümörlerinde endotelial ve metastatik hücrelerden salınır (Meuten, 2017).

Meme kanserlerinde VEGF angiogenizde rol alan dominant mediatördür (Relf vd., 1997). Angiogenesis devam ettikçe tümör hücreleri VEGF üretimini arttırmaya devam eder. Bu üretim ile endotelial hücrelerde adezyon molekülleri olan ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 ve CD34 üretimi arasında negatif korelasyon vardır (Maimela vd., 2019).

Son yapılan çalışmalar makrofajların da tümör hücreleri kadar angiogenik faktör kaynağı olduğunu göstermiştir. Solid tümörlerde TNF- α önemli bir angiogenik faktördür. Deneysel sistemlerde TNF- α 'nın angiogenizi hem stimüle hem de inhibe ettiği görülmüştür. Bu durum TNF- α miktarı ile ilişkilidir (Leek vd., 1998).

Yeni şekillenmiş kan damarlarının etrafını peritümöral yansısal infiltrat çevreler ve bu infiltrat fibroblastlar, makrofaj, mast hücresi ve diğer lökositleri içerir. Bunlar da angiogenik sitokinler ve proteolitik enzimleri salgılayarak angiogenik cevabı başlatabilirler. Mobilize angiogenik faktörler ekstraselüler matrikste depolanabilir (Ribatti vd., 1999). Tümörlerde kemokinler (Ribatti vd., 1999), FGF-2 ve VEGF gibi faktörler tümör hücreleri tarafından salınır ve aktive eder. Aktive olmuş makrofajlar da birçok angiogenik faktör sekrete eder. Bu faktörlere FGF-1, VEGF, TNF- α , IL-8, doku faktörü, hepatosit büyüme faktörü ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 örnek verilebilir (Sunderkötter vd., 1994).

Tümör ilişkili makrofajlar aynı zamanda NOS da sekrete eder. NOS'un endotelial hücre migrasyon ve proliferasyonunda benzer etkisi vardır. Tümör ve tümörü çevreleyen dokuya kan akışını hızlandıran vazodilatör etkisine de sahiptir (Jenkins vd., 1995).

Lenfositlerin de FGF-2 ve VEGF sentezi ve sekresyonu yaptığı ve insanlardaki kanserlerde T lenfosit infiltrasyonunun VEGF ekspresyonuna sebep olduğu bilinmektedir (Ribatti vd., 1999).

1.13.2.Ekstraselüler Matriks (ECM)

Ekstraselüler matriks, birçok bileşeni fibroblastlar tarafından sentezlenen, kolajen, elastin, proteoglikan ve diğer yapısal proteinleri içeren ve hücrelere destek sağlayan 3D bir yapıdır (Finger ve Giaccia, 2010; Weber ve Kuo, 2012). Bu protein ve proteoglikanlar hücre sağ kalımı, proliferasyon, farklılaşma, hücre migrasyonu ve invazyon gibi hücresel işlemleri düzenlerler (Finger ve Giaccia, 2010).

Matriks metalloproteinazlar (MMPs) endopeptitaz ailesi üyesi olan ve TMC ve EMT işlemlerinde kritik öneme sahip enzimlerdir (Finger ve Giaccia, 2010) ve ECM, MMPler aracılığı ile yeniden şekillenir (Weber ve Kuo, 2012).

İnsan kanserleri üzerinde yapılan birçok çalışma MMPlerin aşırı salındığını göstermiştir. MMPler aynı zamanda bazal membran ve ekstraselüler matriks yoluyla proliferasyon ve invazyon için önemlidir (Weber ve Kuo, 2012). Birçok çalışma MMP alt tiplerinden olan MMP-2 ve MMP-9'un meme, akciğer, pankreas gibi solid kanserlerin ileri safhalarında ekspresyonunun düşük sağ kalımla korele olduğunu göstermiştir (Koç vd., 2006).

Genel kolajen miktarının çokluğu hem meme kanseri riskini hem de kötü prognozu artırır. Aynı zamanda kolajen matriksinin organizasyonu ve sertliği meme tümörü büyümesi ve invazyonundaki en önemli mediatörlerden biridir. Fibriler meme kolajeni tümör hücre proliferasyonu ve progresyonunu stimüle eden aktif sinyal yollarında görülür (Rosen vd., 2020).

1.13.3.Yangı ve Tümör Gelişimi

Özel koşullar altında yangı anti anjiogenik sitokinlerin üretimine sebep olur. Bu sitokinler tümör büyümesini baskılar. Fakat birçok tümörde yangı hücreleri anjiogenezis, büyüme, tümör hücre migrasyonu, doku yıkımı ve yeniden yapılanma basamaklarını desteklemektedir (Lorusso ve Rüegg, 2008).

Kronik yangı tümör mikro çevresine aktif moleküller sağlar ve bu da tümör gelişiminde önemli kolaylaştırıcı programların aktivasyonuna katkıda bulunur (Carvalho vd., 2015)

ve kanser gelişiminin en önemli bileşenlerinden biridir (Diakos vd., 2014; Nascimento ve Ferreira, 2021). Kanser ilişkili yangı kanserin evresini ve klinik görünümünü etkiler. Yangısal sitokinler birçok farklı yolak aracılığı ile kanserin ilerlemesinde önemli rol oynar. (Diakos vd., 2014). Kronik yangının TMC'ye sağladığı aktif moleküller büyüme ve sağ kalım faktörleri, VEGF gibi proanjiogenik faktörler ve anjiogenez, invazyon ve metastaza izin veren ekstraselüler remodeling enzimleridir. Yangı hücreleri aynı zamanda kanser hücrelerinin mutajenik transformasyonuna katkıda bulunmaktadır. Köpek meme tümörleri üzerinde yapılan çalışmalar tümör ilişkili yangı cevabının tümörigeneziste önemli rol oynadığını göstermiş olsa da meme tümörü mikro çevresi ile kronik yangı ilişkisi henüz tam olarak anlaşılmamıştır. İnsan meme kanserleri ve köpek meme tümörlerinde yapılan çalışmalar T lenfositlerin yangının önemli regülatörleri olduğunu ve TMC'de toplandıklarına vurgu yapmaktadır. Yine bu çalışmalar CD3, CD31 ve VEGF ekspresyonunun yüksek olduğu tümörlerde genel sağ kalımın düşük olduğunu göstermiştir (Carvalho vd., 2015) ve tümör ilişkili nötrofillerin VEGF, IL6, IL8 gibi faktörlerin kaynaklarından biri olduğu bilinmektedir (Nascimento ve Ferreira, 2021)..

Birçok çalışma lenfositler tarafından aracılık edilen kazanılmış bağışıklığın antitümör cevapta hayati öneme sahip olduğunu göstermiştir. Bağışıklık hücreleri stromada (sTILs) ya da direkt kanser hücreleri ile temas halinde (iTILs) olabilir. Stromal yüzey bölgesinde bağışıklık hücresi olan hastaların %50-60'ında prognozun iyi olduğu ve bu hastaların kemoterapiye cevap verdiği bilinmektedir. CD3 + T hücreleri TILs'ın ana bileşenleridir ve meme kanserinde iyi prognozu gösterir. Fakat tümör ilişkili makrofajlar zayıf prognozun habercisidir. Kedi meme tümörlerinde yapılan çalışmaların agresif meme tümörlerinde VEGF ve TILs ekspresyonu uyumunu yüksek olduğunu göstermiştir (Nascimento ve Ferreira, 2021).

1.13.3.1.Nükleer faktör kappa B (NF-KB)

NF-KB, yangı, bağışıklık proliferasyonu ve hücre ölümü gibi fizyolojik süreçleri ve 100'lerce genin ekspresyonunu regüle eden bir transkripsiyon faktörüdür (Zinatizadeh vd., 2021). Beş alt tipi olan protein ailesini içerir ve hemen hemen her hücre tipinde bulunur. Bağışıklık ve yangı sürecini kontrol etmede anahtar rolleri vardır. TNF- α (Şen vd., 2017) ve IL-1 β gibi sitokinler bu faktörün güçlü indükleyicilerindedir. NF-KB

aktivasyonu hücreyi TNF- α 'nın indüklediği apoptozisten koruyan önemli bir basamaktır. Bunlar kanserle ilişkili basamaklardır (Zinatizadeh vd., 2021). NF-K β aynı zamanda meme bezi dahil olmak üzere bir çok organ gelişiminde kritik role sahiptir. Bu faktörün aktivasyonu organ yaşlanması sırasında anormal olabilmekte ve bu durum malignite ile ilişkilendirilmektedir (Zhou vd., 2005).

NF-K β doğal bağışıklık ve yangısal cevapta önemli bir rol oynar ve yangı ile tümörigenezis arasındaki en önemli bağlantılardan biridir. Bu faktör apoptotik genleri aktive eder ve büyüme, invazyon, metastaz ile ilişkili genlerin de transkripsiyonunu destekler. Prokanseroz ve malignant hücrelerin apoptozisten kaçmasına izin verir. Tümörigenezis ve yangının farklı aşamalarında hem anti hem de proinflamatorik sitokinleri düzenler (Martins vd., 2016).

Son yapılan çalışmalar ER (-) meme kanserlerinde NF-K β 'nin daha yüksek fakat normal meme dokusuyla kıyaslandığında tüm meme kanseri tiplerinde DNA'ya bağlanma aktivitesinin fazla olduğunu göstermiştir (Zhou vd., 2005). Yapılan çalışmalar NF-K β ve insan meme kanseri arasındaki ilişkinin kesinliğini tam ortaya koyamamıştır. Bu ilişki bazı çalışmalarda kuvvetli iken bazılarında normal olarak bulunmuştur. Fakat HER2 ve NF-K β arasında önemli bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Indra vd., 2021).

Meme tümörlü köpeklerle yapılan bir çalışmada NF-K β 'nin yüksek gen ve protein ekspresyonu olduğu bulunmuş. Ayrıca yine 10 yaş ve üzeri köpeklerde yüksek NF-K β 'nin oksidatif stres ile pozitif korelasyonun bulunduğu ve bunun doku hasarı ve kronik yangı ile ilişkili olduğu görülmüştür. Ayrıca yine yapılan bir çalışmada 3 cm'den büyük meme tümörü ve lenf nodu metastazı olan köpeklerde NF-K β 'nin yüksek olduğu bunun da IL-6 ve TNF- α ekspresyonunu pozitif yönde modüle ettiği görülmüştür (Martins vd., 2016).

İnsanlarda hepatik karsinomlu hastalarla yapılan bir çalışma NF-K β 'nin yangı ilişkili kanserin çok önemli bir tetikleyicisi olduğunu göstermiştir (Pikarsky vd., 2004).

İnsan kolon kanserlerinde NF-K β inhibisyonu aynı zamanda mikro damar yoğunluğu (CD31), IL-6, TNF- α , IL-1 α 'nın mRNA ekspresyonu seviyelerini, ayrıca Ki-67, VEGF protein seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü bulunmuştur (Al-Halabi vd., 2011).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar NF-K β ve HIF-1 α sinyalleri arasında güçlü bağlantılar bulmuşlardır. NF-K β , HIF-1 α 'nın transkripsiyonal aktivatörüdür ve bazal NF-K β aktivitesi normoksida ve hipoksi sırasında HIF-1 α akümülyasyonuna gerek duyar. Aynı zamanda HIF-1 α aktivasyonunun neredeyse NF-K β aktivasyonu ile uyumlu olduğu düşünülmektedir. Örneğin; IL-1 β normoksik koşullarda HIF-1 α proteinini upregüle eder ve bir NF-K β bağımlı yolak aracılığı ile HIF-1-sorumlu gen de VEGF'i aktive eder. Aksine HIF-1 α akümülyasyonunun NF-K β aktivitesini tetiklediği gösterilmiştir (Martinez-Outschoorn vd., 2010).

1.14. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Oksijen hayat için çok önemli olmasına rağmen normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türlerinin vücuda zararlı olmak gibi etkileri vardır. Birçoğunu serbest radikallerin oluşturduğu bu reaktif oksijen türleri kimyasal reaktivitesi yüksek olan oksijen formlarıdır (Koca ve Karadeniz, 2003).

Serbest radikaller, dış yörüngesinde çift oluşturmamış bir elektron içeren (Nourazarian vd., 2014; İnt. Kyn. 1), karasız, düşük molekül ağırlıklı, ömürleri kısa olmasına rağmen çok etkili (Mercan, 2004), oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilen reaktif bileşiklerdir. Serbest radikaller pozitif ya da negatif yüklü olabildikleri gibi elektriksel olarak nötral de olabilirler (Yoshikaea ve Naito, 2002; Costa vd., 2014). Diğer moleküllerle elektron alışverişleri olabilir ve bu sayede vücutta indirgeyici ya da yükseltgeyici olarak davranırlar. Vücuttaki birçok serbest radikal reaktif oksijen türleri (ROS) adı verilen oksijen türevleri iken nitrojen türevleri de reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak adlandırılır (Mandelker, 2008). Aslında ara ürün olan ROSlar (Sezer ve Keskin, 2014) atmosferdeki oksijenin bir kısmının başta mitokondri olmak üzere diğer hücrel kompartımanlarda metabolizasyon sırasında indirgenmesiyle oluşur (Özcan vd., 2015). Normal oksijen metabolizması sırasında oluşan radikallerin bazıları şunlardır;

- **Süperoksit radikali (O₂⁻)** (Nourazarian vd., 2014); nitrik oksit ya da demir ile bir araya gelmediği sürece aktif olmayan, yüksek seçici, dokular için yararlı ya da zararlı etkileri olabilen bir radikaldir. Hücrel sinyal yolakları için vital bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir (Mandelker, 2008; Nourazarian vd., 2014)

- **Hidrojen peroksit (H_2O_2)**; ksantin, ürat ve birçok protein oksidaz enzimi hidrojen peroksit üretebilir. Eşleşmiş elektronu olduğu için non-radikal olarak adlandırılır (Sezer ve Keskin, 2014). Hemogloblin ve miyogloblin gibi hem proteinlerini indirgeyerek demir açığa çıkarabilir. Demir gibi ağır metallere olan reaksiyonuna Fenton reaksiyonu denir ve bunun sonucunda çok sayıda serbest radikal oluşur (Mandelker, 2008).
- **Hidroksil radikali (OH^*)**; en kuvvetli hidroksil radikali genellikle Fenton reaksiyonu sonucu oluşur. Bu radikal birçok hücresel kompartımana saldırarak hasar verici etki gösterir (Mandelker, 2008).
- **Nitrik oksit (NO)**; nitrik oksit organizma için hem yararlı hem de zararlı etkileri olan serbest bir radikaldir (Islam vd., 2012; Derici ve Demirel-Yılmaz, 2017). Çok reaktif olmasına rağmen vücutta önemli bir sinyal molekülü olarak görev yapar. Nitrik oksit sentetaz (NOS) enziminin etkisiyle şekillenir (Mandelker, 2008). İnsanlarda damar tonusunun düzenlenmesi (gevşemesi), kan basıncı ve böbrek fonksiyonlarının kontrolünde önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda vasküler endotel hücreler için önemli bir vazodilatatördür. Nitrik oksit sentetazlar sinir dokuda, vasküler endotel doku boyunca, trombositler ve diğer dokularda bulunmaktadır (Derici ve Demirel-Yılmaz, 2017). Son zamanlarda yapılan çalışmalar NO'nin VEGF ile kısmen etkileşerek tümör anjiogenezisi, vasküler tonus ve geçirgenlik üzerindeki etkileri ile tümörlere kan akışına aracılık ettiğini göstermiştir (Islam vd., 2012). Nitrik oksit sentetazın, nöronal NOS (tip I, nNOS), endotel hücre NOS (tip III, eNOS) ve indüklenebilir NOS (tip II, iNOS) olmak üzere 3 izoenzimi vardır. Bunlardan iNOS normal şartlarda organizmada bulunmazken yangı varlığında makrofaj ve fagositler (Mandelker, 2008) başta olmak üzere osteoklastlar, mikrogliyal, astrositler, epitel hücreler gibi birçok hücre tarafından, Tümör Nekroz Faktör (TNF) alfa, interferon, IL-1, endotoksin, hipoksi, okside LDL ve liposakkaritler gibi yangısal ajanların etkisiyle ekspresyonu uyarılır ve uzun vadede üretilir (Derici ve Demirel-Yılmaz, 2017). Uzun vadede fazla üretilmesinin birçok hastalığın semptomundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Nitrik oksit aynı zamanda Fenton reaksiyonunu etkileyerek (Fe-S proteininden demiri çıkarıp onun yerine kendisi geçer) karsinogeneziste

rol oynar. Süperoksit dismutaz (SOD) ile yarışmaya girer. Bu yarış sonucunda oksidatif etkileri ortaya çıkar (Derici ve Demirel-Yılmaz, 2017).

Fizyolojik koşullarda NO post pubertal dönemde meme bezi gelişimi için çok önemli bir mediatördür. İndüktif koşullar altında iNOS tarafından sentezlenen yüksek NO seviyeleri antibakteriyel ve antitümöral fonksiyonlara aracılık eder (Islam vd., 2012).

Yapılan çalışmalar meme kanseri dahil birçok kanser tipinde iNOS ekspresyonunun arttığını ve aynı zamanda yüksek iNOS'un düşük sağ kalımla ilişkili olduğunu göstermiştir (Granados- Principal vd., 2015). Karaciğer kanseri üzerinde yapılan çalışmalar, iNOS'un kanser dokusunda anjiogenez, invazyon ve metastazı desteklediği bildirmiştir (Derici ve Demirel-Yılmaz, 2017).

Veteriner onkolojide ise tümör ilişkili NO'nun meme tümörü gelişimini ve metastazı desteklediği bilinmektedir. Bu desteği tümör hücrelerinin invazyon, anjiogenik ve migratorik kapasitelerini arttırarak yapar. Fakat kedi meme tümörleri üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Meme tümörü olan kediler üzerinde yapılan bir çalışmada karsinomlu kedilerin tamamında %100 iNOS pozitifliği, tüm hücrelerin sitoplazmalarında VEGF pozitifliği, endotelial hücrelerde ise zayıf boyanma, karsinomların %95'nin VEGF pozitif olduğu, aynı zamanda iNOS ve VEGF pozitifliğinin paralel olduğu ve son olarak da hipoksinin her iki parametre için kuvvetli stimulan olduğunu göstermiştir (Islam vd., 2012).

