



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEDİLERİN ENJEKSİYON YERİ SARKOMLARINDA PD-1 VE
PD-L1 SUNUMLARININ İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim İsmail KARAGÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK

BURDUR-2023

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEDİLERİN ENJEKSİYON YERİ SARKOMLARINDA PD-1 VE
PD-L1 SUNUMLARININ İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim İsmail KARAGÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK

BURDUR-2023

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince değerli fikirleri ile tezin oluşumundan tamamlanmasına kadarki süreçte yoğun şekilde destek veren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK'e, çalışmalarına değerli zamanlarını ayırarak fikir ve tecrübeleriyle yön veren çok kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e, Sayın Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a ve teknik desteklerinden dolayı Büşra GÜLBENLİ TÜRKOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Enjeksiyon Yeri Sarkomlarının Tarihçesi	2
2.2. Epidemiyoloji ve Karakterizasyon.....	3
2.3. Etiyoloji ve Patogenez	4
2.4. Histopatoloji.....	7
2.5. Tanı Yöntemleri.....	9
2.6. Tedavi	10
2.7. Prognoz.....	12
2.8. Programlı Hücre Ölüm Proteini 1 ve Ligandı	13
2.9. İmmun Checkpoint İnhibitörleri	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	16
3.1. Histopatolojik analizler	16
3.2. İmmunohistokimyasal analizler	17
4. BULGULAR	20
4.1. Tümör Sınıflandırması.....	20
4.2. Histopatolojik Bulgular	27
4.3. PD-1/PD-L1 İmmunohistokimyasal Boyamaları.....	34
4.4. Pearson Korelasyon Analiz Sonuçları	38
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ.....	54

ŞEKİLLER

Şekil 4.1.	Fibrosarkom olgusunda (14-285) vimentin pozitifliği. Bar: 50 µm.	21
Şekil 4.2.	Fibrosarkom olgusunda (18-255) vimentin pozitifliği. Bar: 50 µm.	21
Şekil 4.3.	Liposarkom olgusunda vimentin pozitifliği. Bar: 50 µm.	22
Şekil 4.4.	Rabdomyosarkom olgusunda vimentin pozitifliği. Bar: 50 µm.	22
Şekil 4.5.	Fibrosarkom olgusunda (13-261) S100 pozitifliği. Bar: 50 µm.	23
Şekil 4.6.	Fibrosarkom olgusunda (14-285) S100 pozitifliği. Bar: 50 µm.	23
Şekil 4.7.	Mikzoid farklılaşmalı fibrosarkom olgusunda (22-392) S100 pozitifliği. Bar: 50 µm.	24
Şekil 4.8.	Liposarkom olgusunda S100 pozitifliği. Bar: 50 µm.	24
Şekil 4.9.	Fibrosarkom olgusunda (14-134) diffuz SMA pozitifliği. Bar: 100 µm.	25
Şekil 4.10.	Fibrosarkom olgusunda (17-828) diffuz SMA pozitifliği. Bar: 50 µm.	25
Şekil 4.11.	Fibrosarkom olgusunda (13-261) çevre dokuda yoğun SMA pozitif doku artışı ve bu alanda yerleşim gösteren lenfoid folikül. Bar: 100 µm.	26
Şekil 4.12.	Fibrosarkom olgusunda (19-221) tümör çevresinde yoğun SMA pozitif mezenkimal hücre proliferasyonu. Bar: 200 µm.	26
Şekil 4.13.	Rabdomyosarkom olgusunda sarkomerik aktin pozitifliği. Bar: 50 µm.	27
Şekil 4.14.	Fibrosarkom olgusunda (14-134) iç içe geçen demetler halinde gözlenen iç şekilli mezenkimal hücre proliferasyonları. Bar: 100 µm.	28
Şekil 4.15.	Fibrosarkom olgusunda (22-392) mikzoid farklılaşma alanı. Bar: 100 µm.	28
Şekil 4.16.	İndiferensiye sarkom olgusunda atipik pleomorfik hücreler ve dev hücre oluşumu (ok). Bar: 20 µm.	29
Şekil 4.17.	Fibrosarkom olgusunda (18-255) atipik pleomorfik hücreler ile çok çekirdekli dev hücreleri (oklar). Bar: 50 µm.	29
Şekil 4.18.	Fibrosarkom olgusunda (22-388) çok çekirdekli dev hücreleri. Bar: 100 µm.	30
Şekil 4.19.	Fibrosarkom olgusunda (19-221) tümör çevresinde lenfosit ve gri sitoplazmalı makrofaj birikimleri. Bar: 20 µm.	30
Şekil 4.20.	Liposarkom olgusunda (22-254) belirgin vakuoller içeren neoplastik hücreler. Bar: 50 µm.	31
Şekil 4.21.	Rabdomiyosarkom olgusunda büyük çekirdek ve belirgin çekirdekçiklere sahip pleomorfik mezenkimal hücre proliferasyonları. Bar: 50 µm.	31
Şekil 4.22.	Fibrosarkom olgusunda (13-261) tümör dokusu içerisinde yer alan lenfosit infiltrasyonları (oklar). Bar: 100 µm.	32
Şekil 4.23.	Fibrosarkom olgusunda (22-388) tümör dokusu içerisine infiltre olmuş lenfositler. Bar: 50 µm.	33
Şekil 4.24.	Rabdomyosarkom olgusunda tümör dokusu çevresinde gözlenen lenfositler. Bar: 100 µm.	33

Şekil 4.25.	Fibrosarkom olgusunda (17-828) tümör dokusu çevresinde görülen lenfositler. Bar: 200 µm.	34
Şekil 4.26.	Fibrosarkom olgusunda (22-388) tümör çevresi lenfosit infiltrasyonlarında PD-1 pozitiflikleri. Bar: 100 µm.	35
Şekil 4.27.	Rabdomiyosarkom olgusunda tümör çevresi lenfoid dokuda PD-1 pozitiflikleri. Bar: 50 µm.	36
Şekil 4.28.	Fibrosarkom olgusunda (19-221) tümör içerisine infiltre olmuş geniş sitoplazmalı makrofaj benzeri hücrelerde PD-1 pozitifliği. Bar: 50 µm.	36
Şekil 4.29.	Fibrosarkom olgusunda (18-255) neoplastik hücrelerde PD-L1 pozitifliği. Bar: 100 µm.	37
Şekil 4.30.	Rabdomiyosarkom olgusunda tümör hücrelerinde PD-L1 pozitifliği. Bar: 50 µm.	37
Şekil 4.31.	Fibrosarkom olgusunda (19-221) tümör çevresi lenfoid doku içerisinde gözlenen geniş sitoplazmalı makrofaj benzeri hücrelerde PD-L1 pozitifliği. Bar: 50 µm.	38
Şekil 4.32.	Rabdomiyosarkom olgusunda tümör çevresi lenfoid dokuda hafif dereceli PD-L1 pozitifliği. Bar: 50 µm.	38

TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Çalışmada kullanılan olgulara ait bilgiler ve tanımlar	16
Tablo 3.2.	Çalışmada kullanılan antikorlara ait bilgiler	18
Tablo 4.1.	Olguların immunohistokimyasal boyanma özellikleri	20
Tablo 4.2.	Histopatolojik bulgular ile PD-1 ve PD-L1 skorları	35
Tablo 4.3.	Pearson korelasyon test sonuçları	51



SİMGELER ve KISALTMALAR

AFGF	Fibroblastik Büyüme Faktörü
ALVAC	Rekombinant Canarypox Virus
BFGF	Fibroblastik Büyüme Faktörü
DFI	Hastalıksız Aralık
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FELV	Feline leukemia virüs
FESV	Kedi Sarkomu Virüsü
FIV	Kedi İmmün Yetmezlik Virüsü
FVRCP	Feline Rhinotracheitis Virüs, Calcivirus, Panleukopenia
KEYS	Kedilerin Enjeksiyon Yeri Sarkomları
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD-L1	Programlı Hücre Ölümü 1 Ligandı
PD-1	Programlı Hücre Ölümü 1
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
TFR	İlk Nüks Süresi
TGFB	Tümör Büyüme Faktörü
USDA	ABD Tarım Bakanlığı

ÖZET

Kedilerin Enjeksiyon Yeri Sarkomlarında PD-1 ve PD-L1 Sunumlarının İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması

Bu çalışmada kedi enjeksiyon yeri sarkomları (KEYS) için immunoterapinin farklı bir yönden ele alınmasını sağlayabilecek olan programlı hücre ölümü 1 (PD-1) ve programlı hücre ölümü 1 ligandı (PD-L1) sunumlarının immünohistokimyasal olarak araştırılması amaçlanmıştır. PD-1/PD-L1 eksprese eden tümörlerde, bu yolağın baskılanması temeline dayanan tedavi stratejilerinin uygulanması mümkün olabilmektedir. Bu amaçla çalışmamızda öncelikle KEYS'lerin histolojik olarak sınıflandırmaları yapılmış, ardından sarkomların malignite derecesi ve lenfosit infiltrasyon yoğunluğu belirlenerek, PD-1, PD-L1 sunumlarının farklı malignite dereceleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Tümörler histopatolojik görünümünün yanında immünohistokimyasal olarak vimentin, S100, düz kas aktini (SMA) ve sarkomerik aktin ile boyandı ve incelemeler sonrasında 8 olguya fibrosarkom, bir olguya indifferansiye sarkom, bir olguya liposarkom ve bir olguya rabdomyosarkom tanısı konuldu. PD-1 sunumlarının daha çok lenfoid infiltrasyonlarda ve makrofaj benzeri hücrelerde olduğu, PD-L1'in ise daha çok tümöral hücrelerde ve infiltrate makrofaj benzeri hücrelerde bulunduğu görüldü. Bulguların Pearson korelasyon analizi ile karşılaştırılmasında, tümör farklılaşmasının PD-1 ile orta dereceli ($p < 0,05$), PD-L1 ile ise yüksek dereceli ($p < 0,01$) bir korelasyonu bulunduğu görüldü. Tümör derecesinin de PD-1 ile düşük, PD-L1 ile orta dereceli korelasyon gösterdiği belirlendi ($p > 0,05$). PD-1 ve PD-L1 arasında ise orta dereceli bir korelasyon tespit edildi ($p < 0,05$). Bu bilgiler ışığında PD-1 ve PD-L1'in artan ekspresyonunun KEYS'lerde zayıf tümör farklılaşması ve dolayısıyla kötü prognozla ilişkili olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: İmmünohistokimya, Histopatoloji, Kedi enjeksiyon yeri sarkomu, PD-1, PD-L1

ABSTRACT

Immunohistochemical Evaluation of PD-1 and PD-L1 Expression in Feline Injection Site Sarcoma

The goal of this study is to investigate the immunohistochemical expression of programmed cell death 1 (PD-1) and programmed cell death 1 ligand (PD-L1), which could lead to a new approach to immunotherapy for feline injection site sarcomas (FISS). In tumors expressing PD-1/PD-L1, treatment strategies based on pathway suppression are possible. To that end, histological classifications of FISS were made first, followed by grading of sarcomas and lymphocyte infiltration density, and finally a comparative evaluation of PD-1, PD-L1 presentations with different grades. Tumors were immunohistochemically stained with vimentin, S100, smooth muscle actin (SMA), and sarcomeric actin in addition to their histopathological appearance, and 8 cases were diagnosed as fibrosarcoma, 1 case as an undifferentiated sarcoma, 1 case as a liposarcoma, and 1 case as a rhabdomyosarcoma. PD-1 was found mostly in lymphoid infiltrates and macrophage-like cells, whereas PD-L1 was mostly found in tumoral cells and infiltrating macrophage-like cells. When the results were compared using Pearson correlation analysis, it was found that tumor differentiation had a moderate correlation with PD-1 ($p < 0.05$) and a strong correlation with PD-L1 ($p < 0.01$). Tumor grade was found to have a low correlation with PD-1 and a moderate correlation with PD-L1 ($p > 0.05$). Based on this data, it was concluded that increased PD-1 and PD-L1 expression may be associated with poor tumor differentiation and thus poor prognosis in FISS.

Keywords: Feline injection site sarcoma, Histopathology, Immunohistochemistry, PD-1, PD-L1

1. GİRİŞ

Kedilerin enjeksiyon yeri sarkomları (KEYS) Hendrick ve Goldschmidt (1991) tarafından ilk kez tanımlandığından bu yana neredeyse dünyanın her yerinden bildirilmiştir. İatrojenik olan bu tümörler nadir olup, kuduz ve kedi lösemi virüsüne karşı aşılama olası en yaygın nedendir. Hastalığın kesin etiyopatogenezi bilinmemekle birlikte, aşılar veya diğer enjeksiyonlar tarafından indüklenen yangının tümör gelişiminde kritik bir rol oynadığı yaygın olarak kabul edilmektedir (Hartmann ve ark., 2015). Aşılamalara ek olarak, diğer bazı ilaç uygulamaları sonrasında da şekillenmesi nedeniyle, aşı yeri sarkomu terimi yerine, enjeksiyon yeri sarkomu terimi tercih edilmiştir. KEYS'ler düşük metastatik potansiyellerine rağmen, hızlı büyüme ve lokal olarak malignant özellik sergileme karakteristiklerine sahiptirler (Martano ve ark., 2011). KEYS için cerrahi tedavi sonrası kemoterapi alan veya kemoterapi olmaksızın radyoterapi alan kedilerde, hastalıksız süreç aralığı 398 ile 810 gün arasında değişirken, toplam hayatta kalma süresinin 520 ile 1290 gün arasında değiştiği bildirilmiştir. Ayrıca lokal rekürrens oranı %41-45 ve metastaz oranı da %12-21 arasında değişmektedir (Cronin ve ark., 1998; Cohen ve ark., 2001; Kobayashi ve ark., 2004; Eckstein ve ark., 2009). Cerrahi sonrası güncel immunoterapi yöntemlerinden de faydalanılmaktadır (Jas ve ark., 2015). Erken tümör teşhisi ve hasta eğitimi de KEYS'in başarılı tedavisinde hayati öneme sahiptir (Saba, 2017).

Bu çalışmada KEYS için immunoterapinin farklı bir yönden ele alınmasını sağlayabilecek olan programlı hücre ölümü 1 (PD-1) ve programlı hücre ölümü 1 ligandı (PD-L1) sunumlarının immunohistokimyasal olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enjeksiyon Yeri Sarkomlarının Tarihçesi

Hendrick ve Goldschmidt (1991) kedilerde ilk kez enjeksiyon bölgelerinde fibrosarkom oluşma olasılığı konusunda bir rapor yayınlamışlardır. Bu durumun, Pennsylvania'da kedilerin kuduz aşısını gerektiren bir eyalet yasasının yürürlüğe girmesiyle ilgili olduğunu öne sürmüşler ve yaygın aşılama bölgelerinde (interskapüler bölge) ortaya çıkan tümörlerde, aşılama olmayan bölgelerde (örneğin, kafa) ortaya çıkan tümörlere karşı bir artış izlediklerini belirtmişlerdir. Bu rapor fibrosarkomların, gri-kahverengi yabancı bir madde içeren makrofajlar da dâhil olmak üzere, belirgin bir yangısal bileşene sahip tümörler olarak ilk histopatolojik tanımlamasını yapmıştır.

Ardından Hendrick ve arkadaşları (1992) makrofajların elektron probu ile mikroanalizi sonucu alüminyum varlığını ortaya koymuşlardır. Alüminyum, aşı adjuvanlarının bir bileşeni olarak kullanıldığından, makrofajlar içindeki alüminyumun tanımlanmasının, artık adjuvan ile tutarlı olduğuna inanılıyordu. Alüminyum adjuvanların insanlarda da granüloamatöz reaksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Slater ve ark., 1982).

Sarkom gelişimi ve aşılama arasında önerilen ilişkiyi daha fazla değerlendirmek için, Kass ve arkadaşları (1993), büyük bir özel tanı laboratuvarında sarkom teşhisi konan kediler hakkındaki bilgileri kullanarak epidemiyolojik bir çalışma yürütmüştür. Tipik olarak aşılama için kullanılan bölgelerden gelen sarkomlar, diğer bölgelerde (baş, parmak ve ön ayak) gelişen sarkomlarla karşılaştırılmıştır. Toplam 345 kedi (aşılama bölgelerinde bulunan 185 sarkom, aşı yapılmayan bölgelerde bulunan 160 sarkom) aşılama durumu ile tümör gelişimi arasındaki ilişkinin analizine dâhil edildi. Bulgular, özellikle FeLV'ye karşı aşılama kedilerde ve aynı zamanda kuduz aşısının uygulanmasıyla sarkom gelişme riskinin arttığını göstermiştir. FeLV ile aşılamadan sonra bir aşılama bölgesinde sarkom gelişme olasılığı oranı %5.49 ve kuduz aşılamasından sonra olasılık oranı %1.99 olarak ortaya konulmuştur. İnterskapüler bölgeden yapılan tek bir aşılama, o bölgede aşılama kediye kıyasla %50 daha yüksek bir sarkom gelişme riski, iki aşılama ise %127 artmış risk ile sonuçlanmış ve bu bölgede aynı anda verilen üç veya dört aşılamadan

yaklaşık %175'lik bir risk artışına neden olduğu gözlenmiştir. Fibrosarkom gelişim riski 100,000 kedide 20 olarak ortaya konulmuştur.

Benzer bir retrospektif çalışma Pennsylvania Üniversitesi ve Tufts Üniversitesi'nde Dr. Mattie Hendrick yönetiminde gerçekleştirilmiştir (Hendrick ve ark., 1994). Bu grup, aşılama bölgelerinde (n = 181) ortaya çıkan sarkomlu kedileri diğer bölgelerde ortaya çıkanlarla (n = 58) karşılaştırmıştır. Aşılama için kullanılan bölgelerdeki 181 tümörden sadece 69 kedinin bu bölgelerde aşı olma öyküsü olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma, önceki aşılama bölgelerinde sarkom ortaya çıkan kedilerin anlamlı derecede genç olduğunu bulmuştur ve tümörlerin önceki bir aşılama ile ilişkili olmayan sarkomlu kedilerinkinden önemli ölçüde daha büyük olduğu gözlenmiştir. Yazarlar ayrıca, aşılama bölgelerinde gelişen tümörlerin diğer bölgelerdeki sarkomlara göre daha hızlı ve daha sık nüks ettiğini ve aşılamadan sarkom gelişimine kadar geçen sürenin 3 ay ile 3 yıl arasında değiştiğini belirtmişlerdir.

Başlangıçta, sadece FeLV ve kuduz aşılarının, aşılama bölgesinde sarkom gelişme riskinin artmasına neden olduğu bilinmesine rağmen, Kanada'da yapılan ek bir çalışma, panleukopeni ve solunum yolu virüsleri de dâhil olmak üzere ölü aşıların sarkom gelişiminde bir rol oynadığını öne sürmüştür (Lester ve ark., 1996).

