

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

PERİANAL TÜMÖRLERDE PATOLOJİK İNCELEMELER
VE MAPK SİNYAL YOLAĞININ TÜMÖRÜN
ONKOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ

SEMRA RİFATİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Recai TUNCA

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-19028 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2021

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalı (Veteriner) Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Semra RİFATİ tarafından hazırlanan “Perianal Tümörlerde Patolojik İncelemeler ve MAPK Sinyal Yolağının Tümörün Onkogenezindeki Rolünün Değerlendirilmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/06/2021

Üye (T.D) : Prof. Dr. Recai TUNCA Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Şule Yurdağül ÖZSOY Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Musa KARAMAN Balıkesir Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitim ve öğrenimim süresince ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Recai TUNCA'ya; değerli görüş ve önerileri ile ışık tutan Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Nihat TOPLU, Prof. Dr. Şule Yurdağül ÖZSOY, Prof. Dr. Hamdi AVCI, Dr. Öğr. Üyesi Erkmen Tuğrul EPİKMEN'e; tez savunma sınavı jüri üyesi olarak vermiş olduğu destek ve katkılar için Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Musa KARAMAN'a; tezimin planlanması, laboratuvar işlerinin yürütülmesi, verilerin analizi ve bulguların sunulmasında büyük katkı sağlayan Arş. Gör. Dr. Emrah İPEK'e; yardım ve destekleri ile her zaman yanımda olan Arş. Gör. Dr. Ayşe Nur AKKOÇ'a; tezimin yürütülmesi için gerekli mali desteği sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na; lisansüstü eğitim-öğretim sürecinin sağlıklı bir şekilde yürütülmesinde emeği bulunan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü akademik ve idari kadrosuna, her koşulda yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Karsinogenezis: Kanserin Moleküler Temeli	4
2.1.1. Genetik Hasar	4
2.1.2. Epigenetik Değişiklikler	5
2.2. Kanserin Temel Özellikleri	6
2.2.1. Büyüme Sinyalinde Kendine Yeterlilik: Proto-Onkogenler ve Onkogenler	6
2.2.1.1. Onkogenlerin sınıflandırılması	7
2.2.1.2. Yapısal genetik değişiklikler	8
2.2.1.2.1. Kromozomal translokasyonlar	9
2.2.1.2.2. Gen ekspresyonunda değişime yol açan değişiklikler	9
2.2.2. Büyüme İnhibe Eden Sinyallerden Kaçma	9
2.2.3. Apoptozisten Kaçma	10

2.2.4. Sınırsız Bölünme Yeteneği	10
2.2.5. Anjiyogenezisin Uyarılması	11
2.2.6. İnvazyon ve Metastaz Yapma Yeteneği	12
2.3. Protein Kinaz Ailesi	12
2.3.1. c-KİT Reseptörü	13
2.3.1.1. Mitojenle aktiveşen protein kinazlar	14
2.4. Perianal Tümörler	16
2.4.1. Perianal Tümörlerin Moleküler Temeli	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Gereç	20
3.1.1. Çalışma Materyali	20
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Histopatolojik İnceleme	21
3.2.2. İmmunohistokimyasal İnceleme	21
3.2.3. İmmunohistokimyasal Değerlendirme	23
3.2.4. İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1. Perianal Adenom	26
4.2. Perianal Epitelyom	27
4.3. Perianal Karsinom	27
4.4. Histopatolojik Bulguların İstatistiksel Analizi	28
4.5. Anal Kesenin Apokrin Adenokarsinomu	34
4.6. İmmunohistokimyasal Bulgular	34
4.6.1. CAM5.2 İmmunoreaktivitesi	36
4.6.2. c-KİT İmmunoreaktivitesi	38
4.6.3. p-ERK1/2 İmmunoreaktivitesi	42

5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	51
BİLİMSEL ETİK BEYANI	61
ÖZ GEÇMİŞ	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABL	: Hücre İçi Sinyal İletilmesinde Görevli Olan Proteinler
ADGFR	: Tirozin Kinaz Ailesinde Yer Alan Reseptör
Bcl-2	: B hücreli lenfoma 2
BPH	: Benign Prostat Hiperplazisi
CAM5.2	: Sitokreatin
c-KİT	: Kök Hücre Faktörü Reseptörü
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ER- α	: Estrojen Reseptörü Alfa
ERK	: Ekstra Hücrel Sinyal Düzenlenmiş Kinaz
FGF	: Fibroblast Büyüme faktörü
FGF	: Fibroblastlardan Salınan Büyüme Faktörü
FLT3	: Tirozin Kinaz Ailesinde Yer Alan Reseptör
G1	: Hücre döngüsünün G1 evresi
HRAS	: RAS proteinin H izoformu
JAK	: Janus kinaz
JK	: Jukstamembran
JNK	: Jun N-terminal Kinazlar
JUN	: Proto-onkogen
KRAS	: RAS Proteinin K İzoformu
MAPK	: Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz Yolağı
MAP2K	: MAPK kinaz
MAP3K	: MAPK kinaz kinaz

MAPKs	: Mitojenlerin uyarısıyla aktiveleşen protein kinazlar
M-CSFR	: Tirozin Kinaz Ailesinde Yer Alan Reseptör
MEK	: Sinyal İletiminde Görevli Olan Protein
MEKs	: Sinyal İletiminde Görevli Olan Protein
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
MYC	: Myelocytomatosis Proto-onkogen
NARS	: RAS Proteinin İzofomu
P38	: Mitojenlerle Aktive Olan Protein Kinazlar
P53	: Fosfoprotein
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDGF	: Plateletlerden salınan büyüme faktörü
PLC	: Fosfolipaz C
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PRB	: Fosforillenmiş Retinoblastoma
PUGF	: Plateletlerden Salanan Büyüme Faktörü
RAF	: Sinyal İletiminde Görevli Olan Protein
RAS	: Sinyal İletiminde Görevli Olan Protein
RB	: Retinoblastoma
RNA	: Ribonükleik Asit
SCF	: Kök Hücre Faktörü
STAT	: Sinyal Dönüştürücüleri ve Transkripsiyon Aktivatörleri
Thr202/Tyr204	: Tirozin202/Tirozin204
TK	: Tirozin Kinaz
TP53	: Süpresör Gen
VEGF	: Endotel hücrelerinden salınan büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Olguların cinsiyete göre dağılımı	24
Şekil 2.	Olguların yaşa göre dağılımı	25
Şekil 3.	Olguların ırklara göre dağılımı	25

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Perianal karsinom; neoplastik hücrelerin solid proliferasyonları (lobüler yapı tamamen gözden silinmiş), rezerv benzeri hücrelerde sayıca artış, yer yer kesin kenarlı vakuoller ve mitoz; olgu no: 9, H-E.	30
Resim 2.	Perianal karsinom; neoplastik hücrelerde intrasitoplazmik yağ vakuolleri; olgu no: 14, H-E.	30
Resim 3.	Perianal karsinom; çok çekirdekli neoplastik hücreler; olgu no: 15, H-E. ...	31
Resim 4.	Perianal karsinom; solid neoplastik hücre proliferasyonları, duktus benzeri yapılar ve mitoz; olgu no: 9, H-E.	31
Resim 5.	Perianal karsinom; neoplastik bez epitellerinde mitoz; olgu no: 15, H-E. ...	32
Resim 6.	Perianal karsinom; geniş koagülasyon nekrozu ve yer yer kanama; olgu no: 14, H-E.	32
Resim 7.	Perianal karsinom; lümeni keratinle dolu olan genişlemiş duktus-benzeri yapı; olgu no: 10, H-E.	33
Resim 8.	Perianal karsinom; lümeni keratinle dolu çok sayıda duktus-benzeri yapı; olgu no: 15, H-E.	33
Resim 9.	Perianal karsinom; damarlarda genişleme ve hiperemi; olgu no: 14, H-E. ...	34
Resim 10.	Anal kesenin apokrin adenokarsinomu; neoplastik hücrelerin tamamına yakınında CAM5.2 immunoreaktivitesi; IHC metot.	36
Resim 11.	Anal kesenin apokrin adenokarsinomu; neoplastik hücrelerde sitoplazmik CAM5.2 pozitifliği; IHC metot.	37
Resim 12.	Perianal adenom; neoplastik hücreler CAM5.2 negatif, apokrin bez epitellerinde CAM5.2 immunoreaktivitesi; olgu no: 5, IHC metot.	37
Resim 13.	Perianal karsinom; neoplastik hücreler CAM5.2 negatif; olgu no:13, IHC metot.	38
Resim 14.	Perianal adenom; rezerv hücrelerinde sitoplazmik c-KİT	39

	immunoreaktivitesi; skor= 1; olgu no:1, IHC metot.	
Resim 15.	Perianal adenom; rezerv hücrelerinde sitoplazmik, bez epitellerinde membranöz + sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi; skor = 4; olgu no:3, IHC metot.	39
Resim 16.	Perianal adenom; rezerv ve bez epitellerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi; skor = 4; olgu no:5, IHC metot.	40
Resim 17.	Perianal epitelyom; rezerv hücrelerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi; skor= 2; olgu no: 7, IHC metot.	40
Resim 18.	Perianal karsinom; rezerv benzeri hücre ve bez epitellerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi; skor= 3; olgu no: 11, IHC metot.	41
Resim 19.	Perianal karsinom; rezerv benzeri hücrelerde sitoplazmik, bez epitellerinde membranöz c-KİT immunoreaktivitesi; skor= 3; olgu no: 13, IHC metot. ..	41
Resim 20.	Perianal adenom; rezerv benzeri ve bez epitellerinde p-ERK1/2 immunoreaktivitesi; skor= 1; olgu no: 3, IHC metot.	42
Resim 21.	Perianal epitelyom; rezerv benzeri ve bez epitellerinde p-ERK1/2 immunoreaktivitesi; skor= 2; olgu no: 7, IHC metot.	43
Resim 22.	Perianal karsinom; neoplastik hücrelerde p-ERK1/2 immunoreaktivitesi; skor= 1; olgu no: 12, IHC metot.	43
Resim 23.	Perianal adenom; endotel hücrelerinde p-ERK1/2 immunoreaktivitesi; olgu no: 4, IHC metot.	44

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Olgulara ait demografik bilgiler (ırk, yaş ve cinsiyet)	20
Tablo 2.	İmmunohistokimyasal boyamalarda kullanılan primer antikorlara ait bilgiler ve sulandırma oranları	22
Tablo 3.	Histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgulara göre yapılan sınıflandırma, olgu sayıları ve yüzde oranları	24
Tablo 4.	Histopatolojik bulgular	26
Tablo 5.	Ülser görülme sıklığı ve istatistiksel analiz	28
Tablo 6.	Nekrozun görülme sıklığı, yaygınlığı ve istatistiksel analiz	29
Tablo 7.	Sebaseöz farklılaşma görülme sıklığı, yaygınlığı ve istatistiksel analiz	29
Tablo 8.	Olgulara göre ortalama mitoz sayısı, duktus benzeri yapı sayısı ve istatistiksel analiz	29
Tablo 9.	Perianal tümör olgularında CAM5.2, c-KİT ve p-ERK1/2 immunoreaktivitesi	35

ÖZET

PERİANAL TÜMÖRLERDE PATOLOJİK İNCELEMELER VE MAPK SİNYAL YOLAĞININ TÜMÖRÜN ONKOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ

Rifati S. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Patoloji (Veteriner), Yüksek Lisans Programı, Aydın 2021

Amaç: CD117 –c-KİT olarak da bilinir- c-KİT proto-onkogeni tarafından kodlanan bir tirozin kinaz reseptörüdür. İnsanlarda yapılan çalışmalarda prostat kanseri gibi gonadal hormonların etkisi altında gelişen tümörlerde c-KİT reseptörü ile karsinogenezis arasında ilişki belirlenmiştir. Köpek malign meme tümörü olgularında tümörün alt tipi ile c-KİT boyanma paterni arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Androjenik hormonların etkisi altında geliştiği ileri sürülen perianal tümörlerde c-KİT ekspresyonu bilinmemektedir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada perianal tümör olgularında (toplam 17 olgu) c-KİT ifadesi ve onunla ilişkili sinyal yollarından biri olan MAPK sinyal yolağının aktivasyonu immunohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. Perianal tümörler önerilen histopatolojik ve immunohistokimyasal değerlendirme kriterleri ışığında değerlendirilerek sınıflandırıldı.

Bulgular: Olguların %29'una perianal adenom, %12'sine perianal epitelyom, %59'una ise perianal karsinom tanısı konuldu. İncelenen olguların hiçbiri CAM5.2 ile reaktivite göstermedi. İstatistiksel analizler perianal tümör alt tipleri arasında c-KİT ekspresyonu bakımından farklılık olmadığını ortaya koydu. Tüm olgularda rezerv/bazoloid hücrelerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi belirlendi. Hepatoid hücrelerdeki c-KİT boyanma paterni olgudan olguya değişmekle birlikte olguların genelinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi saptandı. Olguların 3'ünde p-ERK1/2 ile pozitif boyanma belirlendi.

Sonuç: Bir ön çalışma niteliğindeki bu çalışmada olguların genelinde anormal (sitoplazmik) boyanma paterninin belirlenmesi ve membranöz boyanmanın azalma eğiliminde olması c-KİT'in perianal tümör gelişiminde rolü olduğunu düşündürdü. Ayrıca yüksek düzeyde c-KİT ifade eden olguların kinaz inhibitörlerinden fayda görebileceğini akla getirdi.

Anahtar kelimeler: CAM5.2, c-KİT, Köpek, Perianal tümör, p-ERK1/2

ABSTRACT

PATHOLOGICAL EXAMINATIONS OF PERIANAL TUMORS AND EVALUATION OF THE ROLE OF THE MAPK SIGNALLING PATHWAY IN THE ONCOGENESIS OF THE TUMOR

Rifati S. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Pathology (Veterinary), Master Thesis, Aydın, 2021.

Objective: CD117- also known as c-KIT- is a tyrosine kinase receptor encoded by the c-KIT proto-oncogene. In human studies, a relationship between c-KIT receptor and carcinogenesis has been determined in tumors that develop under the influence of gonadal hormones such as prostate cancer. In canine malign breast tumor cases, a relationship between tumor subtype and c-KIT staining pattern has been detected. The expression of c-KIT is unknown in perianal tumors that are claimed to develop under the influence of androgenic hormones.

Material and Methods: In this study, c-KIT expression in perianal tumor gland cases (totally 17) and MAPK signal pathway activation were evaluated by immunohistochemistry. Perianal tumors were evaluated and classified in the light of suggested histopathological and immunohistochemical evaluation criteria.

Results: 29% of the cases were diagnosed as perianal adenoma, 12% as perianal epithelioma, 59% as perianal carcinoma. None of the examined cases showed reactivity with CAM5.2. Statistical analysis did not revealed any differences in c-KIT expression between perianal tumor subtypes. Cytoplasmic c-KIT immunoreactivity was detected in reserve / basoloid cells in all cases. Although the c-KIT staining pattern in hepatoid cells varied between cases, cytoplasmic c-KIT immunoreactivity was detected in all cases. Positive staining with p-ERK1 / 2 was determined in 3 of the cases.

Conclusion: In this study, which is a preliminary study, the determination of abnormal (cytoplasmic) staining pattern in general of the cases and the tendency of membranous staining to decrease suggested that c-KIT has a role in perianal tumor development. It has been also suggested that cases expressing high levels of c-KIT may benefit from kinase inhibitors.

Keywords: CAM5.2, Canine, c-KIT, Perianal tumor, p-ERK1/2.

1. GİRİŞ

Perianal bezler –hepatoid bezler olarak da bilinir- köpek ve ‘keseliler’ alt sınıfındaki türlerde bulunan, akıtıcı kanalları olmayan modifiye yağ bezleridir. Perianal bölgede bulunmasından dolayı bu isim verilmemişse de perineumun yanısıra kuyruk, arka ekstremitte, torakal bölgeler, prepusyum, dişilerde abdominal meme loblarının yakınında da bulunur. İnce bir stromayla lopçuklara ayrılan bu bezler geniş, eozinofilik sitoplazmalı ve normokromatik çekirdekli bez epitellerinden oluşmuştur. Lopçukların periferinde tek sıra halinde rezerv hücreleri bulunur. Bu bezlerden köken alan tümörlere perianal tümörler adı verilir. Köpeklerde görülen deri tümörleri arasında görülme sıklığı açısından 3. sırada yer alır. Histopatolojik olarak; perianal adenom, perianal epitelyom ve perianal karsinom olmak üzere 3 grupta sınıflandırılır. Adenom olgularının androjenik hormonların etkisi altında geliştiği ileri sürülmüştür. Genellikle kısırlaştırılmamış erkek köpeklerde görülmesi ve kastrasyonun tümörün gerilemesine yol açması bu görüşü desteklemektedir. Kastrasyonun perianal karsinom olgularında faydasının olup olmadığı konusu tartışmalıdır. Vail ve diğerleri (1990), perianal karsinom olgularının kastrasyona yanıt vermediğini rapor etmiştir. Pisani ve diğerleri (2006), inceledikleri perianal adenom, -epitelyom ve -karsinom olgularının androjen reseptörü ile kuvvetli reaktivite göstermesinden yola çıkarak perianal karsinom olgularında cerrahi eksizyona ilaveten kastrasyonun yararlı olabileceğini ileri sürmüştür. Perianal tümörlerin moleküler temelini araştırdığı çalışmalardan birinde; adenom ve karsinom olgularında neoplastik hücrelerin büyüme hormonu ile pozitif boyandığını belirlenmiş ve progesteronun meme bez epitelleri ve meme tümörlerinde büyüme hormonu ifadesini arttırdığı bilgisinden hareketle neoplastik hücrelerde belirlenen büyüme hormonu ifadesinin progesteron tarafından uyarılmış olabileceği ileri sürülmüştür (Petterino ve diğerleri, 2004). Başka bir çalışmada; perianal tümörlerde östrojen (ER- α) ve progesteron reseptörlerinin ifade düzeyi incelenmiş ve adenom olgularındaki ER- α ifadesinin karsinom olgularından daha fazla olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar bu bulgulardan yola çıkarak östrojen reseptörünün perianal tümörlerin gelişiminde rolü olduğunu ileri sürmüştür (Kim ve diğerleri, 2018).

Prostat kanseri gibi androjenlerin etkisi altında gelişen tümörlerde anti-androjen tedaviler -örneğin kastrasyon- tümörün gerilemesi yol açar. Kastrasyondan yarar gören kimi

hastalarda bir süre sonra tümörün nüks ettiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar bu durumun neoplastik hücrelerin hormon yoksunluğuna direnç kazanmasıyla ilişkili olabileceğini ileri sürmüştür. Kastrasyona dirençli prostat kanseri olguları üzerinde yapılan çalışmalar neoplastik hücrelerin c-KİT reseptörüne karşı reaktivite gösterdiğini ortaya koymuş ve bu reseptör ve onunla ilgili sinyal yollarının neoplastik hücrelerin çoğalmasını uyardığını göstermiştir (Pfeiffer ve diğerleri, 2011). Wiesner ve diğerleri (2008), benign prostat hiperplazili olguların %5'inin, primer prostat kanserli vakaların %14'ünün, kemik metastazlı olguların ise %40'ının c-KİT ile reaktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. İleri evre prostat kanserli hastalar anti-androjen tedavilerden yarar görebilir. Çünkü bu tümörde tümör hücreleri çoğalmak için androjenlere ihtiyaç duyar. Anti-androjen tedaviden yarar gören hastalardan bir kısmında tümörün nüks ettiği ve bu durumun neoplastik hücrelerin androjen yoksunluğuna direnç geliştirmesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Hormonların etkisinde geliştiği kabul edilen köpek meme tümörlerinde c-KİT boyanma paterni ile malign tümörlerin histolojik alt tipleri arasında korelasyon saptanmış ve boyanma paterninin karsinomun alt tipiyle ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada malign meme tümörü olgularında c-KİT'in boyanma yoğunluğu ve boyanma paterniyle ki67 indeksi arasında ilişki belirlenmiştir. c-KİT ekspresyonu ve ki-67 arasında bulunan korelasyondan dolayı bu tümörlerin tirozin inhibitörlerine duyarlı olabileceğini ileri sürülmüştür (Brunetti ve diğerleri, 2014).

c-KİT reseptörü serin/treonin reseptör kinaz ailesinin bir üyesi olup hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması, büyümesi ve embriyonel gelişimin düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. c-KİT reseptörünün uyarılması hücre içi sinyal iletiminde görevli sinyal yollarının aktifleşmesine yol açar. Mitojenle aktifleşen protein kinaz yolağı (MAPK) bunlardan biridir. MAPK ailesi ERK, p38 ve JNK olmak üzere 3'e ayrılarak sınıflandırılır. Her bir MAPK sinyal yolağı da MAPK kinaz kinaz (MAP3K), MAPK kinaz (MAP2K) ve bir MAPK olmak üzere 3 bileşenden oluşur. MAP3K'lar MAP2K'ları fosforiller ve aktifleştirir. Aktifleşen MAP2K da MAPK'ları fosforilleyerek onların aktifleşmesine yol açar (Kim ve Choi, 2010). JNK ve p38 sinyal yolları çeşitli hücre stresörlerce uyarılırken (Davis, 2000), SCF adı verilen büyüme faktörünün c-KİT reseptörüne bağlanmasıyla ERK sinyal yolağı aktifleştirir. RAS, RAF, MEK ve ERK adı verilen bu sinyal iletiminde görevli proteinlerin sırasıyla aktiflenmesiyle hücre dışındaki sinyaller hücre içine iletilir ve sonuç olarak hücre bölünmesi uyarılır.

Hormonların etkisi altında geliştiği kabul edilen perianal tümörler yaygın olarak görülen tümörler arasında yer almasına karşın gelişim mekanizmalarına ilgili bilgiler oldukça azdır. Bu çalışmada perianal tümörlerin gelişiminde c-KİT reseptörünün rolü olup olmadığını belirlemek amaçlandı. Bu amaçla histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgular esas alınarak sınıflandırılan perianal tümör olgularında c-KİT ifadesi ve onunla ilişkili sinyal yollarından biri olan MAPK sinyal yolağının aktivasyonu immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

Kanser, hücre genomunda meydana gelen mutasyonların birikimi sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalıktır (Alexandrov ve diğerleri, 2002; Garraway ve Lander, 2013). DNA'nın kendini eşlemesi sırasında görülen replikasyon hataları (mutasyonlar) göz önüne alınarak tüm organizmaların er ya da geç kansere yakalanacağı ileri sürülmektedir (Cullen ve Breen, 2016). Replikasyon hatalarından kaynaklanan mutasyonların çoğu önemsiz olarak kabul edilse de zaman içinde birikerek kansere yol açabilirler (Vogelstein ve diğerleri, 2013). Bunların yanı sıra viruslar, mutajenik kimyasallar ve radyasyon gibi bir takım ekzojen faktörler de DNA diziliminde değişikliğe yol açıp kansere neden olabilir (Cullen ve Breen, 2016).