ROS'lar serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatabilirken aynı zamanda birçok serbest radikalin oluşumuna da sebep olabilmektedir (İnt. Kyn. 1). Serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynaklar tarafından meydana getirildiği bilinmektedir (Karabulut ve Gülay, 2016; Özer vd., 2019). ROSlar hücrel işlemlerin yan ürünü olarak üretilmektedir ve endojen ROS'un en önemli kaynağı mitokondridir (Huy vd, 2008). Mitokondriyal solunum sırasında başta süperoksit radikalleri olmak üzere ROS'lar üretilir (Mandelker, 2008). Aynı zamanda peroksizom ve endoplazmik retikulum da ROS kaynağıdır (Ebrahimi vd., 2020). Bazı enzimlerin (örneğin; ksantin oksidaz, aldehid oksidaz, dihidroorotat dehidrojenaz, flavoprotein dehidrojenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksijenaz) katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller oluşabilmektedir. Ayrıca hayvan hücrelerinde C vitamini, adrenalin, filavin koenzimleri (İnt. Kyn. 1), dopamin,

kinon (Nourazarian vd., 2014) da bazı metabolik aktiviteler sonucunda serbest radikallerin kaynağı olmaktadır. Enzimatik lipid peroksidasyonu sonucunda arakidonik asit metabolizması ile de serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Aktif eozinofil, nötrofil ve makrofajlar serbest oksijen radikallerinin başka bir kaynağıdır (Nourazarian vd., 2014; İnt. Kyn. 1). Eksojen ROS kaynaklarına ise UV radyasyon, kimyasal bileşenler ve şiddetli egzersiz (Janssen-Heininger vd., 2008), optikal radyasyon ve anti kanser ilaçları, sigara ve alkol gibi kimyasal bileşenler (Nourazarian vd., 2014) örnek olarak verilebilir. Toksik olan bazı maddeler ya doğrudan serbest radikal üreterek ya da antioksidan aktivitesini düşürerek, serbest radikal oluşumuna katkıda bulunur (İnt. Kyn. 1). Yangı ve yaşlanma gibi bazı faktörler de bu mekanizmaları destekler. ROS homeostazisi normal hücrenin hayatta kalabilmesi için sinyal yolağı gibi çalışır. (Ebrahimi vd., 2020). Düşük dozlardaki ROS'un organizmada yararlı etkileri vardır (Jelic vd., 2021). Düşük ve orta düzey yoğunlukta ROS, hücreleri enfeksiyöz ajanlara karşı korumada, sinyal iletim yollarını düzenlemede ve mitojenik uyarılara karşı yanıtın başlatılmasında önemlidir (Huy vd., 2008; Jelic vd., 2021). ROS aracılı yanıtların çoğu aslında hücreyi oksidatif strese karşı korur ve hücrede normal bir oksidan ve antioksidan dengesi olan "redoks homeostazını" oluşturduğu bilinmektedir (Droge, 2002). Yine vasküler tonusun ayarlanması, ventilasyonu kontrol etmek için oksijen tansiyonunun takibi, eritropoietin üretimi de diğer yararlı etkilerindendir (Mandelek, 2008). ROS konsantrasyonu bazı kritik noktalara ulaşırsa apoptozis görülebilir (Jelic vd., 2021).

ROS aşırı üretilirse ve hücreler fazla ROS ile baş edemezse bu, hücrelerde oksidatif stres denilen durumun ortaya çıkmasına sebep olur ve oksidatif stresi doku hasarı takip eder (Yoshikawa ve Naito, 2002; Huy vd., 2008; Drutel vd., 2013). Yani oksidatif stres intraselüler ROSun miktarının artması (Ebrahimi vd., 2020) olarak tanımlanabilen fizyolojik bir durumdur (Djordjevic, 2004). Hipoksik dokularda oksidatif stres yükündür. Oksidatif strese bağlı hasarın miktarı dokunun içeriği ve hipoksi/iskemiye maruziyet süresine göre değişir. Oksidatif strese iskelet kaslarının direnci yüksekken sinir sistemi dokusunun düşüktür (Mandelker, 2008). Serbest radikal yoğunluğunun artması lipid, protein ve nükleik asitlerde yapısal bozuklukların oluşmasına sebep olur. Bu durum kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıkların oluşumunda rol oynar (Kang, 2002; Yoshikawa ve Naito, 2002; Özer

vd.,2019). Süperoksit ve hidroksil radikali sitoplazma, çekirdek, mitokondri ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunun başlamasına sebep olur. Peroksidasyon başlayınca membran geçirgenliği artar. Bunu çekirdek ve mitokondride DNA hasarı takip eder (İnt. Kyn. 1).

Lipidler oksidatif strese karşı oldukça hassas moleküllerdir. Serbest radikallerin lipidler üzerine etkisi sonucu malondialdehit (MDA) şekillenir (İnt. Kyn. 1, Mercan, 2004). MDA, 3 ya da daha fazla çift bağ içeren lipidlerin peroksidasyonu sonucu oluşarak, hücre membranlarından iyon alışverişini etkileyerek membran bileşiklerinin çapraz bağlanmasına yol açar ve enzim aktiviteleri ve iyon geçirgenliği değişir. MDA'nın bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkileri vardır (Mercan, 2004). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik belirteci olmamakla birlikte peroksidasyon derecesi ile pozitif korelasyon göstermektedir. Aynı zamanda MDA'nın çok sık olamasa da DNA'da mutasyonlara sebep olduğu bildirilmiştir (Marnett, 2002). Lipidlerin peroksidasyon reaksiyonları süpürücü antioksidan reaksiyonlar etkisiyle sonlanabilirken, katalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam da edebilir (Gutteridge, 1995).

Proteinler oksidatif stresten yağlar kadar etkilenmezler. Doymamış bağ ve kükürt içeren amino asitlerin oksidatif stresten etkilenme derecesi diğer amino asitlerden daha fazladır. Bu amino asitlerin reaksiyonu sonucunda sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller şekillenir. Hemoglobinin serbest radikallerle ilişkisi sonucunda methemoglobin oluşumu hızlanmaktadır. İyonize radyasyon DNA'da mutasyonlara yol açarken, kaynağı aktive olmuş nötrofiller olan H₂O₂ şiddetli DNA hasarı, hücrede fonksiyon kaybı ve hatta hücre ölümüne sebep olmaktadır (İnt. Kyn. 1). Hidroksil radikalleri DNA ile reaksiyona girer ve çapraz bağlanmaya neden olarak deoksiribozda değişikliklere neden olur. DNA'da oksidatif hasardan kaynaklanan metabolitler timin glikol ve 8-hidroksideoksi guanozindir (8-OHdG). DNA'ya oksidatif hasarın yaygın bir ürünü ve oksidatif stresin ana belirteci 8-OHdG meme tümörleri başta olmak üzere birçok tümör tipinde tespit edilmiştir (Yoshikawa ve Naito, 2002).

MDA seviyeleri, 8-OHdG ya da antioksidan defans enzimlerinin onkolojide büyük bir diagnostik potansiyeli vardır (Jelic vd., 2021).

Reaktif oksijen türlerinin metabolizmadaki hasarlarını yok etmeye çalışan sistemler antioksidan mekanizmaları olarak adlandırılır. Antioksidanlar hücre içi ve hücre membranında etkili olmaktadır (Süleyman vd., 2018). Antioksidanların serbest radikallere karşı koruyucu etkisi birçok çalışma ile gösterilmiştir (Yoshihara vd., 2010).

Antioksidanların etki şekilleri;

1. Toplayıcı Etki
2. Bastırıcı Etki
3. Zincir Kırıcı Etki
4. Onarıcı Etki

Antioksidanlar endojen ya da eksojen kaynaklı olabilir.

- Endojen Kaynaklı Antioksidanlar: Bunlar enzim olanlar ve enzim olmayanlar diye 2 gruba ayrılmıştır. Enzim olan endojen antioksidanlar;
 - Süperoksit dismutaz (SOD): Oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı koruyan bu molekül bu etkiyi süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyerek yapar. Aynı zamanda fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde öldürülmesine de katkı sağlar. Bu antioksidanın ekstraselüler aktivitesi düşüktür ve oksijen kullanımı fazla olan dokularda daha yüksek miktarlarda bulunur (İnt. Kyn. 1). Memelilerde tamamı dismutasyon reaksiyonunu katalizleyebilen 3 tip SOD bulunmaktadır (Süleyman vd., 2018). SOD ve katalazın birlikte değerlendirilmesi daha sağlıklıdır. Çünkü SOD reaksiyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit katalaz tarafından parçalanarak birkimi engellenir (Mao vd., 1993).
 - Glutatyon peroksidaz (GSH-Px): Sitozolde bulunan ve hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir.
 - Glutatyon S-Transferazlar (GST)
 - Katalaz (CAT): Hidrojen peroksidi suya ve oksijene parçalayan bir hemoproteindir (Kirkman ve Gaetani, 1984). Katalaz bağışıklık sistemi hücrelerini kendi solunum patlamalarına karşı korur (Sezer ve Keskin, 2014).

- Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
- Hidroperoksidaz'dır.

Enzim olmayan endojen antioksidanlar ise; melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, urat, laktoferrin ve albümin olarak sıralanabilir.

- Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar: İlaçlar, vitaminler ve gıda kaynaklı antioksidanlardır (İnt. Kyn. 1).

ROS tümörigeneziste önemli rol oynar ve hücre proliferasyonu, genomik istikrarsızlık, yangı, apoptozise direnç ve metabolik yeniden programlama gibi biyolojik süreçleri etkiler. Artmış ROS seviyeleri birçok kanser hücre hattında belirlenmiştir (Szatrowski ve Nathan, 1991). Tümör hücrelerinde ROS'lar genellikle mitokondri tarafından sentezlenir. Mitokondri oksijenden bir elektron indirgeyerek superoksid ($O_2\bullet$) üretir. Bunu da mitokondriyal elektron transport zinciri (ETC) aracılığı ile yapar. ROS'lar mitokondrinin farklı bölgelerinde meydana gelir. En önemli kompleksler I, II ve III'tür. Kompleks I ve II, $O_2\bullet$ 'yi mitokondriyal matrikste üretirken kompleks III hem matrikste hem de membranlar arası boşlukta üretir. Mitokondriyal matrikste üretilen $O_2\bullet$, SOD 2 tarafından H_2O_2 'ye çevrilir. Membranlar arası boşlukta üretilen ise dış mitokondriyal membrana ve sitozol içine taşınır ve SOD 1 tarafından H_2O_2 'ye dönüştürülür. Kompleks III tarafından üretilen ROSların sitozole girişine izin verildikten sonra hücre sinyal mekanizmalarını etkilediği düşünülmektedir (Weinberg vd., 2019).

ROS'lar kanser başlangıcını etkileyebilen güçlü mutajenlerdir (Ogrunc vd., 2014). Yapılan birçok çalışma ROS ve RNS'lerin karsinogenezin hemen hemen tüm aşamalarında yer aldığını göstermiştir (Kruk, 2014; Onodera vd., 2018). Malignite gelişiminin primer fazında ROS fonksiyonları DNA, RNA ve proteinler üzerinde direkt hasar yapan faktörlerdir (Ogrunc vd., 2014).

Kanser hücreleri, metabolizmaları hızlı ve hücre sel sinyal mekanizmaları bozuk olduğu için yüksek ROS üretme eğilimindedirler. Yüksek ROS seviyelerinin hücreler için zararlı olduğu bilinmektedir. Kanser hücrelerinin redoks durumu normal hücrelerinkinden farklı olduğu için ROS seviyelerini, düşük bir sitostatik seviyenin üstünde, sitotoksik olacak seviyelerin altında, orta derecede yüksek bir tümörojenik

düzye de tutarlar (Mittler, 2017). Kanserin erken dönemlerinde ROS aynı zamanda onkojen ve tümör supresör genlerin üretimini de etkiler. Onkojenik mutasyonlar ROS üretiminin artmasına sebep olurken ROSlar tümör hücresinin hayatta kalmasını NF-KB ve NF-E2 ilişkili faktör 2 gibi çeşitli faktörleri aktive ederek destekler (D'Souza vd., 2020; Ebrahimi vd., 2020). Oksidatif stres aynı zamanda tümör anjiogenezisi ve metastazı da geliştirir. Solid tümörlerde tümörün içinde fazla ve hızlı hücre gelişimi yetersiz kan temini ve ortamın hipoksik olmasına sebep olur. Bu durum da ROS üretimini artırır (Jeon vd., 2012). Kanserin sonraki aşamalarında ise çok yüksek ROS apoptozisi destekler (D'Souza vd., 2020) ve metastazı da inhibe eder. Bu yüzden kanser hücreleri metastaz sırasında hücre ölümünü engellemek için antioksidan kapasitelerini artırır (Ebrahimi vd., 2020).

Devam eden yangı, preneoplastik durumlara öncülük edebilir. Kronik yangılı hücrelerde fazla miktarda ROS/RNS üretilir ve daha fazla aktive olmuş bağışıklık hücresi işe karışır. Bunlar da regüle olmamış sürecin amfilikasyonuna ve sonunda preneoplastik duruma sebep olur. Oksidatif stres ve kronik yangı sıkı ilişki içindedir ve bu durumun devamı engellenemezse muhtemelen genetik/epigenetik değişikliklere sebep olur. Bu değişiklikler de karsinogenezin başlamasına aracılık eder (Murata vd., 2012).

Meme kanseri global çapta kadınlar arasında en sık görülen tümör tiplerinden biridir (Drutel vd., 2013; Nourazarian vd., 2014). Meme kanseri sadece mutasyona uğramış somatik hücrelerin izole bir grubu değil, aynı zamanda meme kanseri hücreleri, fibroblastlar, adipositler, immun ve endotelyal hücrelerden oluşan bir mikro çevre sistemidir. Kanser hücreleri ve stroma arasındaki yakın etkileşimlerin meme kanseri yolaklarını düzenlediği bilinmektedir. Hastalığın gelişim, ilerleme ve metastazını etkileyen birçok faktör arasında oksidatif stres önemli bir role sahiptir. Hastalığın birçok hazırlayıcı faktörü vardır ve bu faktörlerin etkilerini oksidatif stres yoluyla gösterdiği bilinmektedir (Drutel vd., 2013). Yapılan çalışmalar meme kanserinde oksidatif stresin arttığını göstermiştir (Nourazarian vd., 2014). Meme kanserinin etiolojisinde oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu yatmaktadır. Bu hastalarda MDA seviyelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Yine meme kanseri olan hastalarda SOD seviyelerine bakılmış, bazı çalışmalarda bu seviyeler yüksek bulunurken bazılarında düşük olarak saptanmıştır (Jelic vd., 2021). SOD yüksekliği oksidatif strese karşı bir defans mekanizması olarak değerlendirilmiştir. Aynı zamanda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında total

antioksidan kapasitesinin de önemli derecede düşük olduğu belirlenmiştir. GPx ve SOD aktivitesinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, meme kanserli hastaların serum örneklerinde düşük olduğu (Gupta vd., 2012; Zowczak-Drabarczyk vd., 2013) ve meme kanseri alt grupları arasında total antioksidan kapasitesinde önemli değişiklikler olmadığı yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Zowczak-Drabarczyk vd., 2013). Yapılan başka bir çalışma MDA seviyelerinin hastalığın derecesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. İleri hastalık derecelerinde seviyeler yüksektir (Pande vd., 2011). Yani meme kanserli hastalarda antioksidan savunma mekanizmaları (SOD, CAT, GST ve GPx) zayıf ve serbest radikal aktivitesi de yüksek bulunmuştur (Jelic vd., 2021).

Meme tümörü olan köpeklerle E vitamini kullanılarak yapılan bir çalışmada vitamin E verilmeyen grupta oksidatif stresin daha yüksek olduğunu belirlemiştir (Stavinohová vd., 2012).

Bu çalışmada meme tümörlü kedilerden elde edilen tümörlü operasyon materyalleri histopatolojik olarak derecelendirilerek her bir derece arasında oksidatif stres parametreleri (MDA, TOS, OSI, NO), antioksidan kapasite (TAS, GSH, CAT)'yi kimyasal, tümör ilişkili ve tümör mikro çevresi parametreleri olan 8OHdG, HIF-1 α , VEGF, CD3, TNF- α , NF-K β , iNOS ve CD31 seviyelerinin immunohistokimyasal yöntemlerle belirleyip, bu değerlerin kendi aralarında ve histopatolojik derecelerle ilişkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

Çalışmanın materyalini Kuşulu Veteriner Polikliniği'ne teşhis amacıyla getirilen değişik ırk ve yaştaki 17 dişi kediye ait tümörlü meme dokusu (Çizelge 2.1) ile tümörlü kedilerin ve farklı 6 sağlıklı kedinin kan serumu oluşturdu.

Çalışma için T.C. Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AKUHAYDEK)'nden (Tarih: 27.11.2019, 49533702/173 sayı ve 134-19 referans numarası) (Bkz. EK A) ve T.C. Afyonkarahisar Valiliği İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'nden 29. 11. 2019 tarihinde 39637749-325.04.03-E.3690332 sayı numaralı Proje Bazlı İzin (Bkz. EK B) alındı.

Çizelge 2.1: Olguların cinsiyet, yaş, ırk ve kısırlaştırma durumları.

Vaka No	Cinsiyet	Yaş (Yıl)	İrk	Kısırlaştırma Durumu
1	Dişi	10	Tekir	Kısırlaştırılmamış
2	Dişi	12	Tekir	Kısırlaştırılmamış
3	Dişi	9	Tekir	Üç yaşında kısırlaştırılmış
4	Dişi	10	Tekir	Kısırlaştırılmamış
5	Dişi	11	Calico	Kısırlaştırılmış*
6	Dişi	8	Tekir	Kısırlaştırılmış*
7	Dişi	9	Tekir	Kısırlaştırılmamış
8	Dişi	11	Tekir	Kısırlaştırılmış*
9	Dişi	12	Tekir	Kısırlaştırılmış*
10	Dişi	14	Egzotik Shorthair	Kısırlaştırılmamış

11	Dişi	11	Persian	Kısırlaştırılmamış
12	Dişi	10	Tortoiseshell	Kısırlaştırılmış*
13	Dişi	10	Tekir	Kısırlaştırılmamış
14	Dişi	9	Tekir	Kısırlaştırılmamış
15	Dişi	11	Tekir	Kısırlaştırılmış*
16	Dişi	12	Calico	Kısırlaştırılmış*
17	Dişi	14	Tekir	Kısırlaştırılmamış

(*) Yetişkin kısırlaştırılmış, kısırlaştırma yaşı bilinmiyor.

2.2. Metot

2.2.1. Doku Takibi ve Histopatolojik Metot

Çalışmanın histopatolojik ve immunohistokimyasal analizleri Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı.

Tümörlü meme dokuları %10'luk formaldehit solüsyonunda fiksasyon amacıyla 24 saat bekletildi. Fiksasyondan sonra dokular küçültülerek kasetlere alındı. Bu kasetler dokuların iç kısımlarının fikse olması için yine %10'luk formaldehit solüsyonunda bekletildi. Kasetteki dokuların fiksasyonundan sonra dokular rutin doku takibine alındı. Rutin doku takibinde kasetteki dokular otomatik doku takip cihazında (Leica tp1020) düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere geçirilerek dokuların suyu alındı (dehidratasyon). Daha sonra suyu alınan dokuları 2 farklı ksilol seriden geçirilerek alkolün yeri ksilol ile değiştirildi (şeffaflaştırma). Bu aşamanın sonunda dokular vakumlu haznelerdeki 2 seri erimiş parafinde tutularak dokulara parafin emdirildi ve dokular parafin ile bloklandı. Ertesi gün parafin blokları elde edilen dokular kesit alınmak üzere 1 gün boyunca buzdolabında bekletildi. Blok haline gelmiş dokulardan mikrotom yardımı ile normal lama alınan kesitler hematoksilin eozin (HE) boyama için hazır hale getirildi.

Lam üzerine alınan doku örnekleri HE ile boyandı. Boyama prosedürü; lamlar parafin uzaklaştırılması için 30 dakika olacak şekilde 3 farklı ksilol serisinden geçirildi. Daha sonra sırasıyla yüksek dereceden alçak dereceye (%100, 96, 90, 80 ve 70) alkollerden geçirilerek dokular rehidre edildi. Rehidre edilen kesitler hematoksilinde 15 dakika ve eozinde 3 dakika boyanma işlemine tutuldu. Boya sonrasında yine sırayla düşük dereceden yüksek dereceye (%70, 80, 90, 96 ve 100) alkollerden geçirilen dokular

dehidre edildi. Son olarak ksilolde parlatılan kesitler üzerine solvent bazlı yapıştırıcı damlatılarak lamel kapatıldı ve örnekler mikroskop altında incelenerek histopatolojik teşhisleri konuldu, sınıflandırılması (Goldschmidt vd., 2017) ve derecelendirmeleri (Mills vd., 2015) (Çizelge 2.2) yapıldı. Teşhis ve derecelendirmelerde Zeiss Axio Lab A1 ICC kamera ışık mikrosobu kullanıldı.

Çizelge 2.2: Meme tümörlerinin derecelendirme metodu (Mills vd., 2015).