2.2. Epidemiyoloji ve Karakterizasyon

Kedilerde enjeksiyon bölgelerinde gelişen tümör insidansında artış kuduz ve kedi lösemi virüsü (FeLV) aşılarının kullanımının artmasına bağlı olarak ilk kez 1991'de Amerika Birleşik Devletleri'nde bildirilmiştir (Hendrick and Dunagan, 1991; Hendrick and Goldschmidt, 1991). Sonuç olarak bu tümörlere ilk başta kedi "aşı ile ilişkili sarkomlar" adı verilmiştir. Daha sonra, aşı olmayan diğer enjekte edilebilir maddelerin de bu tür tümörlere neden olması, bu neoplazmaların 'kedi enjeksiyon yeri sarkomları' olarak yeniden sınıflandırılmasına yol açmıştır. Bu tümörler kedilere özgü gibi görünse de (Eggers Carroll ve ark., 2002), benzer tümörler gelinciklerde (Munday ve ark., 2003) ve çok nadiren köpeklerde de bildirilmiştir (Vascellari ve ark., 2003).

KEYS'ler, interskapular bölge, skapula, toraks, kalçalar veya pelvik uzuvlar üzerinde, kaudal dorsum ve ventral karın boyunca, lumbal bölge veya semimembranosus ve semitendinosus kasları gibi tipik olarak aşılama ve enjeksiyonlar için kullanılan bölgelerde meydana gelmektedir. KEYS'ler genellikle deri altında oluşurken, nadir olarak kas içinde şekillenebilirler (Dubielzig ve ark., 1993; Hendrick ve Brooks, 1994; Shaw ve ark., 2009).

KEYS'ler enjeksiyondan sonra en erken 4 ay olmak üzere 3 yıl gibi sürelerde de görülebilirler. Genellikle fasiyal hat boyunca deri altı bölgede yayılan invaziv lokal büyüme ile karakterize edilmektedirler (Hirschberger ve Kessler, 2001). KEYS'lerin çoğu fibrosarkomlardır (Doddy ve ark., 1996) ancak osteosarkomlar (Esplin ve ark., 1993), kondrosarkomlar, rabdomiyosarkomlar (Hendrick and Brooks, 1994), malign fibröz histiyositomalar (Esplin ve ark., 1993; Hendrick ve Brooks, 1994) ve miyofibroblastik sarkomlar (Dubielzig ve ark., 1993), sinir kılıf tümörü, liposarkom, mikzosarkom ve indifferensiye sarkom gibi başka maligniteler de bildirilmiştir (Esplin ve ark., 1993; Hershey ve ark., 2000; Dillon ve ark., 2005).

Son 20 yılda, aşılama ile KEYS'in sonraki gelişimi arasında epidemiyolojik bir ilişki gösterilmiştir (Hendrick ve ark., 1992, 1994; Kass ve ark., 1993). KEYS insidansının ABD'de aşılama her 10.000 kedide 1-4 olduğu tahmin edilmektedir ve enjeksiyon yeri sarkomlarının enjeksiyon yeri olmayan sarkomlara oranı 1989'da 0,5'ten 1994'te 4,3'e yükselmiştir (Doddy ve ark., 1996; Coyne ve ark., 1997; Gobar and Kass, 2002). ABD'de yapılan bir çalışma ile, kedilerde 10.000 aşılama 0,3 KEYS ve 10.000 aşılama 11,8 aşılama sonrası yangısal reaksiyon olduğu bildirilmiştir (Gobar ve Kass, 2002).

2.3. Etiyoloji ve Patogenez

Yapılan araştırmalara rağmen, KEYS'in patogenezi dair kesin bilgi bulunmamaktadır. Genellikle enjeksiyon yerindeki kronik bir enflamatuvar reaksiyonun, malign transformasyon için bir tetikleyici olabileceği düşünülmektedir. Adjuvanlanmış aşılama, daha yoğun lokal enflamasyona neden olabileceğinden dolayı KEYS gelişimi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Sarkomların histolojik veya

ultrastrüktürel incelemelerinde adjuvanların görülmesi bu görüşü desteklemektedir (Hendrick ve ark., 1992; Madewell ve ark., 2001).

KEYS'ler ile en çok aşılar ilişkilendirilmektedir ancak uzun etkili steroidler ve antibiyotikler de dâhil olmak üzere diğer enjeksiyonlar ve implantlar (Kass ve ark., 1993; Srivastav ve ark., 2012), emilemeyen dikiş malzemeleri (Buracco ve ark., 2002; Carminato ve ark., 2011) ve mikroçipler (Daly ve ark., 2008) “aşı ile ilişkili sarkom” teriminin, “enjeksiyon yeri sarkomu” şeklinde anılmasına yol açmıştır. Aşı uygulaması ile tümör gelişimi arasındaki gecikme süreleri 2 ay ile 10 yıl arasında değişmektedir (McEntee ve Page, 2001; Séguin, 2002).

İlk başta sadece kuduz ve FeLV aşıları risk faktörleri olarak tanımlanırken daha sonra kedi panleukopenia virüsü (FPV), kedi herpes virüsü-1 (FHV-1) ve kedi calicivirüs (FCV) aşıları da dahil olmak üzere diğer aşılarda KEYS'nin gelişiminde rol oynadığı belirlenmiştir (Hendrick ve ark., 1994; Lester ve ark., 1996; Burton ve Mason, 1997; Coyne ve ark., 1997; De Man ve Ducatelle, 2007). Aşılarla ek olarak, steroid ya da non-steroid antiinflatuar ilaçlar (Kass ve ark., 1993; Munday ve ark., 2003; Martano ve ark., 2011), lufenuron (Kass ve ark., 1993; Esplin ve ark., 1999), sisplatin (Martano ve ark., 2012), antibiyotikler (Zabielska-Koczywas ve ark., 2017) ve meloksikam (Munday ve ark., 2011) gibi enjeksiyonlar da sarkom oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan bir çalışma ile, uzun etkili glukokortikoid enjeksiyonların (deksametazon, metil prednizolon ve triam kinolon) uygulama sıklığının, KEYS'li kedilerde interskapular bölgede kontrol kedilerine göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Srivastav ve ark., 2012). Ayrıca mikroçip implantasyonu veya emilemez cerrahi materyallere reaksiyon olarak da tümörler şekillenebilir (Buracco ve ark., 2002; Daly ve ark., 2008; Carminato ve ark., 2011). Bu durumlarda göz önüne alındığında, teorik olarak tüm yangısal reaksiyonların, malign transformasyona neden olan fibroblastların ve miyofibroblastların kontrolsüz çoğalmasını tetikleyerek KEYS gelişimine neden olduğunu düşündürmektedir (Hartmann ve ark., 2015).

Çoğu inaktif aşıda, bağışıklık tepkisini tetiklemek için ölü bir ajan kullanılırken, enjeksiyon bölgesindeki yangıyı artırma amacıyla adjuvan eklenmesi

gerekmektedir. Yangı, potansiyel olarak malign transformasyona yol açabilmektedir. KEYS'nin histolojik kesitlerinde, özellikle makrofajlar, çok çekirdekli dev hücreler içinde ve daha sonra transforme fibroblastta adjuvant izlerine rastlanmaktadır (Hendrick ve ark., 1992). Yapılan bir çalışmada 20 KEYS'den 5'inde hücre içi kristal partiküllü malzeme gözlenirken, 5 vakadan 1'inin alüminyum bazlı olduğu tespit edilmiştir (Madewell ve ark., 2001). Belirli bir aşı veya adjuvanın neden olduğu kesin olarak belirlenmemiştir (Kass ve ark., 1993). Fakat adjuvandan kaynaklanan lokal iritasyonun, fibroblastlarda malignant transformasyonu uyardığı düşünülmektedir (Hartmann ve ark., 2015).

KEYS'ler mezenkimal kökenlidir (Hendrick ve Brooks, 1994). Son derece lokal invazivdirler ve aşı ile ilişkili olmayan ve daha az görülen sarkomlara göre çok daha fazla gözlenirler (Hendrick ve ark., 1994). Bildirilen metastatik oran %10-25 olup, akciğerler ve bölgesel lenf düğümleri yaygın metastatik bölgelerdir (Lester ve ark., 1996; Hershey ve ark., 2000; Hauck, 2003). Genel görüşe göre, herhangi bir potansiyel aşılama veya enjeksiyon bölgesinin yakınında meydana gelen herhangi bir sarkom KEYS olarak kabul edilmeli ve dikkatli şekilde tedavi edilmelidir (Shaw ve ark., 2009).

Yangısal reaksiyonun tümör oluşumuna neden olduğu mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Büyüme faktörlerinin proliferasyonu teşvik edebildiği, malign transformasyonu indükleyebildiği ve ayrıca anjiyogenezin düzenlenmesinde yer alabildiği öngörülmektedir. KEYS'li kedilerde büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonu ve onkojen aktivasyonu belirlenmekte ve tümör gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (Hendrick, 1998; Nieto ve ark., 2003).

FeLV'ye karşı aşılama, daha yüksek bir KEYS riski ile ilişkili olduğundan, FeLV ve onun mutant kedi sarkom virüsünün (FeSV) KEYS gelişiminde olası bir rolünün incelendiği bir çalışmada, tümörlerde FeLV veya FeSV tespit edilememiştir (Ellis ve ark., 1996). Ayrıca, tümör dokularında kedi immün yetmezlik virüsü, kedi köpüklü virüs, poliomavirüsler veya papilloma virüsler dâhil olmak üzere başka hiçbir virüs tespit edilmediği bildirilmiştir (Kidney ve ark., 2000, 2002; Kidney ve ark., 2001a; Kidney ve ark., 2001b). KEYS oluşumunda endojen retrovirüslerin

replikasyonuna veya ekspresyonuna dair hiçbir kanıtın elde edilemediği belirtilmiştir (Kidney ve ark., 2001c).

Aşılamadan sonra tüm kedilerde KEYS oluşmaması, genetik bir yatkınlık olabileceğini düşündürmektedir. KEYS'li kedilerin kardeşlerinde daha yüksek KEYS insidansı olduğu ve bazı kedilerin birden fazla KEYS geliştirme eğiliminde olduğu öne sürülmüştür. KEYS'li kedilerin ekstra kromozomlarında ve monozomik kromozomlarında hiperploidi (Kalat ve ark., 1991), translokasyonlar (Mayr ve ark., 1996), onkogen ve tümör baskılayıcı lokusların triploidisi (Mayr ve ark., 1991) gibi ilişki düzeyi bilinmeyen değişiklikler belirlenmiştir. KEYS'li kedilerin sarkom dokusunda, kanserin başlaması ve ilerlemesinde rol oynayan tümör baskılayıcı p53 geninde mutasyonlar tanımlanmıştır (Mayr ve ark., 1995, 1998; Nambiar ve ark., 2000, 2001; Banerji ve Kanjilal, 2006). Kedi p53 geninin genomik sekansındaki polimorfizmler ile FiSS'ye yatkınlık arasındaki olası bir ilişkiyi araştıran bir vaka kontrol çalışması, FiSS ile iki polimorfik bölgede spesifik nükleotidlerin varlığı arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Banerji ve ark., 2007). Başka bir çalışma ise açıklanan polimorfizmlerle hiçbir ilişki gözlemlenmediğini ileri sürmüştür (Mucha ve ark., 2014).

2.4. Histopatoloji

KEYS'lerin, diğer bölgelerde görülen fibrosarkomlardan farklı histolojik özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir. Histopatolojik olarak tümör çevresinde perivasküler lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu, merkezi bir nekroz alanı, yangı ve tümör hücrelerinin lokal infiltrasyonu kedi enjeksiyon yeri sarkomları için tipiktir (Doddy ve ark., 1996; Madewell ve ark., 2001). KEYS'lerin diğer bölgelerdeki sarkomlardan daha agresif olduğu düşünülmektedir (Hendrick ve ark., 1994). Metastaz oranı %10-28 arasında değişmektedir (Couto ve Macy, 1998; Hershey ve ark., 2000). Akciğer en yaygın metastaz bölgesidir ve bunu bölgesel lenf düğümleri, böbrek, dalak, bağırsak ve karaciğer gibi karın organları takip etmektedir (Sandler ve ark., 1997; Kobayashi ve ark., 2002).

Doddy ve arkadaşları'nın (1996) 6 adet KEYS'li kedileri 6 yıllık bir süre boyunca gözledikleri bir çalışmada, 165 tümörün 104'ü yaygın aşılama bölgelerinde, 61'i ise diğer bölgelerde ortaya çıkmıştır. Aşılama bölgelerinde ortaya çıkan sarkomların histopatolojisi, diğer bölgelerdeki sarkomlarınkinden deri altı lokalizasyonları bakımından farklı olarak gözlenmiş, ayrıca yangısal infiltrasyon, artmış mitotik indeks, pleomorfizm ve hücre dışı matriksin değişken yoğunluğu ve nekrozun daha yaygın olduğu görülmüştür. Yangısal infiltrasyonun ağırlıklı olarak lenfositlerden oluştuğu, ancak makrofajların da bulunduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada genç kedilerin de aşı ile ilişkili sarkom geliştirme olasılığının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, Hendrick ve arkadaşları (1992) tarafından bildirilen aşı bölgesi sarkomlarının histopatolojik görünümü ile tutarlıdır. Bu raporda ve diğerlerinde, aşılama bölgelerindeki sarkomlar, lenfositler ve makrofajlardan oluşan yangısal bir yanıt tarafından "çevrelenmiş ve kısmen infiltre edilmiş" olarak tanımlanmıştır (Hendrick ve Brooks, 1994). Makrofajların bazen alüminyum olduğu gösterilen gri-kahverengi bir malzeme içerdiği gözlenmiştir. Ek olarak, bu yabancı madde kedi ve köpeklerde aşı sonrası granüloamatöz reaksiyonlarda da tanımlanmıştır (Hendrick ve Dunagan, 1991). Aşılanmamış bölgelerdeki sarkomların %15'inde yangı görülürken, aşı bölgesi sarkomlarının %51'inde yangısal bileşenler gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal boyamalarda ise, çoğu tümörün vimentin pozitif olduğu ve yine kas belirteçleri ile de pozitif reaksiyon alındığı görülmüştür. Bu boyamalarla KEYS'lerin fibroblast/myofibroblast kökenli olduğu düşünülmüştür.(Hendrick ve Brooks, 1994).

Bu tümörleri daha da karakterize etmek için, transmisyon elektron mikroskobu ile ultrastrüktürel değerlendirme yapılmıştır (Madewell ve ark., 2001). Bu çalışmalar, tümörler içinde miyofibroblastların, dev hücrelerin, fibroblastoid hücrelerin ve histiyosit benzeri hücrelerin yanı sıra dispersif X-ışını spektroskopisi ile alüminyum bazlı olduğu doğrulanan hücre içi partikül materyalin varlığını doğrulamıştır.

Özellikle ilgi çekici olan, KEYS ile travma sonrası oküler sarkomların histopatolojik benzerlikleridir. Dubielzig ve arkadaşları (1990) 13 oküler sarkom vakası tanımlamışlar ve bu kedilerin 11'inde tümör gelişiminden önce oküler hastalık öyküsü bildirilmiştir. Tanılar arasında fibrosarkom (8 olgu), osteosarkom (2 olgu) ve

anaplastik sarkom (3 olgu) yer almıştır. Tümör tanısının gizli süresi genellikle birkaç yıl olarak bildirilmiştir. Bu tümörlerin anaplastik olduğu, değişken derecelerde farklılaşma ile granülasyon dokusu ve metaplazi bölgelerine sahip oldukları gözlenmiştir. Bu iki fenomen için de benzer bir patogeneze önerilmiştir.

Schultze ve arkadaşları (1997), kedilerde üç standart kedi aşısını değerlendirdikleri bir çalışmada, kediler dört bölgede salin, FVRCP, FeLV (ölü) ve kuduz virüsü (ölü) ile aşılanmışlardır. Aşı bölgeleri haftalık olarak aspire edilmiş ve yayma preparatlar sitolojik olarak değerlendirilmiştir. Salin enjeksiyonunun yerinden alınan aspiratta az sayıda hücre veya kan gözlenmiştir. Aşılama bölgelerinden gelen yaymaların ise daha hücreli olduğu, bu hücrelerin lenfositler, nötrofiller ve makrofajlardan oluştuğu görülmüştür ve bu bulgular ilk haftada tüm bölgelerde benzer olarak rapor edilmiştir. İkinci haftaya gelindiğinde, kuduz ve FeLV aşılarının bölgelerindeki hücreliliğin ve lenfositlerin, FVRCP aşılama bölgesinden daha yüksek olduğu, makrofajların ise kuduz aşı bölgesinde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Üçüncü haftaya gelindiğinde, FeLV ve FVRCP aşılarının bölgelerindeki yangılanma çözülmüş ancak kuduz aşılama bölgesinde lökosit sayısı artmaya devam etmiştir. Benzer bir model dördüncü haftada da görülmüş, değerlendirme döneminde saptanan en sık hücre tipi lenfosit olmuştur. Tüm kedilerde kuduz aşısı bölgesinde elle tutulur nodüller gelişirken, sadece bir başka aşı bölgesi FVRCP aşılama yerinde reaksiyon kaydedilmiştir.

Ratlarda deri altına lufenuron enjeksiyonu yapılan bir çalışmada, enjeksiyon bölgeleri 21 gün sonra histolojik olarak değerlendirilmiş ve tüm ratlarda (n = 6) enjeksiyon yeri reaksiyonları gelişmiştir. Bu reaktif infiltrasyonların ağırlıklı olarak makrofajlardan oluştuğu bildirilmiştir (Esplin ve ark., 1999).

2.5. Tanı Yöntemleri

Dikkat edilmesi gereken noktalar arasında kedinin aşılama geçmişi, kitlenin yeri, ilk fark edildiğinde, boyuttaki herhangi bir değişiklik ve kitlenin mevcut boyutudur. Biyopsi endikasyonları 3-2-1 kuralına dayanmaktadır (Starr, 1998; Morrison ve Starr, 2001). Yani 3 aydan fazla devam eden, 2 cm'den büyük olan ve /

veya o bölgeye enjeksiyon yapıldığından bu yana 1 ay boyunca büyüyen herhangi bir kitle için insizyonel biyopsi tavsiye edilir. Sitoloji ile ince iğne aspirasyonu, insizyonel biyopsinin en az invaziv ve en ucuz şeklidir. Her zaman kesin bir KEYS tanısı vermesede, sitoloji apse gibi diğer ayırıcı tanıları dışlamada yardımcı olabilir. KEYS'ler heterojen kitleler olduğundan, sitoloji teknikleri kullanıldığında kesin tanı koymak için farklı alanlardan çoklu örnekler toplanmalıdır. KEYS'den şüpheleniliyorsa, tanısal amaçlar için eksizyonel biyopsi şiddetle tavsiye edilmez, çünkü tümörler marjinal olarak eksize edildiğinde hızlı ve sık tekrarlar, bu da gelecekteki tedavi girişimlerini zorlaştırır (Starr, 1998; Morrison ve Starr, 2001; McEntee ve Page, 2001; Séguin, 2002). KEYS doğrulandıktan sonra, pulmoner metastazlar yönünden torasik radyografiler önerilir. Ek olarak, radyasyon ve / veya cerrahi planlama için ileri görüntüleme önerilir (McEntee ve Page, 2001; Séguin, 2002). Tam kan sayımı, serum biyokimya profili, idrar tahlili, T4 ve FeLV / FIV testleri yapılmalıdır. Bununla birlikte, genellikle bu testler normaldir veya KEYS ile ilgisi olmayan hastalıkların göstergesidir (McEntee ve Page, 2001). FeLV veya FIV enfeksiyonu ile KEYS gelişimi arasında bir bağlantı kurulmamıştır (Kidney ve ark., 2000; McEntee ve Page, 2001).