Kanserin nasıl oluştuğunu anlamaya yönelik çalışmalar son zamanlarda hız kazanmıştır. Bu çalışmalar; sağlıklı bir hücrenin kanser hücresine dönüşme sürecini anlamamıza yardımcı olmakla kalmayıp kanserin teşhis ve tedavisine yönelik yeni moleküllerin keşfedilmesine de öncülük etmiştir. Dolayısıyla büyük önem arz etmektedirler.

2.1. Karsinogenezis: Kanserin Moleküler Temeli

2.1.1. Genetik Hasar

Kanserleşme sürecinin en temel bileşenlerinden biridir. Öyle ki insanlarda görülen kanser olguları analiz edildiğinde; olguların % 90'ında somatik mutasyon, % 20'sinde 'germ line' mutasyon, küçük bir oranında da hem somatik hem de 'germ line' mutasyonlar belirlenmiştir (Alexandrov ve diğerleri, 2002; Garraway ve Lander, 2013; Vogelstein ve diğerleri, 2013). Tek bir nükleotidin değişimi aminoasit değişimine yol açıp ilgili proteinin işlevini değiştirmek suretiyle kanser oluşma riskini arttırabilir. Bunun yanı sıra insersiyon, delesyon ve duplikasyon gibi nokta mutasyonlarına göre daha büyük yapısal değişiklikler farklı mekanizmalar üzerinden kanserleşme ihtimalini arttırır. Ayrıca, translokasyonlar gibi kromozom düzeyindeki değişiklikler de kimerik transkriptlere yol açmak, 'promoter' ve

'enhancer' gibi bir genin ifade düzeyini kontrol eden yapıları etkilemek veya gen kopya sayısında artış veya azalışa neden olmak suretiyle malign transformasyona neden olabilir (Cullen ve Breen, 2016).

2.1.2. Epigenetik Değişiklikler

Epigenetik değişiklikler DNA dizisinde değişikliğe neden olmaksızın bir genin ifadesini değiştirerek kanserleşmeye neden olabilir. Epigenetik değişiklikler genetik materyalin yapısında herhangi bir değişikliğe yol açmadan gen ifadesini önemli ölçüde değiştirir. Bu değişiklikler genetik değişikliklerle birlikte kanserleşme sürecinde önemli rol oynar. Epigenetik değişiklikler; DNA metilasyonu, histon asetilasyon ve miRNA olmak üzere başlıca üç grupta sınıflandırılır. DNA metilasyonu bir genin ifadesini arttırabilir ya da azaltabilir. Çeşitli kanser türlerinde DNA metilasyonunda anormallikler belirlenmiştir. Bu durum ilgili kanser türlerinde belirlenen gen ifadesindeki değişikliklerden sorumlu tutulmuştur. Histon proteinleri DNA'nın paketlenmesinde ve gen ifadesinin düzenlenmesinde görevlidir. Gen ifadesini için DNA'ya sıkıca sarılmış olan histon proteinlerinin ayrılması gerekir. Histon proteinlerinin asetilasyonu bunların DNA'dan ayrılmasına ve böylelikle gen ifadesinin başlamasına neden olur. Mikro RNA (miRNA) adı verilen moleküller mRNA dizisine bağlanarak bunların ifadesinin susturulmasında görev alan RNA yapısında moleküllerdir. İnsanlarda görülen çeşitli kanser türlerinde çeşitli miRNA türlerinde ifade artışı ya da bunları kodlayan genlerde delesyonlar şeklinde değişiklikler belirlenmiştir. Hayvanlarda görülen tümörlerdeki rolü hakkındaki çalışmalar oldukça az sayıdadır. İnsan çalışmaları bu moleküllerin kanser gelişiminde rolü olduğunu düşündürmüştür (Cullen ve Breen, 2016).

Kanser çok aşamalı bir süreçtir ve epitel hücrelerinden köken alan bazı kanserlerde her bir aşamaya özgü histolojik fenotipler (hiperplazi, displazi, adenom ve karsinom) görülür. Oluşan mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler zaman içinde birikerek söz konusu morfolojik değişikliklerin oluşumuna yol açar. Buna karşın, bazı durumlarda normal bir hücrede bir onkogenin aktivasyonu hücrenin yaşlanması uyarıp tümör oluşumunu inhibe edebilir (Bardi ve diğerleri, 2004). Paradoks gibi görünen diğer bir durum; onkogen aktivasyonunun hücrenin hücre döngüsünden çıkmasına ve sonuç olarak hücre bölünmesinin durmasına yol açabilmesidir. Bu durumun da tümör gelişimini önleyen

mekanizmalardan biri olduğu düşünölmektedir. Özetle, oluşun genetik ve epigenetik değişiklikler kanser hücrelerinin kendisine özgü temel fonksiyonel özellikler kazanmasına yol açar. Bu özellikler ilk olarak 2000 yılında önerilmiş olup (Wemmert ve diğerleri (2005) yakın bir zamanda güncellenmiştir (Brosens ve diğerleri, 2011).

2.2. Kanserin Temel Özellikleri

Kanserin temel özellikleri aşağıda başlıklar halinde sunulmuştur.

2.2.1. Büyüme Sinyalinde Kendine Yeterlilik: Proto-Onkogenler ve Onkogenler

Normal dokular doku hasarı ya da kaybına hücre proliferasyonunu uyararak yanıt verirler. Hücre proliferasyonu büyüme faktörlerince kontrol edilir. Bu faktörler kendilerine özgü reseptörlere bağlanıp hücre içi sinyal silsilesini başlatarak hücre bölünmesini uyarır. Normal koşullarda hücre proliferasyonu çeşitli mekanizmalar aracılığıyla sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu sayede kontrolsüz hücre bölünmesinin önüne geçilmiş olur. Kanserde ise bu mekanizmalar bozulmuştur. Dolayısıyla kanser hücreleri sınırsız bir şekilde bölünebilir (Cullen ve Breen, 2016).

Hücre dışı sinyallerin hücre içine iletilmesinde çok sayıda protein görev alır. Bu proteinlerin yapısında ya da ifade düzeyinde meydana gelen değişiklikler hücrelerin kontrolsüz ve sınırsız bir şekilde bölünmesine sebep olur. Bu proteinleri kodlayan genlere proto-onkogen adı verilir (Ganguly ve diğerleri, 2014). Söz konusu değişiklikler sonucu yapısı değişen proto-onkogenler ise onkogenler olarak isimlendirilir. Şimdiye kadar 100'ün üzerinde onkogen tanımlanmış olup sayıları her geçen gün artmaktadır. Onkogenlerin çoğu ilk olarak retroviruslarda tanımlanmıştır. Bu nedenle tanımlandığı virusun ismine ithafen isimlendirilmiştir. Örneğin, ilk olarak 'avian myelocytomatosis virus' ta tanımlanan myc proto-onkogeni keşfedildiği virusun adına ithafen myc olarak adlandırılmıştır. Burada altı çizilmesi gereken nokta; onkogenin değil kodladığı proteinin malign transformasyona yol açtığıdır. Onkogenler tarafından kodlanan proteinlere onkoproteinler adı verilir (Cullen ve Breen, 2016).

2.2.1.1. Onkogenlerin sınıflandırılması

Onkogenler kodladığı onkoproteine göre 5 kategoride sınıflandırılır; (I) büyüme faktörleri, (II) büyüme faktörü reseptörleri, (III) hücre içi sinyal ileticiler, (IV) çekirdekte bulunan düzenleyici proteinler (transkripsiyon faktörleri) ve (V) siklinler. Örneğin, 'sis' adı verilen proto-onkogen, plateletlerden salınan büyüme faktörü (PDGF)'in beta zincirini kodlar. Yapısında 'sis' onkogenini barındıran 'simian sarcoma virus' ile infekte olan fibroblastlarda 'sis' onkoproteini sentezi artar. Bu protein PDGF reseptörünün aşırı uyarılmasına ve bu yolla fibroblastların malign transformasyonuna yol açar (Cullen ve Breen, 2016).

Büyüme faktörü reseptörleri yapısal olarak üç bölümde incelenir; (I) büyüme faktörünün bağlandığı hücre dışı bölüm, (II) hücre zarı boyunca uzanan bölüm ve (III) kinaz aktivitesine sahip olan sitoplazmik bölüm. Onkogenlerce kodlanan büyüme faktörü reseptörlerinde genellikle hücre dışı bölüm bulunmaz. Anormal yapıdaki bu reseptörlerin aktiflenmesi için büyüme faktörüne ihtiyaç yoktur. Sürekli olarak aktiftirler. Dolayısıyla reseptörün büyüme faktörü bağlanmaksızın aktiflenmesi ilgili sinyal yolağının kontrolsüz aktivasyonuna yol açar (Cullen ve Breen, 2016).

Hücre içi sinyal iletilmesinde görevli proteinler ya (örneğin, ABL, RAF) sitoplazmada serbest halde ya da hücre zarına bağlı olarak (örneğin, RAS, SRC) bulunurlar. Kinaz aktivitesine sahiptirler. Nokta mutasyonları ya da daha büyük yapısal değişiklikler aktivasyonlarına ve sonuçta kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açar. Hayvanlarda görülen pek çok kanserde (meme kanseri ve mast hücresi gibi) aktivitelerinin bozulduğu belirlenmiştir. Aktivitelerini baskılamaya yönelik araştırmalar devam etmektedir. Kinaz aktivitesini engelleyen bazı moleküller hali hazırda tedavide kullanılmaktadır (Hirsch ve diğerleri, 2013).

Transkripsiyon faktörleri gen ekspresyonunu düzenleyen nükleer proteinlerdir. DNA üzerinde belli yerlere bağlanarak gen ifadesini uyarırlar. MYC, JUN ve FOS gibi onkoproteinlerce kodlanan transkripsiyon faktörleri hücre bölünmesini uyararak genlerin ekspresyonunu arttırır. Ekspresyon düzeyindeki değişiklikler ya da fonksiyonlarını etkileyen mutasyonlar kontrolsüz hücre bölünmesine yol açar (Cullen ve Breen, 2016).

Siklinler hücre döngüsünün kontrolünde görevli proteinlerdir (A'Hern ve diğerleri, 2013). Hücre döngüsü sırasında belli zaman aralıklarında kısa bir süreliğine sentezlenirler.

Siklin bağımlı kinazlar adı verilen hücre döngüsünün ilerlemesinde görevli proteinlerle etkileşerek onların aktivasyonuna yol açar. İşlevlerinin bozulması kontrolsüz hücre proliferasyonuna sebep olur. Hayvanlarda görülen bazı tümörlerde siklinlerin ifade düzeyinde değişiklikler görüldüğü bildirilmiştir. Örneğin, meme bezi karsinomunda siklin A, meme tümörleri, yassı hücre karsinomu ve bazal hücre tümörlerinde siklin D1 ekspresyonunda anormallikler saptanmıştır (Li ve diğerleri, 2013; Vardiman ve diğerleri, 2009).

2.2.1.2. Yapısal genetik değişiklikler

Yapısı değişmiş proto-onkogene onkogen adı verilir. Karyotip değişimi sırasında oluşan kromozomal translokasyonlar protoonkogenin yapısını değiştirebilir. Kimyasal karsinojenler ve bazı radyasyon türleri nokta mutasyonlarına yol açarak protoonkogenin yapısını değiştirirler. Tek bir nükleotidin değişmesi bazı durumlarda çok önemli sonuçlar doğurabilir. Örneğin; orak hücre anemisinde hemoglobinin bir polipeptit zincirini sentezleyen geninde bir nokta mutasyonu oluşmuştur. Bu ise tek bir nükleotide değişime (kalıp DNA zincirinde) ve anormal bir proteinin üretilmesine neden olur. Mutasyonların kanser gelişimi üzerine etkileri RAS adı verilen sinyal iletim yolağında görevli proteinde çok iyi bir şekilde karakterize edilmiştir. Tüm memeli hücrelerinde bulunan RAS proteininin KRAS, NRAS ve HRAS olmak üzere üç izoformu bulunur. Üçü de benzer fonksiyonlara sahip olup GTP'yi fosforilleyerek hücre proliferasyonu ve hayatta kalmasını kontrol eder. RAS geninde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine yol açabilir (Cullen ve Breen, 2016). RAS mutasyonları insan tümörlerinde yaygın olarak görülen mutasyonlardan biridir. Yapılan çalışmalarda incelenen olguların %16-30'unda RAS mutasyonu tespit edildiği rapor edilmiştir. Hayvanlarda görülen tümörlerde insanlardaki kadar yaygın değildir. Köpeklerde yapılan çalışmalarda incelenen olguların %15-25'inde K-RAS mutasyonu saptanmıştır (Thomas ve diğerleri, 2014; Hedan ve diğerleri, 2011; Shapiro ve diğerleri, 2015)

2.2.1.2.1. Kromozomal translokasyonlar

Translokasyon, bir kromozomdan kopan bir parçanın başka bir kromozoma yapışması şeklinde görülen kromozom anomalilerindedir. Bu olay aktif promotor bölgeleri ile proto-onkogenleri yan yana getirerek gen ifadesini değiştirebilir. Örneğin, MYC protoonkogeni B lenfomalarda aşırı ifadelenir. Bunun nedeni yapısında immunglobulin genini barındıran kromozom segmentinin MYC genini içeren kromozoma translokasyonudur (Cullen ve Breen, 2016).

2.2.1.2.2. Gen ekspresyonunda değişime yol açan değişiklikler

Gen ekspresyonu; gen amplifikasyonu ya da delesyonu, promotor insersiyonu, gen translokasyonu ve düzenleyici miRNA'lar tarafından düzenlenir. Bu mekanizmaların her biri, protoonkogenlerce kodlanan proteinlerin ekspresyonunu değiştirebilir. Hücre proliferasyonunu uyarıcı etkiye sahiptirler. Dolayısıyla aşırı ifadelenmeleri kanser oluşumunu yol açabilir (Cullen ve Breen, 2016).

2.2.2. Büyüme İnhibe Eden Sinyallerden Kaçma

Neoplastik hücrelerin temel özelliklerinden bir diğeri hücre proliferasyonunu durduran sinyallerden kaçma yeteneğidir. Hücre proliferasyonunu durduran genlere tümör süpresör genler adı verilir. Şimdiye kadar yirmi beşten fazla tümör süpresör gen keşfedilmiştir. Hücre döngüsünün kontrolünde kritik öneme sahip olan bu genler hücre bölünmesi için adeta fren görevi görürler. Bir tek kopyalarının aktif olması görevlerini yerine getirebilmeleri için yeterlidir. Her iki kopyanın kaybolduğu hücrelerde kanserleşme ihtimali artar. Tümör süpresör genler ilk olarak kansere karşı genetik yatkınlığı olduğu düşünülen aileler üzerinde yapılan çalışmalar sırasında ortaya konmuştur. Bu ailelerin çocuklarında tümör süpresör bir genin bir kopyasının fonksiyonel olmadığı belirlenmiş, aynı genin ikinci kopyasında meydana gelen bir mutasyonun kanser gelişme ihtimalini arttırdığı saptanmıştır. Bu çalışmalar sırasında keşfedilen tümör baskılayıcı gen retinoblastoma genidir. Üzerinde çok çalışılan tümör süpresör genlerden bir diğeri TP53 genidir. Bu gen ilk

olarak Li-Fraumeni sendromlu çocuklarda tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar çoğu kanserde TP53 mutasyonu belirlenmiştir. Köpekler üzerinde yürütülen çalışmalar melanom, histiositik sarkom gibi bazı kanserlerde tümör baskılayıcı genlerde mutasyon şekillendiği ya da bu genlerin ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Golden retrieverlarda lenfoma, 'keesbond' larda paratiroid tümörlerin daha fazla görülmesi bu ırkların bu kanserlere karşı genetik yatkınlığının olduğunu düşündürmüştür (Cullen ve Breen, 2016).

TP53 en iyi karakterize edilen tümör supresör genlerden biri olup genetik hasar veya hipoksi gibi durumlar aktifleşmesine yol açar. TP53 geni nüklear bir fosfoprotein olan p53'ü kodlar. Normal koşullarda hücre döngüsünün düzenlenmesinde görevi bulunmayan bu protein genetik hasar ya da hipoksi gibi durumlarda hücre döngüsünün durdurulmasından sorumludur. UV ışık, radyasyon ya da diğer karsinojenlerin etkisiyle şekillenen DNA hasarını algılayıp hücre döngüsünün S evresinden G1 evresine geçişini durdurur. DNA hasarı çok fazla ise ve DNA tamir mekanizmalarıyla düzeltilmezse hücre apoptozise sürükler (Cullen ve Breen, 2016).

TP53 mutasyonları en sık görülen mutasyonlardan biridir. Köpek osteosarkom olgularının %40'ında TP53 mutasyonu ortaya konmuştur. Köpekler üzerinde yapılan bir başka çalışmada incelenen melanom olgularında TP53 dahil pek çok tümör supresör gende mutasyon saptanmıştır. Köpek meme tümörü, kedi ve köpeklerde yassı hücre karsinomu, köpek mast hücre tümörü üzerinde yapılan çalışmalarda hem TP53 mutasyonlarına hem de p53 ifade düzeyinde değişmelere rastlanmıştır. Köpek histiositik sarkoma vakalarında yapılan sitogenetik analizler çok sayıda tümör supresör gende fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar belirlenmiştir (Cullen ve Breen, 2016).

2.2.3. Apoptozisten Kaçma

Apoptozisi düzenleyen genler tümör gelişiminde önemli rol oynar. B hücreli lenfoma üzerinde yapılan çalışmalar bu genlerin tümör gelişimindeki rolünü anlamamıza yardımcı olmuştur. Bu tümörlerde apoptozisi önlemekle görevli bir protein olan bcl-2'nin ifadesinin arttığı belirlenmiş ve bcl-2 ifade eden tümör hücrelerinin apoptozisinden kaçarak bölünmeye devam ettiği ortaya konmuştur. Kedi lenfoma olguları üzerinde yapılan çalışmalarda da benzer şekilde aşırı bcl-2 ifadesi belirlenmiştir (Cullen ve Breen, 2016).

2.2.4. Sınırsız Bölünme Yeteneği

Sınırsız bölünme yeteneği neoplastik hücrelerin en önemli özelliklerinden biridir. Normal hücreler en fazla 60-70 kez bölünebilirken, malign hücreler sınırsız çoğalabilme yeteneğine sahiptir. Telomeraz enzimi malign hücrelerin sınırsız bir şekilde çoğalmasından sorumludur. Bu enzim somatik hücrelerde inaktif iken kök hücreler, eşey hücreleri ve kanser hücrelerinde aktiftir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %85-95'inde aktifleştieği belirlenmiştir. Telomeraz; ters transkriptaz, RNA kalıbı ve düzenleyici proteinlerden oluşur. Bu yapı DNA eşlenmesi sırasında bir miktar kısalan telomer dizisinin yerine konulması sağlar. Telomerde meydana gelen kayıp belli bir sınıra ulaştığında TP53 ve pRB gibi tümör supresör genler aktive olur ve hücre apoptozise sürüklenir. Telomeraz aktivitesi veteriner onkolojide çok fazla çalışılmamıştır. Köpeklerde yapılan bir çalışmada lenfoma saptanan lenf yumrularının tamamında telomeraz aktivitesi belirlenmiş ve telomeraz aktivitesinin lenfoma vakalarında normale göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (Cullen ve Breen, 2016).

2.2.5. Anjiyogenezisin Uyarılması

Bir tümörün büyümesi anjiyogenezise bağlıdır. Anjiyogenezis pro-anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler tarafından düzenlenir. Pro-anjiyojenik faktörler adından da anlaşılacağı üzere vaskülarizasyonu uyarırken, anti-anjiyojenik faktörler engeller. Tümör hücreleri salgıladıkları pro-anjiyojenik faktörler aracılıyla anjiyogenezisi doğrudan uyarabilir. Diğer taraftan tümör hücreleri salgıladıkları bir takım aracılığıyla dolaylı yoldan anjiyogenezisi tetikleyebilir (Cullen ve Breen, 2016).

Yakın geçmişte yapılan çalışmalar anjiyogenezisin kanserleşme sürecinin tüm aşamalarında görevli olduğunu göstermiştir. Tümör dokusunun anjiyogenezisi temel özellikleri bakımından yara iyileşmesi sürecinde görülen anjiyogenezise benzer. Ancak morfolojik ve fonksiyonel birtakım farklılıklar vardır. Tümör dokusundaki kan damarları tümörün içinde eşit olarak dağılmamıştır. Kan damarları normale göre daha kıvrıntılı ve geniştir. Endotel hücreleri arasında geniş yarıklar bulunur. Bu durum tümör hücrelerinin çevre dokulara yayılmasını kolaylaştırır. Endotel hücreleri arasındaki geniş boşluklardan plazma sıvısı sızar ve intersitisyel basıncı artırır. İntersitisyel basınç artışı kan damarlarının kollapsına ve bölgesel kan akımının bozulması yol açar. Sonuç olarak hipoksik gelişir. Hipoksi tümörün merkezi kısımlarındaki hücrelerin ölümüne neden olur (Cullen ve Breen,

2016).

Anjiyogenezis tümör hücrelerinin çoğalmasında kritik öneme sahiptir. Endotel hücrelerinden salınan büyüme faktörlerinin tümörün büyümesini uyardığı belirlenmiştir. Diğer taraftan tümörün prognozuna dair bilgi verebilir. İnsanlarda yapılan çalışmalar akciğer ve meme kanserlerinde tümör alanındaki kan damarı yoğunluğu ile tümörün prognozu arasında ilişki olduğunu göstermiştir (Cullen ve Breen, 2016).