Histolojik Özellikler	Skor
• Lenfovasküler İnvazyon	
Var	1
Yok	0
• Çekirdek Formu	
<5 Anormal	0
>5 Anormal	1
• Mitotik İndeks	
<62	0
>62	1
Total Skor	Derecelendirme
0	I
1	II
2-3	III

2.2.2. İmmunohistokimyasal Metot

IHC boyamaları için parafin bloklardaki doku örneklerinden adezivli lamlara 4 mikron büyüklüğünde kesitler alındı. Bu kesitler ksilen ile deparafinize ve alkol ile rehidrate edildikten sonra avidin biotin kompleks (ABC) yöntemine göre boyamaları yapıldı. IHC için kullanılan primer antikorlar (CD3, CD31, HIF-1 α , VEGF, NF-K β , 8OHdG, iNOS, TNF- α) çizelge 2.3'te verilmiştir. Deparafinize edilen dokular distile suda 5 dakika

bekletildi. Daha sonra hücrelerdeki endojen peroksidaz aktivitesine baskılamak için, kesitler % 3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika tutuldu. Tekrar distile su ile yıkanan lamalar sitrat buffer (antijen retrieval solüsyonu) ile mikrodalga fırında 15 dakika kaynatıldı. Mikrodalga fırından çıkarılan örnekler 15 dakika dinlendirildi. Dinlendirilip soğutulan dokular 3 kez 5 dakika olacak şekilde fosfat buffer saline (PBS) ile yıkandı. Ardından lam üzerinde boyanacak olan kısımların etrafı hidrofobik kalemle çizildi. Primer antikörleri damlatılan kesitler 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün primer antikörleri dökülen lamalar Tris-buffered saline (TBS) ile yıkandı, sekonder antikörler (Anti-tavşan IgG ve anti-fare IgG) ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldı. Sonra TBS ile 3 kez yıkandı. Daha sonra ABC kiti (Vectastain ABC peroksidaz Kit PK-6100) damlatıldı ve tekrar 1 saat inkübasyona bırakıldı. TBS ile 3 dakika olacak şekilde 2 kez yıkandı. Lamaların üzerine AEC kromojeni (TA-060-HA, AEC Substrate System, LabVision/ThermoScientific) damlatıldı. 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra lamalar distile su ile yıkandı. Gill'in hematoxilen ile 21 dakika boyanan lamalar 15 dakika boyunca akan su altında temizlendi. Lamalar kurutulduktan sonra su bazlı yapıştırıcı ile üzerlerine lamel kapatıldı. Işık mikroskopunda incelendi.

Çizelge 2.3: IHC için kullanılan antikör panelleri.

Primer Antikör	Kaynak	Tür	Sulandırma	Monoklonal /Poliklonal
CD3	Dako – A0452 Santa Cruz	Tavşan	1/200	Poliklonal
CD31	Biochemical – SC-1506 Santa Cruz	Tavşan	1/500	Poliklonal
NF-K β	Biochemical – SC-109 Therm	Tavşan	1/50	Poliklonal
iNOS	Scientific RB-9242	Tavşan	1/50	Poliklonal
VEGF	SC-7269, Santa Cruz Biotechnology	Fare	1/100	Monoklonal

8OHdG	SCBT - sc-66036 Santa Cruz Biotechnology	Fare	1/200	Monoklonal
HIF-1 α	Abcam ab2185	Tavşan	1/200	Poliklonal
TNF- α	sc-52746, Santa Cruz Biotechnology	Fare	1/200	Monoklonal

2.2.3. Biyokimyasal Metot

Çalışmanın biyokimyasal analizleri Afyon Kocatepe Üniversitesi Kimya Bölümü Laboratuvarı'nda yapıldı.

Kedilerden kırmızı kapaklı tüpe alınan kan örnekleri, 5000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Örneklerin serumları ayrılarak ayrılan serumlar -18 derecede muhafaza edildi. Kan serumu örneklerinden total antioksidan statü (TAS) düzeyleri, total oksidan statü (TOS) düzeyleri, redükte glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), katalaz (CAT) tayinleri ve oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplaması yapıldı.

2.2.3.1. Total Antioksidan Statü (TAS) Düzeylerinin Analizi

TAS ölçümü için geliştirilen yöntemlerde, ortama reaktif bir ürün katılır ve bu ürünün ortamda bulunan antioksidanlar tarafından indirgenme/inaktif etme süreci takip edilerek numunenin antioksidan kapasitesi belirlenmeye çalışılır. Bu çalışmada bu prensiple çalışan ticari bir kit (Elabscience) kullanılarak TAS düzeyleri belirlendi. İlk olarak kit ile birlikte temin edilen stok standart yardımıyla 5 farklı konsantrasyonda (2 mmol trolox/L; 1 mmol trolox/L; 0,5 mmol trolox/L; 0,25 mmol trolox/L; 0,1 mmol trolox/L) trolox standart çözeltisi hazırlandı. Daha sonra kalibrasyon eğrisi hazırlanarak numunelerdeki TAS düzeyleri belirlendi. Seviyeleri belirlenen TAS düzeyleri (mmol Trolox Equivalent/L) şeklinde ifade edildi (Erol vd., 2022).

2.2.3.2.Total Oksidan Statü (TOS) Düzeylerinin Analizi

Numunelerde TOS düzeylerini belirleyebilmek için, oksidatif strese sebep olabilecek türlerin toplam etkisini belirlemek üzere kullanılan ticari bir kit (Elabscience) kullanıldı. Kit protokolünde ifade edilen uygulamalar gerçekleştirildikten sonra numunelerin ve kitle birlikte temin edilen stok standartın dilüsyonu ile hazırlanan standartların (6,25 µmol H₂O₂/L; 12,5 µmol H₂O₂/L; 25 µmol H₂O₂/L; 50 µmol H₂O₂/L; 100 µmol H₂O₂/L) absorbans değerleri belirlendi. Standartların absorbans değerleri ve konsantrasyonları kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak numunelerde ölçülen TOS seviyeleri µmol hidrojenperoksit equivalent litre (µmol H₂O₂ Equiv./L) şeklinde ifade edildi.

2.2.3.3.Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Seviyelerinin Belirlenmesi

Bir ortamda bulunan oksidan ve antioksidan türlerin etkileri dikkate alınarak, ortamın oksidatif stres düzeyi (OSI) değerlendirilebilmektedir. Bu amaçla TOS ve TAS düzeyleri belirlendikten sonra bu veriler birbirlerine oranlanarak OSI değeri bulunmaktadır. Bu çalışmada da aynı yöntemle (OSI = TOS/TAS) oksidatif stres indeksi hesaplanmıştır (Hazman ve Bozkurt, 2015).

2.2.3.4.Redükte glutatyon (GSH) Tayini

Serum içerisinde SH (sülhidril) taşıyan bütün proteinler, presipitasyon (çöktürücü) çözeltisi ile çöktürülüp, süzülerek ayrıldı. GSH seviyeleri, süzüntüde SH gruplarının DTNB (5,5'-2-dithiobis nitrobenzoik asit) ile tepkime sonucu oluşan sarı rengin 412 nm dalga boyunda absorbansı ile ölçüldü (Buetler vd., 1963). Ölçülen absorbanslardan yararlanarak GSH standartları kullanılarak hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi ile örneklerin GSH konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçlar µmol/L şeklinde ifade edildi (Hazman vd., 2018).

2.2.3.5.Malondialdehit (MDA) Tayini

MDA tayini, iki molekül tiyobarbitürik asidin (TBA) bir molekül MDA ile asit ortamda reaksiyona girerek pembe renkli ürün oluşturması ve oluşan ürünün 535 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır (Yoshoiko vd., 1979). Çalışmada standart madde olarak tetraetoksipropan kullanıldı. Çalışma protokolü şu şekilde

uygulandı; 0,125 ml numune vida kapaklı cam tüpe kondu, üzerine 0,250 ml TBA eklenerek 30 dakika 95⁰C sıcaklıktaki su banyosunda bekletildi. Isıtma sonunda su banyosundan alınan tüpler buzlu suda soğutulularak, tüplere 1 ml n-bütanol ilave edildi. Son aşamada tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santifürüj edildi. Santifürüj sonunda TCA ile hazırlanan kör tüpüne karşı numunelerin ve standartların oluşturduğu çözeltilerin absorpsansları 535 nm'de belirlendi. MDA konsantrasyonları standart absorpsanslarının kullanılmasıyla oluşturulan kalibrasyon eğrisi aracılığı ile saptandı. Serum MDA düzeyleri µmol/L şeklinde ifade edildi (Hazman vd., 2018).

2.2.3.6.Nitrik oksit (NO) Tayini

Serum nitrik oksit miktarı Miranda vd.,'nin (2001) Griess yöntemi ile ölçüldü. Bu yöntem vanadium (III) klorür'ün 37⁰C'lik ortamda nitrati nitrite dönüştürmesi ve nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin olan sülfanilamid ile diazotizasyonu ve N-(1-naphthyl) ethylenediamin (NEDD) ile renkli bir azo türevi oluşturması ve 540 nm'de absorpsansının belirlenmesi esasına dayanır. Bu yöntemle NO düzeylerini belirlemek için önceden hazırlanmış ependorflara 50 µl plazma veya serum kondu. Üzerine 200 µl %70'lik etil alkol eklenerek vorteksle karıştırıldı. Bu karışım bir gece + 4⁰C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 3000 rpm'de santifürüj edilerek oluşan süpernatanttan 100 µl alınarak üzerine 100 µl vanadium klorür, 50 µl sülfanilamide ve son olarakta 50 µl NEDD eklendi. 30 dakika 40⁰C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede absorpsanslar belirlendi. Blank olarak distile su ile hazırlanan kör tübündeki çözelti kullanıldı. Belirlenen serum NO seviyeleri µmol(NO_x)/L şeklinde ifade edildi (Hazman vd., 2018).

2.2.3.7.Katalaz (CAT) Tayini

CAT enzim aktivitesi serumda Aebi (1974) metoduna göre manuel yöntemle çalışıldı. H₂O₂ 240 nm'de maksimum absorpsans vermektedir. Deney ortamına ilave edilen H₂O₂ CAT tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumda absorpsans azalması şeklinde göstermektedir. Absorpsanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Analizde fosfat tamponu (pH 7.50 mM) ve absorpsansı 0.500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan H₂O₂ fosfat tamponu (H₂O₂ çözeltisi) kullanıldı. Fosfat tamponuna göre 240 nm dalga boyunda sıfırlanan köre karşı H₂O₂ çözeltisinin absorpsansı 0.500'e ayarlandıktan sonra spektrofotometrede kinetik okuma

ile numunelerin absorbans değişimleri belirlendi. Bunun için numune ilavesi ile absorbans azalması her 15 saniyede bir defa olmak üzere 1 dakika süre ile kaydedildi. Absorbans azalmasının değerleri esas alınarak yapılan hesaplama ile CAT enzim aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar U/mL şeklinde ifade edildi (Hazman vd., 2018).

2.2.4. İstatiksel Metot

Biyokimyasal analiz sonucunda elde edilen veriler, SPSS 20 istatistik programı kullanılarak ilk önce ortalama \pm standart sapma şeklinde tanımlandı. Gruplar arasındaki istatistiki farkın varlığını ($p < 0.05$) belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde ise Duncan post testi kullanıldı.

Laboratuvar analizlerinden elde edilen veriler başlangıçta SPSS 25 istatistik programı kullanılarak ortalama \pm standart sapma (sd) olarak tanımlandı. İstatistiksel farklılıkların belirlenmesi için laboratuvar sonuçlarından elde edilen verilere normallik testi uygulandı. Normal dağılım gösteren gruplar arasında istatistiksel farkı belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ($p < 0,05$) ve farklılıkları değerlendirmek için son test olarak Duncan testi tercih edildi. Normal dağılım göstermeyen parametre verileri arasında istatistiksel fark olup olmadığını ($p < 0,05$) belirlemek için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren parametre verilerine Mann-Whitney U testi uygulanarak istatistiksel olarak farklı gruplar tespit edildi.

3. BULGULAR

Meme tümörü belirlenen 17 kedinin yaşları 8-14 (ortalama 10,7), kontrol grubundaki kedilerin ise 5'i 1 yaşlı, biri ise 13 yaşlıydı. Kedilerin tamamı dişiydi. Irk olarak 12 kedi tekir, 1 kedi tortoiseshell, 2 kedi calico, 1 kedi egzotik shorthair ve 1 kedi persian olarak belirlendi. Kedilerin 9'u kısırlaştırılmamış, 8'i ise yetişkin yaşta kısırlaştırılmıştı.

Vakaların boyutlarına bakıldığında, en küçüğü 3x2x3 cm çaplarındayken en büyüğü 6x6x7 cm çapındaydı. Aynı zamanda 17 vakanın 9'unda total mastektomi, 4'ünde tek zincir mastektomi uygulandı. Dördüne ise lezyonlu meme lobu alındı.

Çalışmada kullanılan operasyon materyalleri genellikle deriden taşkın, boz beyaz renkli ve elastik kıvamlıydı (Şekil 3.1). Bazı vakalar ülserli ve nekrotikti (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1: Adenokarsinom, kedi. Boz beyaz renkli kitle.

3.1. Histopatolojik Bulgular

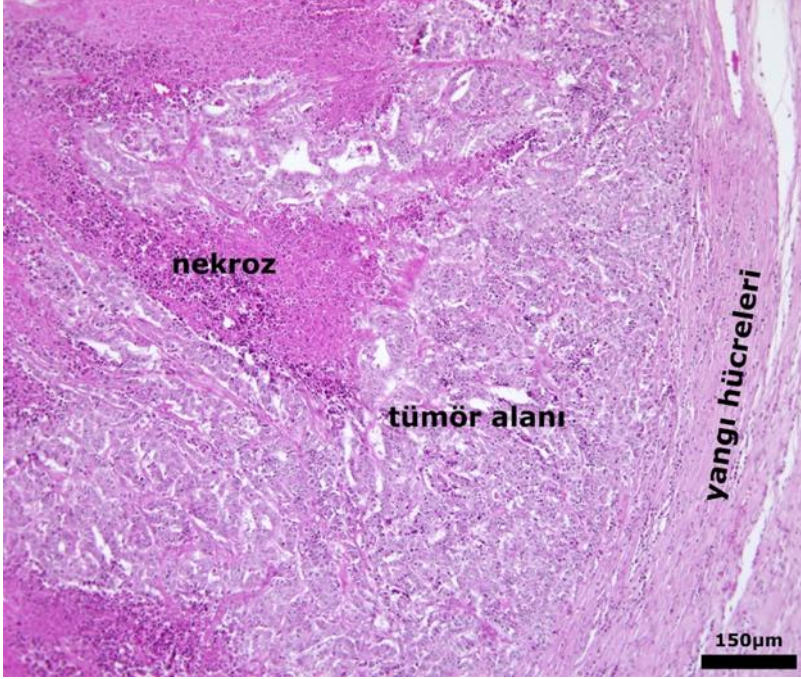
Vakaların 6'sı 1. Derece (Şekil 3.2.), 5'i 2. Derece (Şekil 3.3.) ve 6'sı de 3. Derece (Şekil 3.4.) tümör olarak değerlendirildi (Çizelge 3.1.). Vakalar Goldschmidt vd. (2017) kriterlerine göre histopatolojik olarak sınıflandırıldı. Bu sınıflandırmaya göre vakaların; 11'i tubuler adenokarsinom, 3'ü tubulopapillar karsinom, 2'si solid karsinom (1'i sikiröz tip) ve 1'i de papillar karsinom olarak bulundu (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1: Olguların ırk, yaş, kısırlaştırma durumuna göre dağılımı ve histopatolojik teşhisleri.

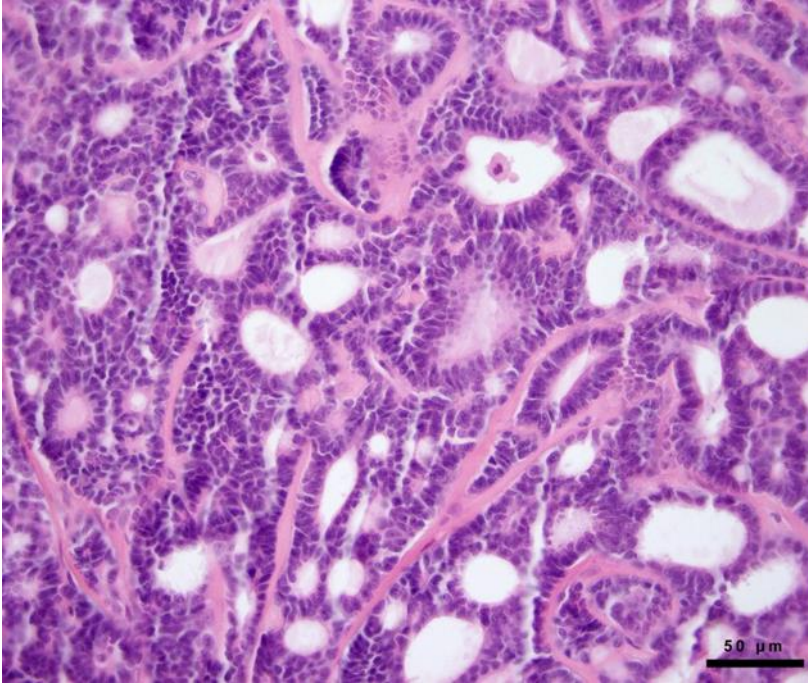
	Vaka numarası	İrk	Yaş (Yıl)	Kısırlaştırma durumu	Histopatolojik teşhis
Derece 1	No:1	Tekir	10	Kısırlaştırılmamış	Tubuler adenokarsinom
	No:2	Tekir	12	Kısırlaştırılmamış	Tubuler adenokarsinom
	No:3	Tekir	9	Kısırlaştırılmış*	Tubuler adenokarsinom
	No:4	Tekir	10	Kısırlaştırılmamış	Tubuler adenokarsinom
	No:5	Calico	11	Kısırlaştırılmış*	Tubulopapillar karsinom
	No:6	Tekir	8	Kısırlaştırılmış*	Tubuler

Derece 2	No:7	Tekir	9	Kısırlaştırılmamış	adenokarsinom Tubuler
	No:8	Tekir	11	Kısırlaştırılmış*	adenokarsinom Solid karsinom
	No:9	Tekir	12	Kısırlaştırılmış*	Tubuler adenokarsinom
	No:10	Egzotik shorthair	14	Kısırlaştırılmamış	Tubulopapillar karsinom
	No:11	Persian	11	Kısırlaştırılmamış	Tubuler adenokarsinom
	No:12	Tortoiseshell	10	Kısırlaştırılmış*	Solid karsinom (sikinöz tip)
Derece 3	No:13	Tekir	10	Kısırlaştırılmamış	Tubuler adenokarsinom
	No:14	Tekir	9	Kısırlaştırılmamış	Papiller karsinom
	No:15	Tekir	11	Kısırlaştırılmış*	Tubuler adenokarsinom
	No:16	Calico	12	Kısırlaştırılmış*	Tubuler adenokarsinom
	No:17	Tekir	14	Kısırlaştırılmamış	Tubulopapillar karsinom

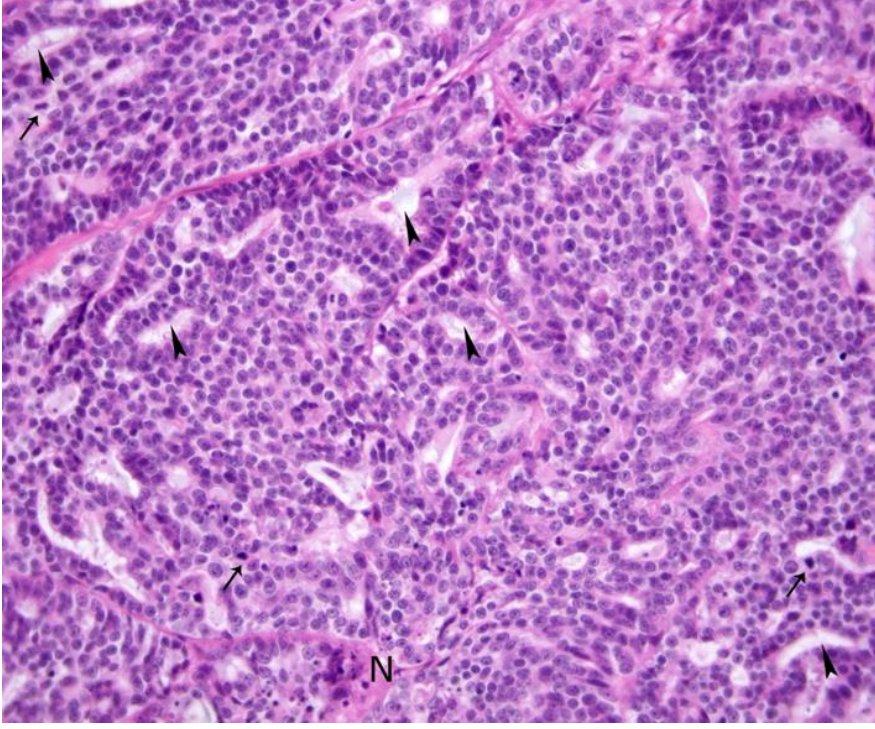
(*)Kısırlaştırma yaşı bilinmiyor.