2.6. Tedavi

Tümörlerin uzaklaştırılmalarını takiben %14-69 oranında nüks gözlenmesi nedeniyle, KEYS'lerin tedavisi oldukça problemlidir (Martano ve ark., 2005; Romanelli ve ark., 2008; Giudice ve ark., 2010; Phelps ve ark., 2011). Geniş veya radikal cerrahi eksizyon (tümörün etrafındaki her yönde 3-5 cm normal doku ve onun derinliğinde bir ila iki fasyal düzlem olarak tanımlanır) KEYS'i ortadan kaldırmak için tedavinin temelini oluşturmaktadır (Davidson ve ark., 1997; Séguin, 2002; Phelps ve ark., 2011). Tümörler özellikle de tek başına cerrahi ile tedavi edildiğinde lokal olarak tekrarlar ve 2 ay ila 16 ay arasında değişen nüksler bildirilmiştir (Davidson ve ark., 1997; Hershey ve ark., 2000). Nüksler sıklıkla cerrahi skar boyunca birden fazla bölgede görülür. Amputasyon veya hemipelvektomi, uzuvlarında veya kuyruklarında yeterince distalde yerleşmiş tümörleri olan kedilerde tek başına cerrahi ile başarılı bir tedavi için potansiyel adaylardır (Hershey ve ark., 2000; Hendricks ve ark., 2014). Cerrahi eksizyon yapıldığında, numune kenar boşlukları mürekkeplenmeli veya

dikişle tanımlanmalıdır. Tüm örnek formalin içinde yeterince sabitlenmeli ve histopatolojik inceleme için bir veteriner patoloji laboratuvarına gönderilmelidir. Lokal tümör nüksünü önlemek veya en azından hastalıksız aralığı (DFI) uzatmak amacıyla, cerrahi ve kesin radyasyon tedavisi de dâhil olmak üzere çoklu tedavi seçenekleri sıklıkla önerilmektedir (Saba, 2017).

Cronin ve arkadaşları (Cronin ve ark., 1998), kesin radyasyon tedavisi ve ardından cerrahi ile tedavi edilen kedilerde %79'luk bir lokal tedavi başarısızlığı bildirmiştir. Bununla birlikte, genel olarak, ortalama DFI'lar tek başına ameliyatla karşılaştırıldığında uzar ve 398 gün ile >1.000 gün arasında değişir (Cronin ve ark., 1998; Cohen ve ark., 2001; Hahn ve ark., 2007; Eckstein ve ark., 2009). Kemoterapinin KEYS tedavisindeki rolü hakkında daha az şey bilinmektedir. KEYS, agresif radyasyon tedavisi ve cerrahi protokoller karşısında bile görülen nükslerle son derece lokal invaziv olduğundan, bazı onkologlar DFI'yı daha da uzatmak amacıyla kemoterapiyi de tedaviye dahil ederler. Karboplatin, doksorubisin, lipozomal doksorubisin, siklofosfamid, ifosfamid ve lomustin, KEYS tedavisinde bildirilen kemoterapötikler arasındadır ve yanıt oranları %0 ile %>50 arasında değişmektedir (Kobayashi ve ark., 2002; Rassnick ve ark., 2006; Eckstein ve ark., 2009).

Tedavide cerrahi yaklaşımlarla birlikte, adjuvant radyoterapi, kemoterapi ve immunoterapi gibi yöntemler güncel olarak çalışılmaktadır (Zabielska-Koczywas ve ark., 2017). Jourdir ve arkadaşları (2003) fibrosarkomlu kedilerde insan interlökin-2'yi (NYVAC insan IL-2) eksprese eden genetik olarak zayıflatılmış bir vaccinia virüs vektörünü ve kedi interlökin-2'yi (ALVAC kedi IL-2) eksprese eden rekombinant bir kanarypox virüsü vektörünü araştırmıştır. Bu yaklaşımla, vektör virüsü kedinin hücrelerine enjeksiyon yakınında girer; bu hücreler daha sonra lokal bir antitümör immün yanıtı tetikleyen IL-2 üretir. IL-2'nin lokal olarak verilmesi, hastanın sistemik IL-2 uygulaması ile görülen sistemik toksisite riskini azaltır. 2014 yılında, ALVAC kedi IL-2 immünoterapisi, fibrosarkomlu kedilerde lokal tümör nüks riskini azaltmak için cerrahiye adjuvan bir tedavi olarak Avrupa'da piyasaya sürüldü (Merial SAS, Lyon, Fransa). ALVAC kedi IL-2 daha sonra 2015 yılında Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) tarafından şartlı olarak lisanslanmıştır (Merial Inc., Duluth, GA, ABD). Tedavi endikasyonları, nodal veya uzak metastaz kanıtı olmayan

fibrosarkomlu (2-5 cm çapında) kedileri içerir. ALVAC IL-2'nin güvenliği ve etkinliği ile ilgili ek araştırmalar devam etmiştir (Jas ve ark., 2015). KEYS tedavisinde güncel bir yaklaşım olan ve bir immunoterapi yöntemi olan interlökin-2 (IL-2) eksprese eden rekombinant canarypox virus (ALVAC) kullanımı cerrahi sonrasında yardımcı olarak ve brahiterapi şeklinde uygulanmaktadır (Jas ve ark., 2015).

2.7. Prognoz

Tanımlanan prognostik faktörlerin çoğu lokal tümör nüksü ile ilişkilidir. Primer tümör büyüdükçe ve üstteki cildi germeye ve altta yatan dokuları istila etmeye başladıkça, cilt ülserasyonu, ağrı, kalıcı kanama, enfeksiyon ve nekroz, kedinin yaşam kalitesini olumsuz yönde etkiler. Lokal nüksün yaygın bir belirleyicisi, cerrahi eksizyonun (yani temiz sınırların) bütünlüğüdür. Bu özellikle tek başına cerrahi ile tedavi edilen kediler için geçerli olsa da, çoklu tedaviyi takiben (Davidson ve ark., 1997; Hershey ve ark., 2000) temiz olmayan sınırlar da daha kısa DFI ile ilişkilendirilmiştir (Cronin ve ark., 1998; Cohen ve ark., 2001; Kobayashi ve ark., 2002). Önceki ameliyatların sayısı da zamanla lokal nüks ile ters orantılıdır; cerrahi girişimlerin sayısı arttıkça, lokal DFI tipik olarak azalır (Davidson ve ark., 1997; Cohen ve ark., 2001). Bu bulgu, tümör çıkarılmasında ilk girişimin en başarılı olduğu ilkesiyle uyumludur. İlk eksizyondan önce, çevredeki anatomi hala nispeten normaldir ve sonraki her tümör nüksetmesi ve çıkarılması girişimiyle, kapatma için doku miktarı azalır ve temiz kenarlar ile eksizyon imkânsız hale getirir (Farese ve Withrow, 2013). Ayrıca bu bulgu doğrultusunda, Hershey ve arkadaşlarının (2000) çalışmasında elde edilen sonuçlar, önceden eksize edilen tümörleri olan kedilerle kıyaslandığında ilk kez eksizyonu yapılan kediler için ortalama ilk nüks süresinin (TFR) anlamlı derecede daha uzun olduğu gösterilmiştir (ortalama TFR 274 güne karşı 66 gündür). Bu çalışma ile (Hershey ve ark., 2000) Phelps ve arkadaşlarının (2011) çalışmasında olduğu gibi, radikal bir ilk eksizyonun nükste daha uzun süreler elde etmek için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Bir çalışmada, histolojik tipin genel sağkalım ile anlamlı derecede ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Fibrosarkom veya sinir kılıfı tümörü olan kedilerin, malign fibröz histiyositomlu kedilerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha uzun hayatta

kalma sürelerine sahip oldukları gösterilmiştir. Bildirilen ortalama sağkalım süreleri sırasıyla 640 ve 645 güne karşı 290 gündür (Dillon ve ark., 2005). Mitotik indeks, nekroz yüzdesi ve pleomorfizm derecesi ile belirlenen histolojik derece, yumuşak doku sarkomlu köpeklerde uzak metastaz olasılığı ile ilişkilendirilmektedir (Kuntz ve ark., 1997) ve kedilerde de benzer bir eğilim kaydedilmiştir. Daha yüksek dereceli KEYS’li kedilerin metastaz geliştirme olasılığı daha yüksektir ve bir çalışma ayrıca metastazı olan kedilerin genel hayatta kalma sürelerinin daha kısa olduğunu göstermiştir (Romanelli ve ark., 2008). Kuşkusuz, KEYS mitotik olarak daha aktif olma eğilimindedir ve artan nekroz yüzdesine ve daha büyük bir pleomorfizm derecesine sahiptir (Doddy ve ark., 1996). Bununla beraber histolojik derecenin KEYS yönetimindeki rolünü tamamen aydınlatmak için daha fazla araştırma yapılması gerektiği belirtilmiştir (Couto ve ark., 2002).

2.8. Programlı Hücre Ölüm Proteini 1 ve Ligandı

Edinsel immun yanıtlara inhibitör olarak etki eden mekanizmalar; ligandlar ya da reseptörler olarak tanımlanabilir. Yabancı antijenler veya tümör antijenleri bir yanıtı uyardıktan sonra, yangısal immun yanıtın sürekli olarak şekillenmesini engellemek için “checkpointler” adı verilen ve “reseptör sistemi” olarak da adlandırılabilen bir yöntem kullanılır. Bu checkpointler çoğunlukla tümör mikroçevresindeki hücreler üzerindeki ligandlara bağlanan T hücresi reseptörü tarafından tanınır, daha sonra T hücresinin fonksiyonlarını düzenleyen immünolojik sinapslar oluşturularak bu hücrelerin baskılanmasıyla sonuçlanır (Speil ve Rzepka, 2011).

Son yıllarda en çok dikkat çeken iki inhibitör reseptör/ligand çifti, B7 ligandı ile sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4 (CTLA-4) reseptörü ve PD1-L1 ligand ile programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD1) reseptörüdür (Brunet ve ark., 1987; Oiseth ve Aziz, 2017). PD-1 1992’de klonlanmıştır ve B7 ligand ailesinin üyeleri olan PD-L1 ve PD-L2 ligandları daha sonra karakterize edilmiştir. Programlı hücre ölümü 1 (PD-1) proteini aktive T ve B lenfositler, makrofajlar, monositler ve dendritik hücrelerde eksprese ve upregüle edilen, ko-sinyal moleküllerinin immunglobulin superailesine ait bir proteindir (Ishida ve ark., 1992). PD-1, reseptörlerine (PD-L1 ve

PD-L2) bağlanarak doğal ve edinsel immun yanıtın baskılanmasında rol alır (Yao ve ark., 2013). PD-1'in bu inhibitör özelliğinin PD-L2'den ziyade PD-L1'e bağlanarak oluştuğu gösterilmiştir (Tsushima ve ark., 2007). PD-L1 aynı zamanda tümör hücreleri tarafından da eksprese edilerek T hücre aktivitesini düzenler ve tümörün immun sistemden kaçışına olanak sağlayan immun supresyonu uyarır (Gatalica ve ark., 2014; Baptista ve ark., 2016; Kim ve ark., 2017).

PD-1, kostimulasyon oluşumuna müdahale etmeksizin T-hücresindeki anahtar sinyalleşmede rol alan ara maddelerin fosforilasyonunu önleyen ve aktivasyonlarını azaltan sinyaller üretir. B7 ligandları antijen sunan hücreler tarafından eksprese edilirken (dendritik hücreler, makrofajlar ve B hücreleri içerir), PD-L1, aktive edilmiş T hücreleri tarafından immün yanıtta üretilen interferon gammaya maruz kaldıktan sonra; T hücreleri, epitel hücreleri, endotel hücreleri ve tümör hücreleri dâhil birçok hücre tipinde eksprese edilebilir. PD-L2 öncelikle dendritik hücreler ve monositlerde eksprese edilir, ancak çok çeşitli diğer immün hücrelerde ve immün olmayan hücrelerde de indüklenebilir (Ishida ve ark., 1992).

2.9. İmmun Checkpoint İnhibitörleri

Hangi tümörlerin bir anti-PD-L1 antikoru ile en iyi şekilde tedavi edileceğini belirlemek için immunohistokimya ile PD-L1 protein ekspresyonları araştırılabilir, fakat bu yöntemin standardizasyonunun olmaması ve bazen PD-L1-pozitif tümör hücrelerinin tümör mikroçevresindeki diğer PD-L1-pozitif hücrelerden ayırt edilmesi zor olduğu için çok kullanışlı olmayabilir. Ayrıca, immunohistokimya, PD-L1 mRNA ekspresyonunu ölçen çalışmalara kıyasla daha düşük bir duyarlılığa sahiptir (Mino-Kenudson, 2016).

Tamamı malign melanom tedavisi için kullanılmakta olan ipilimumab, nivolumab ve pembrolizumab olarak adlandırılan üç bağışıklık kontrol noktası inhibitörü pazarlanmaktadır: 2011 yılında monoklonal CTLA4'e özgü antikor ipilimumab metastatik malign melanom için, 2014 yılında PD1'e özgü bir monoklonal antikor Nivolumab, malign melanom, metastatik melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu, renal hücreli karsinom ve

glioblastoma multiforme için, ve yine 2014 yılı sonlarında anti-PD1 antikoru pembrolizumab, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu, ürotelyal mesane kanseri için kullanılmaya başlanmıştır (Suzman ve ark., 2018).

Bu çalışmada KEYS için immunoterapinin farklı bir yönden ele alınmasını sağlayabilecek olan programlı hücre ölümü 1 (PD-1) ve programlı hücre ölümü 1 ligandı (PD-L1) sunumlarının immunohistokimyasal olarak araştırılması amaçlanmıştır. Daha önce KEYS'lerde PD-1 ve PD-L1 sunumlarının araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle bu tez çalışması PD-1 ve PD-L1 immun checkpoint molekül inhibitörleriyle KEYS tedavisinin mümkün olup olmadığı yönünde yapılmış bir ön çalışma niteliği taşımaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada geçmiş yıllarda anabilim dalımıza gelen 11 adet kedi enjeksiyon yeri sarkomunun arşivdeki blokları kullanıldı. Bu bloklardan histopatolojik ve immunohistokimyasal analizler için normal ve poli-l-lizinli lamlara kesitler alındı. Histopatolojik analizler için rutin hematoksilin-eozin boyaması yapıldı. Tümörlerin immunofenotipik özelliklerini ortaya koymak için ayrıca vimentin, S100, SMA ve sarkomerik aktin antikorları ile immunohistokimyasal boyamalar gerçekleştirildi. Olgulara ait bilgiler Tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan olgulara ait bilgiler ve tanıları

Vaka no	Tür	İrk	Cinsiyet	Yaş	Altınan yer	Tanı
18-255	Kedi	Melez	Erkek	10 yaş	Sırt bölgesi	Fibrosarkom
13-261	Kedi	Tekir	Dişi	12 yaş	Sırt bölgesi	Fibrosarkom
19-221	Kedi	Tekir	Erkek	10 yaş	Sırt bölgesi	Fibrosarkom
14-285	Kedi	Melez	Erkek	8 yaş	Son kosta hizasında	Fibrosarkom
22-388	Kedi	Smokin	Dişi	8 yaş	Sol aksillar bölge	Fibrosarkom
17-828	Kedi	-	-	11 yaş	Aksillar bölge	Fibrosarkom
14-134	Kedi	-	Dişi	11 yaş	Sol pektoral bölge	Fibrosarkom
22-392	Kedi	Blue point	Dişi	6 yaş	Skapula üzeri	Fibrosarkom (mikzoid)
15-400	Kedi	-	Erkek	11 yaş	Sol skapula üzeri	İndiferensiye sarkom
22-254	Kedi	Tekir	Erkek	4 yaş	Arka ekstremité	Liposarkom
21-525	Kedi	Van	Dişi	5 yaş	Skapula üzeri	Rabdomyosarkom

3.1. Histopatolojik analizler

Öncelikle KEYS’lerin klasifikasyonu yapıldı (Hendrick ve ark., 1998). Histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgulara göre tümörler fibrosarkom, indiferensiye sarkom, liposarkom ve rabdomyosarkom şeklinde sınıflandırıldı.

Bu temel sınıflandırma sonrasında tümörlerin derecelendirmesi (grade) amacıyla tümör diferensiyasyonu (farklılaşma), mitotik indeks ve nekroz açısından değerlendirme yapıldı (Couto ve ark., 2002). Buna göre tümörler farklılaşma derecelerine göre 1-3 arasında skorlandı (1; tümör hücreleri olgun farklılaşma gösteriyor, 2; tümörler tanımlanan histolojik fenotipe sahip, 3; az farklılaşma gösteren tümörler). Mitotik indekse göre de yine 1-3 arasında skorlama yapıldı (1; 10 adet 400x büyütme alanında 1-9 mitotik figür, 2; 10 adet 400x büyütme alanında 10-19 mitotik figür, 3; 10 adet 400x büyütme alanında 20 veya daha fazla mitotik figür). Nekroz varlığı açısından da 1-3 arasında (1; nekroz yok, 2; örnekteki toplam alanın

%50'sinden az nekroz, 3; örnekteki toplam alanın %50'sinden fazla nekroz) skorlama yapıldı. Bunun ardından elde edilen toplam skora göre de tümörün derecesi (grade) belirlendi. Toplam skoru 3 veya 4 olan tümörler grade I, 5 veya 6 olanlar grade II, 7, 8 veya 9 olanlar ise grade III olarak derecelendirildi.

Bunların dışında tümör dokusu içerisindeki lenfosit infiltrasyonları açısından da düşük büyütmede (40x) değerlendirmeler yapıldı ve skorlandı. Buna göre tüm peritümöral alanlarda lenfosit infiltrasyonlarının varlığı skor 3, lenfoid hücreler peritümöral alanların %50'sinden az oranda diffuz olarak bulunuyor ve küçük foliküller oluşturuyorsa skor 2, az sayıda lenfositin görüldüğü ve bunların çok az folikül oluşturduğu ya da folikül gözlenmediği durumlar ise skor 1 ve son olarak yangının bulunmadığı tümörler ise skor 0 olarak belirlendi (Couto ve ark., 2002).