2.2.6. İnvazyon ve Metastaz Yapma Yeteneği

Metastaz çok aşamalı bir süreçtir. Neoplastik hücrelerin çok azı bu süreci tamamlayabilir. Tümör gelişimi sırasında neoplastik hücrelerin bir kısmı metastaz yapma yeteneği kazanabilir. Epitelial tümörlerde metastazın ilk aşaması hücre adezyon faktörlerinin aktivitesindeki bozulma sonucu hücreler arası bağlantıların kopmasıdır. Bu sırada N-kaderinler gibi hücre yüzeyinde bulunan adezyon molekülleri yeniden ifadelenmeye başlar. Bunlar hücrelerin göçüyle ilişkilidir. Hücrelerin yayılması birkaç aşamada gerçekleşir. Hücreler iki aşamadan oluşan süreçle bazal membrana penetre olur. İlk olarak hücreler laminin, fibronektin vb. reseptörler aracılığıyla bazal membrana tutunur, takiben bazal membranı eriten hidrolitik enzimler salgırlar. Sonraki aşamada hareket ederler. Nihayetinde bir kan damarı ya da lenfatik damarla karşılaşrlar. Tümör hücrelerinin kan damarları ya da lenfatiklere girmeleri intravazasyon olarak adlandırılır. Bu olayın gerçekleşmesi için hücrenin gireceği damarın bazal membranına tutunması ve onu yıkılması gerekir. Kan ya da lenf dolaşımına giren tümör hücresi endotel hücreleri arasından geçerek uzak organlara yayılır (Cullen ve Breen, 2016).

2.3. Protein Kinaz Ailesi

Protein kinaz ailesi tirozin kalıntılarını fosforilleyen tirozin kinazlar ve serin/treonin kalıntılarını fosforilleyen serin/teronin kinazlar olmak üzere başlıca iki grupta sınıflandırılır. Bunlar dışında hem tirozin hem de serin/treonin kalıntılarını fosforilleyen kinazlar da vardır. Kinazlar hücrenin farklı bölümlerinde yerleşmiştir; (I) hücre zarı, (II) sitoplazma ve (III) çekirdek. İnsan genomunda toplam 518 kinaz tanımlanmıştır; bunlardan 90'ı tirozin

kinazdır. Hücre zarında yerleşenler -ki bunlar tirozin kinazdır- büyüme faktörlerince aktiflenir ve reseptör tirozin kinaz olarak da adlandırılırlar. Büyüme faktörlerince uyarılmaları ATP'deki bir fosforik grubunun tirozin kalıntılarındaki hidroksil grubuna transfer edilmesine yol açar. Yapısal olarak üç bölümde incelenirler; (I) hücre dışına uzanan kısım, (II) hücre zarında boyunca uzanan kısım ve (III) hücre içine uzanan sitoplazmik kısım. Hücre dışına uzanan kısım tirozin kinaz reseptörüne göre değişiklik gösterir. Sitoplazmik kısım neredeyse tüm tirozin kinaz reseptörlerinde benzerdir. Bu kısım reseptörün kinaz aktivitesinden sorumludur. VEGF, PDGF, cKIT, FGF gibi büyüme faktörleri reseptör kinaz ailesinin üyeleridir. Kinazlar hücrenin iç dengesinin sağlanmasında önemli görevler üstlenir. Bunun yanı sıra kanser gelişiminde, konjenital bozukluklarda, immun yetmezliklerde, aterosklerozda ve nörolojik rahatsızlıklarda rol oynadıkları saptanmıştır. Aktivasyonları büyüme faktörlerince kontrol edilir. Büyüme faktörlerinin bağlanması reseptör birimlerinin bir araya gelmesine ve çapraz fosforilasyona yol açar. Aktiflenen reseptör kinaz bir kinaz silsilesini başlatır. Böylece hücre dışı sinyaller hücre içine iletilmiş olur. Sinyal yolağının son basamağındaki protein çekirdeğe geçerek gen ifadenmesini değiştirir (Argyle, 2014)

2.3.1. c-KİT Reseptörü

c-KİT diğer adıyla CD117, sınıf III reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. Bu ailede yer alan diğer reseptörler; PDGFR, FLT3/CD135 ve M-CSFR'dir. c-KİT hematopoetik hücreler, germ hücreleri, Cajal hücreler, melanositler, B hücre progenitörleri ve mast hücrelerinde ifadenir. Toplam 976 aminoasitten oluşan cKIT yapısal olarak üç bölüme ayrılır; (I) hücre dışına uzanan kısım [519 aa], (II) hücre zarı boyunca uzanan kısım [23 aa], (III) hücre içinde bulunan kuyruk kısmı [433]. Hücre dışına uzanan kısmı 5 bölümden oluşur. Hücre içinde bulunan kısmının jukstamembran (JK) ve tirozin kinaz (TK) olmak üzere 2 bölümü vardır. Tirozin kinaz bölümü 'kinaz insersiyon' adı verilen bir bölüm ile TK1 ve TK2 olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Jukstamembran ve kinaz insersiyon bölümleri çok sayıda fosforillenme bölgesi barındırır.

SCF adı verilen protein c-KİT'in ligandı olup hematopoetik bir sitokindir. Bu sitokin hematopoetik hücrelerin hayatta kalmasından sorumludur. Bunun dışında, hücre proliferasyonu, farklılaşması, büyüme ve gelişmenin düzenlenmesinde de görevlidir. SCF

hücre dışı sinyallerin hücre içine iletilmesini sağlar. SCF bağlanması sitoplazmik parçadaki tirozin kalıntılarının fosforillenmesini uyarır. Fosfotirozinler hücre içi sinyal iletiminde görevli proteinlerin bağlanması için bağlanma noktaları oluşturur. cKIT reseptörü tarafından kullanılan hücre içi sinyal yolları oldukça karmaşıktır. cKIT sinyal yollarından birkaçını uyarabilir. Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), fosfolipaz C (PLC), Src kinaz ailesi ve JAK/STAT sinyal yolları bunlardan bazılarıdır.

İnsan ve köpeklerde görülen bazı kanser türlerinde c-KIT mutasyonları belirlenmiştir. Bu mutasyonlar reseptörün özellikle hücre dışına uzanan kısmı ile sitoplazmik kısmında yoğunlaşmıştır. Sitoplazmik kısmın bölümlerinden biri olan jukstamembran bölümdaki mutasyonlar reseptörün kendi kendini inhibe etme yeteneğinin kaybolmasına yol açar. Köpek ve insan gastrointestinal stromal tümörlerinde, köpek mast hücre tümörlerinde ve insan melanom olgularında reseptörün jukstamembran kısmında mutasyonlar şekillendiği ortaya konmuştur. Diğer taraftan insan seminoma olgularında, sistemik mastositoziste ve akut miyeloid lösemi vakalarında reseptörün 'activating loop' bölümünde mutasyonlar belirlenmiştir. Reseptörün çeşitli bölümlerinde şekillenen mutasyonlar SCF bağlanmaksızın reseptörün uyarılmasına neden olur (Cullen ve Breen, 2016).

2.3.1.1. Mitojenle aktive eden protein kinazlar

Mitojenlerin uyarısıyla aktive eden protein kinazlar (MAPKs) hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücre ölümü ve transformasyon gibi hücresel süreçlerin düzenlenmesi önemli görevler üstlenir. MAPK ailesi memelilerde ERK, p38 ve JNK olmak üzere 3'e ayrılarak sınıflandırılır. Her bir enzimin çok sayıda izoformu bulunur; ERK'in 8 adet (ERK1-8), P38'in α , β , γ ve δ olmak üzere 4 adet ve JNK'nın toplam 3 adet (JNK1-3) izoformu vardır (Dhillon ve diğerleri, 2007; Schaeffer ve Weber, 1999). Her bir MAPK sinyal yolağı da MAPK kinaz kinaz (MAP3K), MAPK kinaz (MAP2K) ve bir MAPK olmak üzere 3 bileşenden oluşur. MAP3K'lar MAP2K'ları fosforiller ve aktive eder. Aktive eden MAP2K da MAPK'ları fosforilleyerek onların aktive edilmesine yol açar. Aktive edilmiş MAPK'lar; Elk-1, c-Jun, ATF-2 ve p53 gibi transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere çeşitli proteinleri fosforiller (Kim ve Choi, 2010).

JNK ve p38 sinyal yolları pro-inflamatuar sitokinler (TNF- α , IL-1 β) ve çeşitli hücrel stresörler (genotoksik, ozmotik, hipoksik ya da oksidatif stres) tarafından aktive edilir. JNK sinyal yolağı üç üyeden oluşur; 1. JNK, 2. SEK1 ya da MKK7 gibi MAP2K ve 3. ASK1, MEKK1, MLK ya da TAK1 gibi MAP3K (Davis, 2000). p38 sinyal yolağında görevli MAP2K'lar örneğin MKK3 ve MKK6 p38'i aktive eder ve kendileri de yine bu yolda görevli MAP3K'larca (ASK1 ve TAK1) tarafından aktive edilir (Kim ve Choi, 2010).

ERK sinyal yolağı büyüme faktörünün reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Reseptörün yapısında birtakım değişiklikler meydana gelir ve reseptör üzerindeki fosfotirozinler adaptör proteinlerde bulunan SH2 bölgeleri için yavaş hareket eder. Hücre içi sinyal silsilesi 1 adet SH2 bölgesi ve 2 adet SH3 bölgesi içeren adaptör bir protein olan Grb-2'nin bağlanmasıyla başlar. Reseptörün fosforillenmesiyle Grb-2'nin SH2 bölgesi reseptör tirozin kinazın fosfotirozin birimine bağlanır. Grb-2 SH3 bölgeleri aracılığıyla Sos adı verilen bir proteinin poliprolin zengin polipeptitlerine bağlanır. Sos, RAS'a bağlanır ve onu aktive eder. Öne çıkan bir sinyal iletim bileşeni olan RAS, küçük G proteinleri adı verilen protein sınıfının üyesidir. HRAS, KRAS ve NRAS olmak üzere 3 izoformu bulunur. Küçük G proteinleri GDP bağlı olmaları durumunda aktif değildirler. Sos, RAS'ın nükleotid bağlama cebini açar böylelikle GDP ayrılıp yerine GTP yerleşebilir. RAS üzerindeki etkisinden dolayı Sos guanin nükleotid değişim faktörü olarak da bilinir. GTP'ye bağlanan RAS, RAF olarak adlandırılan bir protein kinaz da dahil olmak üzere diğer proteinlere bağlanır. RAF'ın çok sayıda izoformu bulunur; ARAF, BRAF, CRAF vs. RAF RAS'a bağlanınca RAF-protein kinaz bölgesini aktive eden bir konformasyonel değişime uğrar. Aktiflenmiş RAF MEKs olarak tanımlanan protein kinazlar da dahil olmak üzere diğer proteinleri fosforiller. MEKs hücre dışı sinyal tarafından düzenlenen kinazları (ERKs) aktive eder. ERK daha sonra çekirdeğe göç eder ve MYC gibi transkripsiyon faktörlerinin ifadenmesini uyarır. Transkripsiyon faktörleri dinlenme halindeki hücrelerin döngüsüne girmesine yol açan genlerin ifadenmesini uyarır. Hücrel sinyal yolları uyarıcı ve inhibe edici bir takım faktörlerce çok hassas bir şekilde kontrol edilir. Uyarıcı sinyallerin aktive edilmesi ve inhibe edici sinyallerin bozulması hücre proliferasyonunu uyarır. RAS mutasyonları GAP proteinin RAS'ı defosforile etme yeteneğini bozarak aktif durumda kalmasına neden olur. Sonuç olarak hücre proliferasyonu uyarılır (Cullen ve Breen, 2016).

ERK sinyal yolağındaki bozulma birçok kanser türünün gelişiminde önemli rol oynar. RAS mutasyonları özellikle KRAS insanlardaki tümörlerde en sık tespit edilen

mutasyonlardır. Kanser olgularının %30'unda KRAS mutasyonu belirlenmiştir. Benzer şekilde, RAF mutasyonlarına da sıklıkla rastlanmaktadır. Çalışmalar tüm kanser olgularının %8'inde RAF mutasyonu varlığını ortaya koymuştur. Diğer taraftan MEK mutasyonları RAS ve RAF mutasyonları kadar yaygın değildir. Kanser vakalarının yalnızca %1'inde MEK mutasyonu görüldüğü bildirilmiştir. ERK sinyal yolağının üyelerinde meydana gelen mutasyonları bu yolağın aktiflenmesine yol açar. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar ovaryum kanseri, meme kanseri ve akciğer kanseri gibi kanserlerde ERK ekspresyonunun arttığını göstermiştir. Hong ve ark, ovaryum kanserlerinde ERK ekspresyonu düzeyini incelemiş ve neoplastik hücrelerde normal hücrelere göre ERK ekspresyon düzeyinin arttığını ortaya koymuştur. Lee ve ark, kolon kanseri, villöz adenom ve tubular adenomda fosforillenmiş MEK ekspresyonu düzeyinin sırasıyla %76, %40 ve %30 olduğunu rapor etmiştir (Cullen ve Breen, 2016).

2.4. Perianal Tümörler

Perianal bezlerden köken alan perianal tümörler, tüm deri tümörleri içinde mast hücre tümörü ve meme tümörlerinden sonra üçüncü sıklıkta görülen kanser türüdür. Perianal adenom, perianal epiteliyom ve perianal karsinom olmak üzere 3'e ayrılarak sınıflandırılır. Bunlar içinde en sık görüleni perianal adenomdur. Perianal adenom histolojik olarak perianal bezlere benzer yapıdadır. Görülme sıklığı 8-13 yaş grubunda pik yapar. Cinsiyet yatkınlığı vardır; özellikle erkek köpekler yüksek risk altındadır. Kastrasyon tümörün gerilemesi neden olur. Olgulara büyük çoğunlukla (%88) perianal bölgede rastlanır. Makroskopik olarak, soliter ya da 'multiple' ekzofitik ya da endofitik intradermal kitleler şeklinde görülür. Perineumdan sonra tümörün en sık yerleştiği bölgeler; kuyruğun dorsal ve ventral derisi ve prepusyumdur. Tümörün kesit yüzü ince ancak belirgin kollajen bir stromayla ayrılmış sarı esmer renkte çok sayıda lobülden oluşur. Histolojik olarak neoplastik hücrelerin oluşturduğu kordonlar, adacıklar ve yer yer anastomozlaşmış trabeküler yapıdadır. Hücreler polihedral şekilli olup geniş eozinofilik sitoplazmalıdır. Çekirdek hücrenin merkezinde yerleşmiş olup büyük, ovoid şekilli, normokromatiktir. Lobüllerin periferinde tek sıra halinde rezerv hücreleri adı verilen küçük ve bazofilik hücreler bulunur. İnterlobuler stroma kan damarlarından zengindir ve yangı hücreleri barındırabilir. Tümör dıştan bağ doku kapsülü ile kuşatılmıştır. Bazı olgularda kan damarları

oldukça genişlediği dikkati çeker, yer yer kanama görülebilir. Rezerv hücrelerinde mitotik figürlere rastlanabilir. Küçük, yuvarlak şekilli, merkezinde keratinleşme gösteren duktus benzeri yapılar görülebilir. Bazı hücrelerde intrasitoplazmik vakuoller görülebilir. Bu hücrelerin yağ hücresi olma yönünde farklılaşma gösterdikleri düşünülmektedir. Lenfatik invazyonu değerlendirirken dikkat etmek gerekir; çünkü lobüler genişleme ile rezerv hücrelerin baskı altında kalması bunların yanlışlıkla lenfatiklere invazyon gösteren tümör embolusu olarak değerlendirilmesine yol açabilir (Goldschmidt ve Goldschmidt, 2016).

Perianal epitelyom düşük dereceli malignite olarak kabul edilmektedir. Neoplastik hücrelerin büyük çoğunluğunu rezerv hücreler oluşturur. Perianal adenomlara göre çok daha nadirdir. Görülme sıklığı 9-13 yaş grubunda pik yapar. Irk yatkınlığı bildirilmiştir. Erkek köpeklerde daha yaygındır. Olguların büyük çoğunluğu (%95) perianal bölgeden köken alır. Makroskobik olarak soliter ya da 'multiple' kitleler şeklinde görülür. Anamnezinde kitlenin kısa sürede büyüdüğü bildirilir. Tümör genellikle endofitik olarak büyür. Kesit yüzünün görünüşü diğer hepatoid tümör türlerinden farklı değildir. Histolojik olarak, rezerv hücrelerinde sayıca artış dikkati çeker. Adenomlarda görülen belirgin lobuler yapı görülmez. Mitoz görülebilir, genellikle rezerv hücrelerdedir. Nükleer pleomorfizm minimaldir. Kapsüler invazyon bildirilmiştir, ancak çevre dokulara invazyonu nadirdir (Goldschmidt ve Goldschmidt, 2016).

Perianal karsinom perianal bezin nadir görülen malign tümörüdür. Görülme sıklığı 9-13 yaş grubunda pik yapar. Bluetick coonhound, Belgian shepherd, Siberian husky, Samoyed ve Alaskan malamute için ırk yatkınlığı bildirilmiştir. Kısırlaştırılmamış erkek köpekler yüksek risk (%55) altındadır. Kısırlaştırılmamış (%4) ve kısırlaştırılmış (%15) dişilerde görülme ihtimali daha azdır. Primer yerleşim yeri perianal bezlerdir (%83), bunu sırasıyla prepusyum (%6) ve kuyruk derisi (%4) takip eder. Makroskobik incelemede benign hepatoid tümörlerden ayırt edilemez. Histolojisinde adenom ve epitelyom olgularında görülen lobuler ve trabeküler yapı görülmez. Bazı tümörler zayıf farklılaşmış neoplastik hücrelerden oluşur. Bu hücreler morfolojik olarak hiperkromatik çekirdekli, belirgin çekirdekli ve dar sitoplazmalıdır. Ara sıra hepatoid diferensiyasyon gösteren hücelere rastlanır. Rezerv ve hepatoid hücrelerin görüldüğü tümörlerde rezerv hücrelerde mitoz artmıştır. Malign hepatoid hücreler geniş eozinofilik sitoplazmalı ve büyük çekirdeklidir. Çekirdekçik sayısı artmıştır. Mitotik olarak aktiftirler. Farklılaşmış hepatoid hücrelerde mitoz görülmesi ve/veya tümör hücrelerinin çevre dokuya ve lenfatiklere invazyonu maligniteye işaret eder. Tümör lokal olarak yayılır. Sakral ve internal iliak lenf

nodlarına metastaz görülebilir. Uzak organ metastazı oldukça nadirdir (Goldschmidt ve Goldschmidt, 2016).

2.4.1. Perianal Tümörlerin Moleküler Temeli

Perianal bez dokusunun gelişimi puberteyle başlayıp yaşlılık evresine kadar devam eder (Baker, 1967). Bezin gelişimi cinsiyet hormonlarınca kontrol edilir (Hayes ve Wilson, 1977; Maita ve Ishida, 1975; Wilson ve Hayes, 1979). Androjenik hormonlar bezin gelişimini uyarır (Genevois, 1980; Maita ve Ishida, 1975). Testosteron verilen 60 günlük köpeklerin perianal bez dokusunun büyüyerek yetişkinlik dönemindeki boyutlarına eriştiği bildirilmiştir (Maita ve Ishida, 1975). Nielsen ve Attosmis (1964), perianal tümörlerin cinsiyet hormonlarının etkisinde altında geliştiğini, androjenik hormonların tümör gelişimini uyardığını, östrojenin ise baskıladığını ileri sürmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalar perianal tümörlerde androjen, östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığını ortaya koymuştur (Kim ve diğerleri, 2018; Pettorino ve diğerleri, 2004; Pisani ve diğerleri, 2006). Pettorino ve diğerleri (2004), adenom ve karsinom olgularında neoplastik hücrelerin büyüme hormonu ile pozitif boyandığını belirlenmiş ve progesteronun meme bez epitelleri ve meme tümörlerinde büyüme hormonu ifadesini arttığı bilgisinden hareketle neoplastik hücrelerde belirlenen büyüme hormonu ifadesinin progesteron tarafından uyarılmış olabileceği ileri sürmüştür. Pisani ve diğerleri (2016), hiperplastik bezlerde normal perianal bez dokusuna androjen reseptörü (AR) ifadesinde belirgin artış saptamıştır. Perianal adenom, -epitelyom ve -karsinom olgularında AR ile pozitif boyanan hücre sayısının normal bez dokusuna göre daha fazla olduğu belirlemiştir. İstatistiksel analizler benign ve malign olgular arasında AR ifadesi bakımından farklılık olmadığını göstermiştir. Aynı çalışmada ‘zayıf farklılaşmış karsinom’ olarak sınıflandırılan az sayıdaki olguda AR pozitif hücre sayısının daha az olduğunu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını rapor etmiştir. Kim ve diğerleri (2018), perianal tümörlerde östrojen (ER- α) ve progesteron reseptörlerinin ifadenme düzeyini incelemiş ve normal bez dokusu ve adenom olgularındaki ER α ifadesinin karsinomlardan daha fazla olduğunu rapor etmiştir. Normal bez dokusu ve adenomlar arasında boyanma oranı ve yoğunluğu bakımından farklılık görülmemiştir. Aynı çalışmada PI3K sinyal yolağında görevli proteinlerden biri olan AKT proteinin ifadesi incelenmiş ve karsinom olgularındaki AKT ekspresyon düzeyinin adenom

olgularından yüksek olduğu saptanmıştır.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar hormonların etkisinde gelişen tümörlerde -prostat kanseri gibi- c-KİT'in rolü olduğu gösterilmiştir. Wiesner ve diğerleri (2008), benign prostat hiperplazili olguların %5'inde, primer prostat kanserli vakaların %14'ünde, kemik metastazlı olguların ise %40'ında c-KİT ekspresyonu saptamıştır. Hormonların etkisinde geliştiği kabul edilen köpek meme tümörlerinde c-KİT boyanma paterni ile malign tümörlerin histolojik alt tipleri arasında korelasyon saptanmış ve boyanma paterninin karsinomun alt tipiyle ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada malign meme tümörü olgularında c-KİT'in boyanma yoğunluğu ve boyanma paterniyle ki67 indeksi arasında ilişki belirlenmiştir. c-KİT ekspresyonu ve ki67 arasında bulunan korelasyondan dolayı bu tümörlerin tirozin inhibitörlerine duyarlı olabileceğini ileri sürülmüştür (Brunetti ve diğerleri, 2014). Gelişiminde hormonal uyarıların önemli bir rolü olduğu ileri sürülen perianal tümörler köpeklerde yaygın olarak görülen tümörler arasında yer almasına karşın gelişim mekanizmasıyla ilgili bilgiler oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmada perianal tümörlerde c-KİT reseptörü ve ve onunla ilişkili sinyal yollarından biri olan MAPK sinyal yolağının aktivasyonunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Materyali

2005-2021 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne gönderilen perianal tümör şüpheli biyopsi materyallerinden hazırlanan preparatlar Goldschmidt ve Goldschmidt (2016), tarafından önerilen histopatolojik ve immunohistokimyasal değerlendirme kriterleri ışığında incelenerek perianal adenom, perianal epitelyom ve perianal karsinom tanısı konulan toplam 17 olgu çalışmanın materyalini oluşturdu. Olgulara ait demografik bilgiler (ırk, yaş ve cinsiyet) Tablo 1'de sunuldu.