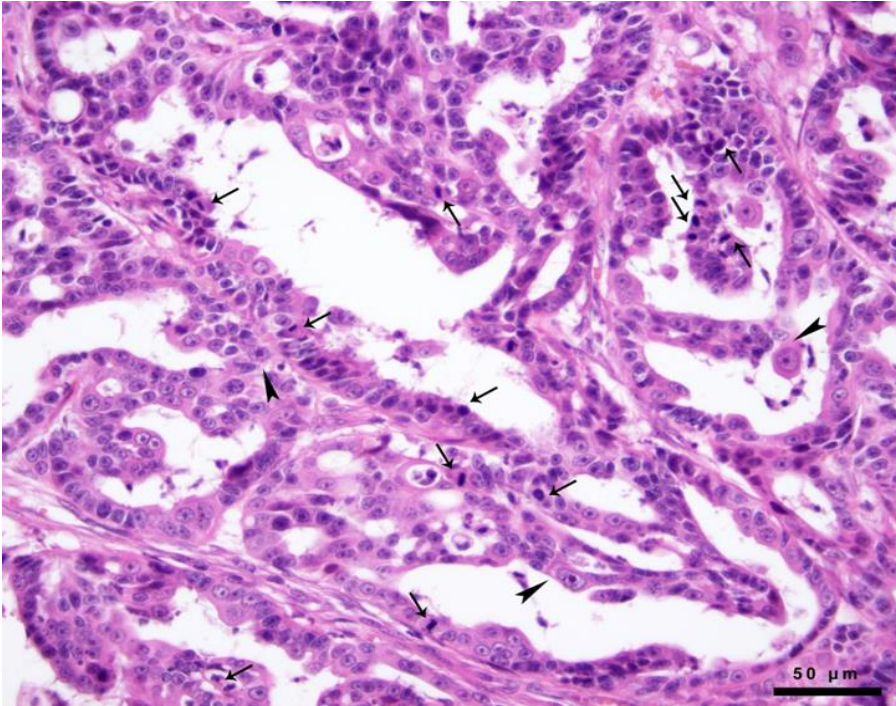
Şekil 3.2: Kedi meme adenokarsinomunun küçük büyültmede mikroskopik görünümü, merkezde nekroz sahaları, ortada karsinoma ait sahalar, periferde fibrozis ile beraber genellikle mononükleer hücrelerden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu. HE. Bar=gerçek uzunluk.



Şekil 3.3: Derece I meme adenokarsinomunun mikroskopik görünümü: tubuler yapılar halinde dizilim gösteren neoplazik hücrelerden oluşan alanlar. HE. Bar= gerçek uzunluk



Şekil 3.4: Derece II meme adenokarsinomunun mikroskopik görünümü: Kısmen korunmuş tubuler yapılar (ok başları) halinde orta seviyede mitoz gösteren (oklar), tümör nekrozu (N) içeren neoplazik alanlar. HE. Bar= gerçek uzunluk



Şekil 3.5: Derece III meme adenokarsinomunun mikroskopik görünümü: tubulopapiller yapılar halinde şiddetli pleomorfizm gösteren (ok başları), bol mitoz sergileyen (oklar) neoplazik hücreler. HE. Bar= gerçek uzunluk

3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

3.2.1. CD3 Skorlaması

CD3, T lenfositlerin sitoplazma ya da sitoplazma membranını boyayan bir parametredir. Tümör mikro çevresinde bulunan ve tümör içine invaze olmuş yangıyı değerlendirmek için her bir kesitte CD3 boyaması yapıldı. Her vakada CD3 boyaması pozitif olarak değerlendirildi. CD3 skorlaması için her bir kesitte rastgele 4 alan seçildi. Bu alanlardaki boyanan hücreler sayıldı. Hiç boya almayan alanlar (-) negatif, 0-25 hücre sayılanlar hafif (+), 25-50 hücre sayılan alanlar orta (++), 50-100 hücre sayılan alanlar yoğun (+++) ve 100 hücre üzeri sayılan alanlar ise şiddetli (+++++) pozitif olarak skorlandı. Buna göre derecelere göre CD3 pozitifliği Çizelge 3.2’te verildi.

Çizelge 3.2: Tümör derecelerine göre CD3 skorlaması

	No:1	No:2	No:3	No:4	No:5	No:6
Derece 1	22 (+)	20 (+)	18 (+)	14 (+)	9 (+)	17 (+)
	27 (++)	17 (+)	20 (+)	17 (+)	7 (+)	23 (+)
	31 (++)	21 (+)	24 (+)	8 (+)	19 (++)	19 (+)
	42 (++)	19 (+)	20 (+)	14 (+)	23 (++)	30 (++)
Ortalama	++	+	+	+	+	+
	No:7	No:8	No:9	No:10	No:11	
Derece 2	46 (++)	54 (+++)	37 (++)	14 (+)	31 (++)	
	35 (++)	49 (++)	36 (++)	7 (+)	37 (++)	
	22 (+)	63 (+++)	18 (+)	11 (+)	24 (+)	
	0 (-)	57 (+++)	32 (++)	26 (++)	19 (+)	
Ortalama	+	+++	++	+	+	
	No:12	No:13	No:14	No:15	No:16	No:17
Derece 3	76 (++++)	8 (+)	55 (++++)	33 (++)	27 (++)	51 (++++)
	84 (++++)	15 (+)	62 (++++)	34 (++)	15 (+)	39 (++)
	65 (++++)	30 (++)	42 (++)	42 (++)	39 (++)	33 (++)
	93 (++++)	14 (+)	26 (++)	38 (++)	14 (+)	38 (++)
Ortalama	+++	+	+++	++	++	++

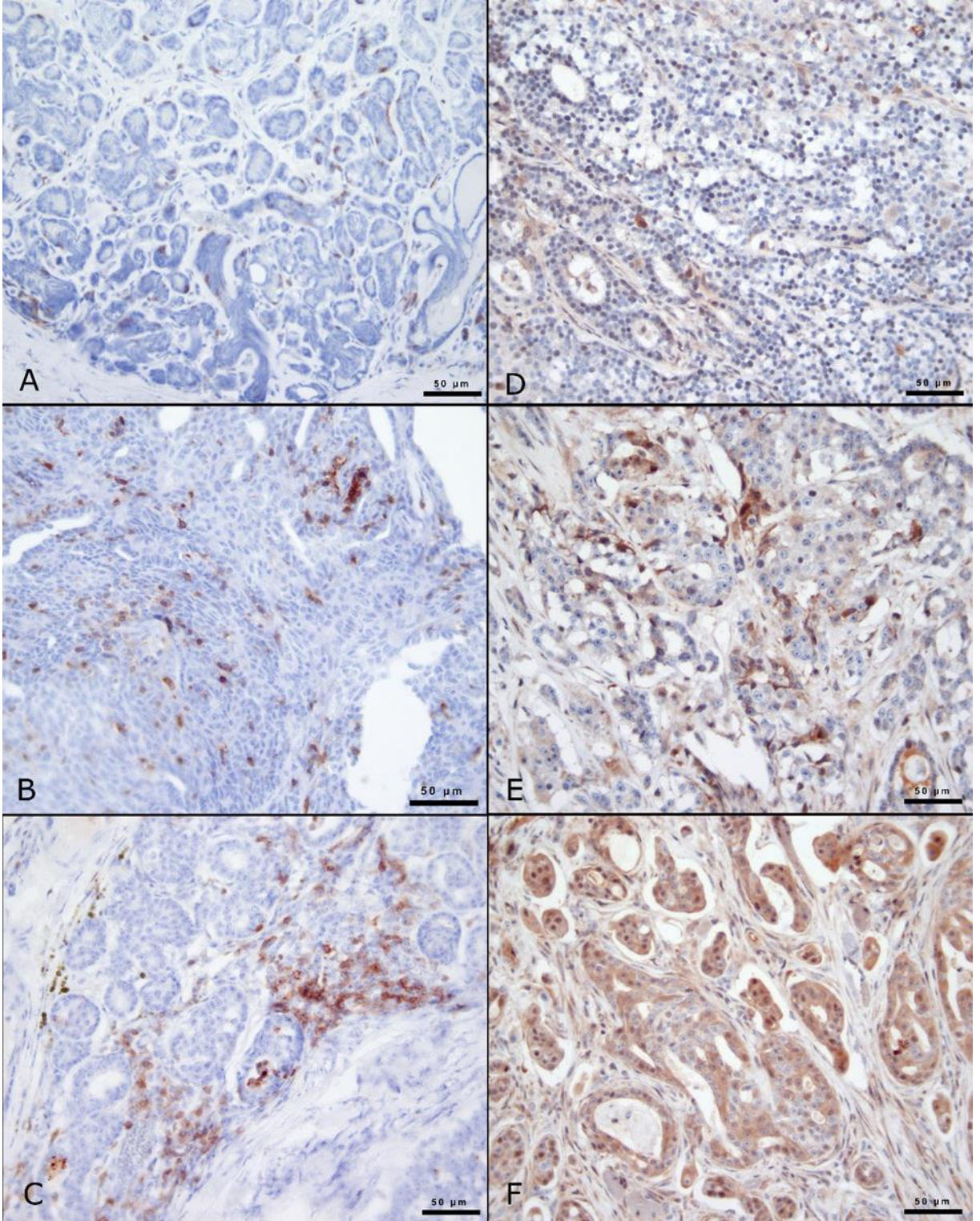
Kesitler üzerinde yapılan mikroskopik incelemelerde tümör etrafındaki nekrozun yoğun boyandığı görüldü. Derece 1 tümörlerde boyanma hafifken derece 2 olanlarda nispeten yoğundu. Derece 3 olanlarda ise yoğun boyanma tespit edildi. Derece 1 ve derece 3 tümörler arasındaki boyanma yoğunluğu farkı belirgindi (Şekil 3.6.).

3.2.2. Her Bir Tümör Derecesine Göre NF-K β Skorlaması

NF-K β yorumlaması yarı kantitatif olarak yapıldı. Boyanmış hücre grubu ekspresyonu ve boyama yoğunluğuna bakıldı. Her bir örnekte yüksek çözünürlüklü 4 alan sayıldı. Boyanmış hücrelere göre; yok (-), hafif (+), orta (++) ve yoğun (+++) olarak değerlendirme yapıldı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3: Tümör derecelerine göre NF-K β skorlaması

	No:1	No:2	No:3	No:4	No:5	No:6
Derece 1	++	+	++	+	++	+
	++	+	+	++	++	+
	+++	++	++	++	++	+
	+++	+	++	++	++	++
Ortalama	+++	+	++	++	++	+
	No:7	No:8	No:9	No:10	No:11	
Derece 2	+	++	++	++	++	
	+	+++	++	++	++	
	+	+++	+	++	++	
	++	+++	++	+	++	
Ortalama	+	+++	++	++	++	
	No:12	No:13	No:14	No:15	No:16	No:17
Derece 3	+++	++	+++	++	+++	+++
	+++	+++	++	++	+++	+++
	+++	+++	++	++	+++	+++
	++	+++	++	++	+++	+++
Ortalama	+++	+++	++	++	+++	+++



Şekil 3.6: CD3 ve NF-KB'nın tümör derecelerine göre IHC görünümü. Derece 1'de az sayıda ve dağınık CD3 pozitif lenfositler (A), Derece 2'de küçük gruplar halinde CD3 pozitif lenfositler (B) Derece 3'te ise büyük gruplar halinde CD3 pozitif lenfositler (C) görüldü.

İncelenen kesitlerin hepsinin çekirdek ve sitoplazmalarının pozitif boyandığı (Şekil 3.6.), derece 1 ve 2 tümörler arasında önemli bir farklılık yokken, derece 3 tümörlerin diğer derece tümörlere göre boyanma yoğunluğunda belirgin bir farklılık olduğu belirlendi.

3.2.3. Her Bir Tümör Derecesine Göre VEGF Skorlaması

Örneklerde VEGF skorlaması boyanma yoğunluğu ve yaygınlığı beraber değerlendirilerek yapıldı. Her bir örnekte 4 alan seçilerek bu alanlardaki hücreler sayıldı. Boyanmış hücrelere göre; yok (-), hafif (+), orta (++) ve yoğun (+++) olarak değerlendirme yapıldı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4: Tümör derecelerine göre VEGF skorlaması

	No:1	No:2	No:3	No:4	No:5	No:6
Derece 1	+	++	+	+	+	+
	+	++	+	++	+	++
	++	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	++
Ortalama	+	++	+	+	+	++
	No:7	No:8	No:9	No:10	No:11	
Derece 2	+	++	+	++	++	
	+	++	+	++	++	
	+	++	+	++	+	
	++	+++	++	++	+	
Ortalama	+	++	+	++	++	
	No:12	No:13	No:14	No:15	No:16	No:17
Derece 3	+	+++	+++	++	+++	++
	++	+++	++	++	+++	++
	++	+++	++	++	++	+++
	++	++	++	++	+++	+++
Ortalama	++	+++	++	++	+++	+++

Tüm kesitler pozitif olarak değerlendirilirken gruplar arasında belirgin farklılıklar görüldü. Derece 3 tümörlerin hem tümör çevresinde hem tümör içinde boyanma

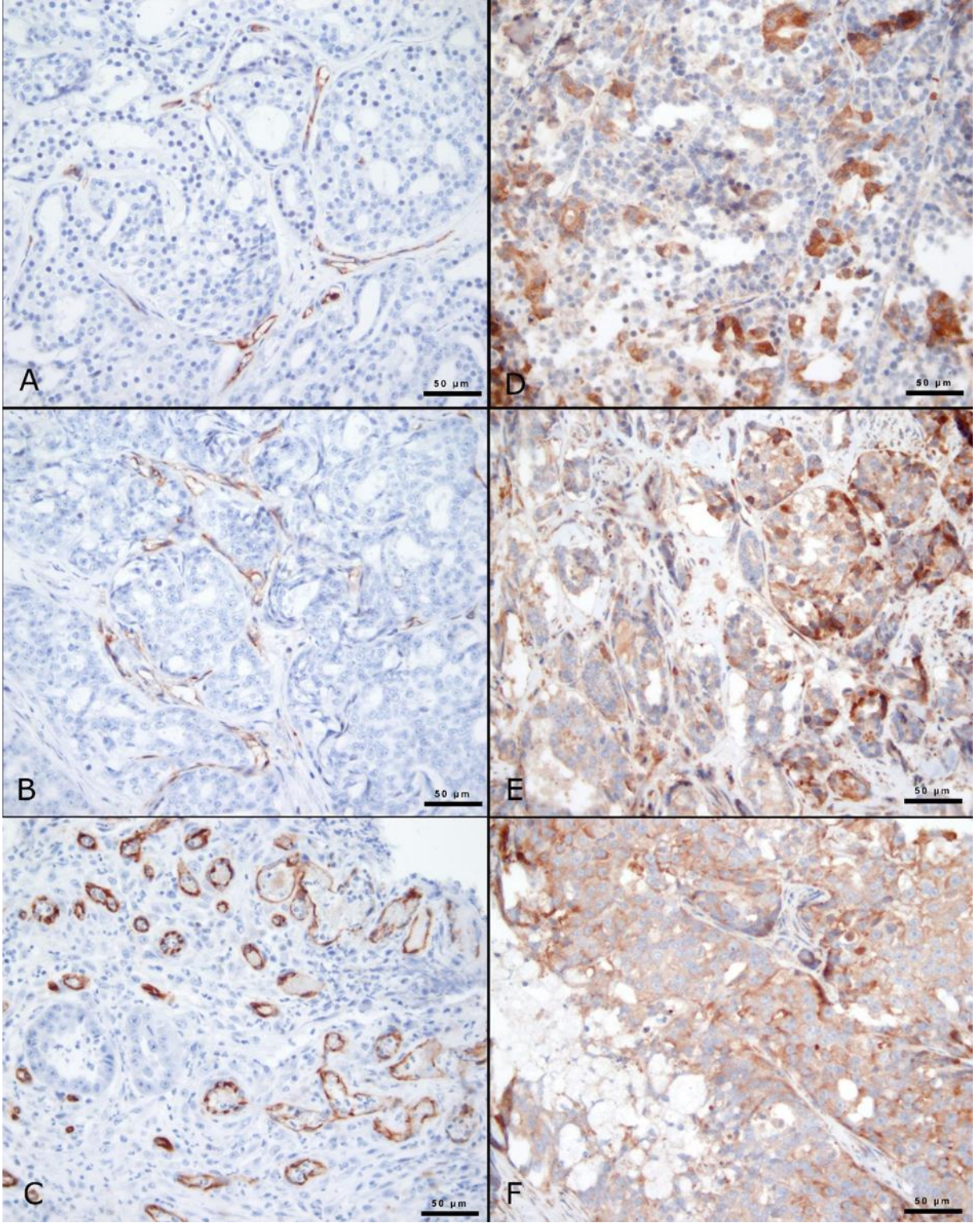
yoğunluğu ve yaygınlığı şiddetli olarak belirlendi. Derece 2 tümörler orta derecede boyanmışken derece 1 tümörlerin hafif boyandığı tespit edildi (Şekil 3.7.).

3.2.4. Her Bir Tümör Derecesine Göre CD31 Skorlaması

Mikro damar dansitesi belirlenmesi amacıyla değerlendirilen CD31 belirteci için her tümör kesitinde 4 alan sayıldı. Alanlardaki hücre sayımları ImageJ programı kullanılarak yapıldı. Alanlarda sayılan mikro damar miktarına göre skala oluşturuldu. Bu skalaya göre; hiç boya almayan alanlar (-) negatif, 0-25 hücre sayılanlar hafif (+), 25-50 hücre sayılan alanlar orta (++), 50-100 hücre sayılan alanlar yoğun (+++) ve 100 hücre üzeri sayılan alanlar ise şiddetli (++++) pozitif olarak skorlandı (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5: Tümör derecelerine göre CD31 skorlaması

	No:1	No:2	No:3	No:4	No:5	No:6
Derece 1	25 (+)	10 (+)	24 (+)	17 (+)	30 (++)	19 (+)
	19 (+)	9 (+)	27 (++)	11 (+)	20 (+)	24 (+)
	12 (+)	12 (+)	18 (+)	13 (+)	25 (+)	20 (+)
	25 (+)	22 (+)	16 (+)	10 (+)	22 (+)	24 (+)
Ortalama	+	+	+	+	+	+
	No:7	No:8	No:9	No:10	No:11	
Derece 2	9 (+)	20 (+)	11 (+)	19 (+)	20 (+)	
	16 (+)	17 (+)	10 (+)	14 (+)	15 (+)	
	24 (+)	15 (+)	15 (+)	13 (+)	18 (+)	
	18 (+)	17 (+)	18 (+)	14 (+)	20 (+)	
Ortalama	+	+	+	+	+	
	No:12	No:13	No:14	No:15	No:16	No:17
Derece 3	25 (+)	14 (+)	51 (+++)	22 (+)	28 (+)	17 (+)
	23 (+)	11 (+)	66 (+++)	19 (+)	9 (+)	15 (+)
	16 (+)	19 (+)	46 (++)	22 (+)	11 (+)	16 (+)
	15 (+)	13 (+)	26 (++)	13 (+)	26 (+)	15 (+)
Ortalama	+	+	++	+	+	+



Şekil 3.7: CD31 ve VEGF'in tümör derecelerine göre IHC görünümü. Derece 1 (A), Derece 2 (B) ve Derece 3 tümörlerde CD31 pozitifliği. VEGF ile boyamalarda Derece 1 (D), Derece 2 (E) ve Derece 3 (F) pozitif boyanma.