3.2. İmmunohistokimyasal analizler

İmmunohistokimyasal boyamalar için kullanılan yöntem aşağıdaki şekildedir; Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2125) yardımı ile 4-5 µm kalınlığındaki kesitler poli-l-lizinli lamalar (Menzel Polysine Slides: J2800AMNZ) üzerine alındı, kesitler ksilollerde (Xylene - Merck Millipore:108661) deparafinize, alkol serilerinde de dehidre edildikten sonra antigen retrieval işlemine geçildi. Antigen retrieval için tris-edta buffer solüsyonunda mikrodalga fırında 20 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. Bu işlemten sonra kesitler 20-30 dakika soğumaya bırakıldı. PBS (Phosphate buffered saline Sigma: P4417) solüsyonunda 15 dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi için karanlık ortamda %3 hidrojen peroksit (Hydrogen peroxide 30% Merck: 108597) solüsyonunda 20 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyon bitince kesitler tekrar PBS solüsyonuyla 15 dakika yıkamaya alındı. Bu aşamadan sonra nonspesifik antikor bağlanmasını önlemek için dokuların üzerine Ultra V Blok (UltraVision™ Large Volume Detection System anti-Polyvalent, HRP (Ready-To-Use) Thermo Scientific: TP-060-HL) solüsyonu damlatılıp 10 dakika beklenilerek akabinde yıkama yapılmadan sulandırılmış (Large Volume UltraAb Diluent Plus Thermo Scientific: TA-125-UDX) PD-1 (Cellmarque, klon nat105, 1:100 dilüsyon) ve kullanıma hazır PD-L1 (Leica marka, klon 73-10, kullanıma hazır) primer antikorları ile +4°C'de bir gece inkübasyon yapıldı. Pozitif

kontrol olarak PD-1 için insan tonsili PD-L1 için ise insan plasentası kullanıldı. Negatif kontrol için protein bloklama işleminden sonra primer antikor yerine PBS kullanılıp dokular bir gece bu solüsyon ile inkube edildi. Primer antikor inkubasyonundan sonra PBS ile 15 dakika yıkanan kesitler reaksiyonun gösterilmesi için DAB kromojeni ile mikroskop altında kontrollü şekilde boyandı. Mayer's hematoksilenle zıt boyama yapılan kesitler entellan ile kapatılıp mikroskop altında incelendi.

Vimentin, SMA ve sarkomerik aktin boyamaları için hazır sekonder kit (ImmPRESS® Excel Amplified Polymer Staining Kit, Anti-Mouse IgG, Peroxidase MP-7602) kullanıldı. S100 boyaması için ise benzer kitten (ImmPRESS® Excel Amplified Polymer Staining Kit, Anti-Rabbit IgG, Peroxidase MP-7601) yararlanıldı. Kullanılan antikorlar ile prosedür bilgileri Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan antikorlara ait bilgiler

Antikor	Marka	Tür	Klon	Dilüsyon	Süre
Vimentin	Dako	Fare	Vim 3B4	1:200	O.N.*
S100	Dako	Tavşan	poliklonal	1:400	O.N.*
SMA	Dako	Fare	1A4	1:100	O.N.*
Sarkomerik aktin	Dako	Fare	Alpha-Sr-1	1:100	O.N.*
PD-1	Cellmarque	Fare	nat105	1:100	O.N.*
PD-L1	Leica	Fare	73-10	Hazır	O.N.*

*O.N.: Bir gece boyunca

İmmunhistokimyasal boyanmaların değerlendirilmesi semi-kantitatif olarak yapıldı (Kamarlis ve ark., 2018). Bu amaçla hem boyanma yoğunluğu, hem de boyanan hücre yüzdesi belirlendi ve ardından total skor elde edildi. Boyanma yoğunluğu 1 (boyanma yok), 2 (zayıf boyanma), 3 (orta dereceli boyanma) ve 4 (güçlü boyanma) şeklinde skorlandı. Ardından pozitif boyanan hücrelerin toplam tümör hücrelerine oranlanması ile elde edilen yüzdelik dilime göre 1 (< %20), 2 (≥ %20–50), 3 (> %50–80) ve 4 (> %80) şeklinde skorlama yapıldı. Elde edilen skorların çarpılmasıyla 1-16 arasında skor elde edildi ve daha sonra immunoreaktivite skoru 1; ≤ 5, 2; ≥ 6 – 10 ve 3; ≥ 11 – 16 şeklinde belirlendi.

Çalışma sonunda KEYS'ler sergiledikleri malignite derecelerine, lenfosit yoğunluğuna ve immunohistokimyasal skorlarına göre karşılaştırmalı olarak istatistiksel analizler ile değerlendirildi ve PD-1/PD-L1 pozitifliklerinin tümör malignite dereceleri ve lenfosit infiltrasyonları arasındaki ilişki ortaya konuldu. İstatistiksel analizler için Minitab® 16.1.1 programı kullanıldı. Elde edilen skorların ilişkisini araştırmak amacıyla Pearson korelasyon testi uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre korelasyon “r” değeri 0-0,3 arası önemsiz korelasyon, 0,3-0,5 arası düşük korelasyon, 0,5-0,7 arası orta dereceli korelasyon, 0,7-0,9 arası yüksek korelasyon ve 0,9-1 arası çok yüksek korelasyon olarak kabul edildi (Hinkle ve ark., 2003; Mulaka, 2012).



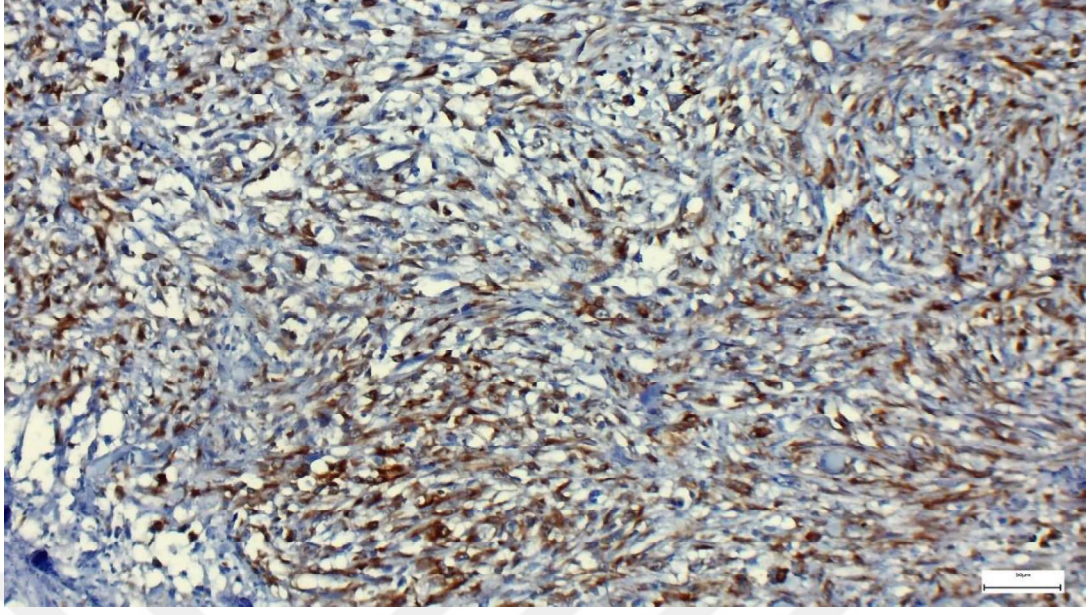
4. BULGULAR

4.1. Tümör Sınıflandırması

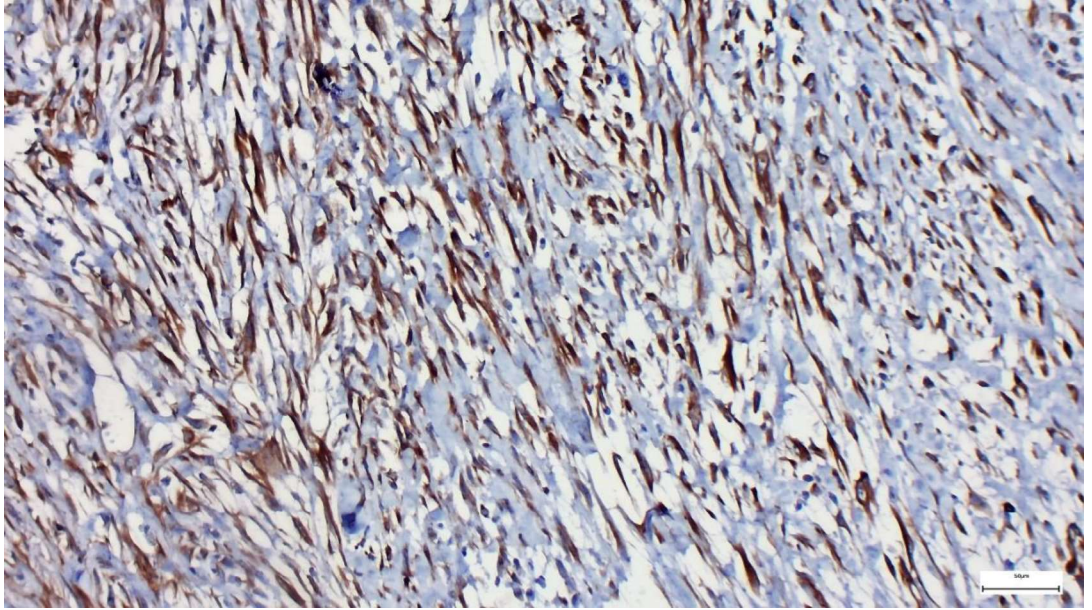
Tümörler histopatolojik özelliklerine ve immunohistokimyasal fenotiplerine göre alt tiplendirmeleri yapıldı. Vimentin ve S100'ün tüm olgularda değişen şiddetlerde pozitif olduğu, sarkomerik aktinin ise yalnızca bir olguda pozitif olduğu görüldü (Şekil 1-8). Fibrosarkom tanılı olguların ikisinde SMA'nın diffuz şekilde tümör dokusunun büyük çoğunluğunda pozitif olduğu (Şekil 9-10), iki fibrosarkom olgusunda ise tümör dokusunun çevresini saran mezenkimal dokuda belirgin bir pozitiflik gözlemlendi (Şekil 11, 12). İster tümör içinde, ister dışında olsun, SMA pozitif olguların tümüne myofibroblast farklılaşması içeren fibrosarkom tanısı konuldu. Sarkomerik aktin ve SMA pozitif olan olguda ise tanı histopatolojik bulgular da göz önüne alınarak rabdomyosarkom olarak teşhis edildi (Şekil 13). İncelemeler sonrasında 8 olguya fibrosarkom, bir olguya indifferensiye sarkom, bir olguya liposarkom ve bir olguya rabdomyosarkom tanısı konuldu. Çalışmada kullanılan olgulara ait immunohistokimyasal boyanma özellikleri Tablo 3'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Olguların immunohistokimyasal boyanma özellikleri

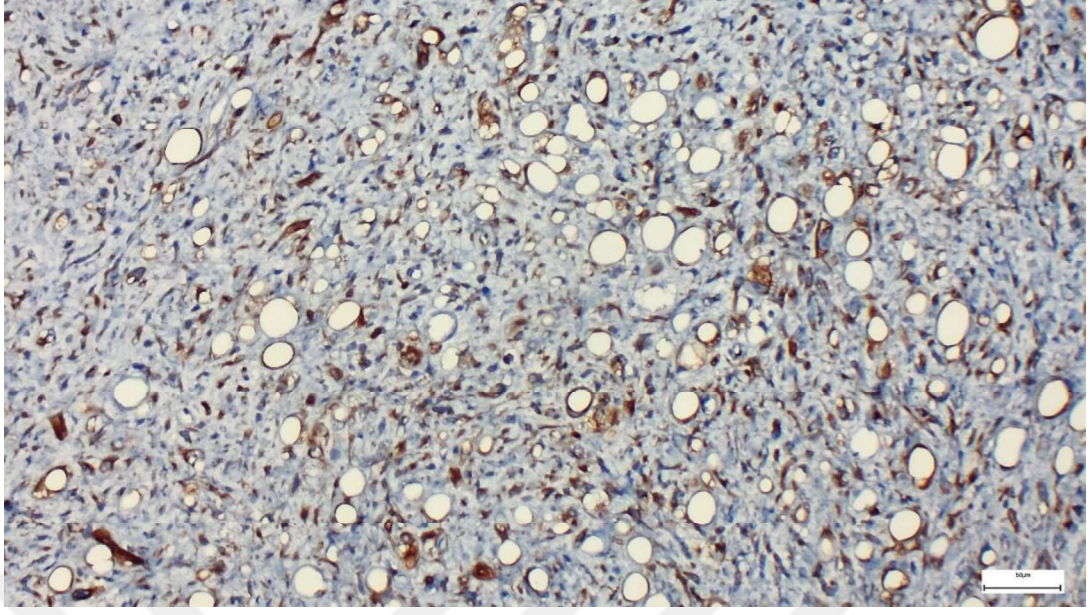
Vaka no	Tanı	Vimentin	SMA	S100	Sarkomerik Aktin
13-261	Fibrosarkom	+	+	+	-
14-134	Fibrosarkom	+	+	+	-
14-285	Fibrosarkom	+	-	+	-
17-828	Fibrosarkom	+	+	+	-
18-255	Fibrosarkom	+	-	+	-
19-221	Fibrosarkom	+	+	+	-
22-388	Fibrosarkom	+	-	+	-
22-392	Fibrosarkom (mikzoid)	+	-	+	-
15-400	İndifferensiye sarkom	+	-	+	-
22-254	Liposarkom	+	-	+	-
21-525	Rabdomyosarkom	+	+	+	+



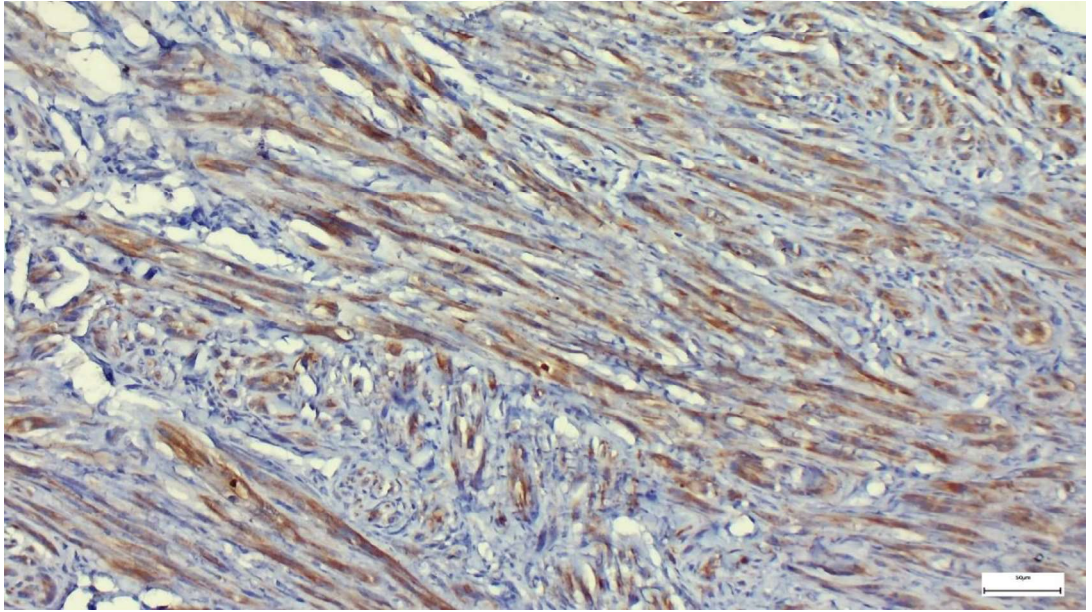
Şekil 4.1. Fibrosarkom olgusunda (14-285) vimentin pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.



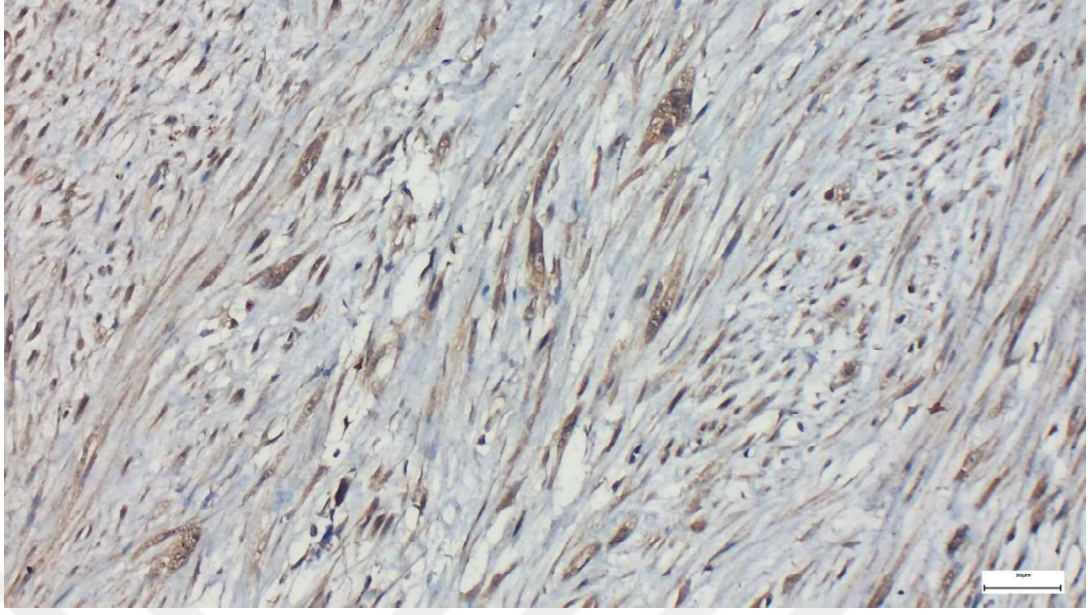
Şekil 4.2. Fibrosarkom olgusunda (18-255) vimentin pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.