Tablo 1. Olgulara ait demografik bilgiler (ırk, yaş ve cinsiyet).

Olgu	Rutin no	İrk	Yaş	Cinsiyet
1	163-05	Melez	8	Dişi
2	176-05	Terrier	13	Erkek
3	205-05	Collie	8	Erkek
4	44-16	*	6	Erkek
5	29-18	*	14	Erkek
6	88-07	Kangal	13	Erkek
7	262-16	*	17	Erkek
8	125-07	Terrier	14	Dişi
9	44-07	Melez	11	Erkek
10	113-08	Terrier	11	Erkek
11	223-10	*	11	*
12	98-11	German shepherd dog	12	Erkek
13	06-14	Terrier	14	Erkek
14	108-14	*	12	Erkek

15	334-14	*	1	Dişi
16	151-16	Labrador retriever	8,5	Erkek
17	226-17	Golden retriever	14	Erkek

*kayıt yok

3.2. Yöntem

3.2.1. Histopatolojik İnceleme

Proje süresi boyunca laboratuvarımıza gönderilen perianal tümör şüpheli biyopsi materyalleri %10'luk tamponlanmış formaldehid solüsyonunda 24-48 saat süreyle tespit edildi. Rutin takip işlemlerinin ardından parafinde bloklanan örneklerden normal ve pozitif yüklü lamlara 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Normal lamlara alınan kesitler hematoksilin-eozin (H-E) ile boyandı. Pozitif yüklü lamlara alınan kesitler ise immunohistokimyasal boyamalarda kullanıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus, BX51) incelendi ve mikroskopik dijital fotoğraflar çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

Mitoz sayısını belirlemek için 40x objektif büyütmesinde en fazla mitoz görülen 5 saha incelendi. Her sahada mitoz görülen toplam hücre sayısı belirlendi. Duktus benzeri yapıların sayısını belirlemek için 20x objektif büyütmesinde rastgele seçilen 5 saha incelendi ve her sahada duktus-benzeri yapıların toplam sayısı belirlendi. Nekrozun yaygınlığı semikantitatif olarak (0= yok, 1= tek hücre nekrozu, 2= hücre gruplarında nekroz ve 3= bir lobün tamamına yakınında nekroz) değerlendirildi. Ülserasyon var/yok şeklinde değerlendirildi. Sebace farklılaşma gösteren hücrelerin yaygınlığı semikantitatif olarak (0= yok, 1= nadir, 2= orta düzeyde ve 3=yaygın) şeklinde değerlendirildi.

3.2.2. İmmunohistokimyasal İnceleme

Pozitif yüklü lamlara alınan kesitler CAM5.2, c-KIT ve p-ERK1/2 antikorları ile boyandı. Bu amaçla; kesitler ksilol ve konsantrasyonu gittikçe azalan alkol serilerinden geçirilerek deparafinizasyon ve rehidrasyon sağlandı. Bu aşamadan sonra uygulanan tüm

işlemler arasında kesitler 3'er kez beşer dakika TBS-T (pH: 7,6) solüsyonu ile yıkandı. Kesitler, metanolde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilerek dokuların endojen peroksidaz aktivitesi engellendi. Kesitler antijen retrieval solüsyonunda (95 °C) 30 dakika inkübe edilerek dokudaki antijenlerin açığa çıkması sağlandı. Kesitler bloklama solüsyonu ile muamele edilip 30 dakika inkübe edilerek dokudaki spesifik olmayan boyanmalar engellendi. Takiben kesitler, TBS-T'de hazırlanmış %3'lük BSA ile sulandırılan CAM5.2, c-KİT ve p-ERK1/2 antikorları ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Takiben HRP ile işaretlenmiş sekonder antikorlar (anti-mouse veya anti-rabbit) ile muamele edilerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ile muamele edilerek 5 dakika inkübasyona bırakılıp reaksiyon sonlandırıldı. Gril II hematoksilin ile karşıt boyama yapıldıktan sonra kesitler konsantrasyonu gittikçe artan alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi. Ksilen ile şeffaflandırılan kesitler yapıştırıcı ile kapatıldı. Negatif kontrol için kesitler primer antikor yerine bu antikorun sulandırılmasında kullanılan solüsyon ile muamele edildi. Pozitif kontrol olarak; anal kesenin apokrin bez karsinomu (CAM5.2 için) ve mast hücre tümörü (c-KİT ve p-ERK1/2 için) olgularından hazırlanan kesitler kullanıldı.

İmmunohistokimyasal boyamalarda kullanılan primer antikorlara ait bilgiler ve sulandırma oranları Tablo 2'de sunuldu.

Tablo 2. İmmunohistokimyasal boyamalarda kullanılan primer antikorlara ait bilgiler ve sulandırma oranları.

Antikor		Firma	Katalog no	Sulandırma oranı
Anti-Cytokeratin (CAM 5.2)	Mouse monoklonal	BD Biosciences	347653	*
c-KİT (CD117)	Rabbit poliklonal	Dako	A4502	1:100
p-ERK1/2 (Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204))	Rabbit monoklonal	Cell Signaling Technology	4370S	1:250

*kullanıma hazır

3.2.3. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

c-KİT immunoreaktivitesi; c-KİT pozitif neoplastik hücrelerin tüm neoplastik hücrelere oranını esas alan değerlendirme yöntemiyle; 0=negatif, 1= %1-10 pozitif, 2= %11-40 pozitif, 3= %41-70 ve 4= %71 ve üzeri pozitif şeklinde semikantitatif olarak skorlandı (Fonseca-Alves ve diğerleri, 2017). Ayrıca c-KİT'in hücresel lokalizasyonu (membranöz, sitoplazmik ve membranöz + sitoplazmik) değerlendirildi. İlgili değerlendirme kriteri köpek meme tümörü olgularında c-KİT lokalizasyonunu değerlendirmek için kullanılmıştır (Brunetti ve diğerleri, 2014).

p-ERK1/2 antikoru ile boyanan kesitler, p-ERK1/2 pozitif neoplastik hücrelerin tüm neoplastik hücrelere oranını esas alan değerlendirme yöntemiyle; 0=negatif, 1= %1-30 pozitif, 2= %31 ve üzere pozitif şeklinde semikantitatif olarak skorlandı (Wei ve diğerleri, 2016).

CAM5.2 antikoru ile boyanan kesitler neoplastik hücrelerde CAM5.2 pozitifliğinin görülüp görülmemesine göre pozitif ya da negatif şeklinde değerlendirildi.

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Hipotez testleri değerlendirilmeden önce verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ve Q-Q grafik yöntemi, varyansların homojenliği ise Levene testi ile değerlendirildi. İkili gruplarda c-KİT ekspresyonu, p-ERK1/2, mitoz sayısı, duktus benzeri yapı sayısı parametrelerinin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Gruplar arasında ülser ve nekroz görülme oranlarının kıyaslamasında Ki-Kare testi kullanıldı. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde önemlilik faktörü olarak $p < 0.05$ kriteri ele alındı. Verilerin analizlerinde SPSS v26 paket programından faydalanıldı.

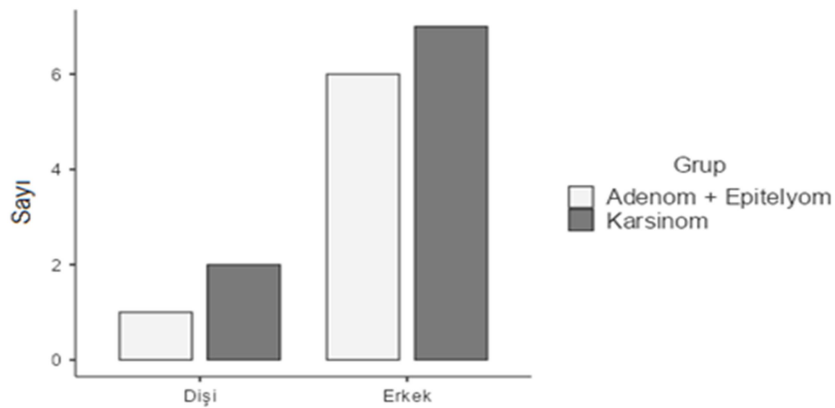
4. BULGULAR

Perianal tümörler; perianal adenom, perianal epitelyom ve perianal karsinom olmak üzere 3 grupta incelendi. Histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgulara göre yapılan sınıflandırma, olgu sayıları ve yüzde oranları Tablo 3'te sunuldu.

Tablo 3. Histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgulara göre yapılan sınıflandırma, olgu sayıları ve yüzde oranları.

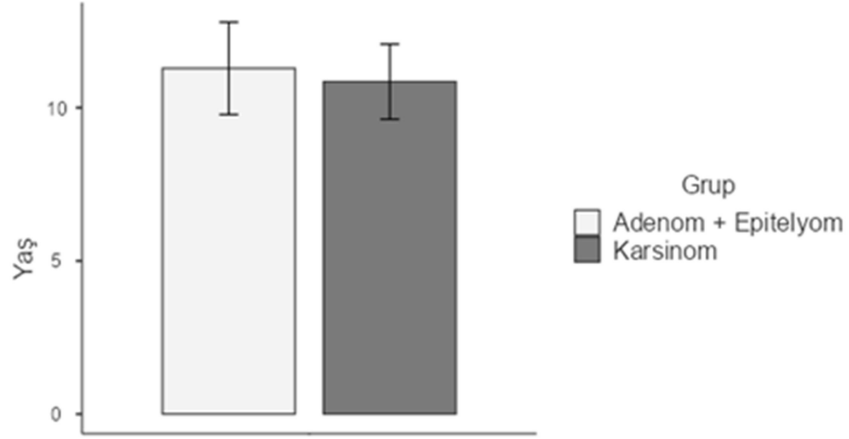
Tam	Olgu sayısı	Yüzde oran (%)
Perianal adenom	5	29
Perianal epitelyom	2	12
Perianal karsinom	10	59
Toplam	17	100

Olguların %29'una perianal adenom, %12'sine perianal epitelyom, %59'una ise perianal karsinom tanısı konuldu. Olguların cinsiyete göre dağılımı Şekil 1'de sunuldu. Şekilde görüldüğü üzere; adenom/olgularının 1'i dişi, 6'sı erkek iken, karsinom olgularının 2'si dişi 7'si erkekti.



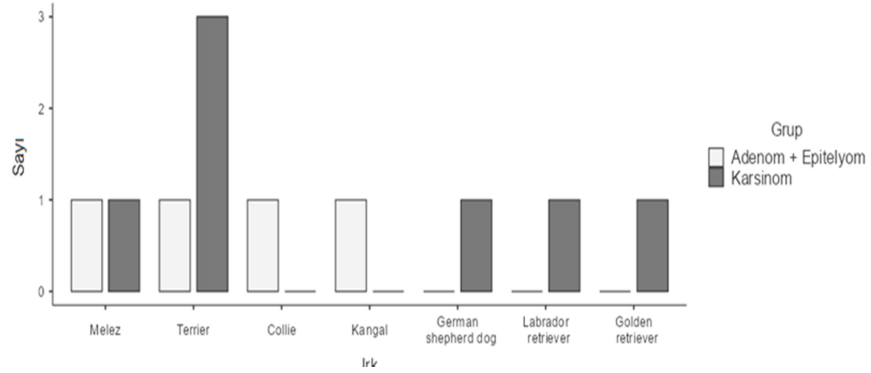
Şekil 1. Olguların cinsiyete göre dağılımı.

Olguların yaşa göre dağılımı Şekil 2’de sunuldu. Adenom/epitelyom olgularının yaşları 6-17 (ortalama 13) arasında, karsinom olgularıninki ise 1-14 (ortalama 11.5) arasında değişmektedir.



Şekil 2. Olguların yaşa göre dağılımı.

Olguların ırklara göre dağılımı Şekil 3’te sunuldu.



Şekil 3. Olguların ırklara göre dağılımı.

Histopatolojik incelemede karşılaşılan bulgular Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4. Histopatolojik bulgular.

Olgu	Histopatolojik tanı	Histopatolojik bulgular				
		Nekroz	Duktus benzeri yapı	Sebaseöz farklılaşma	Ülser	Mitoz sayısı
1	Perianal adenom	1	0,4	2	*	0
2	Perianal adenom	2	1	1	-	0
3	Perianal adenom	0	0	0	-	0
4	Perianal adenom	0	0,4	0	-	0
5	Perianal adenom	1	0,8	1	*	0
6	Perianal epitelyom	1	4,2	1	+	*
7	Perianal epitelyom	2	4,8	1	-	0
8	Perianal karsinom	1	0	2	+	1,4
9	Perianal karsinom	0	0,4	3	+	2,2
10	Perianal karsinom	1	4,6	0	+	2,2
11	Perianal karsinom	3	1,8	1	*	0,2
12	Perianal karsinom	3	3,6	2	+	0
13	Perianal karsinom	3	3,4	1	+	1,4
14	Perianal karsinom	3	2,2	2	+	3
15	Perianal karsinom	3	1,6	1	-	1,6
16	Perianal karsinom	3	1,8	1	+	0,6
17	Perianal karsinom	1	1	3	+	0,2

*: değerlendirme yapılamadı

-: negatif

+: pozitif

4.1. Perianal Adenom

Bu tip tümörlerde lobüler yapıda ya da kordonlar şeklinde dizilim gösteren neoplastik hücre proliferasyonları dikkati çekti. Lobüller birbirinden ince bir bağ dokusu

stromasıyla ayrılmıştı. Her bir lobül poligonal şekilli, geniş eozinofilik sitoplazmalı ve ökromatik çekirdekli bez epitellerinden oluşmuştu. Lobüllerin periferinde tek sıra halinde dizilmiş küçük ve hiperkromatik çekirdekli rezerv hücreleri yer almaktaydı. Olguların ikisinde (olgu no: 2, 3) kan damarları oldukça genişlemiş ve hiperemik olup yer yer kanamalar şekillenmişti. Bir olguda (olgu no: 2) oldukça genişleyen bir lobülün merkezi kısımlarda, iki olguda (olgu no: 1, 5) ise tek hücre nekrozu şeklinde koagülasyon nekrozuna rastlandı. Olguların genelinde lobüllerin aralarında farklı büyüklüklerde duktus benzeri yapılar göze çarptı. Bu yapıların lümenleri keratinle dolu idi. Üç olguda (olgu no: 2-4) ülser görülmedi. Deri ile örtülü olmayan 2 olguda ülser şekillenip şekillenmediği değerlendirilemedi. Neoplastik hücrelerde mitoz figürlerine rastlanmadı. Üç olguda (olgu no: 1, 2 ve 5) sebaceöz yönde farklılaşma gösteren tümör hücreleri göze çarptı.

4.2. Perianal Epitelyom

Bu tip tümörlerde lobüler yapılar adenom olgularındaki kadar iyi seçilememekte idi. En dikkat çeken bulgu bazaloid hücrelerde sayıca artış idi. Sitoplazmik sınırları seçilemeyen bu hücrelerin çekirdekleri oval ya da yuvarlak şekilli olup hipokromatikti. Nükleer pleomorfizm minimaldi. Neoplastik hücrelerde mitoz figürlerine rastlanmadı. Bir olguda (olgu no:7) küçük hücre gruplarında, bir olguda (olgu no:6) ise tek hücre nekrozu şeklinde koagülasyon nekrozuna rastlandı. Bir olguda (olgu no: 6) epidermisin ülserleşerek gözden silindiği belirlendi. Ülserleşmiş alanlar; fibrin, hücre artıkları, eritrosit ve nötrofil lökositlerden oluşan eksudatla örtülmüştü. Yer yer duktus benzeri yapılar göze çarptı. 20x objektif büyütmesinde ortalama 5 adet duktus benzeri yapı sayıldı. Bir olguda (olgu no:6) kimi duktus benzeri yapıların genişleyerek içi keratinle dolu epidermoid kist biçimini aldığı görüldü. Adenom olgularında görüldüğü gibi yer yer sebaceöz yönde farklılaşma gösteren tümör hücreleri göze çarptı. Bir olguda (olgu no: 6) kan damarları oldukça genişlemiş ve hiperemik olup yer yer kanamalar şekillenmişti.

4.3. Perianal Karsinom

Solid yapılar şeklinde dizilmiş neoplastik hücre proliferasyonları dikkati çekti

(Resim 1). Adenom olgularında görülen lobüler yapı tamamen gözden silinmişti. Bez epitellerinin bazoloid hücrelere oranı olgudan olguya değişmekte idi. Bazı olgularda neoplastik hücrelerin tamamına yakını bazaloid hücrelerden oluşmaktaydı. Hem bez epitelleri hem de bazoloid hücrelerde belirgin nükleer pleomorfizm saptandı (Resim 2). Bez epitelleri ovalden yuvarlağa değişen şekillerde, hipokromatikli çekirdekli ve belirgin çekirdeğe sahipti. Yer yer iki ya da üç çekirdekli bez epitelleri göze çarptı (Resim 3). Hem bez epitelleri hem de bazoloid hücrelerde yüksek mitotik aktivite belirlendi (Resim 4 ve 5). 40x'lık objektif büyütmesinde 0-5 (ortalama 1,28) adet mitoz sayıldı. Olguların genelinde; oldukça geniş nekroze alanlar saptandı (Resim 6). Lobüller arasında duktus benzer yapılar göze çarptı (Resim 7 ve 8). Dört olguda (olgu no: 10, 11, 14, 17) kan damarları oldukça genişlemiş ve eritrositlerle dolu idi (Resim 9). Yer yer kanamalar şekillenmişti. Olguların tamamına yakınında epidermisin ülserleşerek gözden silindiği belirlendi. Yeni şekillenmiş ülserlerde; ülserleşmiş alan fibrin, hücre artıkları, eritrosit ve nötrofil lökositlerden oluşan eksudatla örtülmüştü. Eskimiş olaylarda ise fibroblast proliferasyonu, yeni kan damarları oluşumları ve makrofaj infiltrasyonu ile karakterize granülasyon dokusu şekillenmişti.

4.4. Histopatolojik Bulguların İstatistiksel Analizi

Ülser görülme sıklığı Tablo 5'te sunuldu. Ülser görülme sıklığı açısından iki grup arasında anlamlı farklılık belirlendi.

Tablo 5. Ülser görülme sıklığı ve istatistiksel analiz.

Ülser	Grup		P
	Adenom/Epitelyom	Karsinom	
Var	1	8	
Yok	4	1	0,023
Total	5	9	

Nekrozun görülme sıklığı ve yaygınlığı Tablo 6'da sunuldu. Nekrozun yaygınlığı bakımından iki grup arasında farklılık belirlenmedi.

Tablo 6. Nekrozun görülme sıklığı, yaygınlığı ve istatistiksel analiz.

Nekroz	Grup		P
	Adenom/Epitelyom	Karsinom	
0-1	5	4	0,335
2-3	2	6	
Total	7	10	

Sebaseöz farklılaşma görülme sıklığı ve yaygınlığı Tablo 7’de sunulmuştur. İstatistiksel analizler adenom/epitelyom olguları ile karsinom olguları arasında sebaseöz farklılaşma açısından farklılık olmadığını gösterdi.

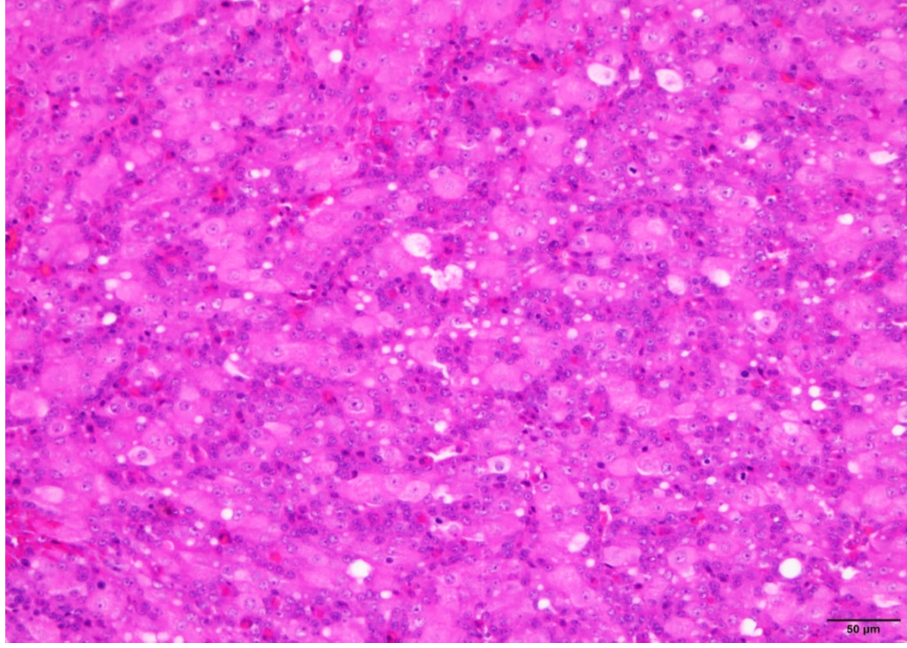
Tablo 7. Sebaseöz farklılaşma görülme sıklığı, yaygınlığı ve istatistiksel analiz.