Tüm kesitlerde hafif pozitiflik belirlendi. Gruplar arasında farklılık yoktu. Tüm gruplarda tümör hücreleri hafif boyanırken periferdeki hücreler daha yoğundu (Şekil 3.7.). Sadece bir kesitte (no:15) yoğun boyanma tespit edildi.

3.2.5. Her Bir Tümör Derecesine Göre iNOS Skoruması

iNOS skoruması boyama yoğunluğuna bakılarak yapıldı. Her bir örnekte çözünürlüğü yüksek olan 4 alan sayıldı. Boyanmış hücrelere göre; yok (-), hafif (+), orta (++) ve yoğun (+++) olarak değerlendirme yapıldı (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6: Tümör derecelerine göre iNOS skoruması

	No:1	No:2	No:3	No:4	No:5	No:6
Derece 1	+	+	++	+	++	++
	+	++	+	+	+++	++
	+	+	+	+	++	+++
	-	+	++	+	+	++
Ortalama	+	+	++	+	++	++
	No:7	No:8	No:9	No:10	No:11	
Derece 2	++	+	++	+++	+	
	++	++	+	++	++	
	++	++	+++	++	+	
	+	++	+++	+++	+	
Ortalama	++	++	++	+++	+	
	No:12	No:13	No:14	No:15	No:16	No:17
Derece 3	++	++	+++	+++	+++	+++
	++	++	+++	+++	++	+++
	++	+++	+++	+++	++	+++
	++	+++	++	+++	+++	++
Ortalama	++	+++	+++	+++	+++	+++

Derece 1 kesitlerde tümör hücrelerinin periferinin ve yangı hücrelerinin ve bir kesitte makrofajların yoğun boyandığı belirlendi. Yine derece 2 preparatlarda da yangı hücrelerinin pozitif, tümör hücrelerinin negatif boyandığı, derece 3 kesitlerde ise tümör hücreleri, stroma ve bazal hücrelerin yoğun boyandığı tespit edildi. İncelenen tüm

kesitlerin boya aldığı ve her bir derecede boyanma açısından anlamlı farklılıklar olmadığı görüldü (Şekil 3.8.).

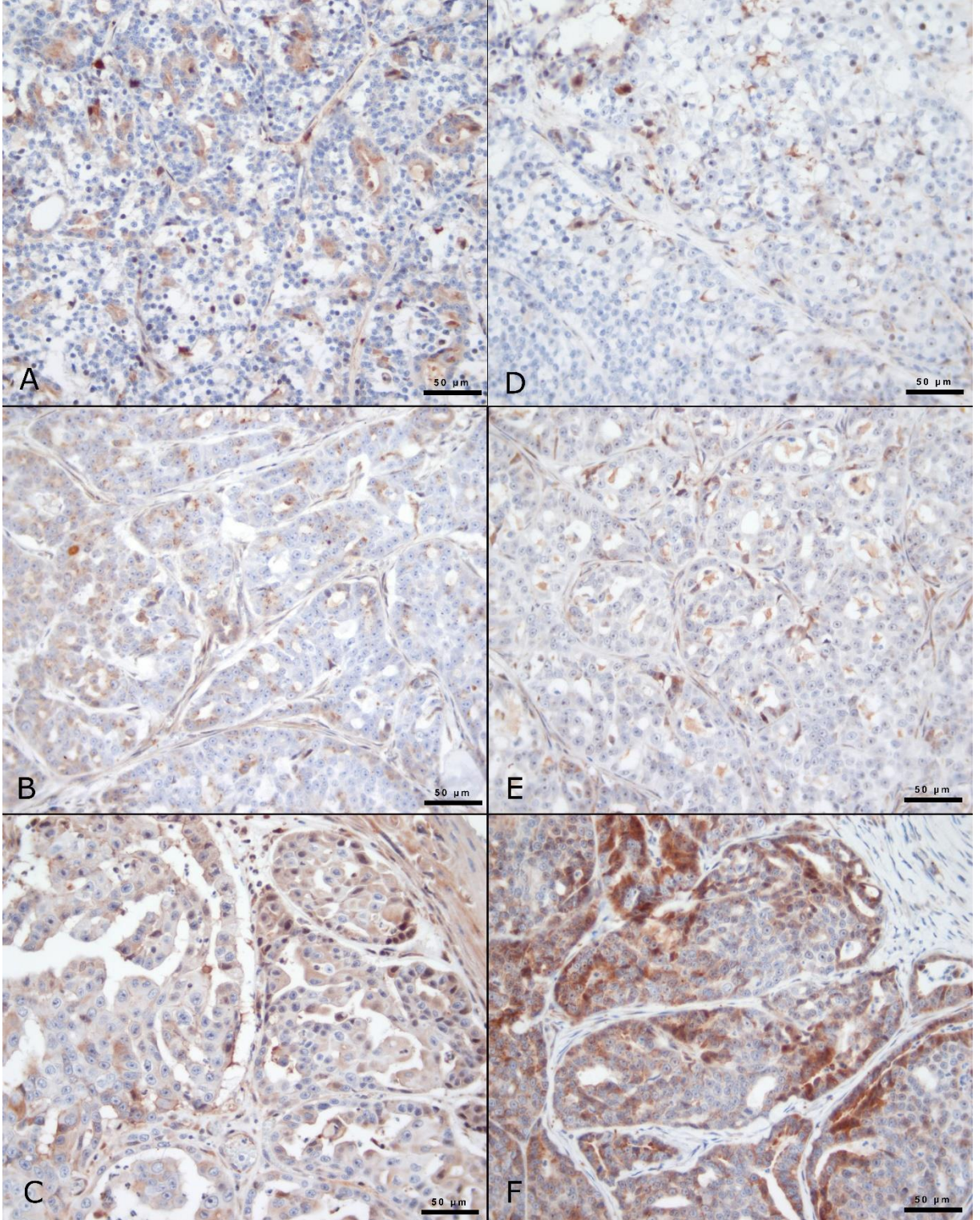
3.2.6. Her Bir Tümör Derecesine Göre HIF1- α Skorlaması

Örneklerde HIF1- α skorlaması boyanma yoğunluğu ve yaygınlığı beraber değerlendirilerek yapıldı. Her bir örnekte 4 alan seçilerek bu alanlardaki hücreler sayıldı. Boyanmış hücrelere göre; yok (-), hafif (+), orta (++) ve yoğun (+++) olarak değerlendirme yapıldı (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7: Tümör derecelerine göre HIF1- α skorlaması

	No:1	No:2	No:3	No:4	No:5	No:6
Derece 1	+	++	++	++	+	+
	+	+	++	+	+	+
	+	+	+	+	+	++
	+	+	+	++	+	+
Ortalama	+	+	++	++	+	+
	No:7	No:8	No:9	No:10	No:11	
Derece 2	++	++	++	+	++	
	++	++	+	+	++	
	++	++	+++	++	++	
	+	++	++	+	++	
Ortalama	++	++	++	+	++	
	No:12	No:13	No:14	No:15	No:16	No: 17
Derece 3	++	++	+++	+++	++	+++
	+++	+++	+++	+++	++	+++
	+++	+	+++	++	+++	++
	++	++	+++	+++	+++	+++
Ortalama	+++	++	+++	+++	++	+++

Derece 1 tümörlerin hafif, derece 2 tümörlerin orta derece ve derece 3 tümörlerin yoğun boyandığı belirlendi. Derece 3 tümörlerde tümör çekirdeklerinin pozitif reaksiyon verdiği ve genel olarak yangı hücrelerinin daha yoğun boyandığı tespit edildi (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8: iNOS ve HIF1- α 'nın tümör derecelerine göre IHC görünümü. (A-B-C): Sırasıyla tüm derecelerde iNOS'un yoğun olarak boyanması. HIF1- α Derece 1'de hafif (D), Derece 2'de orta (E) ve Derece 3'te belirgin şekilde yoğun (F) boyandı.

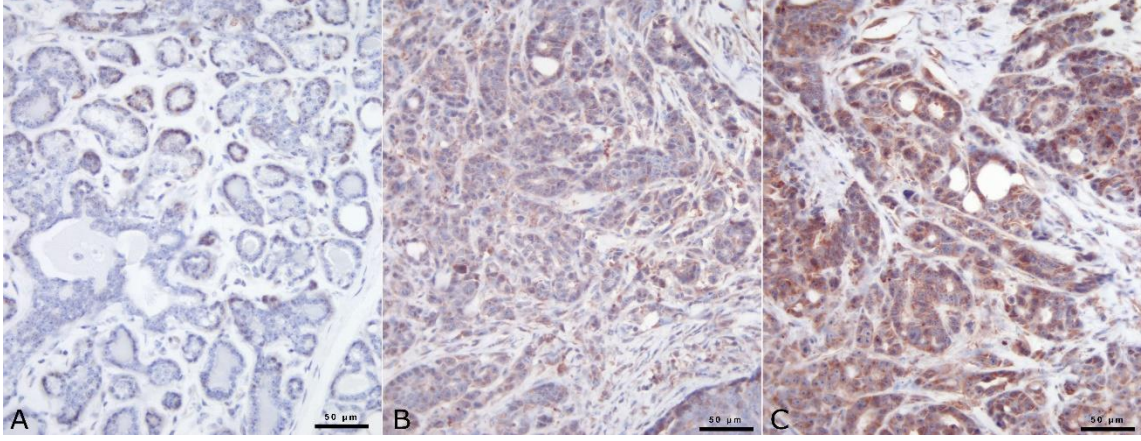
3.2.7. Her Bir Tümör Derecesine Göre 8OHdG Skorlaması

Örneklere 8OHdG skorlaması boyanma yoğunluğu ve yaygınlığı beraber değerlendirilerek yapıldı. Her bir örnekte 4 alan seçilerek bu alanlardaki hücreler sayıldı. Boyanmış hücrelere göre; yok (-), hafif (+), orta (++) ve yoğun (+++) olarak değerlendirme yapıldı (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8: Tümör derecelerine göre 8OHdG skorlaması

	No:1	No:2	No:3	No:4	No:5	No:6
Derece 1	++	++	++	+	++	++
	++	++	+	+	++	+
	++	++	+	+	++	+
	+	++	++	++	++	+
Ortalama	++	++	+	+	++	+
	No:7	No:8	No:9	No:10	No:11	
Derece 2	++	++	++	+	++	
	++	+	++	+	++	
	++	+	+	++	++	
	++	+++	++	++	++	
Ortalama	++	++	++	+	++	
	No:12	No:13	No:14	No:15	No:16	No:17
Derece 3	+++	++	+++	+++	+++	++
	++	++	+++	++	+++	++
	+++	+++	+++	+++	+++	++
	+++	+++	+++	++	+++	+++
Ortalama	+++	+++	+++	+++	+++	++

Genel olarak tüm derecelerdeki tümörlü hücrelerin çekirdeklerinin etkilendiği ve boyandığı belirlendi (Şekil 3.9.). Gruplar arasında anlamlı bir fark olmamasına rağmen derece 3 tümörlerin yoğun boyandığı gözlemlendi.

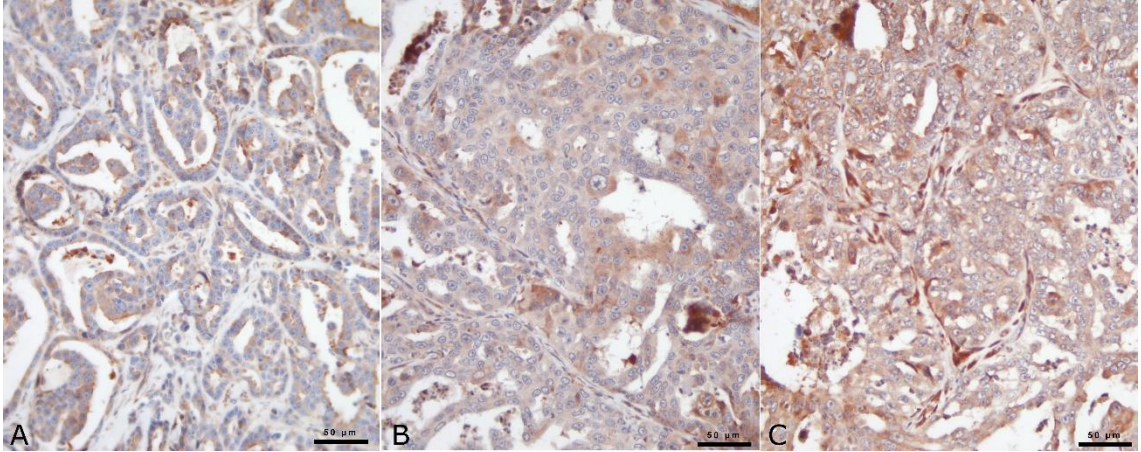


Şekil 3.9: 8OHdG'nin tümör derecelerine göre IHC görünümü. Tüm gruplar pozitif olarak boyanırken, derece 3 tümörlerin (C) derece 1 (A) ve derece 2 (B)'ye göre daha yoğun boyanma.

3.2.8. Her Bir Tümör Derecesine Göre TNF- α Skorlaması

Örneklerde TNF- α skorlaması boyanma yoğunluğu ve yaygınlığı beraber değerlendirilerek yapıldı. Her bir örnekte 4 alan seçilerek bu alanlardaki hücreler sayıldı. Boyanmış hücelere göre; yok (-), hafif (+), orta (++) ve yoğun (+++) olarak değerlendirme yapıldı (Çizelge 3.9).

İncelenen tüm kesitlerin pozitif olarak ve hem tümör hücrelerinin hem de tümör periferinin pozitif boyandığı belirlendi (Şekil 3.10.). Özellikle makrofajlarda şiddetli, miyoepitelde de belirgin boyanma fark edildi.



Şekil 3.10: TNF- α 'nın tümör derecelerine göre IHC görünümü. Tüm kesitlerde pozitif boyanma belirlendi.

Çizelge 3.9: Tümör derecelerine göre TNF- α skorlaması

	No:1	No:2	No:3	No:4	No:5	No:6
Derece 1	+	++	+++	++	-	++
	++	++	+++	+++	+	+++
	++	++	+++	+++	-	+++
	+	++	+++	+++	-	+++
Ortalama	++	++	+++	+++	-	+++
	No:7	No:8	No:9	No:10	No:11	
Derece 2	++	++	+++	+++	+++	
	++	++	++	++	++	
	++	++	++	+++	++	
	++	+++	++	++	+++	
Ortalama	++	++	++	+++	+++	
	No:12	No:13	No:14	No:15	No:16	No:17
Derece 3	+++	++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	++	+++	+++
Ortalama	+++	+++	+++	+++	+++	+++

3.2.9. Patoloji Bulgularının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler sonucunda her bir değer için derece 1 ve derece 2 tümörler arasında, NF-K β ve CD31 parametrelerinde gruplar arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi. Diğer parametreler için ise değerlendirme şu şekilde bulundu; CD3 parametresinde 1 ve 3 derece tümörler arasında, VEGF, iNOS, HIF-1 α ve 8OHdG parametrelerinde derece 3 tümörlerin derece 1 ve derece 2 tümörler arasında, TNF- α için ise derece 2 ve derece 3 tümörler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar ($p < 0,05$) olduğu tespit edildi (Çizelge 3.10.).

Çizelge 3.10: Patolojik analizlerinin istatistiksel sonuçları

GRUPLAR	Derece 1	Derece 2	Derece 3
CD3	1,167 ±0,408	1,600 ±0,894	2,167 ±0,753 ^a
NF-KB	1,833 ±0,752	2,000 ±0,707	2,667 ±0,516
VEGF	1,333 ±0,516	1,600 ±0,548	2,500 ±0,548 ^{a,b}
CD31	1,000 ±0,000	1,000 ±0,000	1,167 ±0,408
iNOS	1,500 ±0,548	2,000 ±0,707	2,833 ±0,408 ^{a,b}
HIF1-α	1,333 ±0,516	1,800 ±0,447	2,667 ±0,516 ^{a,b}
8OHdG	1,500 ±0,548	1,800 ±0,447	2,833 ±0,408 ^{a,b}
TNF-α	2,600 ±0,548	2,400 ±0,548	3,000 ±0,000 ^b

^a: Derece 1 ile istatistiksel fark vardır ($p<0,05$), ^b: Derece 2 ile istatistiksel fark vardır ($p<0,05$)

3.3. Biyokimyasal Bulgular

Biyokimyasal analizler sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 3.11’de verildi. Bu analizlere göre;

MDA parametresinde deney grupları arasında anlamlı farklılık yokken kontrol grubu ve derece 3 tümörler arasında anlamlı fark belirlendi. Yine kontrol grubu ve derece 1 ve derece 2 tümörler arasında anlamlı fark bulunamadı.

NO ve GSH parametrelerinde deney gruplarının kendi aralarında, kontrol grubu ve deney grupları arasında anlamlı fark yoktu.

TAS ölçümlerinde deney gruplarının kendi aralarında, kontrol grubu ve derece 1 ve derece 2 deney grupları arasında fark bulunamazken, kontrol grubu ile derece 3 tümörler arasında anlamlı fark vardı.

TOS ve OSI ölçümlerinde kontrol grubu ile tüm deney grupları arasında anlamlı fark varken deney grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı.

CAT ölçümünde kontrol grubu ile derece 2 ve derece 3 tümörler arasında fark yokken, kontrol grubu ile derece 1 tümörler arasında fark bulundu.

Çizelge 3.11: Biyokimyasal analizlerin istatistiksel sonuçları

Analizi Gerçekleştirilen Parametreler	Deney Grupları				P
	Kontrol	Derece I	Derece II	Derece III	
MDA (nmol/mL)	7,86 ±0,29 ^a	9,57 ±1,26 ^{a,b}	9,79 ±1,21 ^{a,b}	11,29 ±2,29 ^b	0,007
NO (µmolNOx/L)	182,61 ±55,06	205,53 ±42,91	199,32 ±39,21	187,44 ±47,98	0,847
GSH (µmol/L)	109,58 ±4,05	109,85 ±3,25	109,25 ±2,51	110 ±3,89	0,889
TAS (mmol Trolox Equivalent/L)	3,44 ±0,62 ^a	3,79 ±0,47 ^{a,b}	4,03 ±0,61 ^{a,b}	4,43 ±0,73 ^b	0,043
TOS (µmol H ₂ O ₂ Equiv./L)	40,17 ±15,86 ^a	108,92 ±26,98 ^b	110,65 ±21,82 ^b	129,53 ±27,58 ^b	0,000
OSI (Arbitrary unit)	12,11 ±5,39 ^a	29,29 ±9,34 ^b	27,35 ±3,42 ^b	29,83 ±7,49 ^b	0,000
CAT (U/L)	10,83 ±1,53 ^b	5,92 ±1,35 ^a	9,95 ±1,67 ^b	11,68 ±2,77 ^b	0,000

Veriler ortalama ± standard sapma şeklinde sunuldu (n=5-9). Aynı satırda bulunan deney grupları verileri arasındaki istatistiksel farklar, (p < 0,05) harflerle üst simge (^{a,b,c}) halinde ifade edilmiştir.