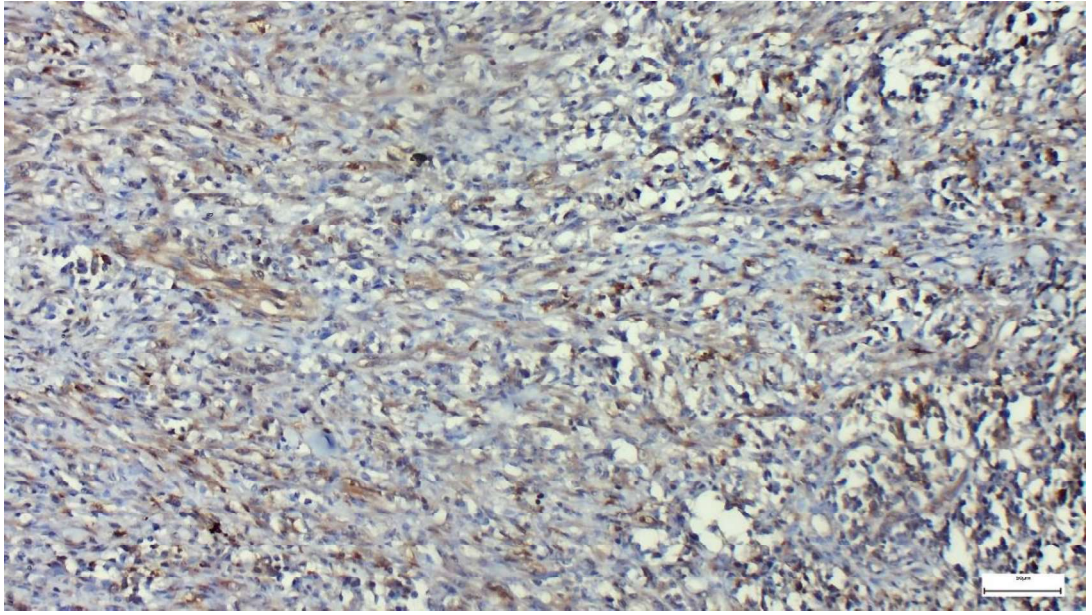
Şekil 4.3. Liposarkom olgusunda vimentin pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.



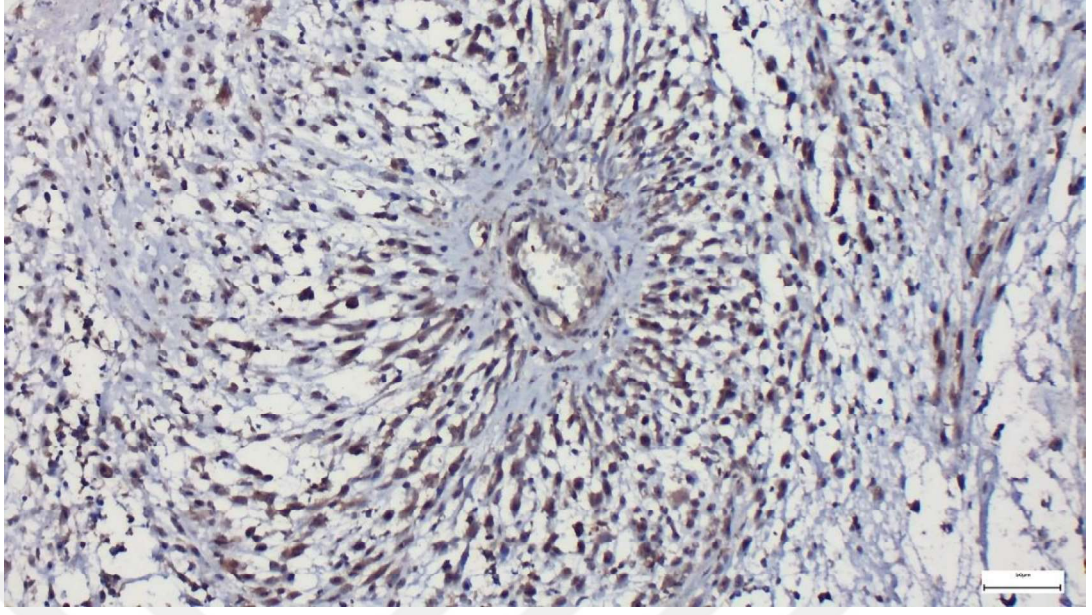
Şekil 4.4. Rabdomyosarkom olgusunda vimentin pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.



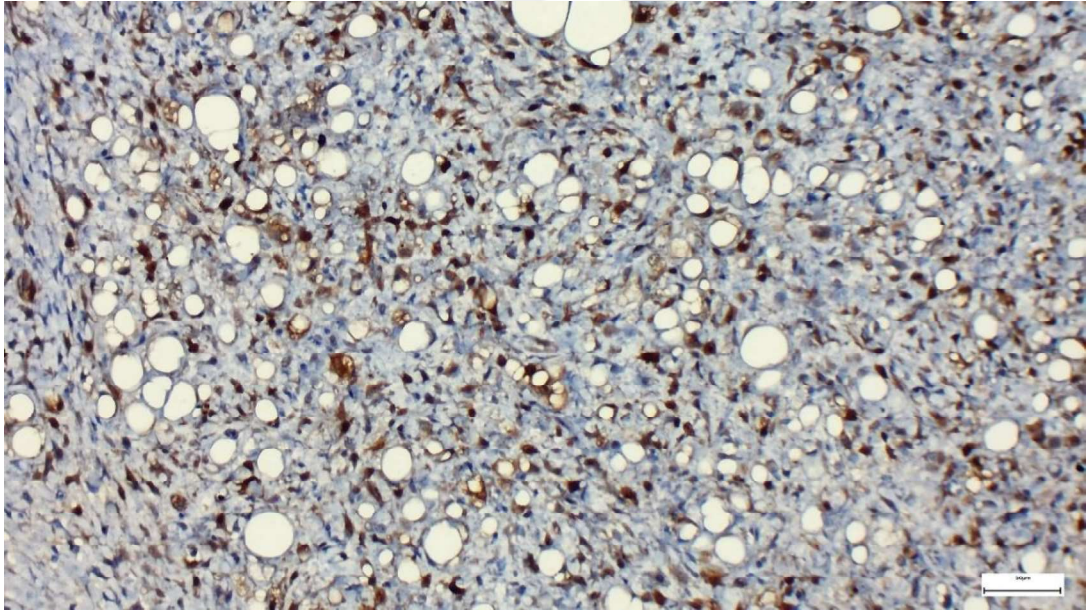
Şekil 4.5. Fibrosarkom olgusunda (13-261) S100 pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.



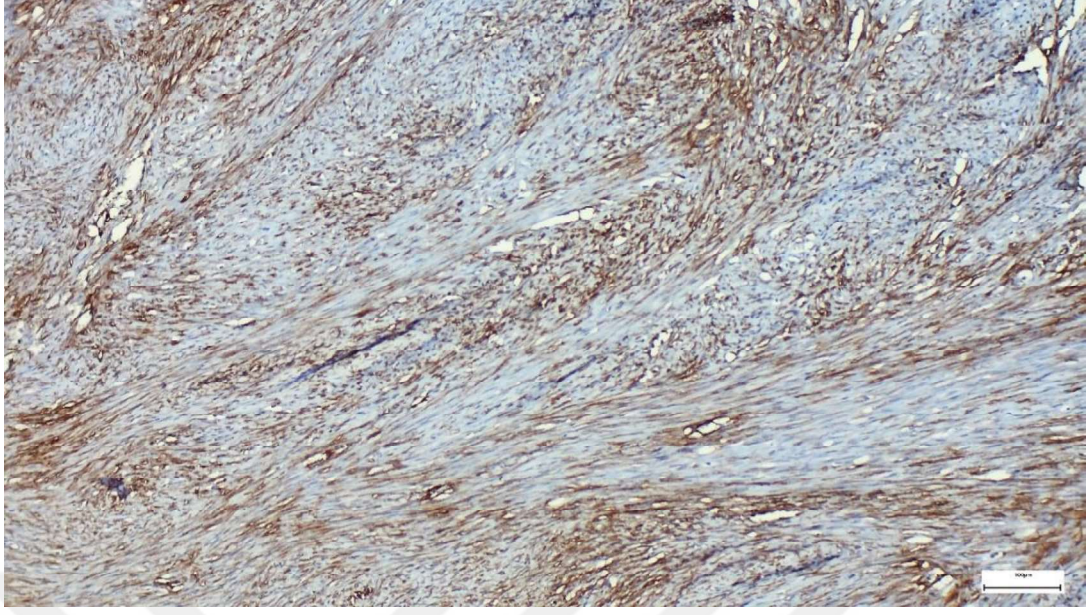
Şekil 4.6. Fibrosarkom olgusunda (14-285) S100 pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.



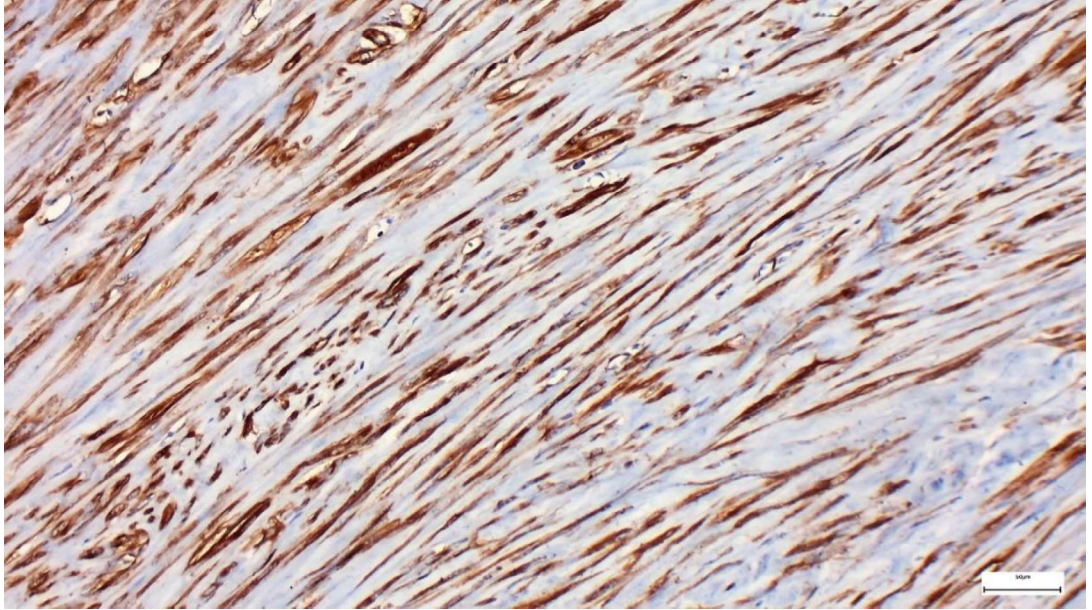
Şekil 4.7. Mikzoid farklılaşmalı fibrosarkom olgusunda (22-392) S100 pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.



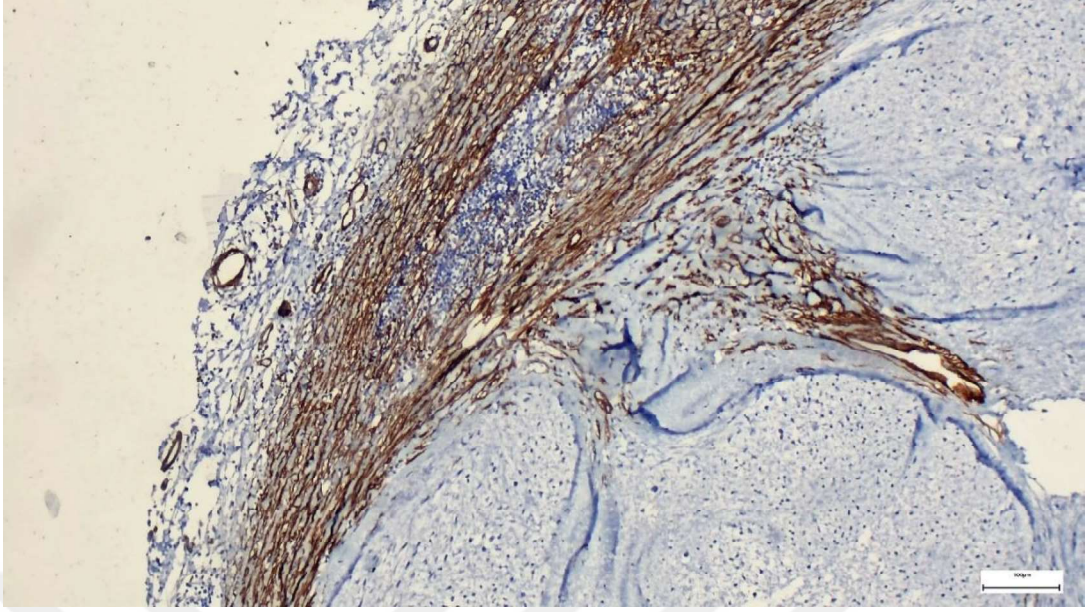
Şekil 4.8. Liposarkom olgusunda S100 pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.



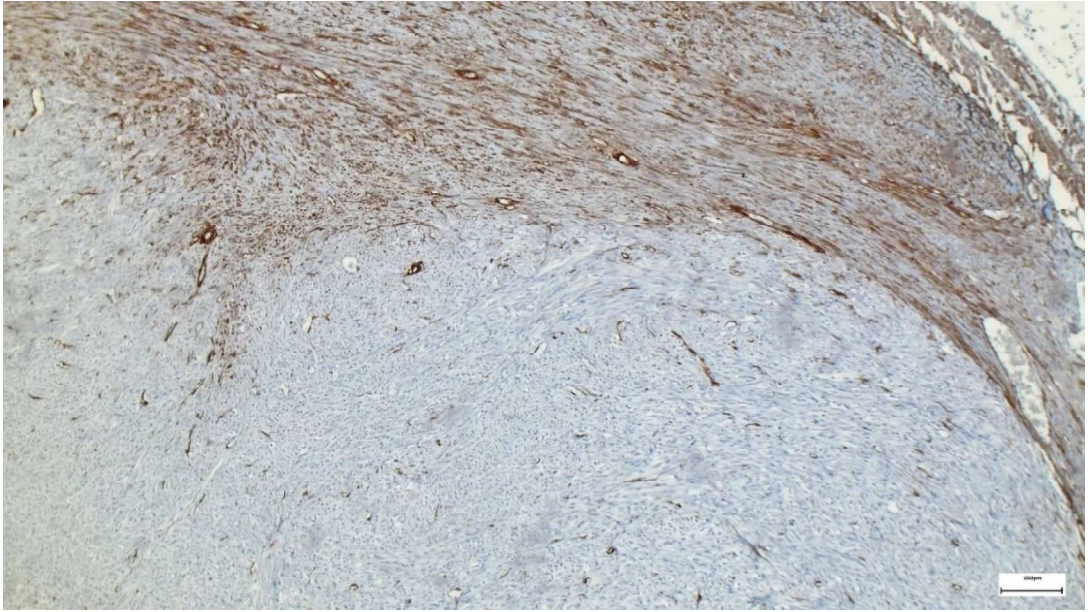
Şekil 4.9. Fibrosarkom olgusunda (14-134) diffuz SMA pozitifliği. Strepto-Avidin.
Bar: 100 µm.



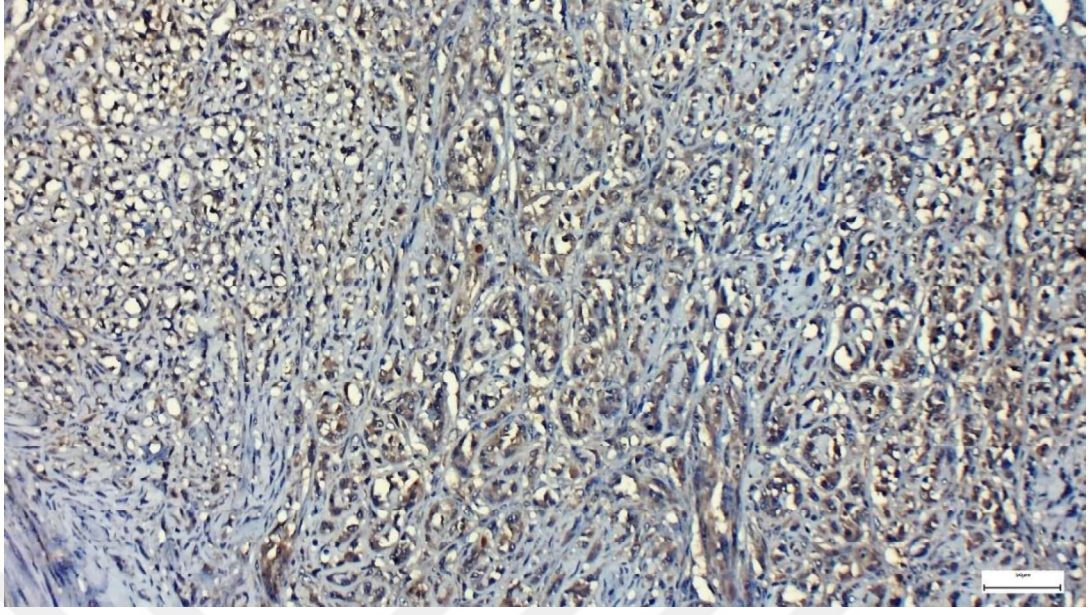
Şekil 4.10. Fibrosarkom olgusunda (17-828) diffuz SMA pozitifliği. Strepto-Avidin.
Bar: 50 µm.



Şekil 4.11. Fibrosarkom olgusunda (13-261) çevre dokuda yoğun SMA pozitif doku artışı ve bu alanda yerleşim gösteren lenfoid folikül. Strepto-Avidin. Bar: 100 µm.



Şekil 4.12. Fibrosarkom olgusunda (19-221) tümör çevresinde yoğun SMA pozitif mezenkimal hücre proliferasyonu. Strepto-Avidin. Bar: 200 µm.

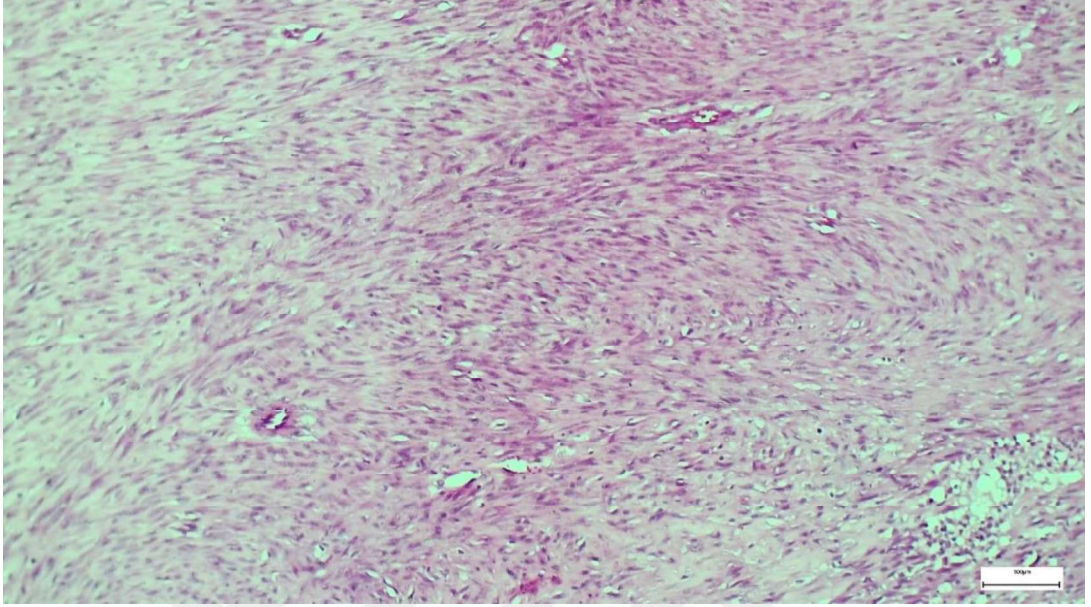


Şekil 4.13. Rabdomyosarkom olgusunda sarkomerik aktin pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.