Sebaseöz farklılaşma	Grup		P
	Adenom/Epitelyom	Karsinom	
0-1	6	5	0,304
2-3	1	5	
Total	7	10	

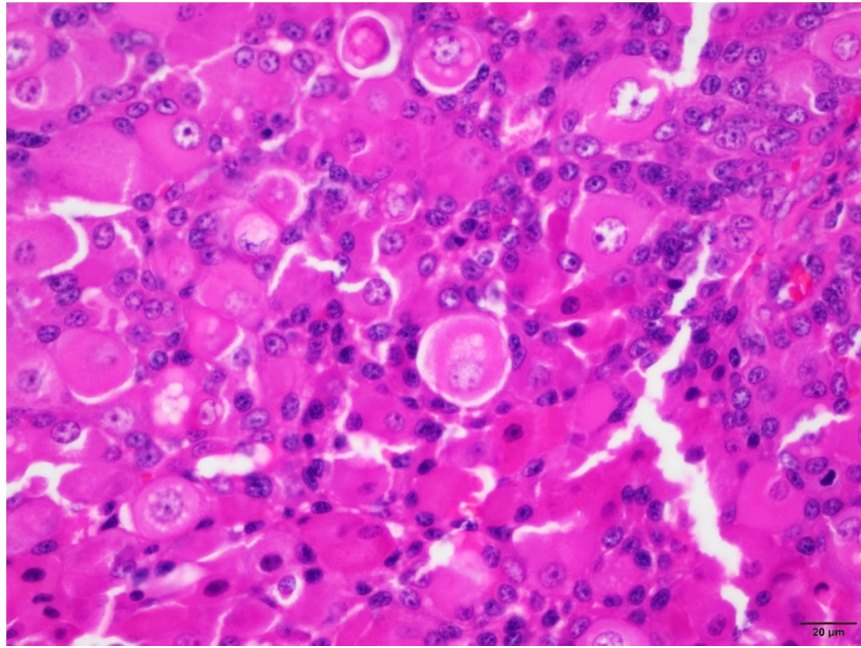
Tablo 8’de görüldüğü üzere; karsinom olgularındaki mitoz sayısı adenom/epitelyom olgularına göre belirgin şekilde yüksekti. Duktus benzeri yapıların sayısı açısından olgular arasında anlamlı farklılık yoktu.

Tablo 8. Olgulara göre ortalama mitoz sayısı, duktus benzeri yapı sayısı ve istatistiksel analiz.

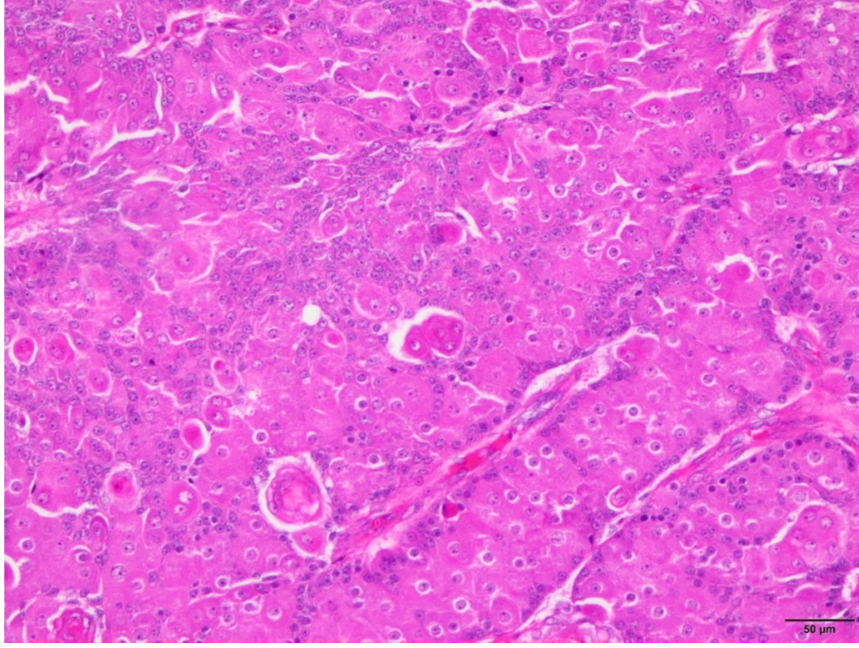
Grup	Mitoz sayısı	Duktus benzeri yapı sayısı
Adenom/Epitelyom	0 (0-0)	0.8 (0-4,8)
Karsinom	1,4 (0-3)	1.8 (0-4,6)
P	0,003	0,462



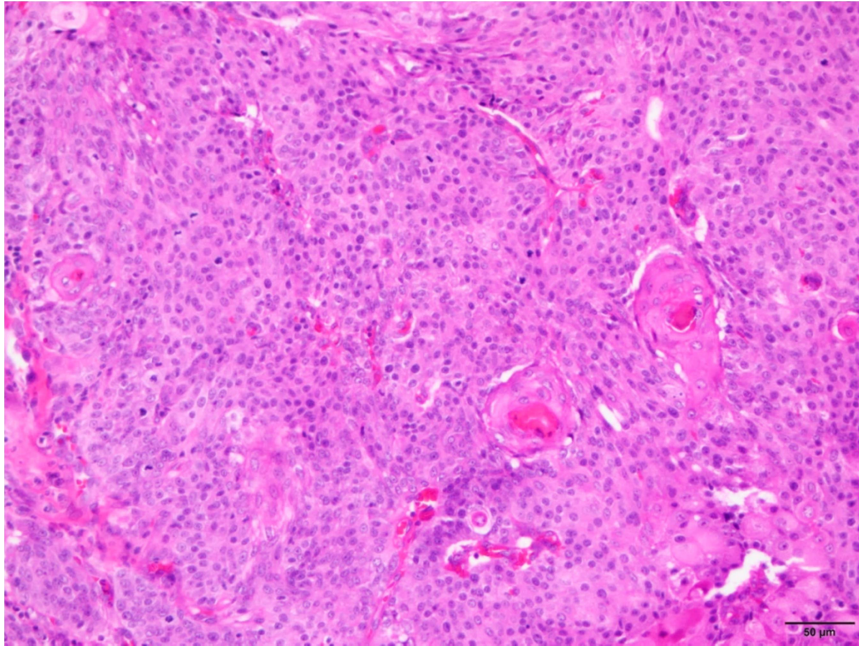
Resim 1. Perianal karsinom; neoplastik hücrelerin solid proliferasyonları (lobüler yapı tamamen gözden silinmiş), rezerv benzeri hücrelerde sayıca artış, yer yer kesin kenarlı vakuoller ve mitoz; olgu no: 9, H-E.



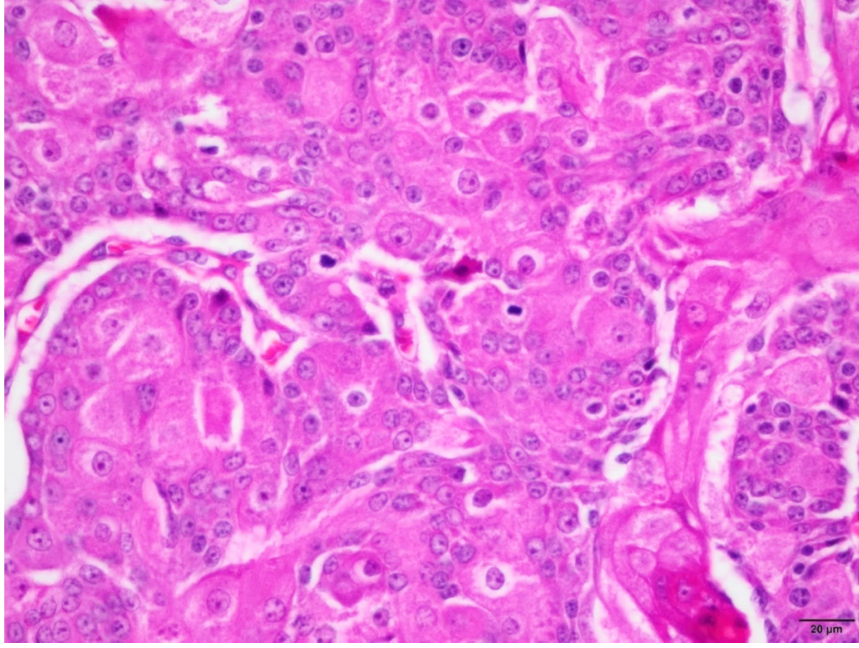
Resim 2. Perianal karsinom; neoplastik hücrelerde intrasitoplazmik yağ vakuolleri; olgu no: 14, H-E.



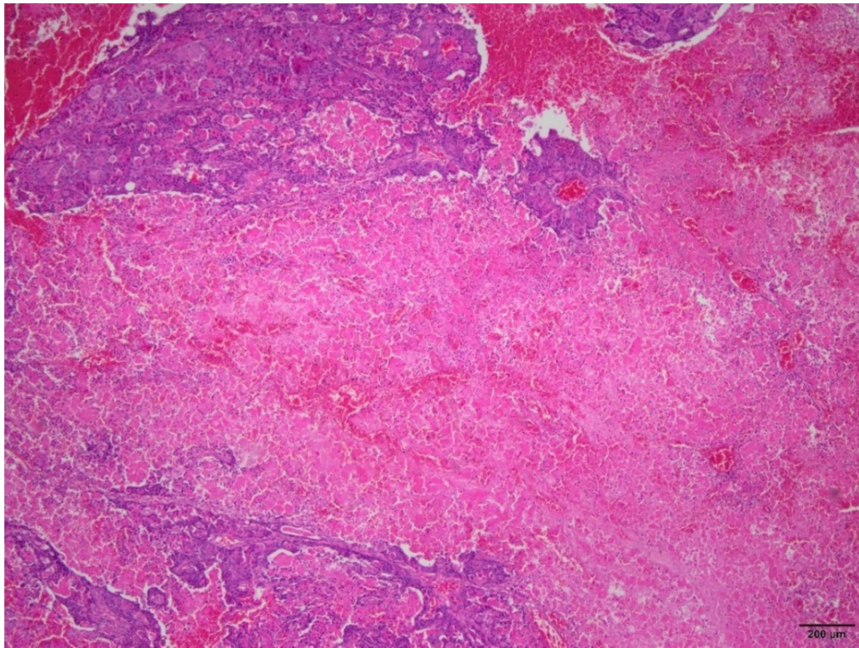
Resim 3. Perianal karsinom; çok çekirdekli neoplastik hücreler; olgu no: 15, H-E.



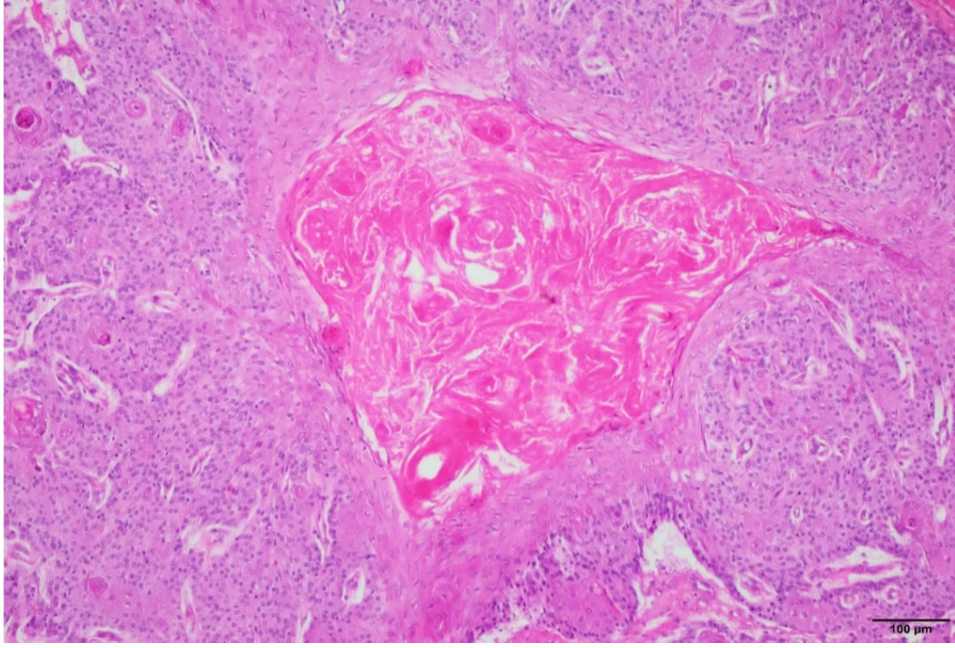
Resim 4. Perianal karsinom; solid neoplastik hücre proliferasyonları, duktus benzeri yapılar ve mitoz; olgu no: 9, H-E.



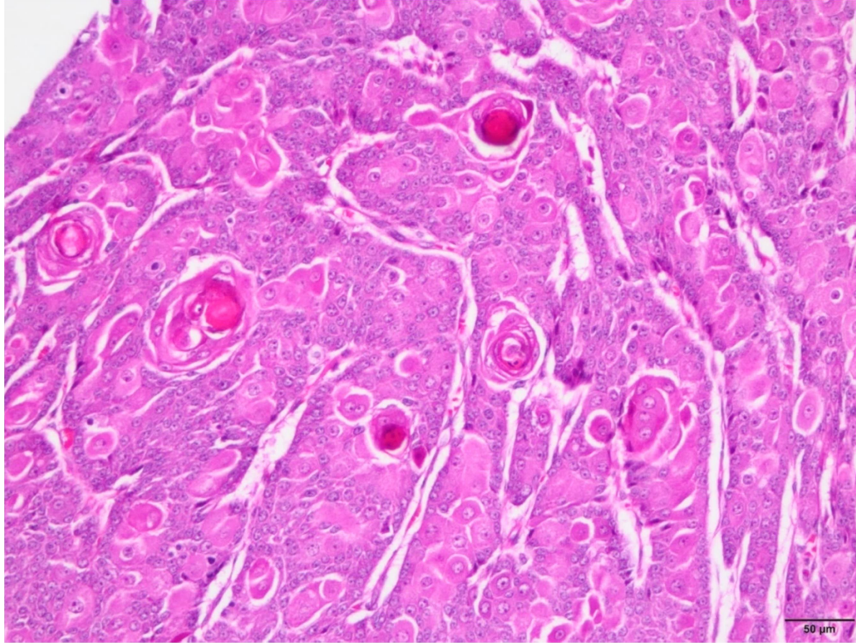
Resim 5. Perianal karsinom; neoplastik bez epitellerinde mitoz; olgu no: 15, H-E.



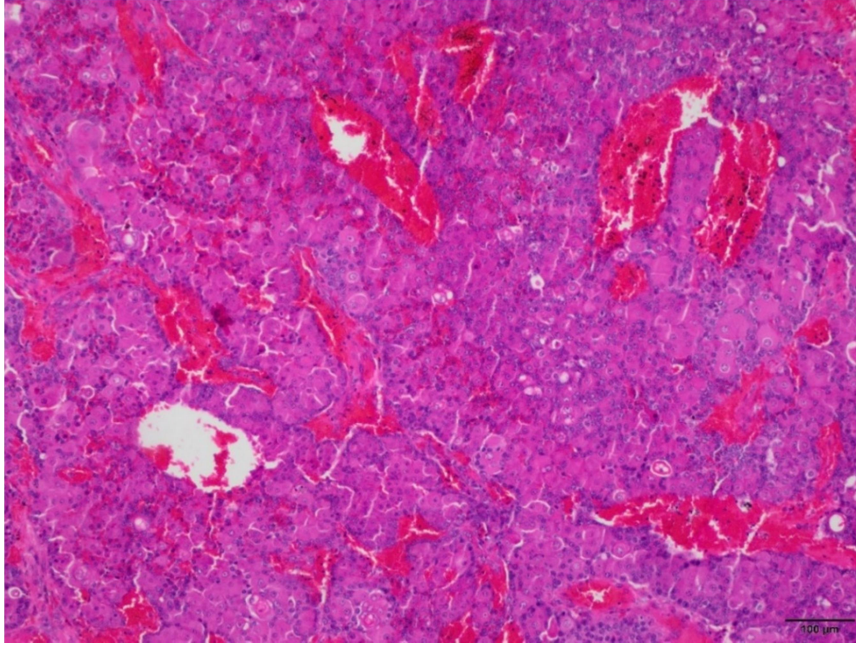
Resim 6. Perianal karsinom; geniş koagülasyon nekrozu ve yer yer kanama; olgu no: 14, H-E.



Resim 7. Perianal karsinom; lümeni keratinle dolu olan genişlemiş duktus-benzeri yapı; olgu no: 10, H-E.



Resim 8. Perianal karsinom; lümeni keratinle dolu çok sayıda duktus-benzeri yapı; olgu no: 15, H-E.



Resim 9. Perianal karsinom; damarlarda genişleme ve hiperemi; olgu no: 14, H-E.

4.5. Anal Kesenin Apokrin Adenokarsinomu

İmmünohistokimyasal boyamalarda pozitif kontrol olarak kullanıldığımız olgunun (rutin no: 121-18) histopatolojik incelemesinde; trabeküler yapılar oluşturan neoplastik hücre proliferasyonları dikkati çekti. Bu yapılar birbirinden ince fibröz bir stroma ile ayrılmıştı. Bazı alanlarda neoplastik hücrelerin bir lümen çevresinde dairesel tarzda dizilerek rozet benzeri yapılar oluşturduğu göze çarptı. Bu yapıların merkezinde eozinofilik bir materyale rastlandı. Neoplastik hücrelerde nükleer pleomorfizm oldukça belirgindi. Bu hücreler; oval, ökromatik ya da hiperkromatik çekirdekli ve belirgin bir çekirdekçiğe sahipti.

4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular

İncelenen olgularda belirlenen CAM5.2, c-KİT ve p-ERK1/2 immunoreaktivitesi Tablo 9'da sunuldu.

Tablo 9. Perianal tümör olgularında CAM5.2, c-KİT ve p-ERK1/2 immunoreaktivitesi.

Olgu	Tanı	CAM5.2 ekspresyonu	c-KİT ekspresyonu			p-ERK1/2 ekspresyonu
			Pozitiflik	Yerleşimi		
				Rezerv/bazoloid	Bez epiteli	
1	Perianal adenom	N*	1	Sitoplazmik	N	N
2	Perianal adenom	N	4	Sitoplazmik	Membranöz	N
3	Perianal adenom	N	4	Sitoplazmik	Sitoplazmik + membranöz	N
4	Perianal adenom	N	3,4	Sitoplazmik	Sitoplazmik	1
5	Perianal adenom	N	4	Sitoplazmik	Sitoplazmik	N
6	Perianal epitelyom	N	2,4	Sitoplazmik	Sitoplazmik	N
7	Perianal epitelyom	N	2	Sitoplazmik	N	2
8	Perianal karsinom	N	-	-	-	N
9	Perianal karsinom	N	4	Sitoplazmik	Sitoplazmik	N
10	Perianal karsinom	N	1	Sitoplazmik	Membranöz	N
11	Perianal karsinom	N	3	Sitoplazmik	Sitoplazmik	N
12	Perianal karsinom	N	2	Sitoplazmik	Membranöz	1
13	Perianal karsinom	N	3	Sitoplazmik	Membranöz	N
14	Perianal karsinom	N	4	Sitoplazmik	Sitoplazmik	N
15	Perianal	N	1	Sitoplazmik	Sitoplazmik	N

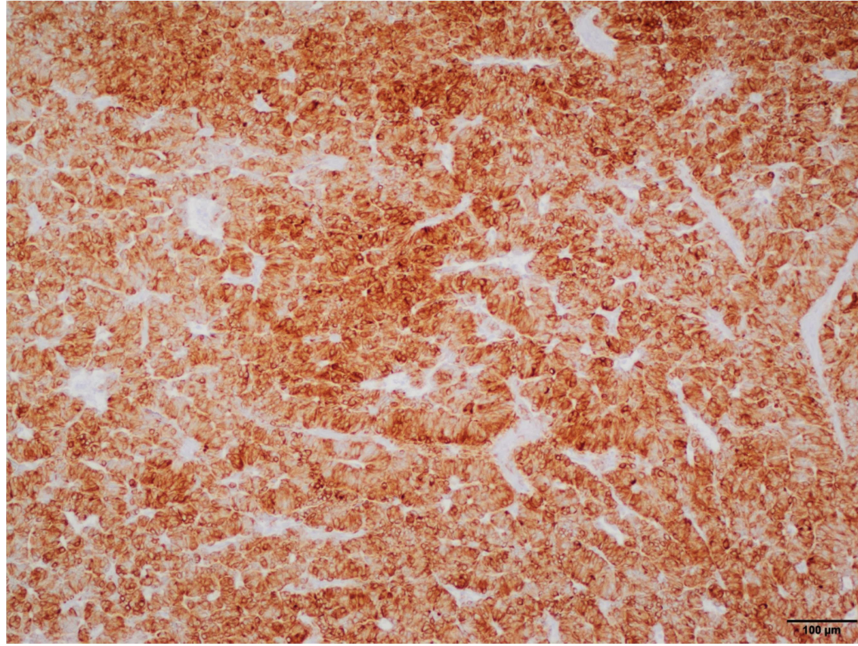
	karsinom					
16	Perianal karsinom	N	3	Sitoplazmik	Sitoplazmik	N
17	Perianal karsinom	N	4	Sitoplazmik	Sitoplazmik	N

*N: negatif

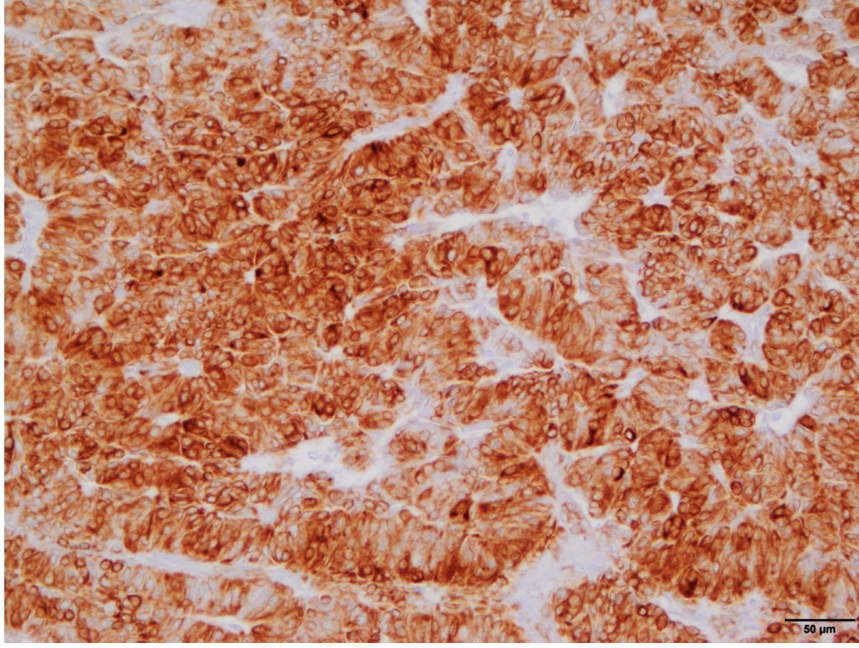
-.: değerlendirme yapılamadı

4.6.1. CAM5.2 İmmunoreaktivitesi

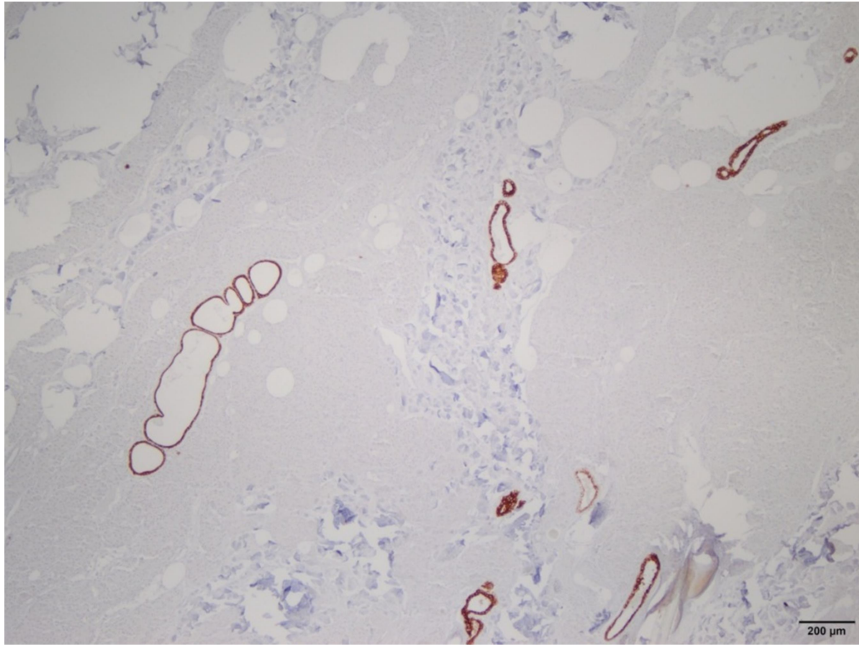
İmmunohistokimyasal boyamalarda pozitif kontrol olarak kullanılan anal kesenin apokrin adenokarsinomu kesitlerinde neoplastik hücrelerin tamamına yakını CAM5.2 pozitif (Resim 10 ve 11). Perianal adenom, perianal epitelyom ve perianal karsinom olgularının hiçbirinde CAM5.2 immunoreaktivitesine rastlanmadı (Resim 12 ve 13).