3.4. Histopatolojik, İmmunohistokimyasal ve Biyokimyasal Analizler Arasındaki İlişki

Oksidatif stres parametreleri olan MDA ve TOS ile OSI'nın özellikle derece 3 tümörlerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olduğu görüldü. Yine DNA'daki oksidatif hasarın göstergesi olan 8OHdG derece 3 tümörlerde derece 1 ve 2 olanlara göre farklıydı. Oksidatif stresin tetiklediği parametrelerden olan HIF-1 α 'nın derece 3 tümörlerde daha yoğun boyandığı ve anlamlı fark oluştuğu görüldü. Birbirini takip eden parametrelerde HIF-1 α 'nın aktive ettiği VEGF'in yine derece 3 tümörlerde daha yoğun olduğu belirlendi. Malignitelerde yüksek olduğu bilinen iNOS parametresi açısından derece 3 tümörlerin diğer derecelere göre daha yüksek olduğu belirlendi. Tümör yangısını gösteren CD3 değerinde derece 3 ve derece 1 tümörler arasında anlamlı fark varken yine yangı belirteçlerinden biri olan NF-K β her bir grupta boyandı ve gruplar arasındaki fark anlamlı değildi. Yangı parametrelerinden TNF- α derece 3 ve derece 2 tümörler arasında farklı bulundu.

Bu sonuçlar ışığında oksidatif stresin derece 3 tümörleri daha yoğun olduğu belirlendi. Bu tümörlerde diğer derecelere göre anlamlı olmasa da daha yoğun bir antioksidan cevap oluştuğu görüldü.

4. TARTIŞMA

Meme tümörleri insanlarda olduğu gibi kedi ve köpeklerde de çok sık karşılaşılan ve malignitesi çok yüksek tümörlerdir. Bu sebepten son zamanlarda yapılan çalışmalar, insan ve hayvanlarda görülen hastalığın sebeplerini ortaya çıkarmayı ve sebebe yönelik tedavi geliştirmeyi amaçlamaktadır.

Meme tümörü kedilerde en çok teşhis edilen üçüncü tip tümördür ve % 90'ı malign karakterlidir (Dorn vd., 1968; Hayes vd., 1981; Nordin vd., 2017; Cassali vd., 2020; Nascimento vd., 2020; Rosen vd., 2020; Zheng vd., 2020; Manoel vd., 2021; Moraes ve Borges, 2021). Hastalık daha çok dişi kedilerde bildirilmiştir ve siyam ırkı ve evcil kısa tüylü kedilerde yatkınlık belirtilse de ırk predispozisyonu çeşitlilik gösterir (Hayes ve Mooney, 1985; Ito vd., 1996). Kedi meme tümörlerinin en çok görüldüğü yaş grubu ortalama 10-12 yaşdır. FMC orta yaş ve yaşlı kedileri daha çok etkilemektedir (Dorn vd., 1968; Johnston vd., 2001; Kustritz, 2007). Bu çalışmaya dahil edilen kedilerin tamamı dişi olup, tümör belirlenen 17 kedinin 12'si tekir olarak belirlendi. Yine çalışmaya dahil edilen kedilerin yaş ortalaması 10,7 olarak bulundu. Bu bilgiler literatürlerle uyumlu olarak bulunmuştur.

Kedilerin reproduktif durumu meme tümörü etiolojisinde rol oynayan en önemli etkenlerden biridir. Hastalık en çok kısırlaştırılmamış (Misdorp vd., 1991; Overley vd., 2005) ya da 12 aylık yaştan sonra kısırlaştırılmış kedilerde görülmektedir (Overley vd., 2005; Nordin vd., 2017). Bu çalışmada kullanılan vakaların hepsi ya kısırlaştırılmamış ya da yetişkin yaşta kısırlaştırılmış kediler olduğu için bulduğumuz sonuçlar literatürle uyumludur.

Organizmada serbest radikal miktarı artarsa ve organizma bununla başa çıkamazsa oksidatif stres denilen durum ortaya çıkar. Bu durum da hücrelerdeki lipit, protein ve nükleik asitlerde yapısal değişikliklere sebep olur. Bu değişimler sonucunda kanser dahil olmak üzere birçok hastalık oluşabilmektedir (Kang, 2002; Yoshikawa ve Naito, 2002; Özer vd.,2019). Serbest radikaller lipidleri etkilediklerinde mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkilere sahip olanMDA şekillenir (İnt. Kyn. 1, Mercan, 2004). Kanser üzerine yapılan birçok çalışmada da MDA düzeyleri kanserli dokularda yüksek olarak bulunmuştur (Öztürk vd., 2000). Meme kanseri ile yapılan çalışmalarda, meme kanserinin etiolojisinde oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun önemli rol oynadığı

ve bu hastalarda MDA seviyelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Jelic vd., 2021). Yaptığımız çalışmada MDA değerlerinin kontrol grubu ile derece 3 tümörlerde anlamlı farklılık gösterdiğini belirledik. Bu sonuç literatürlerde belirtildiği gibi MDA'nın kanser gelişiminde rol oynayabileceğini göstermiştir fakat sonuçların daha anlamlı ve kesin olabilmesi için çalışmaların ve örneklem büyüklüğünün artırılması gerekir. Yapılan bu çalışmada total oksidan kapasitesindeki değişim gruplar arasında anlamlı değilken, grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında anlamlı bulunmuştur.

Total oksidan seviyesi oksidatif stresin toplam değerini verir. Yapılan bu çalışmada TOS seviyesinin tümör derecesi ile birlikte arttığı gösterilmiştir ve kontrol grubuna göre de belirgin bir yükseklik vardır. Bu sonuçlar literatürlerde (Zengin vd., 2022) belirtilen oksidatif stres ve kanser/malignite bilgileri ile uyumludur.

Oksidatif stres indeksi de yine oksidatif stresin yüksekliğini gösteren bir parametredir ve yapılan çalışmada tümör grupları arasında fark olmamasına rağmen kontrol grubu ile olan anlamlı fark oksidatif stresin kanser üzerindeki etkisini gösterebilmesi açısından değerlendirilebilecek bir parametredir.

Fizyolojik koşullarda NO post pubertal dönemde meme bezi gelişimi için çok önemli bir mediatördür ve indüktif koşullar altında iNOS tarafından sentezlenen yüksek NO seviyeleri antibakteriyal ve antitümöral fonksiyonlara aracılık eder (Islam vd., 2012). Dolayısıyla NO organizma için hem yararlı hem de zararlı etkileri olan serbest bir radikaldir (Islam vd., 2012; Derici ve Demirel-Yılmaz, 2017). Tümör anjiogenezisi, vasküler tonus ve geçirgenlik üzerindeki etkileri ile tümörlere kan akışına aracılık ettiği bilinmektedir (Islam vd., 2012).

Kedi meme tümörleri üzerine yapılan bu çalışmada nitrik oksit seviyelerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tümör gruplarında da normal olduğu görülmüştür. iNOS seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark olduğu için NO seviyelerindeki benzerliğin nitrik oksitin antitümöral etkisinden kaynaklanmasıyla açıklanabilir

Reaktif oksijen türlerinin organizmadaki hasarını yok etmeye çalışan mekanizmalar ise antioksidan mekanizmalardır (Süleyman vd., 2018). Birçok kanser çalışmasında MDA yükselirken (Yarıktaş vd., 2003; Pande vd., 2011; Jelic vd., 2021) CAT ve GSH enziminin düştüğünü göstermektedir (Yarıktaş vd., 2003). Akciğer kanserli hastalarda

da tümör dokusunda CAT enzimi düşüklüğü bildirilirken bazı çalışmalarda ise farklılıklar görülmemektedir (Öztürk vd., 2000). Meme kanseri üzerine yapılan çalışmalarda, meme tümörlü hastalarda antioksidan savunma mekanizmaları (SOD, CAT, GST ve GPx) zayıf ve serbest radikal aktivitesi de yüksek bulunmuştur (Jelic vd., 2021). Kedi meme tümörleri üzerine yaptığımız çalışmada tümör derecesinin arttığı dokularda CAT seviyesinin derece 1 tümörlere göre yüksek olduğu ve kontrol grubuna göre anlamlı farklılığın derece 1 tümörlerde görüldüğü belirlendi.

Total antioksidan kapasitesi plazmadaki antioksidan moleküllerinden büyük oranda etkilenmektedir ve tümörlü dokularda önemli derecede düşük olduğu belirlenmiş (Gupta vd., 2012; Zowczak-Drabarczyk vd., 2013). Ancak meme kanseri alt grupları arasında total antioksidan kapasitesinde önemli değişiklikler olmadığı tespit edilmiştir (Zowczak-Drabarczyk vd., 2013). Bu çalışmada antioksidan cevabı gruplar arasında farklılık göstermemektedir. Bu sonuç literatür bilgisi ile uyumluken kontrol grubuna göre TAS seviyeleri en güçlü olan grup derece 3 tümör grubu olarak belirlendi. Yüksek ROS seviyeleri apoptozisi desteklediği için kanser hücreleri metastaz sırasında hücre ölümünü engellemek amacıyla antioksidan kapasitelerini artırır (Ebrahimi vd., 2020). Bu bilgi derece 3 tümörlerin TAS seviyelerinin yüksekliğini açıklamaktadır.

DNA'da oksidatif hasardan kaynaklanan metabolitlerden biri 8-hidroksideoksi guanozindir. DNA'daki oksidatif hasarın yaygın bir ürünü ve oksidatif stresin ana belirteci olan 8-OHdG meme tümörleri başta olmak üzere birçok tümör tipinde tespit edilmiştir (Yoshikawa ve Naito, 2002). Sunduğumuz çalışmada tüm grupların pozitif boyandığı fakat derece 3 tümörlerin diğer derecelere göre nispeten daha yoğun boyandığı tespit edildi. İstatistiksel olarak da derece 3 tümörler ile diğer gruplar arasında anlamlı fark olduğu belirlendi. Bu sonuçların geçmiş çalışmalarda bulunan sonuçlar ile uyumlu olduğu belirlendi.

Yangının kanser gelişiminin en önemli bileşenlerinden biri olduğu bilinmektedir ve kanserin evre ve klinik görünümünü etkiler (Diakos vd., 2014; Nascimento ve Ferreira, 2021). Birçok tümörde yangı hücreleri, anjiogenezis, büyüme, tümör hücre migrasyonu, doku yıkımı ve yeniden yapılanma basamaklarını desteklemektedir (Lorusso ve Rüegg, 2008). Yapılan çalışmalar T lenfositlerin yangının önemli regülatörleri olduğunu ve TMC'de toplandıklarına vurgu yapmaktadır (Carvalho vd., 2015). Yaptığımız bu

çalışma T lenfositleri gösteren CD3 pozitifliğinin tümör malignitesi arttıkça yükseldiğini göstermiştir. Derece 1 ve derece 3 tümörler arasında hem boyanma yoğunluğu hem de istatistiksel olarak belirgin bir fark görülmüştür. Tümör malignitesi arttıkça yangısal T lenfosit cevabının arttığı da gösterilerek literatürlerle uyumlu bulunmuştur.

NF-K β yangısal cevapta önemli bir rol oynayan ve aynı zamanda yangı ile tümörigenezis arasındaki en önemli bağlantılardan biri olan bir faktördür. Bu faktör apoptotik genleri aktive eder (Martins vd., 2016). Hemen hemen her hücre tipinde bulunur (Zinatizadeh vd., 2021). Ayrıca 10 yaş ve üzeri köpeklerde yüksek NF-K β 'nin oksidatif stres ile pozitif korelasyonun bulunduğu ve bunun doku hasarı ve kronik yangı ile ilişkili olduğu görülmüştür. (Martins vd., 2016).

Bu çalışmada NF-K β 'nin tüm dereceli tümörlerde pozitif sonuç verdiği fakat 3. derece olanlarda daha yüksek yoğunlukta boyandığı görüldü. Fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Oksidatif stres ile pozitif korelasyonu olduğu bilinen bu parametrenin TOS sonuçları ile de uyumlu olduğu görüldü. Bu bilgiler ışığında her iki yangı belirteci olan CD3 ve NF-K β da birbiri ile uyumlu olarak bulundu. Gruplar arasındaki benzerlik bu parametrenin hemen her dokuda bulunması ile açıklanabilir.

iNOS normal şartlarda organizmada bulunmayan bir faktördür. Fakat yangı varlığında makrofaj ve fagositler (Mandelker, 2008) tarafından eksprese edilebilir. Karsinogeneziste rol oynadığı bilinmektedir (Derici ve Demirel-Yılmaz, 2017). Meme kanseri dahil birçok kanser tipinde iNOS ekspresyonunun arttığını ve aynı zamanda yüksek iNOS'un düşük sağ kalımla ilişkili olduğu çalışmalar ile gösterilmiştir (Granados- Principal vd., 2015). Meme tümörü olan kediler üzerinde yapılan bir çalışmada karsinomlu kedilerin tamamında %100 iNOS pozitifliği belirlenmiştir (Islam vd., 2012). Sunulan çalışmada iNOS antikorunun tüm kesitlerde boyandığı ama seviyelerin derece 3 tümörlerde çok yoğun olduğu görülmüştür. Bu yoğunluk derece 3 tümörler ile derece 1 ve derece 2 tümörler arasında istatistiksel olarak da gösterilmiştir. Bu veriler literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur.

İnsanlarda meme kanserleri sistemik yangısal bir hastalık olarak kabul görmektedir. Hastalıkta tümör ve tümör mikro çevresinde yangısal mediatörlerin arttığı

bilinmektedir. Bunlardan biri de TNF- α 'dır (Aral vd., 2014). TNF- α apoptozis ve yangısal süreçlerde rol oynar. Tümöral süreçte sadece tümör nekrozuna değil tümör gelişimine de katkı sağlamaktadır. Az salınımı kanser hücrelerinin gelişimini arttırırken fazla salındığında ise apoptozis veya nekroza sebep olur (Işık vd., 2008). Çalışmada TNF- α 'nın tüm kesitlerde yoğun olarak boyanmış fakat en yüksek yoğunluğun derece 3 tümörlerde olduğu görülmüştür. Bu fark hem mikroskopik muayenede hem de istatistiksel analizde belirlenmiştir. TNF- α genel olarak çalışmalar arasında farklı sonuçlar elde edilen bir parametredir ve standardizasyonu zordur. Yapılan bu çalışmada derece 2 tümörlerde en düşük seviyenin belirlenmesi (istatistiksel olarak) diğer çalışmalarla skorlama farkından ve derece 2 tümörlerde çalışmaya dahil edilen diğer gruplara göre daha az sayıda hayvan olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Anjiogenezis solid tümörlerin büyüme, invazyon ve metastazı için çok önemlidir (Millanta vd., 2002; Carmeliet, 2005). Tümörlerde anjiogenezisin anahtar mediatörü ise VEGF'dir. VEGF ve VEGF ilişkili angiogenezis tümör büyümesi ile ilişkili önemli bir faktördür (Carmeliet, 2005). VEGF'in kedi ve köpek meme tümörlerinde endotelial ve metastatik hücrelerden salındığı bildirilmiştir (Meuten, 2017). Yapılan bu çalışmada tüm kesitlerin VEGF pozitif boyandığı fakat malignite arttıkça boyanma yoğunluğunun arttığı görülmüştür. İstatistiksel veriler boyanma yoğunluğunu desteklemektedir. Derece 1 ve derece 3 tümörler arasında belirgin bir fark vardır. Bu sonuçlar kaynaklarda (Carmeliet, 2005; Meuten, 2017) belirtilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur.

Mikro damar dansitesi de anjiogenezis yoğunluğunu belirleyen bir ölçümdür ve birçok tümör tipinde ölçümü yapılmıştır. İnsan meme kanserlerinde bu değer artmasının metastaz ile ilişkisi olduğu bulunmuştur (Millanta vd., 2002). Bu çalışmada mikro damar dansitesini değerlendirmek için CD31 antikoru kullanıldı. Tüm gruplar pozitif boyanırken gruplar arasında boyanma yoğunluğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Millanta vd. (2002) farklı olarak bulunan sonuçların gözlemciye bağlı olarak seçilen vasküler sıcak nokta alanlarının seçimi, skorlama metotlarının farklılığının sebep olabileceği düşünüldü.

Kanser hücrelerini çevreleyen ortam oksijenden yetersiz, düşük besin ve glikoz seviyelerine sahiptir (Cuvier vd., 1997; Witz ve Levy, 2006). Kanser ortamının hiposik olmasını sağlayan HIF-1 α isimli, hipoksik koşullarda aktive edilen bir transkripsiyon

faktörü sorumludur (Goonewardene vd., 2002; Brahimi-Horn vd., 2011). VEGF, eritropoietin ve NOS HIF-1 tarafından aktive edilir. Böylece HIF-1 anjiogenezise de katılmış olur (Hanahan ve Folkman, 1996; Ruan vd., 2009; Finger ve Giaccia, 2010). Meme kanserli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada HIF-1 α 'nın yüksek, sağ kalımın da aynı oranda düşük olduğunu göstermiştir (Bos vd., 2003). Hipoksik koşullarda DNA'nın hasara karşı onarım mekanizmaları düzgün çalışmaz (Bindra ve Glazer, 2005) ve değişimler çok daha agresif tipte tümör oluşumuna zemin hazırlar (Weber ve Kuo, 2012). Yapılan bu çalışmada HIF-1 α 'nın derece 2 ve 3 kesitlerde daha yoğun boyandığı görüldü. Bu boyanma farklılığı istatistiksel olarak da belirlendi. Derece 3 tümörlerde diğerlerine göre anlamlı bir farklılık vardı. Bu bilgiler literatürlerle uyumlu olarak bulundu.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada malign kedi meme tümörlerine tümör mikro çevresi üzerine oksidatif stresin etkisi ve organizmanın antioksidan savunma mekanizmaları değerlendirilmiştir. Bu çalışma bu konu üzerine ülkemizde kedi meme tümörleri ile yapılan en kapsamlı çalışmadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekildedir.

Çalışmaya 17 meme tümörlü kedi dahil edildi. Histopatolojik olarak, bu kedilerin 6'sı derece 1, 5'i derece 2 ve 6'sı derece 3 olarak belirlendi. Yirmi bir kedinin yaş ortalaması 10,7 idi. Yaşları 8-14 yaş aralığındaydı. Irk olarak en fazla tekir ırkı kedide hastalık tespit edildi. Hastalık, kedilerin bazılarında tek meme lobundayken bazı kedilerde birkaç meme lobunda hastalık belirlendi.

Derece 1 tümörlerin 5'i tubuler adenokarsinom biri ise tubulopapillar karsinomdu. Derece 2 tümörler daha fazla çeşitlilik gösteriyordu. Bu tümörlerin 3'ü tubuler adenokarsinom, 1'i solid karsinom ve 1' de tubulopapillar karsinom olarak değerlendirildi. Derece 3 tümörler ise 2'si solid, 1'i papiller, 1'i tubulopapiller karsinom ve 2'si tubuler adenokarsinom olarak belirlendi.

Oksidatif stres, tümör oluşumu ve tümör mikro çevresi arasındaki karmaşık etkileşim ele alınacak olunursa yapılan bu çalışmada oksidatif stres belirteçlerinin (TOS, MDA ve 8OHdG) derece 3 tümörlerde diğerlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı zamanda meme tümörlerinde kilit tetikleyicilerden olan MDA ve 8OHdG'nin kontrol grubuna göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tümör yangısının tüm gruplarda olduğunun fakat derece 3 tümörlerde daha fazla görüldüğü belirlenmiştir. oksidatif stresin direkt etkilediği HIF-1 α yine malignite arttıkça daha yoğun olarak gözlemlenmiştir. Özellikle HIF-1 α 'dan etkilenen VEGF değerinin malignite arttıkça HIF-1 α ile doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür.

Elde edilen sonuçların tümü değerlendirildiğinde yapılan bu çalışma literatür bilgileri tarafından desteklenmekte ve aynı zamanda literatürleri de desteklemektedir. Türkiye'de kedi meme tümörü, tümör mikro çevresi, oksidatif stres ve antioksidan kapasiteyi de içeren en kapsamlı çalışmadır.