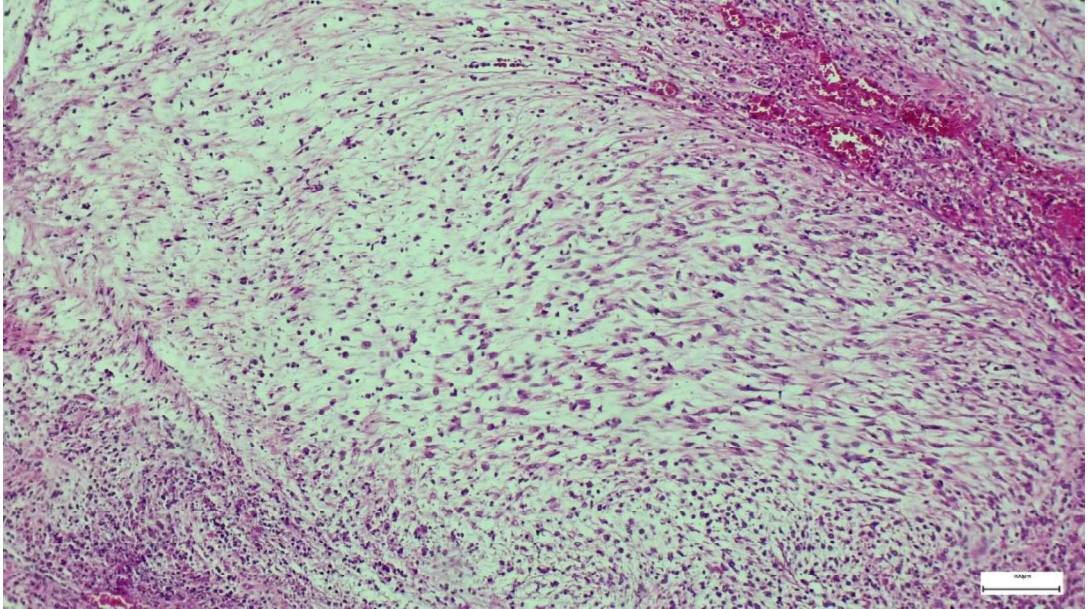
4.2. Histopatolojik Bulgular

Fibrosarkom olgularında belirgin malignite bulguları sergileyen, mekik şekilli ve farklı yönlerde uzantılar gösteren, yer yer de iç içe geçmiş görünümde hücre demetleri oluşturan mezenkimal hücre proliferasyonları gözlemlendi (Şekil 14). Mikzoid farklılaşma gösteren fibrosarkom olgusunda belirgin malignite bulguları ve sitoplazmik mikzomatöz özellikler sergileyen neoplastik mezenkimal hücre proliferasyonlarına rastlandı (Şekil 15). İndiferensiye sarkom tanılı olguda bir tümör tipine ait belirgin tipik bir histolojik morfoloji sergilemeyen, anaplastik özellikler sergileyen mezenkimal tümör görüntüsü dikkati çekti (Şekil 16). İndiferensiye sarkom, rabdomyosarkom ve iki fibrosarkom olgusunda çok çekirdekli dev hücrelerinin varlığı dikkati çekti (Şekil 17, 18). Gri renkli sitoplazmaya sahip ve belirgin şekilde birikimleri gözlenen makrofajlara ise yalnızca bir fibrosarkom olgusunda rastlandı (Şekil 19). Liposarkom olgusunda, genellikle tek ve oldukça büyük çekirdekçikler içeren, belirgin anizokaryozis sergileyen büyük çekirdeklere sahip, oval şekilli ve sitoplazmalarında çok sayıda farklı boyutlarda vakuollerin bulunduğu neoplastik proliferasyonlar dikkati çekti (Şekil 20). Rabdomyosarkom olgusunda iğ şekilli iç içe geçmiş hücre demetleri halinde gözlenen neoplastik proliferasyonlara rastlandı. Tümör

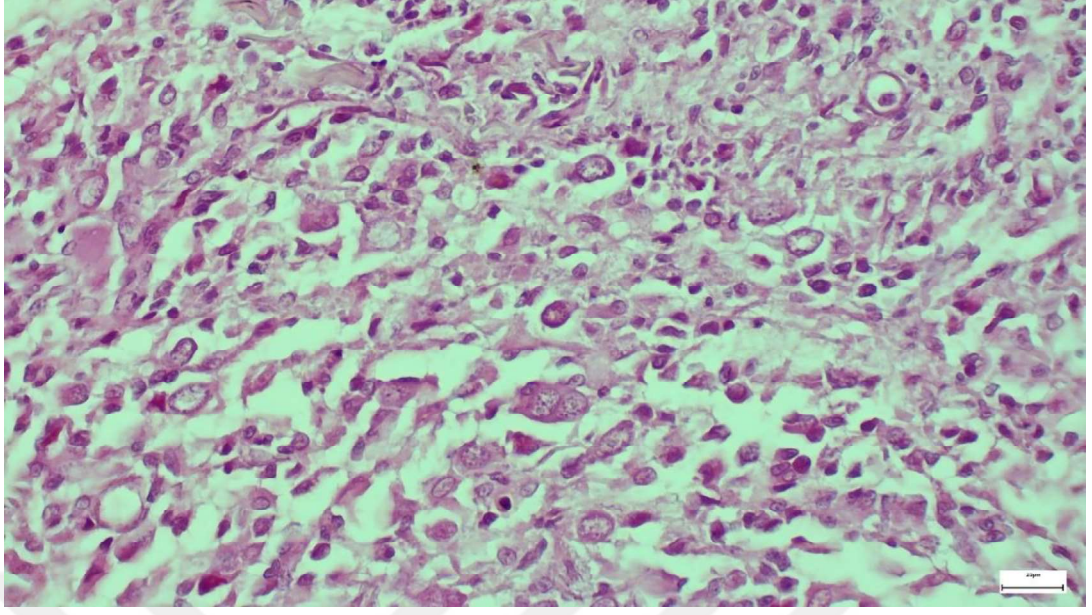
hücreleri ovalden uzuna değişen, poligonal şekilli, hiperkromatik ve genellikle merkezi yerleşime sahip bir çekirdeğe sahipti (Şekil 21).



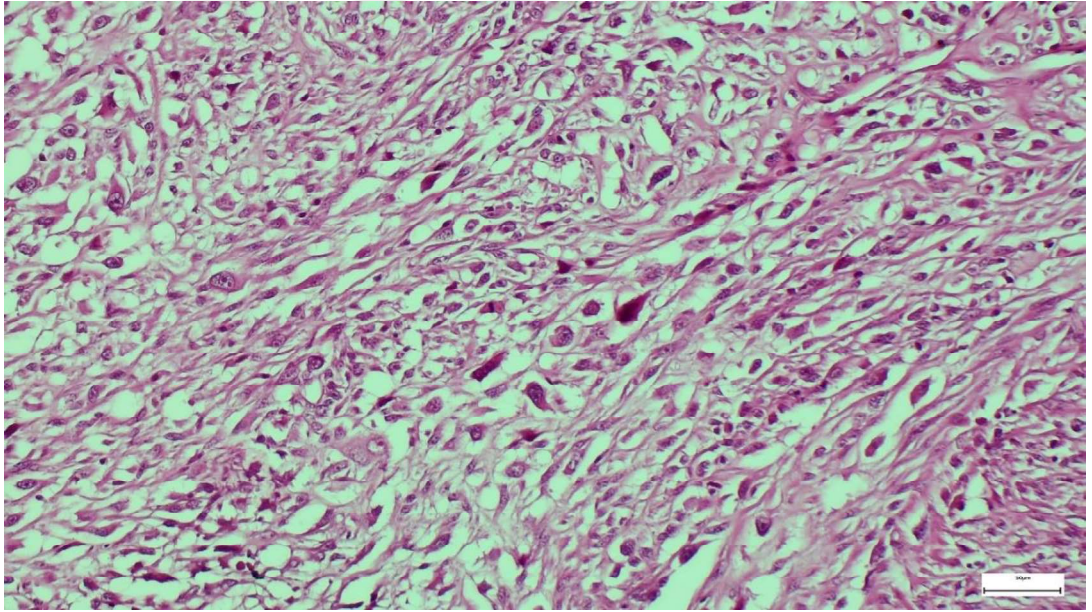
Şekil 4.14. Fibrosarkom olgusunda (14-134) iç içe geçen demetler halinde gözlenen iğ şekilli mezenkimal hücre proliferasyonları. H&E. Bar: 100 µm.



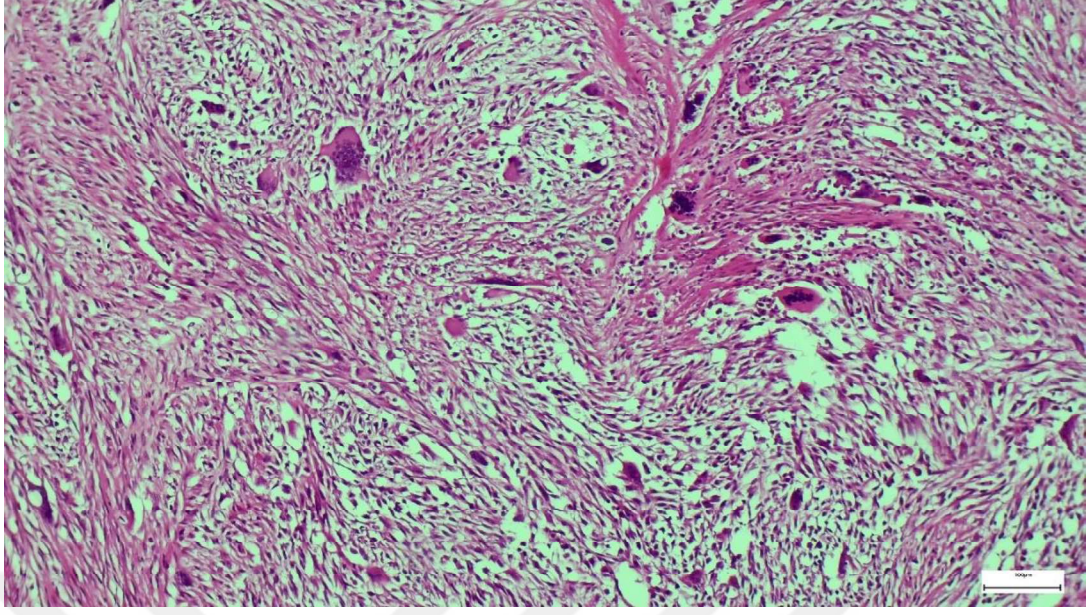
Şekil 4.15. Fibrosarkom olgusunda (22-392) mikzoid farklılaşma alanı. H&E. Bar: 100 µm.



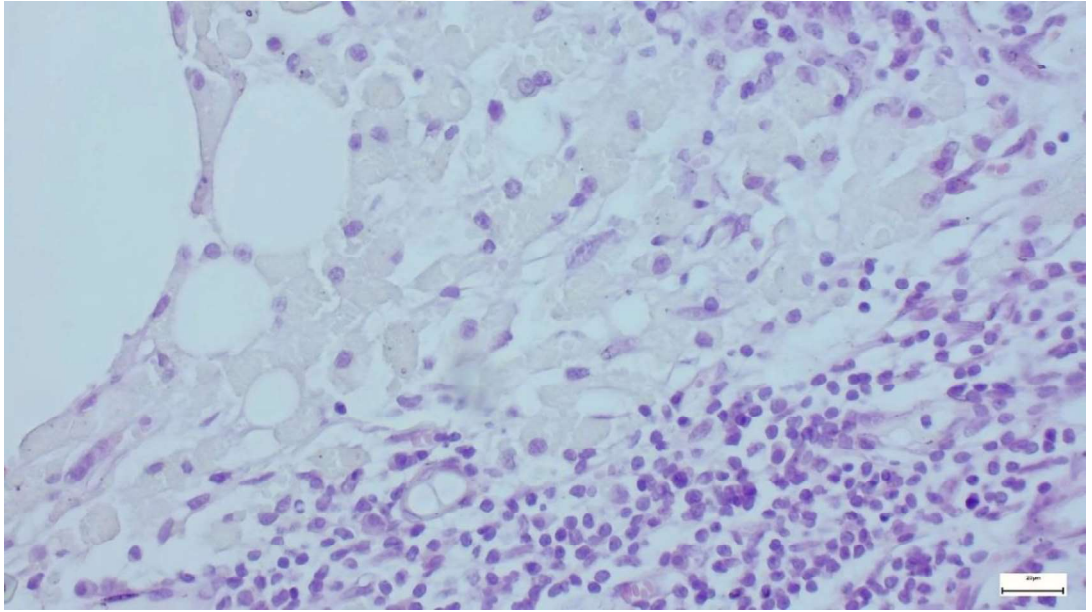
Şekil 4.16. İndiferensiye sarkom olgusunda atipik pleomorfik hücreler ve dev hücre oluşumu. H&E. Bar: 20 µm.



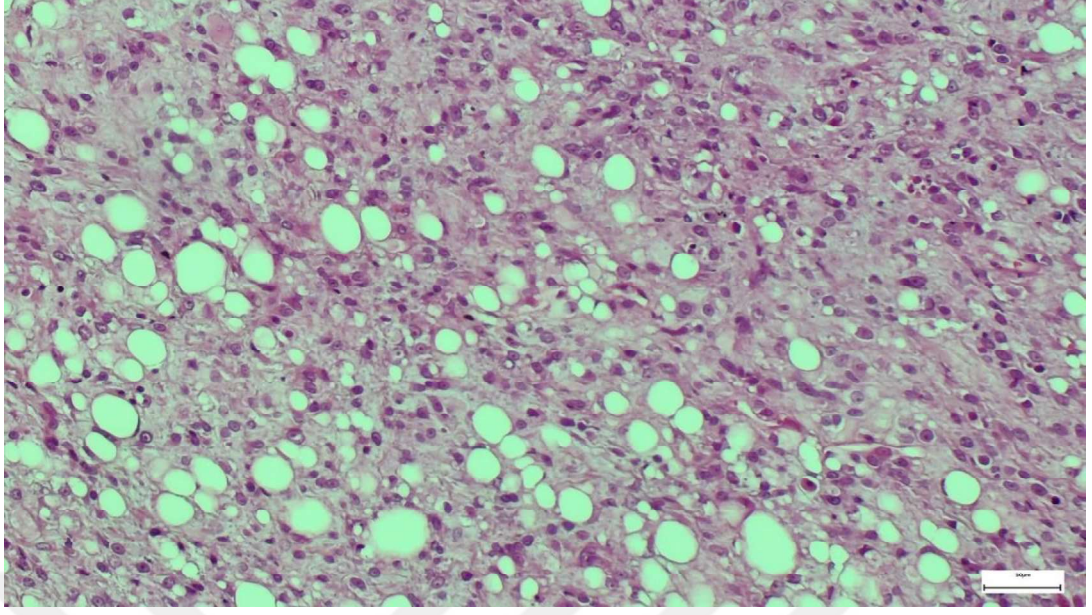
Şekil 4.17. Fibrosarkom olgusunda (18-255) atipik pleomorfik hücreler ile çok çekirdekli dev hücreleri. H&E. Bar: 50 µm.



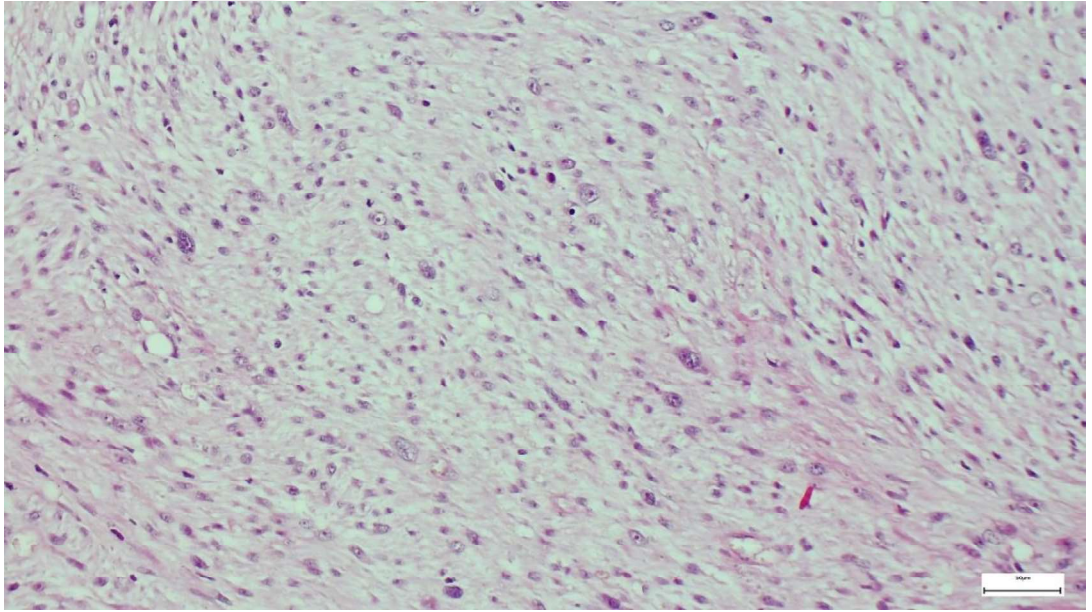
Şekil 4.18. Fibrosarkom olgusunda (22-388) çok çekirdekli dev hücreleri. H&E. Bar: 100 µm.



Şekil 4.19. Fibrosarkom olgusunda (19-221) tümör çevresinde lenfosit ve gri sitoplazmalı makrofaj birikimleri. H&E. Bar: 20 µm.



Şekil 4.20. Liposarkom olgusunda (22-254) belirgin vakuoller içeren neoplastik hücreler. H&E. Bar: 50 µm.