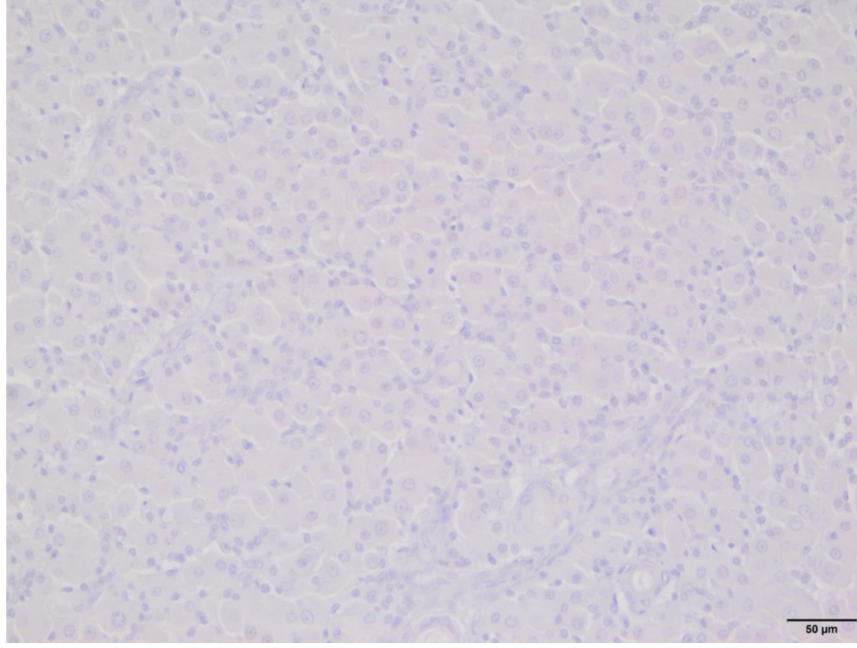
Resim 10. Anal kesenin apokrin adenokarsinomu; neoplastik hücrelerin tamamına yakınında CAM5.2 immunoreaktivitesi; IHC metot.



Resim 11. Anal kesenin apokrin adenokarsinomu; neoplastik hücrelerde sitoplazmik CAM5.2 pozitifliği; IHC metot.



Resim 12. Perianal adenom; neoplastik hücreler CAM5.2 negatif, apokrin bez epitellerinde CAM5.2 immunoreaktivitesi; olgu no: 5, IHC metot.



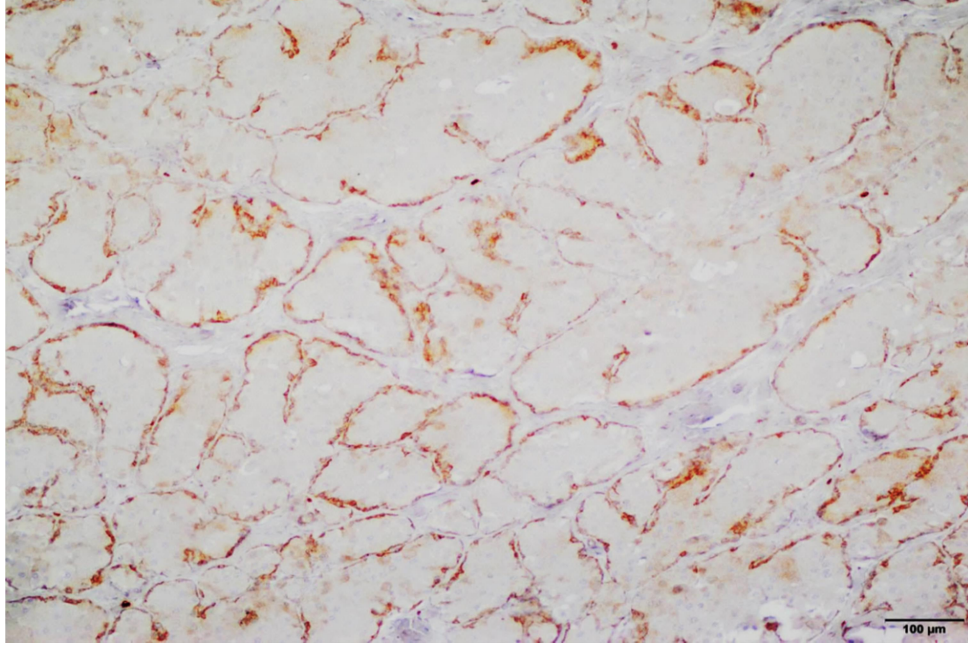
Resim 13. Perianal karsinom; neoplastik hücreler CAM5.2 negatif; olgu no:13, IHC metot.

4.6.2. c-KİT İmmunoreaktivitesi

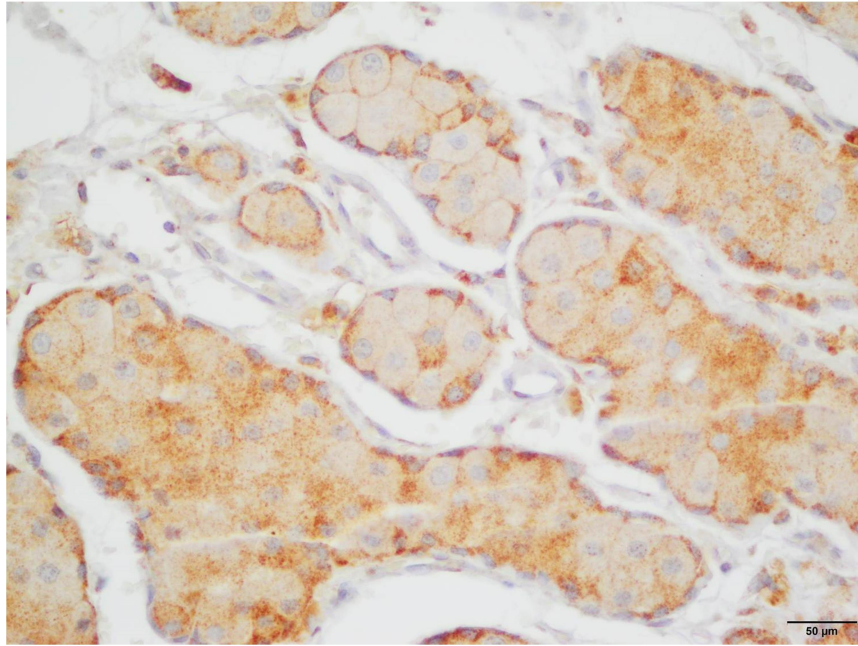
Perianal adenom: İncelenen tüm olgularda rezerv hücrelerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi saptandı (Resim 14). Olguların genelinde bez epitellerinde pozitiflik görüldü. Ancak bez epitellerindeki lokalizasyonu olgudan olguya farklılık göstermekte idi. Bir olguda (olgu no: 2) membranöz, bir olguda (olgu no: 3) membranöz + sitoplazmik (Resim 15) ve iki olguda ise (olgu no: 4, 5) sitoplazmik boyanma (Resim 16) belirlendi.

Perianal epitelyom: Bu grupta yer alan iki olguda da rezerv hücrelerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi saptandı (Resim 17). Bir olguda (olgu no: 6) bez epitellerinde sitoplazmik c-KİT pozitifliği belirlenirken, diğer olguda (olgu no: 7) bez epitellerinde boyanma görülmedi.

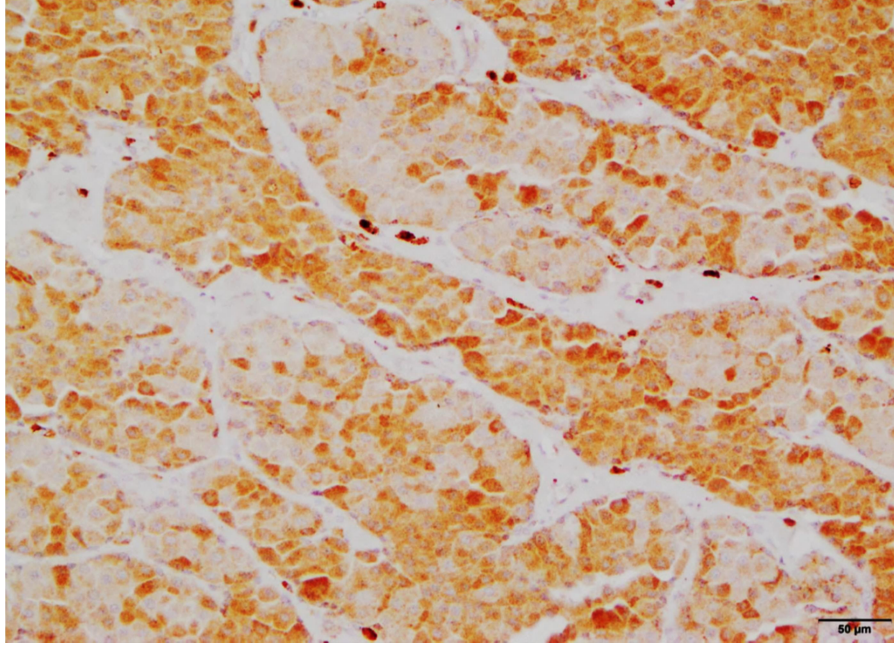
Perianal karsinom: İncelenen olguların tamamında (bir olguda değerlendirme yapılamadı) rezerv hücrelerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi belirlendi (Resim 18). Tüm olgularda bez epitelleri c-KİT ile reaktivite gösterdi. Adenom ve epitelyom vakalarında görüldüğü gibi bez epitellerindeki c-KİT lokalizasyonu olgudan olguya değişiklik göstermekte idi. Olguların genelinde sitoplazmik c-KİT pozitifliği belirlendi (Resim 19).



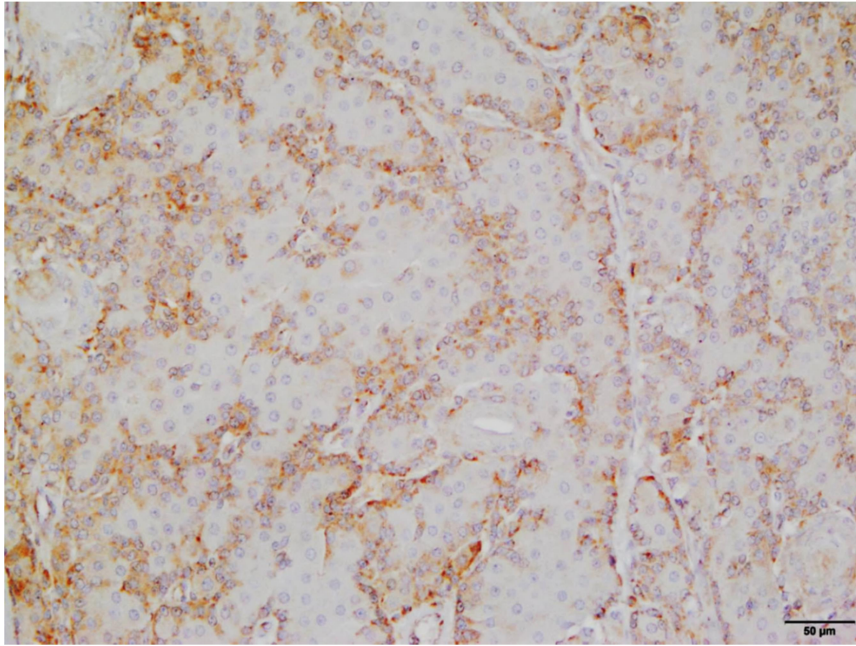
Resim 14. Perianal adenom; rezerv hücrelerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi; skor= 1; olgu no:1, IHC metot.



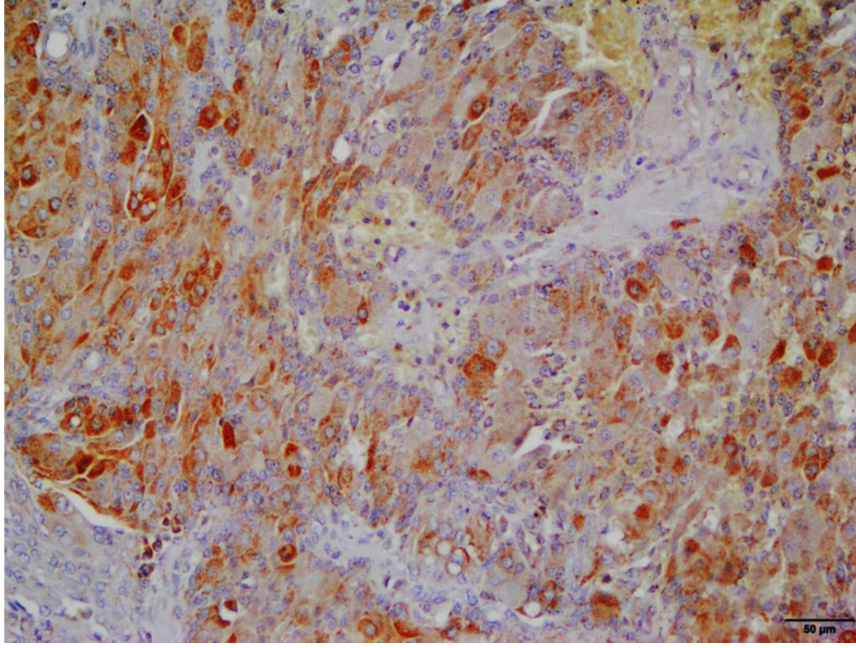
Resim 15. Perianal adenom; rezerv hücrelerinde sitoplazmik, bez epitellerinde membranöz + sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi; skor = 4; olgu no:3, IHC metot.



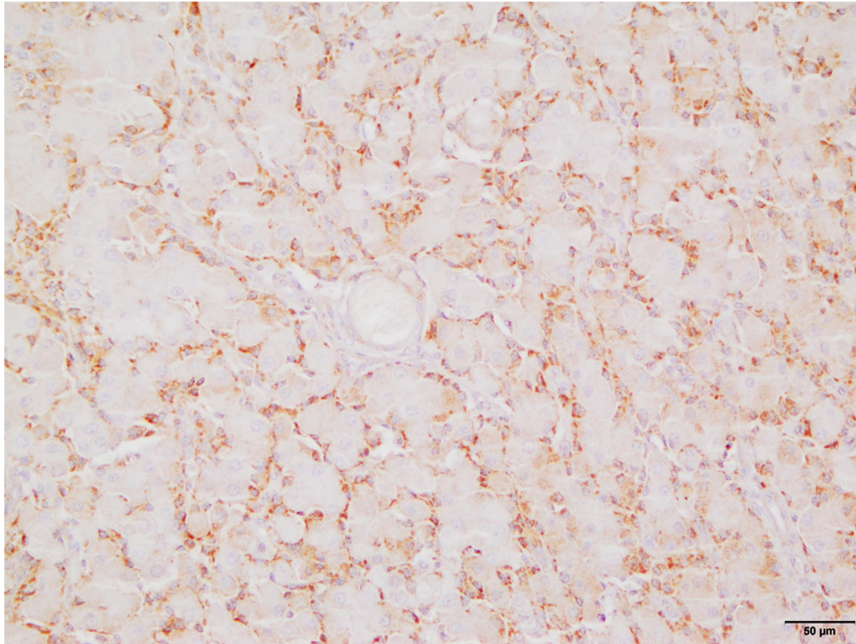
Resim 16. Perianal adenom; rezerv ve bez epitellerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi; skor = 4; olgu no:5, IHC metot.



Resim 17. Perianal epitelyom; rezerv hücrelerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi; skor= 2; olgu no: 7, IHC metot.



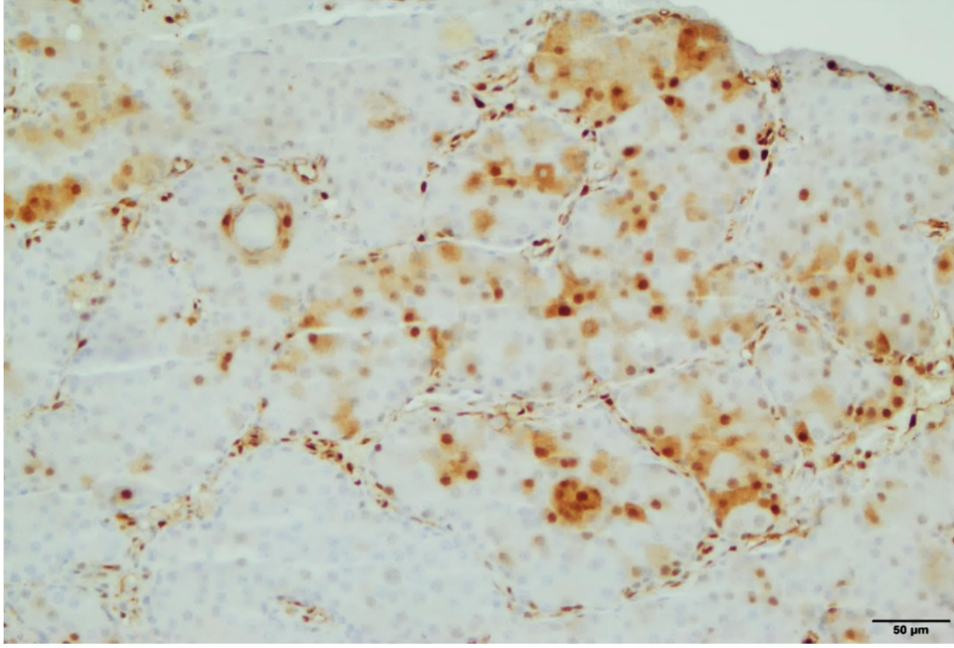
Resim 18. Perianal karsinom; rezerv benzeri hücre ve bez epitellerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi; skor= 3; olgu no: 11, IHC metot.



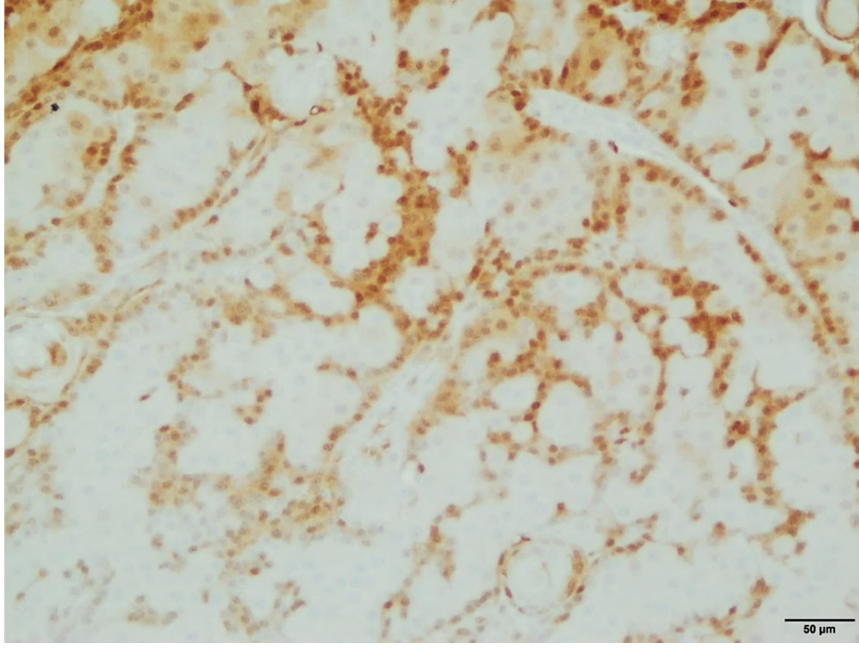
Resim 19. Perianal karsinom; rezerv benzeri hücrelerde sitoplazmik, bez epitellerinde membranöz c-KİT immunoreaktivitesi; skor= 3; olgu no: 13, IHC metot.