Sonuç olarak bu tez konusu altında incelenen parametrelerin tümörigenezdeki rolü kanıtlanmış ve bilinmektedir. Bu parametreler tümör mikro çevresinde birbiri ile bağlantılı ve tümör oluşumunu destekleyen parametrelerdir. Bu çalışmada da özellikle derece 3 tümörlerde bu etkileşim belirgin olarak görülmektedir. Alınan sonuçların daha kesin olabilmesi için ve tedavi seçenekleri oluşturulabilmesi açısından örneklem büyüklüğü genişletilebilir, coğrafi olarak daha fazla alanda çalışılarak ırk çeşitlendirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Aebi, H. (1974). Catalase in Methods of Enzymatic Analysis, Ed: Bergmeyer U, Academic Press New York and London, p: 673-677.
- Al-Halabi, R., Chedid, M.B., Merhi R.A., [El-Hajj, H.](#), [Zahr, H.](#), [Schneider-Stock, R.](#), [Bazarbachi, A.](#), [Gali-Muhtasib, H.](#) (2011). Gallotannin inhibits NF κ B signaling and growth of human colon cancer xenografts. *Cancer Biology and Therapy*, 12 (1): 59–68.
- Anadol, E., Yar Saglam, A.S., Gultiken, N., Karakas, K., Alçığır, E., Alkan, H., Kanca, H. (2017). Expression Of Inos, Cox-2 And VEGF In Canine Mammary Tumours And Non-Neoplastic Mammary Glands: Association With Clinicopathological Features And Tumour Grade. *Acta Veterinaria Hungarica*, 65(3): 382–393.
- Aral, A.L., Baştürk, B., Kurukahvecioğlu, O., Yamaç, D. (2014). Metastazı Olan ve Olmayan Meme Kanseri Hastalarında Anti-Endotel Hücre Antikoru Pozitifliği. *Turk J Immunol*, 2(1): 9-15.
- Bailey, K.M., Wojtkowiak, J.W., Hashim, A.I., Gillies, R.J. (2012). Targeting the metabolic microenvironment of tumors, *Adv. Pharmacol*, 65: 63.
- Barbieri, F., Wurth, R., Ratto, A., Campanella, C., Vito, G., Thellung, S., Daga, A., Cilli, M., Ferrai, A., Florio, T. (2012). Isolation of stem - like cells from spontaneous feline mammary carcinomas: phenotypic characterization and tumorigenic potential. *Exp Cell Res*, 318: 847-860.
- Beam, S.L., Rassnick, K.M., Moore, A.S., McDonough, S.P. (2003). An Immunohistochemical Study of Cyclooxygenase-2 Expression in Various Feline Neoplasms. *Vet Pathol*, 40: 496–500.
- Bindra, R.S., Glazer, P.M. (2005). Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutat Res*, 569(1-2): 75-85.
- Borrego, J.F., Cartagena, J.C., Engel, J. (2009). Treatment of feline mammary tumours using chemotherapy, surgery and a COX-2 inhibitor drug (meloxicam): a retrospective study of 23 cases (2002-2007). *Vet Comp Oncol*, 7: 213–221.
- Bos, R., van der Groep, P., Greijer, A.E., Shvarts, A., Meijer, S., Pinedo, H.M., Semenza, G.L., van Diest, P.J., van der Wall, E. (2003). Levels of Hypoxia-Inducible Factor-1 Independently Predict Prognosis in Patients with Lymph Node Negative Breast Carcinoma. *Cancer*, 97: 1573–81.
- Brahimi-Horn, M.C., Bellot, G., Pouyssegur, J. (2011). Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev*, 21(1): 67-72.
- Brunetti, B., Asproni, P., Beha, G., Muscatello, L.V., Millanta, F., Poli, A., Benazzi, C., Sarli, G. (2013) Molecular phenotype in mammary tumours of queens: correlation between primary tumour and lymph node metastasis. *J Comp Pathol*, 148: 206-213.
- Buetler, E., Dubon, O., Kelly, B.M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61: 882-888.

- Burrai, G.P., Mohammed, S.I., Miller, M.A., Marras, V., Pirino, S., Addis, F.M., Uzzau, S., Antuofermo, E. (2010). Spontaneous feline mammary intraepithelial lesions as a model for human estrogen receptor - and progesterone receptor - negative breast lesions. *BMC Cancer*, 10: 156.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology*, 69(3): 4–10.
- Carvalho, M.I., Pires, I., Dias, M., Prada, J., Gregório, H., Lobo, L., Queiroga, F. (2015). Intratumoral CD3+ T-Lymphocytes Immunoexpression and Its Association with c-Kit, Angiogenesis, and Overall Survival in Malignant Canine Mammary Tumors. *Hindawi Publishing Corporation Analytical Cellular Pathology*, DOI:10.1155/2015/920409.
- Carvalho, M.I., Pires, I., Prada, J., Ferreira, A.F., Queiroga, F.L. (2015). Positive Interplay Between CD3+ T-lymphocytes and Concurrent COX-2/EGFR Expression in Canine Malignant Mammary Tumors. *Anticancer Research*, 35: 2915-2920.
- Cassali, G.D., Serakides, R., Gartner, F., Schmitt, F.C. (2002). Invasive micropapillary carcinoma of the dog mammary gland. A case report. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 24: 366–369.
- Cassali, G.D., Jark, P.C., Gamba, C., Damasceno, K.A., Estrela-Lima, A., de Nardi, A.B., Ferreira, E., Horta, R.S., Firmo, B.F., Sueiro, F.A.R., Rodrigues, L.C.S., Nakagaki, K.Y.R. (2020). Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors. *Braz J Vet Pathol*, 13(3): 555–574.
- Castagnaro, M., Casalone, C., Bozzetta, E., De Maria, R., Biolatti, B., Caramelli, M. (1998). Tumour grading and the one-year postsurgical prognosis in feline mammary carcinomas. *J Comp Pathol*, 119:263–275.
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., Schumacker, P.T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J. Biol. Chem*, 275: 25130–25138.
- Chen, B., Je-Han Lin, S., Li, W., Chang, H., Pang, V.F., Chu, P., Lee, C.C., Nakayama, H., Wu, C.H., Jeng, C.R. (2020). Expression of HIF-1 α and VEGF in feline mammary gland carcinomas: association with pathological characteristics and clinical outcomes. *BMC Veterinary Research*, 16: 125 DOI:10.1186/s12917-020-02338-y.
- Costa, A., Scholer-Dahirel, A., Mechta-Grigoriou, F. (2014). The Role of Reactive Oxygen Species and Metabolism on Cancer cells and their Microenvironment. DOI:10.1016/j.semcancer.
- Crouch, J.E., Lackey, M.B. (1969). The mammary gland - Its structure, relationships and blood supply. In *Text-Atlas of Cat Anatomy*. Lea & Febinger, Philadelphia, PA, p: 183.
- Cuvier, C., Jang, A., Hill, R.P. (1997). Exposure to hypoxia, glucose starvation and acidosis: effect on invasive capacity of murine tumor cells and correlation with cathepsin (L + B) secretion. *Clin Exp Metastasis*, 15(1): 19-25.
- 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.
- Danforth, D.N. (2021). The Role of Chronic Inflammation in the Development of Breast Cancer. *Cancers*, DOI:10.3390/cancers13153918.

- de las Mulas, J.M., Millan, Y., Bautista, M.J., Perez, J., Carrasco, L. (2000). Oestrogen and progesterone receptors in feline fibroadenomatous change: an immunohistochemical study. *Res Vet Sci*, 68: 15-21.
- de las Mulas, J.M., van Niel, M., Millan, 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. *Domest Anim Endocrinol*, 18: 111–125.
- de las Mulas, J.M., van Niel, M., Millan, Y., Ordas, J., Blankenstein, M.A., van Mil, F., Misdorp, W. (2002). Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumourous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Research in Veterinary Science*, 72: 153-161.
- de Maria, R., Maggiora, P., Biolatti, B. (2002). Feline STK Gene Expression in Mammary Carcinoma. *Oncogene*, 21: 1785-90.
- del Prete, A., Schioppa, T., Tiberio, L., Stabile, H., Sozzani, S. (2017). Leukocyte tracking in tumor microenvironment. *Curr. Opin. Pharmacol*, 35: 40–47.
- Deome, K.B., Faulkin, L.J. Jr, Bern, H.A., Blair, P.B. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland - free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res*, 19: 515-520.
- Derici, M.K., Demirel-Yılmaz, E. (2017). Nitrik oksitin kanser gelişimi ve metastaz üzerine etkileri. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 74(2): 161–174.
- Diakos, C.I., Charles, K.A., McMillan, D.C., Clarke, S.J. (2014). Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol*, 15: 493–503.
- Djordjeic, V.B. (2004). Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol*, 237: 57–89.
- Dorn, C.R., Taylor, D.O., Frye, F.L., Hibbard, H.H. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. I. Methodology and description of cases. *J Natl Cancer Inst*, 40: 295–305.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell production. *Physiol Rev*, 82: 47–95.
- [D'Souza, L.C., Mishra, S., Chakraborty, A., Shekher, A., Sharma, A., Gupta, S.C. \(2020\). Oxidative Stress and Cancer Development: Are Noncoding RNAs the Missing Links?. *Antioxidants & Redox Signaling*, 33\(17\): 1209-1229.](#)
- Ebrahimi, S.O., Reisi, S., Shareef, S. (2020). miRNAs, oxidative stress, and cancer: A comprehensive and updated review. *J Cell Physiol*, 235(11): 8812-8825..
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Haggstrom, J., Holst, B.S., Möller, L., Nødtvedt, A. (2010). Morbidity of insured Swedish cats during 1999-2006 by age, breed, sex, and diagnosis. *J Feline Med Surg*, 12: 948–959.
- Erol, I., Hazman, Ö., Aksu, M., Bulut, E. (2022). Synergistic effect of ZnO nanoparticles and hesperidin on the antibacterial properties of chitosan. *Journal of biomaterials science*, DOI:10.1080/09205063.2022.2099668.
- Eurell, J.A., Frappier, B.L. (2006). Dellmann's Textbook of Veterinary Histology. 6th Ed., Blackwell Publishing, USA.

- Ferrara, N., Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161: 851-855.
- Ferrara, N. (2005). VEGF as a Therapeutic Target in Cancer. *Oncology*, 69(3): 11–16.
- Ferrara, N. (2009). VEGF-A: A critical regulator of blood vessel growth. *Eur. Cytokine Netw*, 20: 158–163.
- Ferreira, E., Campos, M.R.A., Nakagaki, K.Y.R., Cassali, G.D. (2017). Prognostic and Predictive Markers in Breast Cancer. *Canine Mammary Pathology: From diagnosis to treatment. São Paulo Med Vet*, 141-49.
- Finger, C.E., Giaccia, A.J. (2010). Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev*, 29: 285-293.
- Gama, A., Gartner, F., Alves, A., Schmitt, F. (2009). Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res Vet Sci*, 87: 432-437.
- Gameiro, A., Urbano A.C., Ferreira, F. (2021). Emerging Biomarkers and Targeted Therapies in Feline Mammary Carcinoma. *Vet. Sci*, [DOI:10.3390/vetsci8080164](https://doi.org/10.3390/vetsci8080164).
- Ghosh, R.K. (2013). *Essential of Veterinary Histology and Embryology*. 2nd ed. The Indian Press, Kolkata.
- Gimenez, F., Hecht, S., Craig, E.L., Legendre, A.M. (2010). Early Detection, Aggressive Therapy Optimizing the Management of Feline Mammary Masses. *J Feline Med Surg*, 12: 214-224.
- Goldschmidt, M.H., Pena, L., Zappuli, V. (2017). Tumors of the Mammary Gland. *Tumors in Domestic Animals*. 5th ed., Wiley Blackwell, p: 731-773.
- Goonewardene, T.I., Sowter, H.M., Harris, A.L. (2002). Hypoxia-induced pathways in breast cancer. *Microsc Res Tech*, 59(1): 41-8.
- Granados-Principal, S., Liu, Y., Guevara, M.L., Blanco, E., Choi, D.S., Qian, W., Patel, T., Rodriguez, A.A., Cusimano, J., Weiss, H.L., Zhao, H., Landis, M.D., Dave, B., Gross, S.S., Chang, J.C. (2015). Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 17: 25. DOI:10.1186/s13058-015-0527-x.
- Gupta, R.K., Patel, A.K., Kumari, R., Chugh, S., Shrivastav, C., Mehra, S., Sharma, A.N. (2012). Interactions between oxidative stress, lipid profile and antioxidants in breast cancer: A case control study. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13: 6295-8.
- Gutteridge, J.M.C. (1995). Lipid-Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue-Damage. *Clinical Chemistry*, 41: 1819-1828.
- Gültiken, N. (2016). Meme Hastalıkları. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics*, 2: 2.
- Hahn, K.A., Adams, W.H. (1997). Feline mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis, and treatment alternatives. *Feline Pract*, 25: 5–11.
- Hamilton, J.M., Else, R.W. (1976). Oestrogen receptors in feline mammary carcinomas. *Veterinary Record*, 99: 477-479.

- Hanahan, D., Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3): 353-364.
- Hayden, D.W., Barnes, D.M., Johnson, K.H. (1989). Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate treated and untreated cats: a retrospective study. *Vet Pathol*, 26: 104-113.
- Hayes, H.M., Jr Milne, K.L., Mandell, C.P. (1981). Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *Vet Rec*, 108: 476-479.
- Hayes, A.A., Mooney, S. (1985). Feline mammary tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 15: 513-520.
- Hazman, Ö., Bozkurt, M.F. (2015). Anti-inflammatory and Antioxidative Activities of Safranal in the Reduction of Renal Dysfunction and Damage that Occur in Diabetic Nephropathy. *Inflammation*, 38(4): 1537-45.
- Hazman, Ö., Bozkurt, M.F., Fidan, A.F., Uysal, F.E., Çelik, S. (2018). The Effect of Boric Acid and Borax on Oxidative Stress, Inflammation, ER Stress and Apoptosis in Cisplatin Toxication and Nephrotoxicity Developing as a Result of Toxication. *Inflammation*, 41(3): 1032-1048.
- Horvath, M.M., Wang, X., Resnick, M.A., Bell, D.A. (2007). Divergent Evolution of Human p53 Binding Sites: Cell Cycle versus Apoptosis. *PLOS Genet.* 3:e127.
- Hughes, K., Dobson, J.M. (2012). Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. *Vet J*, 194: 19-26.
- Indra, Manginstar, C., Islam, A.A., Sampepajung, D., Hamdani, W., Bukhari, A., Syamsu, S.A., Prihantono, Smaradania, N., Faruk, M. (2021). The relationship between NFKB, HER2, ER expression and anthracycline -based neoadjuvan chemotherapy response in local advanced stadium breast cancer: A cohort study in Eastern Indonesia. *Annals of Medicine and Surgery*, DOI: 10.1016/j.amsu.2021.02.010.
- Islam, M.S., Matsumoto, M., Hidaka, R., Miyoshi N., Yasuda, N. (2012). Expression of NOS and VEGF in feline mammary tumours and their correlation with angiogenesis. *The Veterinary Journal*, 192: 338-344.
- İşık, G., Demirezen, Ş., Beksaç, M.S. (2008). Tümör Nekroz Faktör ve Servikal Kanser Bağlantısı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1(2): 55-61.
- Ito, T., Kadosawa, T., Mochizuki, M., Matsunaga, S. (1996). Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. *J Vet Med Sci*, 58: 723-726.
- Janssen - Heining, Y.M., Mossman, B.T., Heintz, N.H., Forman, H.J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., van derVliet, A. (2008). Redox - based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(1): 1-17.
- Jelic, M.D., Mandic, A.D., Maricic, S.M., Srdjenovic, B.U. (2021). Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of Cncer Research and Therapeutics*, 17(1): 22-28.
- Jenkins, D.C., Charles, I.G., Thompson, L.L., Moss, D.W., Holmes, L.S., Baylis, S.A., Rhodes, P., Westmore, K., Emson, P.C., Moncada, S. (1995). Role of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci*, 92: 4392-4396.
- Jeon, S.M., Chandel, N.S., Hay, N. (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*, 485(7400): 661-665.

- Jeziarska-Drutel, A., Rosenzweig, S.A., Neumann, C.A. (2013). Role of Oxidative Stress and the Microenvironment in Breast Cancer Development and Progression. *Advances in Cancer Research*, 119: 107-25.
- Johnston, S.D., Hayden, D.W., Kiang, D.T., Handschin, B., Johnston, K.H. (1984) Progesterone receptors in feline mammary adenocarcinomas. *American Journal of Veterinary Research*, 45:379-384.
- Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R., Olson, P.N.S. (2001). Disorders of the mammary gland of the queen. *Canine and feline theriogenology*. Saunders, Philadelphia, p: 474-485.
- Joseph, R.B. (2002). *Encyclopedia of Cancer: Volume 1 A-R*. Academic Press, New York.
- Kang, H.D. (2002). Oxidative Stress, DNA Damage, and Breast Cancer. *AACN Clinical Issues*, 13(4): 540-549.
- Karabulut, H., Gülay, M.Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1): 50-59.
- Keith, R., Laderoute, R.M., Alarcon, M.D., Brody, J.M., Calaoagan, E.Y., Chen, A., Merrill K., Yun, Z., Denko, N.C., Giaccia, A.J. (2000). Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. *Clinical Cancer Research*, 6(7): 2941-2950.
- Kirkman, H.N., Gaetani, G.F. (1984). Catalase - a Tetrameric Enzyme with 4 Tightly Bound Molecules of Nadph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 81: 4343-4347.
- Koca, N., Karadeniz, F. (2003). Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16: 32-37.
- Koç, M., Ediger, D., Budak, F., Karadağ, M., Oral, H.B., Uzaslan, E., Ege, E., Gözü, R.O. (2006). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) elevated in serum but not in bronchial lavage fluid in patients with lung cancer. *Tumori*, 92(2): 149-154.
- Kruk, J. (2014). Overweight, Obesity, Oxidative Stress and the Risk of Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(22): 9579-9586.
- Kustritz, M.V. (2007). Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 231: 1665-1675.
- Küçükbeğir, Ç.N., Uçmak, Z.G., Kırşan, İ., Tek, Ç. (2020). A case of feline fibroepithelial hyperplasia in a male cat. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*, 4(1): 8-12.
- Lana, S.E., Rutteman, G.R., Withrow, S.J. (2007). Tumors of the mammary gland. In Withrow SJ, Vail DM, editors: *Small animal clinical oncology*, Elsevier, St Louis, p: 619-636.
- 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. *Vet Pathol*, 46: 1275-1280.
- Leek, R.D., Landers, R., Fox, S.B., Harris, A., Lewis, C.E. (1998). Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. *British Journal of Cancer*, 77(12): 2246-2251.
- Liebich, H.G. (2019). *Veterinary Histology of Domestic Mammals And Birds*. Textbook and Colour Atlas. 5th Ed., 5M Publishing, UK.