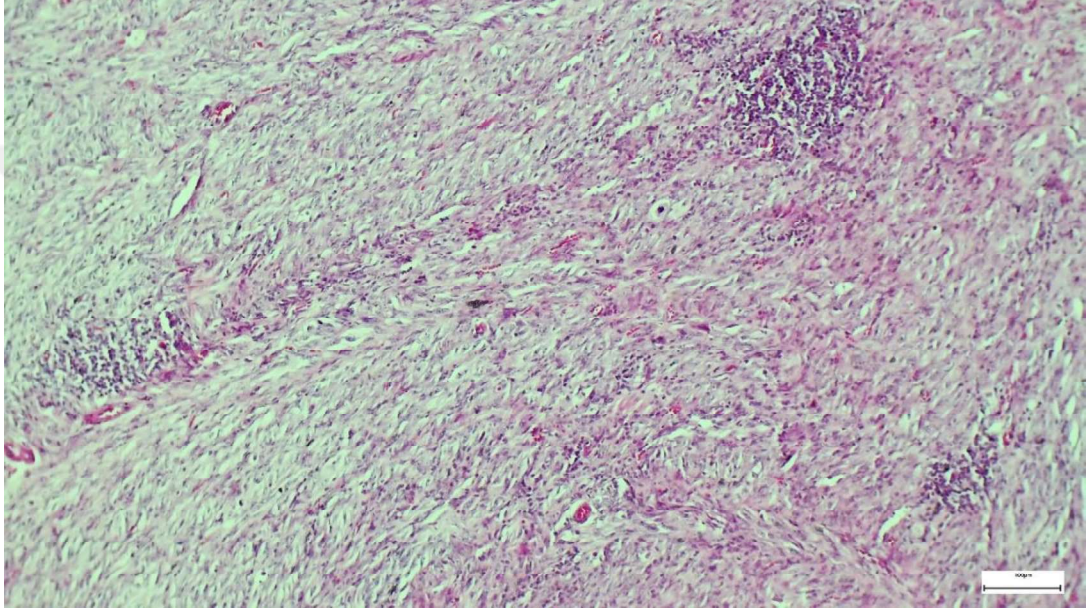


Şekil 4.21. Rabdomiyosarkom olgusunda büyük çekirdek ve belirgin çekirdekçiklere sahip pleomorfik mezenkimal hücre proliferasyonları. H&E. Bar: 50 µm.

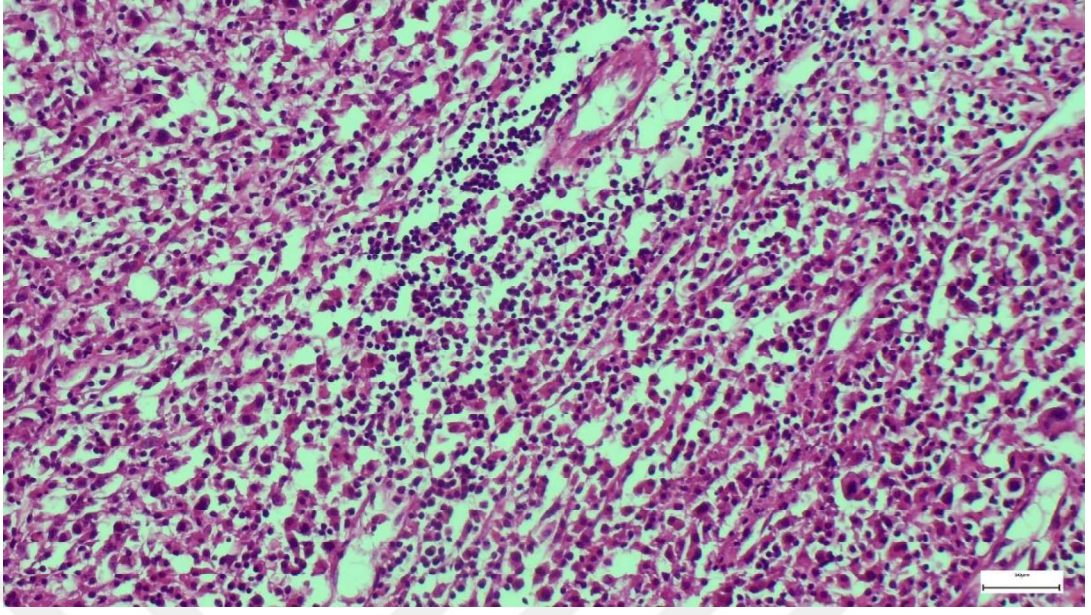
Tümörlerin histolojik derecelendirmesi amacıyla tümör hücrelerinde farklılaşma, mitotik indeks ve nekroz varlığı değerlendirildi. Her bir parametre için 1-3 arasında skorlamalar yapıldı. Ardından bu skorların toplanmasıyla nihai tümör derecesi belirlendi. Buna göre tümör derecesi dört fibrosarkom olgusunda skor 3; diğer

üç fibrosarkom ile indifferensiye sarkom, liposarkom ve rabdomyosarkom olgusunda skor 2; bir fibrosarkom olgusunda ise skor 1 olarak belirlendi.

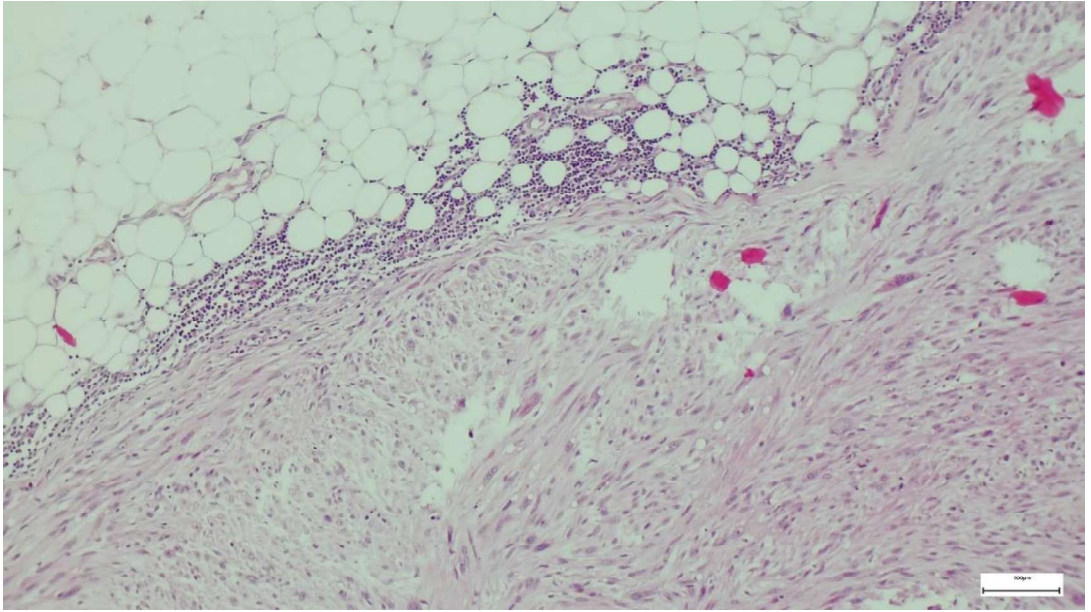
Tümörlerde gözlenen lenfoid infiltrasyonlara göre yapılan değerlendirmede (Şekil 22-25), dört fibrosarkom, indifferensiye sarkom ve rabdomyosarkom olgusunda skor 3; üç fibrosarkom ve liposarkom olgusunda skor 2; bir fibrosarkom olgusunda ise skor 1 olarak belirlendi.



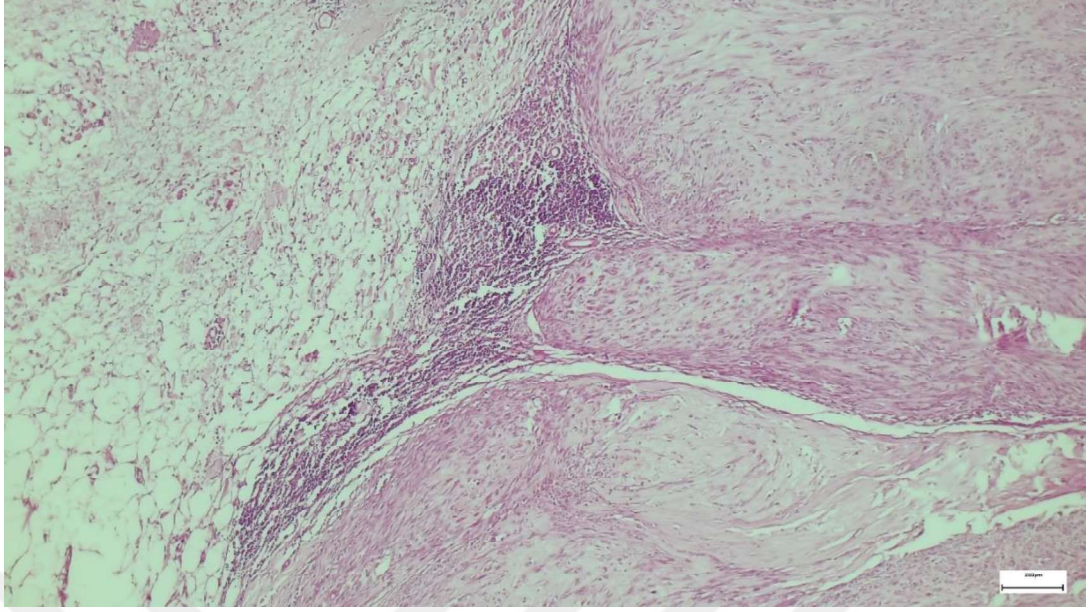
Şekil 4.22. Fibrosarkom olgusunda (13-261) tümör dokusu içerisinde yer alan lenfosit infiltrasyonları. H&E. Bar: 100 µm.



Şekil 4.23. Fibrosarkom olgusunda (22-388) tümör dokusu içerisine infiltrate olmuş lenfositler. H&E. Bar: 50 µm.



Şekil 4.24. Rabdomyosarkom olgusunda tümör dokusu çevresinde gözlenen lenfositler. H&E. Bar: 100 µm.



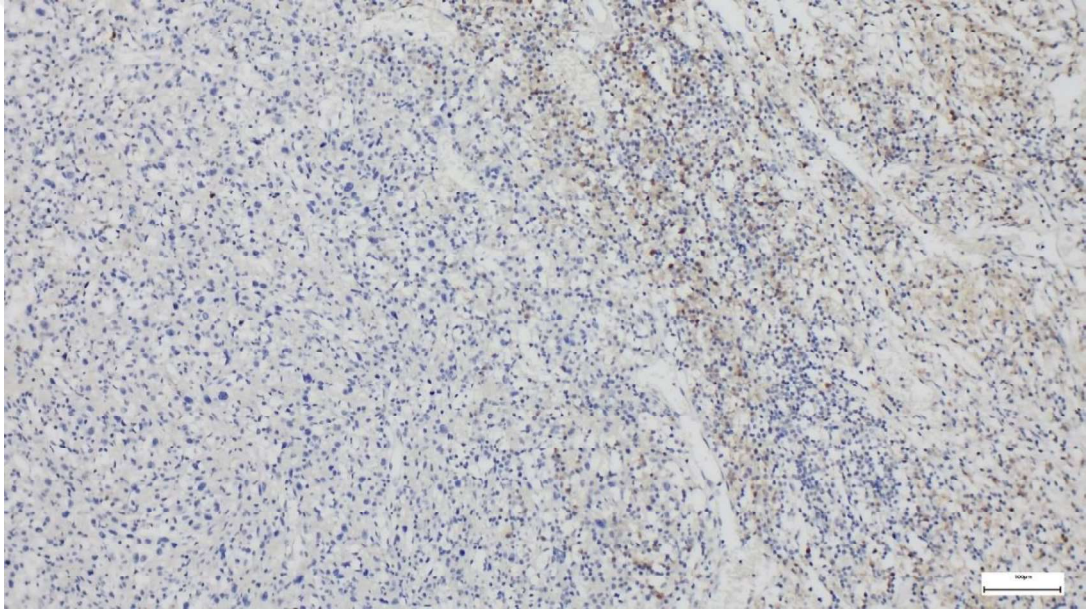
Şekil 4.25. Fibrosarkom olgusunda (17-828) tümör dokusu çevresinde görülen lenfositler. H&E. Bar: 200 μ m.

4.3. PD-1/PD-L1 İmmunohistokimyasal Boyamaları

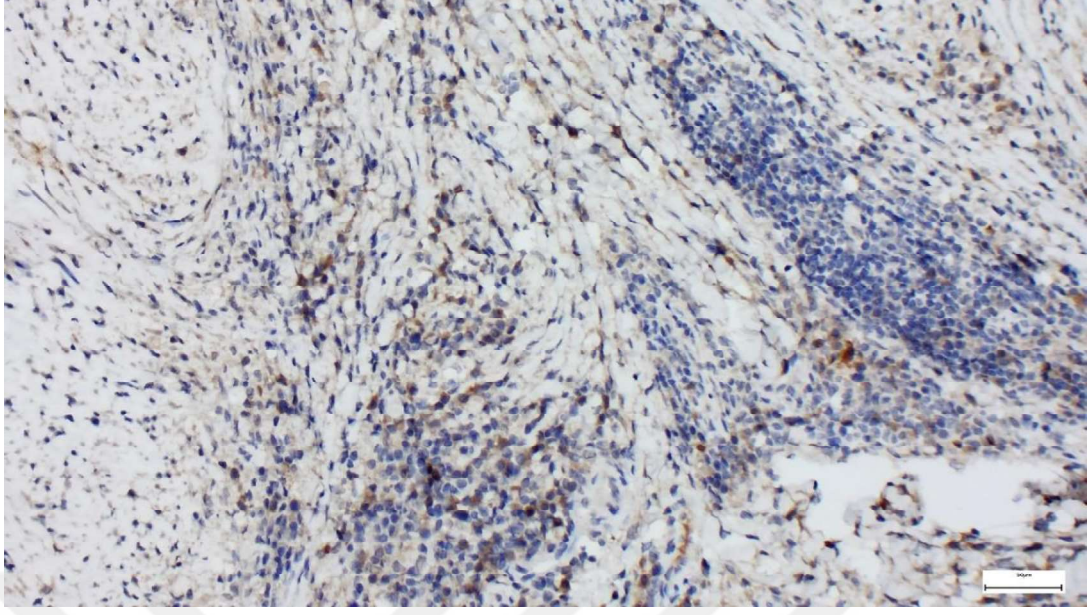
PD-1 açısından yapılan değerlendirmede bir fibrosarkom, liposarkom ve rabdomyosarkom olgusunda skor 3; iki fibrosarkom olgusunda skor 2; beş fibrosarkom ve indifferensiye sarkom olgusunda skor 1 olarak belirlendi. PD-1 pozitifliği başlıca lenfoid hücreler olmak üzere tümörlerin daha çok periferinde ve yer yer içerisinde gözlenen makrofaj benzeri hücrelerde gözlenmiştir (Şekil 26-28). PD-L1 açısından yapılan değerlendirmede ise üç fibrosarkom ve rabdomyosarkom olgusunda skor 2; diğer beş fibrosarkom, indifferensiye sarkom ve liposarkom olgusunda ise skor 1 olarak belirlendi. PD-L1 pozitifliğine çoğunlukla tümör hücrelerinde (Şekil 29) ve tümör içerisinde gözlenen geniş sitoplazmalı, makrofaj benzeri hücrelerde (Şekil 30) rastlandı. Bunun yanında düşük oranda lenfoid foliküller içerisindeki bazı hücrelerde de pozitiflikler bulunduğu görüldü (Şekil 30). Histopatolojik skorlar ile PD-1 ve PD-L1 skorlarına ait bilgiler Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 4.2. Histopatolojik bulgular ile PD-1 ve PD-L1 skorları

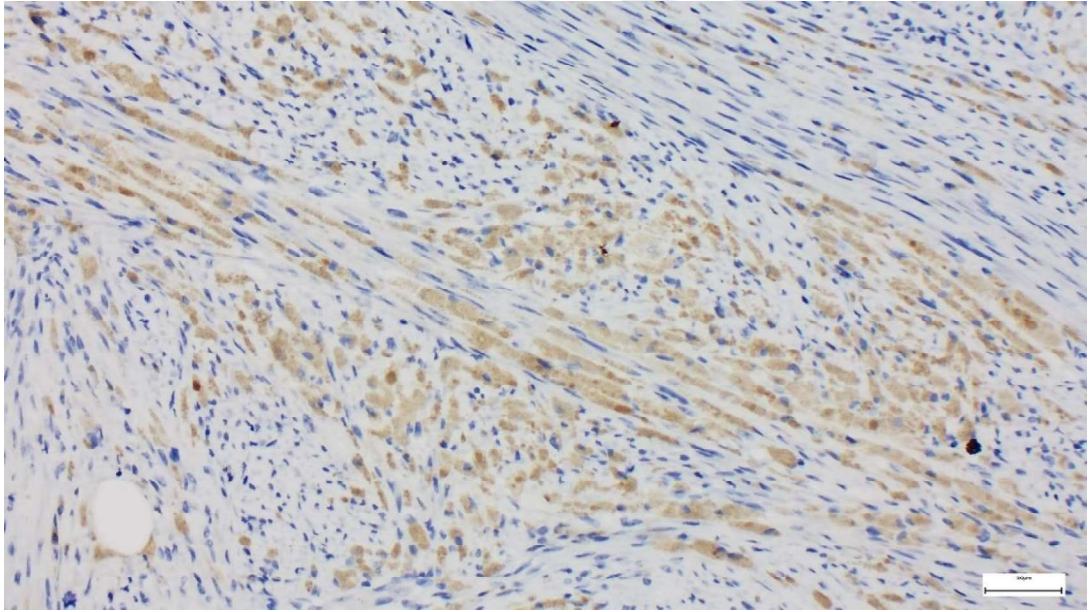
Vaka no	Yeni Tanı	Lenfosit	Farklılaşma	Mitotik indeks	Nekroz	Tümör derecesi	PD-1	PD-L1
13-261	Fibrosarkom	3	2	3	1	2	1	1
14-134	Fibrosarkom	2	2	2	1	2	1	1
14-285	Fibrosarkom	3	2	1	3	2	1	1
17-828	Fibrosarkom	2	1	1	1	1	1	1
18-255	Fibrosarkom	1	3	3	3	3	2	2
19-221	Fibrosarkom	3	2	3	2	3	2	2
22-388	Fibrosarkom	3	3	3	2	3	3	2
22-392	Fibrosarkom (mikzoid)	2	2	3	2	3	1	1
15-400	İndiferensiye sarkom	3	2	1	2	2	1	1
22-254	Liposarkom	2	2	2	2	2	3	1
21-525	Rabdomyosarkom	3	3	2	1	2	3	2



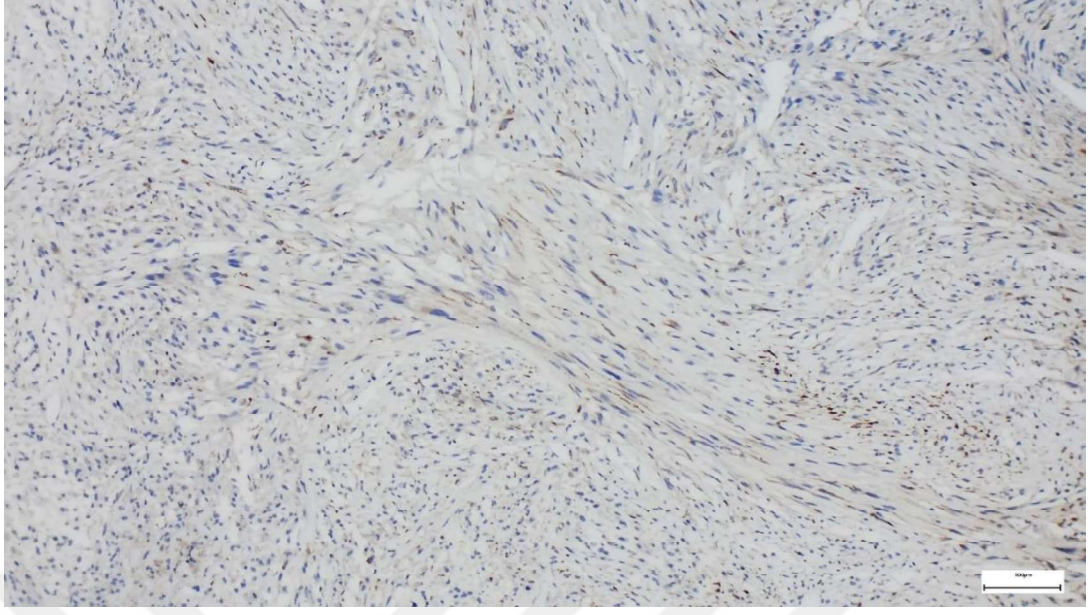
Şekil 4.26. Fibrosarkom olgusunda (22-388) tümör çevresi lenfosit infiltrasyonlarında PD-1 pozitiflikleri. Strepto-Avidin. Bar: 100 µm.