4.6.3. p-ERK1/2 İmmunoreaktivitesi

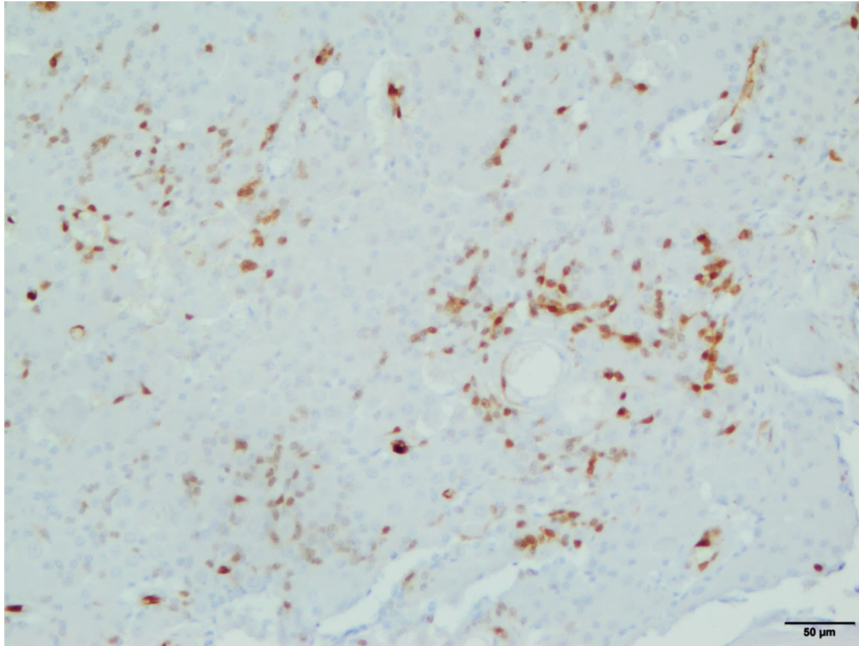
Olguların tamamına yakınında neoplastik hücrelerde p-ERK1/2 ifadesi belirlenmedi. Adenom olgularının birinde (olgu no: 205-05) düşük düzeyde (Resim 20), epitelyom olgularının birinde orta düzeyde (Resim 21) ve karsinom olgularının birinde düşük düzeyde p-ERK1/2 immunoreaktivitesi belirlendi (Resim 22). Tümör tipine bakılmaksızın tüm olgularda endotel hücreleri p-ERK1/2 pozitif (Resim 23).



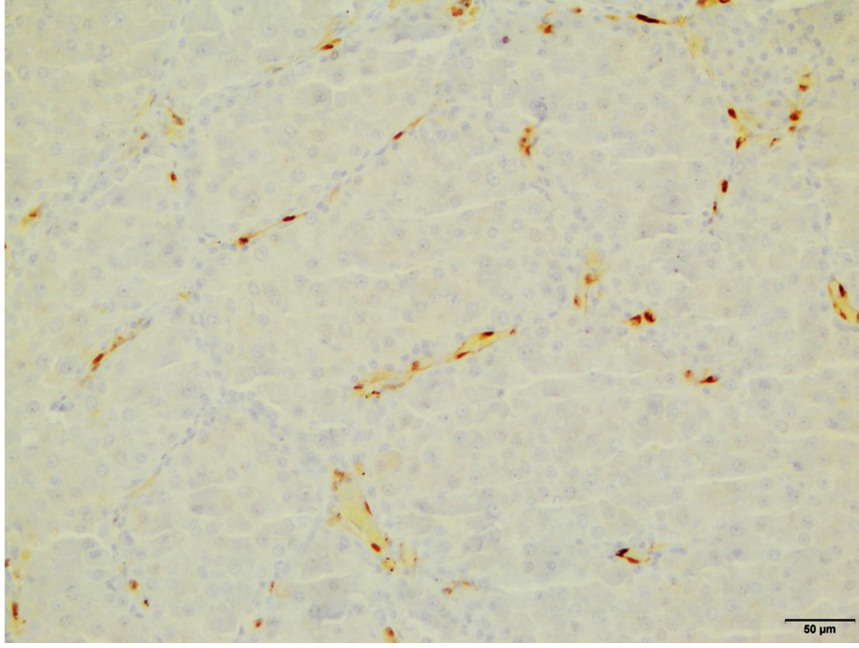
Resim 20. Perianal adenom; rezerv benzeri ve bez epitellerinde p-ERK1/2 immunoreaktivitesi; skor= 1; olgu no: 3, IHC metot.



Resim 21. Perianal epitelyom; rezerv benzeri ve bez epitellerinde p-ERK1/2 immunoreaktivitesi; skor= 2; olgu no: 7, IHC metot.



Resim 22. Perianal karsinom; neoplastik hücrelerde p-ERK1/2 immunoreaktivitesi; skor= 1; olgu no: 12, IHC metot.



Resim 23. Perianal adenom; endotel hücrelerinde p-ERK1/2 immunoreaktivitesi; olgu no: 4, IHC metot.

5. TARTIŞMA

Perianal bez dokusunun gelişimi pubertede cinsiyet hormonlarının etkisi altında başlayıp (Hayes ve Wilson, 1977; Maita ve Ishida, 1975; Wilson ve Hayes, 1979) yaşlılık evresine kadar devam eder (Baker, 1967). Androjenik hormonlar bezin gelişimini uyarır (Genevois, 1980; Maita ve Ishida, 1975). Testosteron verilen 60 günlük köpeklerde perianal bez dokusunun büyüyerek yetişkinlik dönemindeki boyutlarına eriştiği ortaya konulmuştur (Maita ve Ishida, 1975). Perianal bezlerden köken alan perianal tümörlerin de cinsiyet hormonlarının etkisinde altında geliştiği; androjenik hormonların tümör gelişimini uyarırken, östrojenlerin baskıladığını ileri sürülmüştür (Nielsen ve Attosmis, 1964). Neoplastik bez dokusunda androjen, östrojen ve progesterona özgü reseptörlerin ortaya konulması (Kim ve diğerleri, 2018; Pisani ve diğerleri, 2006) bu görüşü desteklemektedir. Kastrasyon bu tümörlerin tedavisinde uygulanan klasik tedavi yöntemidir (Wilson ve Hayes, 1979). Kastrasyonun perianal adenomun tamamen ya da kısmen gerilemesine yol açtığı ve tümörün cerrahi rezeksiyonundan sonra nüks görülmediği rapor edilmiştir (Wilson ve Hayes, 1979). Bunun aksine, Vail ve diğerleri (1990), perianal karsinomlu olgularda kastrasyonun faydasının olmadığını bildirmiştir. Pisani ve diğerleri (2006), perianal karsinomlu olgulardaki androjen reseptörü ifadesinin normal bez dokusuna göre daha fazla olmasından hareketle bu olgularda cerrahi eksizyona ilaveten kastrasyonun yararlı olabileceğini ileri sürmüştür. Bu çalışmada incelediğimiz olguların kastre edilip edilmediğine ve tümörün nüks edip etmediğine dair elimizde kayıt yoktu. Bu nedenle ileri sürülen görüşler değerlendirilemedi.

Perianal tümörler köpeklerde meme tümörleri ve mast hücre tümörlerinde sonra en sık görülen kanser türüdür. Raporlar perianal adenom olgularının tüm deri tümörlerinin %8-20'sini oluşturduğu göstermektedir (Goldschmidt ve Hendrick, 2002; Pereira ve diğerleri, 2013; Yumusak, 2012). Perianal tümörlerin çoğunu adenom olgularının oluşturduğu belirtilmektedir. Brodzki ve diğerleri (2014), inceledikleri perianal tümörlü olguların %60'ını adenom olgularının oluşturduğu rapor etmiştir. Bu çalışmada incelenen olguların yarısından fazlasını (%59) karsinom olguları oluşturdu. Bu sonuç adenom/epitelyom olgularının kastrasyon sonrası kendiliğinden gerilemesi ya da perianal bölgede gelişen kitlelerin hepsinin histopatolojik inceleme talebiyle patoloji laboratuvarına gönderilmemesiyle ilişkili olabilir. Türkiye'de yürütülen bir çalışmada perianal tümörlü 9

olgudan 6'sını karsinom olguları oluşturmuştur (Yumusak, 2012).

Perianal tümörler için cinsiyet yatkınlığı bildirilmiştir; erkek köpeklerde dişilere göre 5,6 kat daha fazla görülür (Hayes ve Wilson, 1977). Milli ve Kutsal (2003), perianal tümörlü 14 olgudan 13'ünün erkek olduğunu rapor etmiştir. Bir başka çalışmada perianal tümörlü 42 olgudan 34'ünün erkek olduğu bildirilmiştir (Pereira ve diğerleri, 2013). Yumusak ve Kutsal (2016), perianal tümörlü 32 olgunun 22'sini (% 68) erkek köpeklerin oluşturduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada incelenen 17 olgunun 14'ünün erkek olması daha önceki raporlarla uyum içindedir. Dişilerde daha az görülmesinin östrojen hormonuyla ilgili olabileceği ileri sürülmektedir (Goldschmidt ve Hendrick, 2002).

Perianal tümörler genelde 8 yaş ve üzeri köpeklerde görülür. Pereira ve diğerleri (2013), inceledikleri perianal tümörlü olguların yaşlarının 3-15 arasında değiştiğini rapor etmiştir. Aynı çalışmada adenom olgularının yaş aralığı 5-13 olarak, epitelyom olgularının 8-15 olarak, karsinom olgularının ise 3-12 olarak kaydedilmiştir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada incelenen olguların yaşlarının 3-16 arasında değiştiği kaydedilmiştir (Yumusak ve Kutsal, 2016). Sunulan çalışmada olguların yaşı 1-17 arasında değişmekte idi. Adenom/epitelyom olgularının yaş aralığı 6-17 (ortalama 13) olarak, karsinom olgularının ise 1-14 (ortalama 11.5) olarak kaydedildi. Bu sonuçlar önceki çalışma sonuçlarıyla uyum içindedir. Perianal karsinomlu 1 olgunun 1 yaşında olması bu tümörlerin her yaştan köpekte görüldüğünü ortaya koymaktadır.

Perianal tümörler için ırk yatkınlığı bildirilmiştir; Siberian Husky, Samoyed, Cocker Spaniel yüksek risk altındaki ırklardır (Goldschmidt ve Hendrick, 2002; Pisani ve diğerleri, 2006; Wilson ve Hayes, 1979). Sunulan çalışmada olguların yaklaşık dörtte birini Terrier ırkı oluşturdu. Bu ırk için duyarlılık bildirilmemiştir. Terrier ırkında daha yüksek oranda görülmesi ırk yatkınlığından ziyade bu bölgede bu ırkın daha çok yetiştirilmesiyle ilgili olabilir. Türkiye'de yürütülen bir çalışmada perianal tümörlü olguların %40,6'sını Terrier ırkı köpeklerin oluşturması (Yumusak, 2012) ileri sürülen görüşü desteklemektedir.

Perianal tümörlü olgularda saptanan histopatolojik bulgular daha önceki raporlarla uyum içindeydi (Goldschmidt ve Hendrick, 2002). Adenom olgularında lobüller yapıda ya da kordonlar şeklinde dizilim gösteren neoplastik hücre proliferasyonları göze çarptı. Neoplastik hücreler morfolojik olarak normal bez epitellerine benzer görünüşte idi. Epitelyom olgularında tümör lobülleri adenom olgularındaki kadar iyi seçilemekte idi ve en dikkat çekici bulgu bazoloid hücrelerdeki sayıca artışı. Sitoplazmik sınırları seçilemeyen

bazoloid hücrelerin çekirdekleri oval ya da yuvarlak şekilli olup hipokromatikti. Nükleer pleomorfizm minimal düzeyde idi. Karsinom olgularında solid yapılar oluşturan neoplastik hücre proliferasyonları dikkati çekti. Hepatoid:bazoloid hücre oranı olgudan olguya değişmekle birlikte bazı olgularda neoplastik hücrelerin tamamına yakınının bazaloid hücrelerden oluştuğu belirlendi. Perianal tümörlü olgularda apoptotik hücre sayısının incelendiği bir çalışmada karsinom olgularındaki apoptotik hücre sayısının hiperplastik, adenom, 'orta derece farklılaşmış adenom', 'zayıf farklılaşmış adenom' olarak sınıflandırılan olgulara göre arttığını bildirmiştir (Martins ve diğerleri, 2008). Aynı çalışmada karsinom olgularındaki yüksek apoptotik hücre sayısının androjenler tarafından intrinsik yolla apoptozisin uyarılması, P53 mutasyonu ya da 'survivin' adı verilen, görevi apoptozu engellemek olan proteini kodlayan gende meydana gelen mutasyon sonucu şekillenmiş olabileceğini ileri sürülmüştür. Sunulan çalışmada adenom/epitelyom olgularının genelinde tek hücre nekrozu şeklinde, karsinom olgularında ise lobüllerin merkezi kısımlarındaki küçük hücre gruplarında ya da bir lobulusun tamamına yakınını etkileyen geniş nekroze alanlar görüldü. Karsinom olgularında görülen geniş nekroze alanlar yeni oluşan kan damarlarının tümörün büyüme hızına yetişemeyip lobülün merkezi kısımlarındaki hücrelerin beslenememesiyle açıklanabilir. İstatistiksel analizlerde nekrozun yaygınlığı bakımından farklılık olmaması incelenen örnek sayısının azlığıyla ilişkili olabilir.

İncelenen adenom/epitelyom olgularında mitoz görülmezken, karsinom olgularında yüksek mitotik aktivite belirlendi. Bu bulgu önceki bir raporla uyum içinde (Yumusak ve Kutsal (2016) iken başka bir çalışmayla Pereira ve diğerleri (2013) çelişmektedir. Pereira ve diğerleri 2013, epitelyom olgularında az sayıda mitoz görüldüğünü, karsinom olgularında bu sayının arttığını bildirmiştir. Sunulan çalışmada epitelyom olgularında mitoz görülmemesi incelediğimiz örnek sayısının az olmasıyla ilişkili olabilir. İstatistiksel analizler karsinom olgularındaki mitoz sayısının adenom/epitelyom olgularına göre anlamlı şekilde yüksek olduğunu ortaya koydu. Bu sonuç yüksek mitoz sayısının karsinom olgularının tanısında yardımcı olabileceği görüşünü desteklemektedir (Goldschmidt ve Hendrick, 2002).

İncelenen olgularının tamamında skuamöz metaplazi görüldü. İstatistiksel analizler adenom/epitelyom ve karsinom olguları arasında skuamöz metaplazi sayısı bakımından farklılık yoktu. Pereira ve diğerleri (2013), inceledikleri epitelyom olgularının bir kısmında yer yer skuamöz metaplaziye rastlandıklarını rapor etmiş, adenom ve karsinom olgularında skuamöz metaplazi görüp görmediklerini rapor etmemiştir. Yine bir başka çalışmada incelenen perianal tümör olgularından karsinom olgularının bir kısmında skuamöz metaplazi

ve duktus benzeri yapılar görüldüğü bildirilmiştir (Yumusak ve Kutsal, 2016).

Perianal karsinom olgularının genelinde epidermin ülserleşerek gözden silindiği bildirilmiştir (Betini ve diğerleri, 2005; Genevois, 1980; Vail ve diğerleri, 1990; Yumusak ve Kutsal, 2016). Bu çalışmada karsinom olgularında adenom/epitelyom olgularına göre daha fazla oranda ülser görülmesi daha önceki raporlarla uyum içindedir (Gross ve diğerleri, 2005). İstatistiksel olarak farklılık saptanması perianal tümör tiplerinin sınıflandırılmasında göz önünde bulundurulması gereken kriterlerden biri olduğu ortaya koydu.

Köpeklerin anal bölgesinde üç tip bez bulunur; perianal bezler, anal bezler ve anal kesenin apokrin bezleri. Perianal bezler anüsün çevresinde bulunan deri altında yerleşmiş modifiye yağ bezleridir. Tubuloasiner bez yapısındaki anal bezler anal kanalın 'columnar' bölgesinde submukoza ve kas katmanları arasında bulunur. Anal kese anal bölgenin ventrolateralinde bulunan bir çift kese olup duvarında apokrin bez yapısında çok sayıda bez yer alır (Evans, 1993; Vos ve diğerleri, 1992). Anal bölgede yer alan bezlerden köken tümörlerin doğru tanısı önem arz eder. Çünkü klinik seyirleri ve tedavi seçenekleri farklılık göstermektedir. Histopatolojik bakı ayırıcı tanıda genelde yeterli olur iken şayet anamnez bilgileri yeterli değilse, biyopsi örneği çok küçükse ve tümör zayıf farklılaşmış neoplastik hücrelerden oluşuyor ise yeterli olmayabilir. Böyle bir durumda tanıyı kesinleştirmek için immunohistokimyasal boyamalar kullanılabilir (Stern ve diğerleri, 2018). Walter (2000), perianal tümürlü olguların sitokeratin 8 ve -18'e özgü CAM5.2 antikoru ile boyanmadığını bildirmiştir. Kedi anal kesenin apokrin adenokarsinomu olguları üzerinde yapılan bir çalışmada; olguların tamamının CAM5.2 pozitif olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada perianal tümürlü 3 köpekten alınan kesitler CAM5.2 immunoreaktivitesi yönünden değerlendirilmiş ve CAM5.2'e karşı reaktivite belirlenmediği rapor edilmiştir (Shoieb ve Hanshaw, 2009). Sunulan çalışmada perianal tümörlerin tanısı ve sınıflandırılmasında histopatolojik inceleme yeterli oldu. Perianal karsinomlu 2 olguda zayıf farklılaşmış hücrelerin yoğun olarak bulunduğu alanlarda dahi yer yer bez epitellerine rastlandı. CAM5.2 antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda neoplastik hücrelerde pozitiflik saptanmadı. İmmunohistokimyasal boyamalarda pozitif kontrol olarak kullanılan anal kesenin apokrin adenokarsinomu olgusunda neoplastik hücrelerin tamamına yakını CAM5.2 pozitif. Elde edilen sonuçlar anüsün çevresindeki bezlerden köken alan tümörlerin ayırıcı tanısında özellikle zayıf farklılaşmış olgularda CAM5.2 antikoruyla yapılan immunohistokimyasal boyamaların yararlı olabileceğini düşündürdü.

CD117; c-KİT proto-onkogeni tarafından kodlanan bir tirozin kinaz reseptörüdür.

Hücre proliferasyonu, farklılaşması, büyümesi ve gelişmenin düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. Kastrasyona dirençli prostat kanseri olguları üzerinde yapılan çalışmalar neoplastik hücrelerin c-KİT reseptörüne karşı reaktivite gösterdiğini ortaya koymuş ve bu reseptör ve onunla ilgili sinyal yollarının neoplastik hücrelerin çoğalmasını uyardığı kanısına varılmıştır (Pfeiffer ve diğerleri, 2011). Wiesner ve diğerleri (2008), incelenen benign prostat hiperplazisi, primer prostat kanseri, kemik metastazlı prostat kanseri olguları arasında c-KİT reaktivitesi bakımından farklılık olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada perianal tümör olgularında c-KİT ifadesi ilk kez değerlendirildi. İstatistiksel analizler perianal tümör alt tipleri arasında c-KİT ifadesi bakımından farklılık olmadığını gösterdi. Köpek meme tümörlerinde yapılan bir çalışmada c-KİT ifadesiyle tümörün histolojik alt tipi arasında bağlantı olmadığı belirlenmiştir (Brunetti ve diğerleri, 2014). Başka bir çalışmada köpek prostat kanseri olgularında c-KİT ifadesiyle tümörün alt tipi arasında ilişki bulunmadığı rapor edilmiştir (Fonseca-Alves ve diğerleri, 2017). Köpek meme tümörlerinde yapılan çalışmada olgular arasında c-KİT boyanma paterni bakımından farklılık olduğu rapor edilmiştir. Benign olgularda membranöz, sitoplazmik ve membranöz sitoplazmik boyanma görülürken, malign olgularda sitoplazmik ya da membranöz + sitoplazmik boyanma belirlenmiş ve istatistiksel analizler c-KİT boyanma paterniyle malign olguların histolojik alt tipleri arasında korelasyon olduğunu ortaya koymuştur (Brunetti ve diğerleri, 2014). Bu çalışmada incelenen tüm olgularda rezerv/bazoid hücrelerinde sitoplazmik c-KİT immunoreaktivitesi belirlendi. Hepatoid hücrelerdeki c-KİT boyanma paterni olgudan olguya göre değişmekte idi. Adenom/epitelyom olguları incelendiğinde bir olguda membranöz, 3 olguda sitoplazmik, 1 olguda ise membranöz + sitoplazmik boyanma belirlenidi. Karsinom olgularından 6'sında sitoplazmik, üçünde ise membranöz boyanma saptandı. c-KİT boyanma paterniyle tümör tipi arasında anlamlı farklılık bulunmamışsa olsa da bu durum örnek sayısının azlığıyla ilişkili olabilir. O nedenle elde edilen sonucun gerçek durumu yansıtmıyor olabileceğini düşünüldü. Olguların genelinde sitoplazmik boyanma paterninin belirlenmesi ve membranöz boyanmanın az olması nihai olgunluğa erişemeyen proteinin hücre içinde birikmesine, aktiflenmiş cKIT'in internalizasyonuna ya da anormal sentezine bağlı olabilir (Brunetti ve diğerleri, 2014). Bir ön çalışma niteliğinde olan bu çalışmadan elde edilen bulgular c-KİT'in perianal tümör gelişiminde rolü olduğunu düşündürdü. Kesin kanıya varabilmek için çok sayıda örnekte inceleme yapılmasının gerektiğini düşünmekteyiz. Karsinom olgularının genelinde c-KİT ifadesinin belirlenmesi bu olguların özellikle de yüksek düzeyde c-KİT ifade edenlerin tirozin kinaz inhibitörlerine karşı duyarlı olabileceğini düşündürdü.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada perianal tümörlü olgularda c-KİT reseptörü ve onunla ilişkili sinyal yollarından biri olan MAPK sinyal yolağının aktivasyon durumu değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar;

1. Perianal karsinom olgularının tıpkı perianal adenom ve –epitelyom olguları gibi yaygın olarak görüldüğünü gösterdi.

2. Perianal tümörlerin erkek köpeklerde dişilere göre daha sık görüldüğü görüşünü doğruladı.

3. Perianal tümörlerin genellikle 8 yaş ve üstündeki yaşlı köpeklerde görüldüğü görüşünü teyit etti.

4. Nekroz, mitoz sayısı ve ülser gibi H-E ile boyanmış preparatlarda kolaylıkla değerlendirilebilecek histopatolojik parametrelerin perianal tümörlerin alt türlerinin tanısında yardımcı birer parametre olarak kullanılabilceğini düşündürdü.

5. Perianal tümör olgularında CAM5.2 antikoruna ile reaktivite görülmemesi anüsün çevresindeki bezlerden köken alan tümörlerin ayırıcı tanısında CAM5.2 antikoruyla yapılan immunohistokimyasal boyamaların yararlı olabileceğini düşündürdü.

6. Perianal tümörün histolojik alt tipiyle c-KİT ifadesi arasında ilişki olmadığı gösterildi. Olguların genelinde sitoplazmik (anormal) c-KİT immunoreaktivitesinin belirlenmesi bu reseptörün perianal tümör gelişiminde rolü olduğunu düşündürdü. Ayrıca yüksek düzeyde c-KİT ifade eden olguların kinaz inhibitörlerinden fayda görebileceğini akla getirdi.