- Liotta, L.A., Kohn, E.C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411(6835): 375-9.
- Little, E.S. (2016). August's Consultations in Feline Internal Medicine. 7th ed., Elsevier, USA, p:578-582.
- Loretti, A., Ilha, M., Ordas, J., de las Mulas, J.M. (2005). Clinical, pathological and immunohistochemical study of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of depot medroxyprogesterone acetate. *J Feline Med Surg*, 7: 43-52.
- Lorusso, G., Rüegg, C. (2008). The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol*, 130: 1091-1103.
- MacEwen, E.G., Hayes, A.A., Mooney, S. (1984). Evaluation of Effect of Levamisole on Feline Mammary Cancer. *J Biol Response Mod*, 3: 541-46.
- Maimela, N.R., Liu, S., Zhanga, Y. (2019). Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17: 1-13.
- Mandelker, L. (2008). Introduction to Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Vet Clin Small Anim*, 38: 1-30.
- Manoel, C.V., de Carvalho, P.L.T., Govoni, V.M., da Silva, T.C., Queiroga, F.L., Cogliati, B. (2021). Immunoexpression and Prognostic Significance of Multidrug Resistance Markers in Feline Mammary Carcinomas. *J. Comp. Path*, 183: 13-25.
- Mao, G.D., Thomas, P.D., Lopaschuk, G.D., Poznansky, M.J. (1993). Superoxide-Dismutase (Sod)-Catalase Conjugates - Role of Hydrogen-Peroxide and the Fenton Reaction in Sod Toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 416-420.
- Marnett, L.J. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181: 219-222.
- Martinez-Outschoorn, U.E., Trimmer, C., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Chiavarina, B., Zhou, J., Wang, C., Pavlides, S., Martinez-Cantarín, M.P., Capozza, F., Witkiewicz, A.K., Flomenberg, N., Howell, A., Pestell, G.R., Caro, J., Lisanti, M.P., Sotgia, F. (2010). Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival Role of hypoxia, HIF1 induction and NFκB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle*, 9(17): 3515-3533.
- Martins, G.R., Gelaleti, G.B., Moschetta, M.G., Maschio-Signorini, L.B., Ap, D., Zuccari, P.C. (2016). Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines Mediated by NF-κB Factor as Prognostic Markers in Mammary Tumors. DOI:10.1155/2016/9512743.
- Matos, A.J., Faustino, A.M., Lopes, C., Rutteman, G.R., Gartner, F. (2006). Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Vet Rec*, 158: 626-630.
- Melchor, L., Benitez, J. (2008). An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familiar breast cancer subtypes. *Carcinogenesis*, 29: 1475-1482.
- Mercan, U. (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU Vet Fak Derg*, 15(1-2): 91-96.
- Meuten, D.J. (2017). Tumors in Domestic Animals. In D. J. C. of V. M. Meuten, N. C. S. University, & U. Raleigh, NC (Eds.), *Tumors in Domestic Animals*. 5th ed., John Wiley & Sons, Inc, p:723-765.

- Millanta, F., Lazzeri, G., Vannozzi, I., Viacava, P., Poli, A. (2002). Correlation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression to Overall Survival in Feline Invasive Mammary Carcinomas. *Vet Pathol*, 39: 690–696.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I., Poli, A. (2005) Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci*, 79: 225-232.
- 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: 350–357.
- Millanta, F., Asproni, P., Canale, A., Citi, S., Poli, A. (2014). COX-2, mPGES-1 and EP2 receptor immunohistochemical expression in canine and feline malignant mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, DOI:10.1111/vco.12096.
- Mills, S.W., Musil, K.M., Davies, J.L., Hendrick, S., Duncan, C., Jackson, M.L., Kidney, B., Philibert, H., Wobeser, B.K., Simko, E. (2015). Prognostic value of histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis. *Vet Pathol*, 52(2): 238–249.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, A.D. (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1): 62-71.
- Misdorp, W., Romijn, A., Hart, A.A. (1991). Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. *Anticancer Res*, 11: 1793–1797.
- Misdorp, W., Else, R.W., Hellmen, E., Lipscomb T.P. (1999). Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat. 2nd ed., Armed Forces Institute of Pathology, Washington.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends Plant Sci*, 22(1): 11-9.
- Mizejewski, G.J. (2019). Breast cancer, metastasis, and the microenvironment: disabling the tumor cell-to stroma communication network. *J Cancer Metastasis Treat*, DOI:10.20517/2394-4722.2018.70.
- Modiano, J.F., Kokai, Y., Weiner, D.B., Pykett, M.J., Nowell, P.C. Lyttle, C.R. (1991). Progesterone augments proliferation induced by epidermal growth factor in a feline mammary adenocarcinoma cell line. *J Cell Biochem*, 45: 196-206.
- Moraes N.S., Borges, N.C. (2021). Sonographic Assessment of the Normal and Abnormal Feline Mammary Glands and Axillary and Inguinal Lymph Nodes. *Veterinary Medicine International*, DOI:10.1155/2021/9998025.
- Murata, M., Thanan, R., Ma, N., Kawanishi, S. (2012). Role of nitrate and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*, DOI:10.1155/2012/623019.
- Naito, E., Yuki, M., Hirano, T., Kainuma, D., Aoyama, R. (2021). Prognostic utility of preoperative neutrophil–lymphocyte ratio in cats with malignant mammary tumors. *Research in Veterinary Science*, 135: 349–354.
- Nascimento, C., Urbano, A.C., Gameiro, A., Ferreira, J., Correia, J., Ferreira, F. (2020). Serum PD-1/PD-L1 Levels, Tumor Expression and PD-L1 Somatic Mutations in HER2-Positive and Triple Negative Normal-Like Feline Mammary Carcinoma Subtypes. *Cancers*, 12(6): 1386.

- Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (1986). *The Anatomy of the Domestic Animals, Circulatory System and the Skin*. Springer, Verlag, New York.
- Nascimento, C., Ferreira, F. (2021). Review Tumor microenvironment of human breast cancer, and feline mammary carcinoma as a potential study model. *BBA - Reviews on Cancer*, DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188587.
- Nascimento, C., Gameiro, A., Ferreira, J., Correia, J., Ferreira, F. (2021). Diagnostic Value of VEGF-A, VEGFR-1 and VEGFR-2 in Feline Mammary Carcinoma. *Cancers*, 13: 117.
- Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslén, L.A., Ragaz, J., Gown, M.A., Gilks, C.B., van de Rijn, M., Perou, C.M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal - like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10: 5367-5374.
- Nolz, J.C., Starbeck-Miller, G.R., Harty, J.T. (2011). Naive, effector and memory CD8 T cell trafficking: parallels and distinctions. *Immunotherapy*, 3: 1223-33.
- Nordin, M.L., Osman, A.Y., Shaari, R., Arshad, M.M., Kadir, A.A., Farhan, M., Reduan, H. (2017). Recent Overview of Mammary Cancer in Dogs and Cats: Classification, Risk Factors and Future Perspectives for Treatment. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*, 10(8): 64-69.
- Nourazarian, A.R., Kangari, P., Salmaninejad, A. (2014). Roles of Oxidative Stress in the Development and Progression of Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(12): 4745-4751.
- Novosad, C.A., Bergman, P.J., O'Brien, M., McKnight, J.A., Charney, S.C., Selting, K.A., Graham, J.C., Correa, S.S., Rosenberg, M.P., Gieger T.L. (2006). Retrospective evaluation of adjunctive doxorubicin for the treatment of feline mammary gland adenocarcinoma: 67 cases. *J Am Anim Hosp Assoc*, 42: 110-120.
- Ogrunc, M., di Micco, R., Lontos, M., Bombardelli, L., Mione, M., Fumagalli, M., diFagagna, F. d A. (2014). Oncogene - induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. *Cell Death and Differentiation*, 21(6): 998-1012.
- Okoh, V., Deoraj, A., Roy, D. (2011). Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1815: 115-133.
- Onodera, Y., Nam, J.M., Horikawa, M., Shirato, H., Sabe, H. (2018). Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe. *Nature Communications*, DOI: 10.1038/s41467-018-05087-7.
- Ordas, J., Millan, Y., Dios, R., Reymundo, C., de las Mulas, J.M. (2007). Protooncogene HER-2 in Normal, Dysplastic, and Tumorous Feline Mammary Gland: an Immunohistochemical and Chromogenic in situ Hybridization Study. *BMC Cancer*, 7: 179.
- Overley, B., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H., Sherer, D., Sorenmo, K.U. (2005). Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma. *J Vet Intern Med*, 19: 560-563.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3): 331-336.

- Özer, Ö.F., Güler, E.M., Selek, Ş., Çoban, G., Türk, H.M., Koçyiğit A. (2019). Akciğer, meme ve kolon kanserli hastalarda oksidatif stres parametrelerinin değişimi. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(2): 235-240.
- Özkurt, S., Demir, S., Köseoğlu, M.H., Enli, Y., Aslan, D., Sevinç, C. (2000). Akciğer kanserli hastalarda plazma melondialdehit düzeyi ve total sülfidril içeriği. *Solunum*, 2: 99-96.
- Pande, D., Negi, R., Khanna, S., Khanna, R., Khanna, H.D. (2011). Vascular endothelial growth factor levels in relation to oxidative damage and antioxidant status in patients with breast cancer. *J Breast Cancer*, 14: 181-4.
- Pawlowski, K.M., Popielarz, D., Szyszko, K., Gajewska, M., Motyl, T., Krol, M. (2012). Growth hormone receptor (GHR) RNAi decreases proliferation and enhances apoptosis in CMT - U27 canine mammary carcinoma cell line. *Vet Comp Oncol*, 10: 2-15.
- Pena, L., Gama, A., Goldschmidt, M.H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Diez, L., Gartner, F., Hellmen, E., Kiupel, M., Millan, Y., Miller, M.A., Nguyen, F., Poli, A., Sarli, G., Zappuli, V., de las Mulas, J.M. (2014). Immunohistochemistry of canine mammary tumors: a consensus on essential phenotype markers and hormone receptor assessment. *Vet Pathol*, 51: 127-145.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, 4(2): 89-96.
- Philibert, J.C., Snyder, P.W., Glickman, N. (2003). Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Intern Med*, 17: 102–106.
- Pikarsky, E., Porat, R.M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., Ben-Neriah, Y. (2004). NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 431: 461-466.
- Pinho, M.S., Gulbenkian, S. (2007). Innervation of the canine mammary gland: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol*, 22: 1175-1184.
- Preziosi, R., Sarli, G., Benazzi, C., Mandrioli L., Marcato, P.S. (2002). Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci*, 73: 53–60.
- Queiroga, F.L., Perez - Alenza, D., Silvan, G., Pena, L., Illera, J.C. (2009). Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem*, 115: 9-13.
- Radisky, E.S., Radisky, D.C. (2007). Stromal induction of breast cancer: Inflammation and invasion. *Rev Endocr Metab Disord*, 8: 279–287.
- Raharison, F., Sautet, J. (2006). Lymph drainage of the mammary glands in female cats. *J Morphol*, 267: 292–299.
- Rasotto, R., Caliarì, D., Castagnaro, M., Zanetti, R., Zappuli, V. (2011). An immunohistochemical study of HER-2 expression in feline mammary tumours. *J Comp Pathol*, 144: 170–179.
- Relf, M., LeJeune, S., Scott, P.A., Fox, S., Smith, K., Leek, R. (1997). Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res*, 57(5): 963-9.

- Restucci, B., Papparella, S., Maiolino, P., de Vico, G. (2002). Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 39(4): 488-93.
- Ribatti, D., Vacca, A., Dammacco, F. (1999). The Role of the Vascular Phase in Solid Tumor Growth: A Historical Review. *Neoplasia*, 1: 293-302.
- Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, A.M., Vacca, A. (2007). The history of angiogenic switch concept. *Leukemia*, 21: 44–52.
- Ribatti, D., Vacca, A. (2008). The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Genes Nutr*, 3(1): 29-34.
- Rosen, S., Becky K. B.K., Durham, A.C., Munroe, C.M., McNeill, C.J., Stefanovski, D., Sørensen, K.U., Volk, S.W. (2020). Intratumoral collagen signatures predict clinical outcomes in feline mammary carcinoma. *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0236516.
- Roy, A., Li, S.D. (2016). Modifying the tumor microenvironment using nanoparticle therapeutics. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol*, 8(6): 891-908.
- Ruan, K., Song, G., Ouyang, G. (2009). Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *Journal Cell Biochemistry*, 107(6): 1053-1062.
- Russo, J., Russo, I.H. (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102: 89–96.
- Salda, D.L., Sarli, G., Benazzi, C., Marcato, P.S. (1993). Giant cells in anaplastic mammary carcinoma of the dog and cat. *J Comp Pathol*, 109: 345-360.
- Sarli, G., Brunetti, B., Benazzi, C. (2006). Mammary mucinous carcinoma in the cat. *Vet Pathol*, 43: 667-673.
- Sayasith, K., Sirois, J., Dore, M. (2009). Molecular characterization of feline COX - 2 and expression in feline mammary carcinomas. *Vet Pathol*, 46: 423-429.
- Seixas, F., C. Palmeira, C., Pires, M.A., Lopes, C. (2007). Mammary Invasive Micropapillary Carcinoma in Cats: Clinicopathologic Features and Nuclear DNA Content. *Vet Pathol*, 44: 842–848.
- 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. *Res Vet Sci*, 84: 428-433.
- Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M.A., Bento, M.J., Lopes, J. (2011). Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. *Vet J*, 187: 65–71.
- Senger, D.R. (2010). Vascular Endothelial Growth Factor: Much More than an Angiogenesis Factor. *Mol Biol Cell*, 21(3): 377–379.
- Sezer, K., Keskin, M. (2014). Serbest Oksijen Radikallerinin Hastalıkların Patogenezisindeki Rolü. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg*, 28 (1): 49 – 56.
- Shofer, F.S., Sonnenschein, E.G., Goldschmidt, M.H., (1989). Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary-carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 13: 49–60.

- Silver, I.A. (1966). The Anatomy of the Mammary Gland of the Dog and Cat. *J. small anim. Pract.* Pergamon Press Ltd, Printed in Great Britain, Vol. 7, p: 689- 696.
- Simeonov, R. (2022). Correlation between fine-needle aspiration biopsy and routine histopathology in the diagnosis of spontaneous feline mammary gland tumours. *Bulg. J. Vet. Med*, DOI:10.15547/bjvm.2438.
- Skorupski, K.A., Overley, B., Shofer, F.S., Goldschmidt, H.M., Miller, C.A., Sørenmo. K.U. (2005). Clinical Characteristics of Mammary Carcinoma in Male Cats. *J Vet Intern Med*, 19: 52–55.
- Soares, M., Madeira, S., Correia, J., Peleteiro, M., Cardoso, F., Ferreira, F. (2016). Molecular based subtyping of feline mammary carcinomas and clinicopathological characterization. *The Breast*, 27: 44-51.
- Soares, M., Ribeiro, R., Carvalho, S., Peleteiro, M., Correia, J., Ferreira, F. (2016). Ki-67 as a Prognostic Factor in Feline Mammary Carcinoma: What Is the Optimal Cutoff Value? *Veterinary Pathology*, 53(1): 37-43.
- Soares, M., Correia, J., Nascimento, C., Ferreira, F. (2021). Anaplastic Mammary Carcinoma in Cat. *Cat. Vet. Sci*, 8:77.
- Sorenmo, 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. *Vet Pathol*, 48: 85-97.
- Sounni, N.E., Noel, A. (2013). Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy, *Clin. Chem*, 59: 85–93.
- Spill, F., Reynolds, D.S., Kamm, R.D., Zaman, M.H. (2016). Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Curr. Opin. Biotechnol*, 40: 41–48.
- Stavinohová, R., Lorenzová, J., Papežíková, I., Borkovcová, I., Pfeifr, J., Lojek, A., Mrázová, M., Crha, M. (2012). Markers of oxidative and antioxidative activity in female dogs with mammary gland tumour with and without additional vitamin E supplementation. *Acta Vet. Brno*, 81: 275–280.
- Sunderkötter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R., Sorg, C. (1994). Macrophages and angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 55(3): 410-422.
- Süleyman, H., Gül, V., Erhan, E. (2018). Oksidatif Stres ve Doku Hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi*, 1: 1-4.
- Szatrowski, T.P., Nathan, C.F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*, 51: 794–798.
- Şen, M., Ay, U., Akbayır, E., Şenyer, S., Tüzün, E., Küçükali, C.İ. (2017). NF-κB, Sumo Ve Ubikitinasyon İlişkisi. *Deneyisel Tıp Dergisi*, 7(13): 35-46.
- Thakkar, S., Sharma, D., Kalia, K., Tekade, R.K. (2020). Tumor microenvironment targeted nanotherapeutics for cancer therapy and diagnosis: A review. *Acta Biomaterialia*, 101: 43–68.
- van Garderen, E., van der Poel, H.J.A., Swennenhuis, J.F., Wissink, E.H., Rutteman, G.R., Hellmen, E., Mol, J.A., Schalken, J.A. (1999). Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. *Endocrinology*, 140: 5907-5914.

- Vannini, F., Kashfi, K., Nath, N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biology*, 6: 334–343.
- Viste, J.R., Myers, S.L., Singh, B., Simko, E. (2002). Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. *Can Vet J*, 43: 33-37.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 92: 5510–5514.
- Weber, E.C., Kuo, P.C. (2012). The tumor microenvironment. *Surgical Oncology*, 21: 172-177.
- Webster, J.D., Dennis, M.M., Heller, J. (2011). Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology. *Vet Pathol*, 48: 7-18.
- Weinberg, F., Ramnath, N., Nagrath, D. (2019). Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. *Cancers*, 11: 1191. DOI:10.3390/cancers11081191.
- Wiese, D.A., Thaiwong, T., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Kiupel, M. (2013). Feline mammary basal-like adenocarcinomas: a potential model for human triple-negative breast cancer (TNBC) with basal-like subtype. *BMC Cancer*, 13:403.
- Williams, C.S., Mann, M, du Bois, R.N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene*, 18: 7908–7916.
- Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R. (2013). Withrow and MacEwen’s small animal clinical oncology. Elsevier Health Sciences, Kindle Location.
- Witz, I.P. (2009). The tumor microenvironment: the making of a paradigm. *Cancer Microenviron*, 2: 9-17.
- Witz, I.P., Levy-Nissenbaum, O. (2006). The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Lett*, 242(1): 1-10.
- Yarıktaş, M., Döner, F., Doğru, H., Aynalı, G., Yönden, Z., Delibaş, N. (2003). Baş-boyun malign tümörlerinde malondialdehit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 10(4): 65-67.
- Yoshihara, D., Fujiwara, N., Suzuki, K. (2010). Antioxidants: Benefits and risks for long-term health. *Maturitas*, 67: 103-7.
- Yoshikawa, T., Naito, Y. (2002). What Is Oxidative Stress? *JMAJ*, 45(7): 271–276.
- Yoshoiko, T., Kawada, K., Shimada, T. (1979). Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 135: 372-376.
- Zaha, D.C. (2014). Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *WJCO*, 5(3): 382-392.
- Zappulli, V., de Zan, G., Cardazzo, B., Bargelloni, L., Castagnaro, M. (2005). Feline mammary tumours in comparative oncology. *Journal of Dairy Research*, 72: 98–106.
- Zappulli, V., Caliarı, D., Rasotto, R. (2013). Proposed classification of the feline “complex” mammary tumors as ductal and intraductal papillary mammary tumors. *Vet Pathol*, 50: 1070-1077.

- Zappulli V, Rasotto R, Caliari D, Mainenti M, Peña L, Goldschmidt MH, Kiupel M. (2015). Prognostic evaluation of feline mammary carcinomas a review of the literature. *Vet Pathol*, 52(1): 46-60.
- Zengin, İ., Koçer, B., Demiray, T., Yılmaz K. (2022). Meme Kanserinde Oksidatif Stresin Prognostik Değeri ve Önemi. *Online Turkish Journal of Health Sciences*, 7(3):453-459.
- Zheng, J., Wei, R., Wang, Z., Song, J., Ge, Y., Wu R. (2020). Serum metabolomic analysis of feline mammary carcinomas based on LC-MS and MRM techniques. *J Vet Res*, 64: 581-588.
- Zhou, Y., Eppenberger-Castori, S., Eppenberger, U., Benz, C.C. (2005). The NFκB pathway and endocrine-resistant breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 12: 37–46.
- Zinatizadeh, M.R., Schock, B., Chalbatani, G.M., Zarandi, P.K., Jalali, S.A., Miri, S.R. (2021). The Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes & Diseases*, 8: 287-297.
- Zowczak-Drabarczyk, M.M., Murawa, D., Kaczmarek, L., Połom, K., Litwiniuk, M. (2013). Total antioxidant status in plasma of breast cancer patients in relation to ERβ expression. *Contemp Oncol (Pozn)*, 17(6): 499–503.

<https://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>