7. Olguların çok azında p-ERK1/2 ile pozitif boyanmanın saptanması bu sinyal yolağının perianal tümörlerin gelişiminde rolü olmadığını düşündürdü.

KAYNAKLAR

- Adachi, M., Hoshino, Y., Izumi, Y., & Takagi, S. (2016). Immunohistochemical detection of a potential molecular therapeutic target for canine hemangiosarcoma. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78(4), 649–656.
- Argyle, D. J. (2013) Molecular/Targeted Therapy of Cancer. In Stephen J. Withrow, David M. Vail, Rodney L (Eds). *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (pp: 215-244), Philadelphia, Saunders.
- A'Hern, R. P., Jamal-Hanjani, M., Szász, A. M., Johnston, S. R., Reis-Filho, J. S., Roylance, R., Swanton, C. Taxane. (2013) benefit in breast cancer--a role for grade and chromosomal stability. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 10(6):357-64.
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A. L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A. P., Caldas, C., Davies, H. R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjörd, J. E., Foekens, J. A... Stratton, MR. (2002) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 500(7463):415-21.
- Baker, K.P. (1967) The history and histochemistry of the circumanal hepatoid glands of the dog. *Journal of Small Animal Practice*. 8, 639–647.
- Bardi, G., Fenger, C., Johansson, B., Mitelman, F., Heim, S. (2004) Tumor karyotype predicts clinical outcome in colorectal cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*. 22(13):2623-34.
- Berrocal, A., Vos, J. H., van den Ingh, T. S., Molenbeek, R. F., van Sluijs, F. J. (1989) Canine perineal tumours. *Zentralbl Veterinarmed A*. 36(10):739-49.
- Betini, G., Morini, M., Campagna, F., Preziosi, R. (2005) True grit: the tale of a subcutaneous mass in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*. 34, 73-75.
- Bettini, G., Morini, M., Marcato, P. S. (2003) Gastrointestinal spindle cell tumours of the dog: histological and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology*. 129(4):283-93.
- Bhattacharya, I., Pradhan, B. S., Sarda, K., Gautam, M., Basu, S., Majumdar, S. S. (2012) A

switch in Sertoli cell responsiveness to FSH may be responsible for robust onset of germ cell differentiation during prepubertal testicular maturation in rats. *American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 303(7):E886-98.

- Bialas, M., Borczynska, A., Rozwadowska, N., Fiszler, D., Kosicki, W., Jedrzejczak, P., Kurpysz, M. (2010) SCF and c-kit expression profiles in male individuals with normal and impaired spermatogenesis. *Andrologia*. 42(2):83-91
- Biermann, K., Göke, F., Nettersheim, D., Eckert, D., Zhou, H., Kahl, P., Gashaw, I., Schorle, H., Büttner, R. (2007) c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma. *The Journal of Pathology*. 213(3):311-8.
- Blanchard, K. T., Lee, J. Boekelheide., K, Leuprolide. (1998) A gonadotropin-releasing hormone agonist, reestablishes spermatogenesis after 2,5-hexanedione-induced irreversible testicular injury in the rat, resulting in normalized stem cell factor expression. *Endocrinology*. 139(1):236-44.
- Brodzki, A., Łopuszyński, W., Brodzki, P., Tatara, M. R. (2014) Diagnostic and prognostic value of cellular proliferation assessment with Ki-67 protein in dogs suffering from benign and malignant perianal tumors. *Folia Biologica*. 62(3):235-41.
- Brosens, R. P., Belt, E. J., Haan, J. C., Buffart, T. E., Carvalho, B., Grabsch, H., Quirke, P., Cuesta, M. A., Engel, A. F., Ylstra, B., & Meijer, G. A. (2011). Deletion of chromosome 4q predicts outcome in stage II colon cancer patients. *Cellular Oncology (Dordrecht)*. 34(3), 215–223.
- Brunetti, B., Beha, G., Benazzi, C., Bondin, V., De Tolla, L., Sarli, G. (2014) CD117 expression influences proliferation but not survival in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 151(2-3):202-6.
- Christoforou, P., Christopoulos, P. F., & Koutsilieris, M. (2014). The role of estrogen receptor β in prostate cancer. *Molecular Medicine*. 20(1), 427–434.
- Correia, S., Alves, M. R., Cavaco, J. E., Oliveira, P. F., Socorro, S. (2014) Estrogenic regulation of testicular expression of stem cell factor and c-kit: implications in germ cell survival and male fertility. *Fertility and Sterility*. 102(1):299-306
- Cronise, K. E., Hernandez, B. G., Gustafson, D. L., Duval, D. L. (2019) Identifying the ErbB/MAPK Signaling Cascade as a Therapeutic Target in Canine Bladder Cancer.

Molecular Pharmacology. 96(1):36-46.

- Cullen, J. M., Breen, M. (2016) An Overview of Molecular Cancer Pathogenesis, Prognosis, and Diagnosis. In Donald J. Meuten (Ed.) *Tumors in Domestic Animals* (pp: 1-26), Wiley-Blackwell
- Dakhova, O., Ozen, M., Creighton, C. J., Li, R., Ayala, G., Rowley, D., & Ittmann, M. (2009). Global gene expression analysis of reactive stroma in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 15(12), 3979–3989.
- Das, S., Idate, R., Cronise, K. E., Gustafson, D. L., Duval, D. L. (2019) Identifying Candidate Druggable Targets in Canine Cancer Cell Lines Using Whole-Exome Sequencing. *Molecular Cancer Therapeutics*. 18(8):1460-1471.
- Dakhova, O., Rowley, D., Ittmann, M. (2014) Genes upregulated in prostate cancer reactive stroma promote prostate cancer progression in vivo. *Clinical Cancer Research*. 20(1):100-9
- Davis, R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 13;103(2):239-52.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W. (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 14;26(22):3279-90.
- Di Lorenzo, G., Autorino, R., D'Armiento, F. P., Mignogna, C., De Laurentiis, M., De Sio, M., D'Armiento, M., Damiano, R., Vecchio, G., De Placido, S. (2004) Expression of proto-oncogene c-kit in high risk prostate cancer. *European Journal of Surgical Oncology*. 30(9):987-92.
- Evans, H. E. (1993) The digestive apparatus and abdomen, In *Miller's Anatomy of the Dog*, (pp: 448–449), Philadelphia, Saunders.
- Figueira, M. I., Cardoso, H. J., Correia, S., Maia, C. J., Socorro, S. (2014) Hormonal regulation of c-KIT receptor and its ligand: implications for human infertility? *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 49(1-3):1-19.
- Figueira, M. I., Correia, S., Vaz, C. V., Cardoso, H. J., Gomes, I. M., Marques, R., Maia, C. J., Socorro, S. (2016) Estrogens down-regulate the stem cell factor (SCF)/c-KIT system in prostate cells: Evidence of antiproliferative and proapoptotic effects. *Biochemical Pharmacology*. 99:73-87.

- Fonseca-Alves, C. E., Kobayashi, P. E., Palmieri, C., Laufer-Amorim, R. (2017) Investigation of c-KIT and Ki67 expression in normal, preneoplastic and neoplastic canine prostate. *BMC Veterinary Research*. 6;13(1):380.
- Fowles, J. S., Denton, C. L., Gustafson, D. L. (2015) Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology*. 13(3):288-304.
- Ganguly, A., Richards-Yutz, J., Ewens, K. G. (2014) Molecular karyotyping for detection of prognostic markers in fine needle aspiration biopsy samples of uveal melanoma. *Methods in Molecular Biology*. 1102:441-58.
- Ganguly, A., Wolfe, L. G. (2006) Canine perianal gland carcinoma-associated antigens defined by monoclonal antibodies. *Hybridoma (Larchmt)*. 25(1):10-4.
- Garraway, L. A., & Lander, E. S. (2013) Lessons from the cancer genome. *Cell*. 153(1):17-37.
- Genevois, J. P (1980): Pathologie ano-rectale et perineale, icircumanalomes. *Revue de Médecine Vétérinaire: RevMedVet*. 131, 697-705.
- Goldschmidt, M. H., Goldschmidt K. H. (2016). Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In Donald J. Meuten (Ed.) *Tumors in Domestic Animals* (pp: 88-141), Wiley-Blackwell.
- Goldschmidt, M. H., Hendrick, M. J (2002) Tumors of the skin and soft tissues. In Donald J. Meuten (Ed.) *Tumors in domestic animals*. (pp: 45-117), Iowa State Press, Iowa, 45-117
- Grieco, V., Banco, B., Giudice, C., Mosca, F., Finazzi, M. (2010) Immunohistochemical expression of the KIT protein (CD117) in normal and neoplastic canine testes. *Journal of Comparative Pathology*. 142(2-3):213-7.
- Gross, T. L., Ihrke, P., Walder, E. J., Affolter, V. K., Blackwell, O. (2005) Sebaceous tumors. In Gross T. L., Ihrke P., Walder E.J., Affolter V.K. (Eds.), *Skin diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis*. (pp: 641-659), Oxford, Blackwell Science
- Hartman, J., Ström, A, Gustafsson, J. Å. (2012) Current concepts and significance of estrogen receptor β in prostate cancer. *Steroids*. 77(12):1262-6.

- Hayes, H. M Jr., Wilson, G. P. (1977) Hormone-dependent neoplasms of the canine perianal gland. *Cancer Research*. 37(7 Pt 1):2068-71.
- Hedan, B., Thomas, R., Motsinger-Reif, A., Abadie, J., Andre, C., Cullen, J., Breen, M. (2011) Molecular cytogenetic characterization of canine histiocytic sarcoma: A spontaneous model for human histiocytic cancer identifies deletion of tumor suppressor genes and highlights influence of genetic background on tumor behavior. *BMC Cancer*. 26; 11:201.
- Hirsch, D., Kemmerling, R., Davis, S., Camps, J., Meltzer, P. S., Ried, T., Gaiser, T. (2013) Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *Cancer Research*. 73(5):1454-60.
- Imura, M., Kojima, Y., Kubota, Y., Hamakawa, T., Yasui, T., Sasaki, S., Hayashi, Y., Kohri, K. (2012) Regulation of cell proliferation through a KIT-mediated mechanism in benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 72(14):1506-13.
- Kanetsky, P. A., Mitra, N., Vardhanabhuti, S., Li, M. Vaughn., D, J. Letrero., R, Ciosek., S, L. Doody., D, R. Smith., L, M. Weaver., J, Albano., A, Chen., C, Starr., J, R. Rader., D, J. Godwin., A, K. Reilly., M, P. Hakonarson., H, Schwartz, S. M., Nathanson, K. L. (2009) Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. *Nature Genetics*. 41(7):811-5.
- Kim, S. H., Seung, B. J., Cho, S. H., Lim, H. Y., Hwang, J. H., Sur, J. H. (2018) Expression of Oestrogen Receptor, Progesterone Receptor and Akt in Canine Circumanal Gland Tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 162:59-65.
- Kimi E. K., Choi, E. J. (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1802(4):396-405.
- Kiupel, M., Webster, J. D., Kaneene, J. B., Miller, R., Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2004) The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*. 41(4):371-7.
- Koenig, A., Bianco, S. R., Fosmire, S., Wojcieszyn, J., Modiano, J. F. (2002) Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Veterinary Pathology*. 39(4):458-72.
- Lammie, A., Drobnjak, M., Gerald, W., Saad, A., Cote, R., Cordon-Cardo, C. (1994) Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *Journal of*

Histochemical Cytochemistry. 42(11):1417-25.

- Lawrence, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Sivachenko, A., Carter, S. L., Stewart, C., Mermel, C. H., Kiezun, A., Hammerman, P. S., McKenna, A., Drier, Y., Zou, L., Ramos, A. H., Pugh, T. J., Stransky, N., Helman, E... Getz, G. (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 499(7457):214–8.
- Li, M. M., Ewton, A. A., Smith, J. L. (2013) Using cytogenetic rearrangements for cancer prognosis and treatment (pharmacogenetics). *Current Genetic Medicine Reports*. 1:99–112.
- Liu, L., Kakiuchi-Kiyota, S., Arnold, L. L., Johansson, S. L., Wert, D., Cohen, S. M. (2013) Pathogenesis of human hemangiosarcomas and hemangiomas. *Human Pathology*. 44(10):2302-11.
- Mainetti, L. E., Zhe, X., Diedrich, J., Saliganan, A. D., Cho, W. J., Cher, M. L., Heath, E., Fridman, R., Kim, H. R., Bonfil, R. D. (2015) Bone-induced c-kit expression in prostate cancer: a driver of intraosseous tumor growth. *International Journal of Cancer*. 136(1):11-20.
- Maita, K., Ishida, K. (1975) Structure and development of the perianal gland of the dog. *The Japanese Journal of Veterinary Science*. 37, 349–356.
- Martins, A. M., Vasques-Peyser, A., Torres, L. N., Matera, J. M., Dagli, M. L., Guerra, J. L. (2008) Retrospective--systematic study and quantitative analysis of cellular proliferation and apoptosis in normal, hyperplastic and neoplastic perianal glands in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*. 6(2):71-9.
- Mayr, B., Schaffner, G., Reifinger, M., Zwetkoff, S., Prodinger, B. (2003) N-ras mutations in canine malignant melanomas. *The Veterinary Journal*. 165(2):169-71.
- Mi, Y., Zhang, C., Xie, M., Zeng, W. (2004) Effects of follicle-stimulating hormone and androgen on proliferation of cultured testicular germ cells of embryonic chickens. *General and Comparative Endocrinology*. 138(3):237-46.
- Milli, U., Kutsal, O. (1993) Köpeklerde Perianal Bez Tümörleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 40(3): 361-370.
- Murakami, A., Mori, T., Sakai, H., Murakami, M., Yanai, T., Hoshino, Y., Maruo, K. (2011) Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral

- malignant melanomas. *Veterinary Comparative Oncology*. 9(3):219-24.
- Newman, S. J., Jankovsky, J. M., Rohrbach, B. W., LeBlanc, A. K. (2012) C-kit expression in canine mucosal melanomas. *Veterinary Pathology*. 49(5):760-5.
- Newman, S. J., Mrkonjich, L., Walker, K. K., Rohrbach, B. W. (2007) Canine subcutaneous mast cell tumour: diagnosis and prognosis. *Journal of Comparative Pathology*. 136(4):231-9.
- Nielsen, S. W., Attosmis, J. (1964). Canine Perianal Gland Tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 15; 144:127-35
- Paronetto, M. P., Farini, D., Sammarco, I., Maturo, G., Vespasiani, G., Geremia, R., Rossi, P., Sette, C. (2004) Expression of a truncated form of the c-Kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer. *The American Journal of Pathology*. 164(4):1243-51.
- Pereira, R. S., Schweigert, A., Dias de Melo, G., Fernandes, F. V., Sueiro, F. A., Machado, G. F. (2013) Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. *BMC Veterinary Research*. 20; 9:83
- Petterino, C., Martini, M., Castagnaro, M. (2004). Immunohistochemical detection of growth hormone (GH) in canine hepatoid gland tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 66(5):569-72.
- Pfeiffer, M. J., Smit, F. P., Sedelaar, J. P., Schalken, J. A. (2011) Steroidogenic enzymes and stem cell markers are upregulated during androgen deprivation in prostate cancer. *Molecular Medicine*. 17(7-8):657-64.
- Pisani, G., Millanta, F., Lorenzi, D., Vannozzi, I., Poli, A. (2006) Androgen receptor expression in normal, hyperplastic and neoplastic perianal glands in the dog. *Research in Veterinary Science*. 81, 231-236.
- Preziosi, R., Morini, M., Sarli, G. (2004) Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 16(6):554-61.
- Rapley, E. A., Turnbull, C., Al Olama, A. A., Dermitzakis, E. T., Linger, R., Huddart, R. A., Renwick, A., Hughes, D., Hines, S., Seal, S., Morrison, J., Nsengimana, J., Deloukas, P., Rahman, N., Bishop, D. T., Easton, D. F., Stratton, M. R. (2009) A

- genome-wide association study of testicular germ cell tumor. *Nature Genetics*. 41(7):807-10.
- Schaeffer, H. J., Weber, M. J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and Cellular Biology*. 19(4):2435-44.
- Shapiro, S. G., Raghunath, S., Williams, C., Motsinger-Reif, A. A., Cullen, J. M., Liu, T., Albertson, D., Ruvolo, M. Bergstrom., Lucas, A., Jin, J., Knapp, D. W., Schiffman, J. D., Breen, M. (2015) Canine urothelial carcinoma: genomically aberrant and comparatively relevant. *Chromosome Research*. 23(2):311-31.
- Shoieb, A. M., Hanshaw, D. M. (2009) Anal sac gland carcinoma in 64 cats in the United kingdom (1995-2007). *Veterinary Pathology*. 46(4):677-83.
- Simak, R., Capodiecici, P., Cohen, D. W., Fair, W. R., Scher, H., Melamed, J., Drobnjak, M., Heston, W. D., Stix, U., Steiner, G., Cordon-Cardo, C. (2000) Expression of c-kit and kit-ligand in benign and malignant prostatic tissues. *Histology & Histopathology*. 15(2):365-74.
- Simmons, M. N., Klein, E. A. (2009) Combined androgen blockade revisited: emerging options for the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Urology*. 73(4):697-705.
- Stern, A. W., Young, A. J., Pieper, J. B. (2018) Cytokeratin Profiles Of Canine Anal Sac And Hepatoid Gland Neoplasms. *Taiwan Veterinary Journal*. 44: 119-123
- Stoop, H., Honecker, F., van de Geijn, G. J., Gillis, A. J., Cools, M. C., de Boer, M., Bokemeyer, C., Wolffenbuttel, K. P., Drop, S. L., de Krijger, R. R., Dennis, N., Summersgill, B., McIntyre, A., Shipley, J., Oosterhuis, J. W., Looijenga, L. H. (2008) Stem cell factor as a novel diagnostic marker for early malignant germ cells. *Journal of Pathology*. 216(1):43-54.
- Thomas, R., Borst, L., Rotroff, D., Motsinger-Reif, A., Lindblad-Toh, K., Modiano, J. F., Breen, M. (2014) Genomic profiling reveals extensive heterogeneity in somatic DNA copy number aberrations of canine hemangiosarcoma. *Chromosome Research*. 22(3):305-19.
- Urie, B. K., Russell, D. S., Kisseberth, W. C., London, C. A. (2012) Evaluation of expression and function of vascular endothelial growth factor receptor 2, platelet derived growth factor receptors-alpha and -beta, KIT, and RET in canine apocrine

gland anal sac adenocarcinoma and thyroid carcinoma. *BMC Veterinary Research*. 25; 8:67

- Vail, D.M., Withrow, S.J., Schwarz, P.D., Powers, B.E. (1990) Perianal adenocarcinomas in the canine male: a retrospective study of 41 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 26, 329–334.
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Le Beau, M. M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., Bloomfield, C. D. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 114(5):937-51
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz Jr, L. A., Kinzler, K. W. (2013) Cancer genome landscapes. *Science*. 339:1546–1558.
- Vos, J. H., Van Den, Ingh. TSGAM., Ramaekers, FCS., De Neijls, M., Van Mil, F. N., Ivanyi, D. (1992) Keratin and vimentin distribution patterns in the epithelial structures of the canine anal region. *The Anatomical Record*. 234:391–398.
- Walter, J. A. (2000) cytokeratin profile of canine epithelial skin tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 122(4):278-87.
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R. A., Kaneene, J. B., Kiupel, M. (2007) Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology*. 44(3):298-308.
- Wei, B. R., Michael, H. T., Halsey, C. H., Peer, C. J., Adhikari, A., Dwyer, J. E., Hoover, S. B., El Meskini, R., Kozlov, S., Weaver, Ohler. Z., Figg, W. D., Merlino, G., Simpson, R. M. (2016) Synergistic targeted inhibition of MEK and dual PI3K/mTOR diminishes viability and inhibits tumor growth of canine melanoma underscoring its utility as a preclinical model for human mucosal melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 29(6):643-655.
- Wemmert, S., Ketter, R., Rahnenführer, J., Beerenwinkel, N., Strowitzki, M., Feiden, W., Hartmann, C., Lengauer, T., Stockhammer, F., Zang, K. D., Meese, E., Steudel, W., I, von Deimling. A., Urbschat, S. (2005) Patients with high-grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment. *Neoplasia*. 7(10):883-93.

- Wiesner, C., Nabha, S. M., Dos Santos, E. B., Yamamoto, H., Meng, H., Melchior, S. W., Bittinger, F., Thüroff, J. W., Vessella, R. L., Cher, M. L., Bonfil, R. D. (2008) C-kit and its ligand stem cell factor: potential contribution to prostate cancer bone metastasis. *Neoplasia*. 10(9):996-1003.
- Wilson, G. P., Hayes, H. M. (1979) Castration for treatment of perianal gland neoplasms in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 174, 1301-1303.
- Yumusak, N., Kutsal, O. (2016) A comparative study between fine needle aspiration biopsy (FNAB) findings and histopathology in the evaluation of canine skin and skin adnexal tumors, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 63, 393-400.
- Yumusak, N. (2012) Köpek ve kedilerde deri ve eklemleri tümörlerinin patomorfolojisi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Perianal Tümörlerde Patolojik İncelemeler ve MAPK Sinyal Yolağının Tümörün Onkogenezendeki Rolünün Değerlendirilmesi” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Semra RİFATİ

04/06/2021

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Rifati Semra
Uyruk : Kosova
Doğum yeri ve tarihi : Prizren 12.06.1990
Telefon : +905077842411
E-mail : rifatistemra@gmail.com
Yabancı Dil : Arnavutça, Güney Slav Dilleri, İngilizce, Türkçe

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
İlkokul	Prizren Slobodan Penezić Krcun İlkokulu	2001
Ortaokul	Prizren Motra Qiriazı Ortaokul	2006
Lise	Prizren Shkolla e Mesme Ekonomike "Ymer Prizreni"	2010
Lisans	Dokuz Eylöl Üniversitesi Eğitim Bilimleri Faköltesi	2017
Y. Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Faköltesi	2021

SERTİFİKALAR:

English Language Teaching "Oxford Regent" English Parade 1 and 2

Microsoft Office Programları "KFOR Education"

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2016-	İnci Özer Anadolu Lisesi MEB	Biyoloji Öğr.
2015-	Şirinyer Anadolu Lisesi MEB	Biyoloji Öğr.
2013-	Laboratoriya Swissmed-Kosova	Stajer