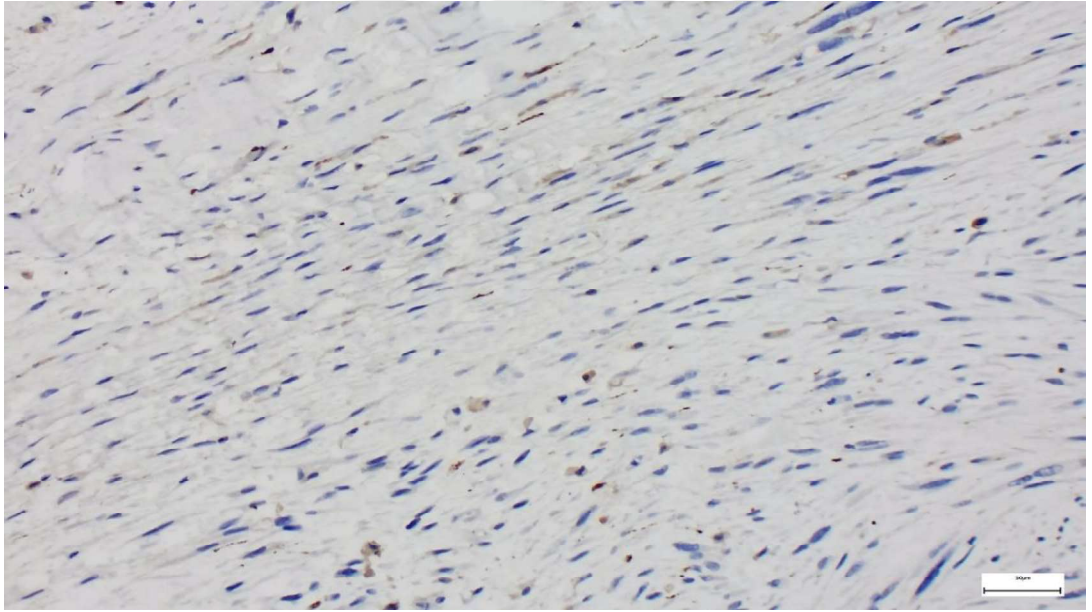
Şekil 4.27. Rabdomiyosarkom olgusunda tümör çevresi lenfoid dokuda PD-1 pozitiflikleri. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.



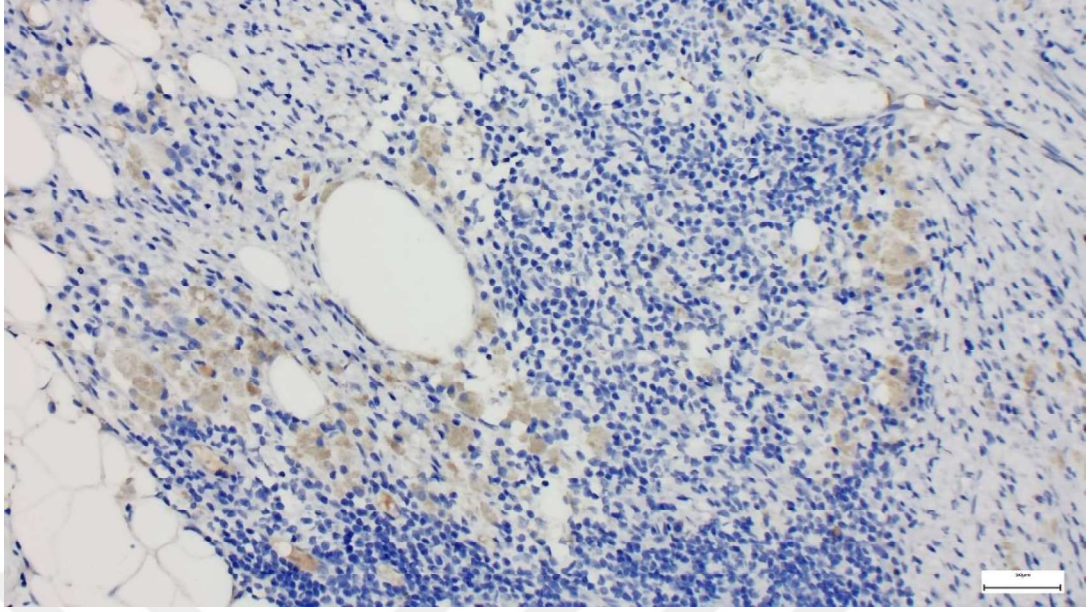
Şekil 4.28. Fibrosarkom olgusunda (19-221) tümör içerisine infiltre olmuş geniş sitoplazmalı makrofaj benzeri hücrelerde PD-1 pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.



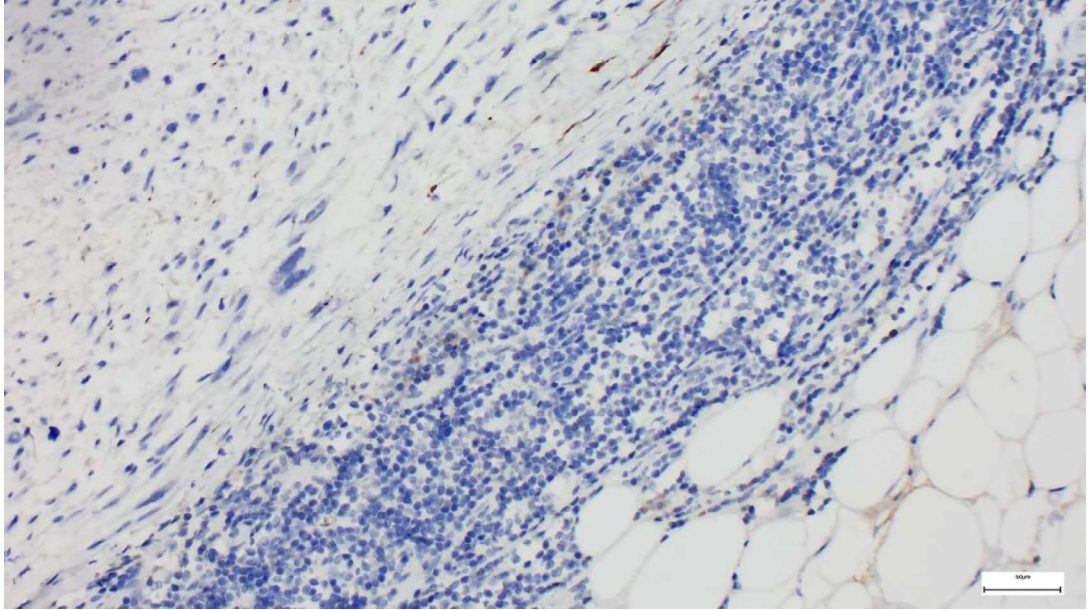
Şekil 4.29. Fibrosarkom olgusunda (18-255) neoplastik hücrelerde PD-L1 pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 100 µm.



Şekil 4.30. Rabdyomiyosarkom olgusunda tümör hücrelerinde PD-L1 pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 µm.



Şekil 4.31. Fibrosarkom olgusunda (19-221) tümör çevresi lenfoid doku içerisinde gözlenen geniş sitoplazmalı makrofaj benzeri hücrelerde PD-L1 pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 μ m.



Şekil 4.32. Rabdomyosarkom olgusunda tümör çevresi lenfoid dokuda hafif dereceli PD-L1 pozitifliği. Strepto-Avidin. Bar: 50 μ m.

4.4. Pearson Korelasyon Analiz Sonuçları

Histopatolojik olarak gözlenen tümör farklılaşması, mitotik indeks, nekroz, tümör derecesi, lenfosit infiltrasyonları, PD-1 ve PD-L1 arasında Pearson korelasyon

analizi gerçekleştirildi. Buna göre; tümör derecesi ile tümör farklılaşması ve mitotik indeks arasında sırasıyla orta ($r=0,629$) ve yüksek dereceli ($r=0,788$) bir korelasyon tespit edildi. Tümör derecesi ile nekroz arasında da orta dereceli ($r=0,524$) bir korelasyon gözlenmekle birlikte anlamlı bir ilişki olmadığı görüldü ($p<0,05$). Tümör farklılaşmasının PD-1 ile orta dereceli ($r=0,650$), PD-L1 ile ise yüksek dereceli bir korelasyonu ($r=0,747$) tespit edilirken, PD-1 ve PD-L1 arasında da orta dereceli bir korelasyon ($r=0,677$) belirlendi. Mitotik indeks ile PD-1 arasında düşük korelasyon ($r=0,322$), PD-L1 arasında ise orta dereceli korelasyon ($r=0,515$) belirlendi fakat bu ilişkiler anlamlı bulunmadı ($p<0,05$). Benzer şekilde tümör derecesi ile PD-1 arasında düşük ($r=0,311$), PD-L1 arasında ise orta dereceli korelasyon ($r=0,585$) belirlendi ve yine sonuçlar anlamlı değildi ($p<0,05$). Lenfositler ile PD-1 ve PD-L1 arasında ise korelasyonun önemsiz düzeyde olduğu görüldü. Pearson korelasyon sonuçları Tablo 5'te sunulmuştur.

Tablo 4.3. Pearson korelasyon test sonuçları

		Farklılaşma	Mitotik indeks	Nekroz	Tümör Derecesi	Lenfosit	PD-1
Mitotik indeks	Pearson correlation	0,500					
	Sig. (2-tailed)	0,117					
Nekroz	Pearson correlation	0,301	0,055				
	Sig. (2-tailed)	0,368	0,871				
Tümör Derecesi	Pearson correlation	0,629	0,788	0,524			
	Sig. (2-tailed)	0,038*	0,004**	0,098			
Lenfosit	Pearson correlation	0,022	-0,151	-0,211	-0,082		
	Sig. (2-tailed)	0,949	0,657	0,533	0,811		
PD-1	Pearson correlation	0,650	0,322	0,067	0,311	0,058	
	Sig. (2-tailed)	0,030*	0,334	0,845	0,352	0,864	
PD-L1	Pearson correlation	0,747	0,515	0,192	0,585	0,052	0,677
	Sig. (2-tailed)	0,008*	0,105	0,572	0,059	0,878	0,022*

*Correlation significant at the 0.05 level (2-tailed), **correlation significant at the 0.01 level (2-tailed)

5. TARTIŞMA

KEYS'ler mezenşimal orijinli, lokal invaziv ve metastatik özellikler gösteren bir tümör grubudur (Hendrick ve Brooks, 1994; Hendrick ve ark., 1994; Lester ve ark., 1996). KEYS'lere en çok fibrosarkom tanısı konulmakla birlikte, malignant fibröz histiyositom, rabdomyosarkom, mikzosarkom, liposarkom, sinir kılıf tümörü, indifferensiye sarkoma, osteosarkoma ve kondrosarkoma tanıları da rapor edilmiştir (Esplin ve ark., 1993; Hendrick ve Brooks, 1994; Hershey ve ark., 2000; Dillon ve ark., 2005). Çalışmamızda KEYS'lere fibrosarkom, indifferensiye sarkom, liposarkom ve rabdomyosarkom tanıları konulmuştur. Bu tanıları koyarken tümörlerin histopatolojik ve immunohistokimyasal boyanma özelliklerinden yararlanılmıştır. Yumuşak doku sarkomlarının ayırıcı tanısında immunohistokimyasal boyama paneli sıklıkla gerekli olmaktadır (Dobromylskyj, 2022). Bu amaçla ve aynı zamanda KEYS'lerin immun karakterizasyonunu ortaya koymak amacıyla çalışmamızda vimentin, SMA, S100 ve sarkomerik aktin belirteçleri ile boyamalar gerçekleştirilmiştir.

Vimentin mezenkimal kökenli tümörlerde eksprese olan bir belirteçtir (Gaitero ve ark., 2008) ve çalışmamızda tüm KEYS'lerin vimentin pozitif olduğu görülmüştür. S100 de tüm olgularda pozitif olduğu gözlenmiştir. Carnerio ve arkadaşlarının (2019) 21 KEYS olgusunda yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada da S100'ün olguların 20'sinde (%95,2) pozitif olduğu görülmüştür. S100'ün periferik sinir sistemi, melanositler, kondrositler ve adipositler tarafından eksprese edildiği bilinmekle birlikte (Gonçalves ve ark., 2010) bağ doku tümörleri ile perivasküler duvar tümörlerinde de pozitif olduğuna dair raporlar mevcuttur (Hendrick ve ark., 1998; Chijiwa ve ark., 2004; Ipek ve ark., 2021). Çalışmamızda yer alan tümörlerde sinir kökenini gösteren Antoni A tipi görünümlere rastlanmamıştır. KEYS'lerde S100 pozitifliğinin bildirilmesi de göz önüne alındığında, yalnızca S100 boyanmalarının sinir kökenini doğrulama da yetersiz olduğu, daha ileri sinir belirteçleriyle boyamaların gerekliliği ortaya çıkmış, fakat daha ileri belirteçler ile maalesef henüz bir inceleme yapılamamıştır. Çalışmamızda rapor edilen diğer olgulardan birisi de rabdomyosarkomdur ve vimentin ile birlikte SMA, S100 ve sarkomerik aktin yönünden pozitiflik gözlenmiştir. Bu olguda histopatolojik özelliklerin yanında

sarkomerik aktin yönünden pozitiflik gözlenmesi teşhiste yardımcı olmuştur. Nitekim sarkomerik aktin iskelet kas hücreleri ve kardiyomiyositlerin I bandlarını işaretler ve rabdomyosarkomlarda pozitiflik bildirilmiştir (Skalli ve ark., 1988; Schürch ve ark., 1996; Kobayashi ve ark., 2004). S100 pozitifliği ise daha önceki bir çalışmamızda köpek rabdomyomunda da bildirilmiştir (Ipek ve ark., 2021). İnsanlarda 60 rabdomyosarkom üzerinde yapılan bir çalışmada da 7 olgunun S100 pozitifliği gösterdiği bildirilmiştir (Coindre ve ark., 1988).

SMA kan damarları duvarları ile leyomiyoma ve leyomiyosarkom gibi düz kas tümörlerinde pozitiflik sergiler (Rizeq ve ark., 1994; Brennan ve ark., 2000). KEYS’lerde SMA pozitifliğinin yoğun şekilde gözlendiği bildirilmekte ve bu pozitifliklerin tümörlerdeki myofibroblast farklılaşmasına işaret ettiği düşünülmektedir (Madewell ve ark., 2001). SMA pozitif myofibroblast benzeri hücrelerin KEYS’lerde hem tümör dokusunda veya tümör çevresinde bulunduğu ve tümör çevresinde yer alanların neoplastikten çok reaktif bir yanıt olabileceği ifade edilmiştir (Couto ve ark., 2002). Çalışmamızda SMA pozitif myofibroblast benzeri hücreler üç olguda tümöral dokuda, iki olguda ise tümör çevresi dokuda gözlenmiştir. Couto ve arkadaşlarının (2002) ifade ettiği gibi tümör çevresi şekillenen bu pozitifliğin reaktif olabileceği düşünülmüştür. Bununla beraber tümör içerisinde yoğun pozitifliklerin bulunduğu iki olguda histolojik olarak perivasküler duvar tümörü benzeri geyik boynuzu damar yapısı görünümünün bulunması, bu görünümünün myofibroblast farklılaşmasından ziyade, bu hücrelerin perivasküler duvar kökenli olabileceği olasılığını da akla getirmiştir. Fakat bu teoriyi desteklemek için daha fazla sayıda belirteç ile kökenin doğrulanmasına ihtiyaç vardır.

Chijiwa ve arkadaşları (2004), alfa-SMA’nın hemangioperisitomları periferik sinir kılıf tümörlerinden ayırt etmede faydalı olabileceğini belirtmişlerdir. Fakat tüm hemangioperisitomlarda SMA pozitifliği de gözlenmesi gereken bir durum değildir (Fujii ve ark., 2013). Perivasküler duvar tümör tanısında hem histopatolojik hem de immunohistokimyasal özelliklerin karakterizasyonu oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Avallone ve arkadaşları (2007) köpek perivasküler duvar tümörlerinde yaptıkları bir çalışmada girdap/helezon yapıları ile geyik boynuzu damar yapısının çoğu perivasküler duvar tümöründe tanıda oldukça yardımcı olabileceğini

belirtmişlerdir. Bu histolojik özelliklerin yanında detaylı immunohistokimyasal boyanma karakteristikleri de çalışmayla ortaya konulmuş ve insanlardakine benzer şekilde perivasküler duvar tümörlerinin detaylı alt tiplendirmesi için bir öneride bulunulmuştur. Çalışmamızda önerilen bu belirteçlerden yalnızca birkaçının kullanımı nedeniyle spesifik bir ayrıma gidilememiştir. Fakat dikkate değer şekilde SMA pozitifliğinin gözlemlendiği olgularda histolojik olarak geyik boynuzu damar paterni dikkati çekmektedir. Fakat KEYS'lerin pleomorfik yapılarından dolayı, şimdilik histolojik ve immun karakteristiklerine bakılmaksızın basitçe sarkom olarak ifade edilmeleri gerektiği ifade edilmektedir (Couto ve ark., 2002) ve daha sonraki çalışmalar da bu görüşü benimseyen bir yaklaşım sergilemektedir (Carneiro ve ark., 2019). Çalışmamızdaki belirteçlerin sınırlılığı ve KEYS'in histolojik pleomorfik özelliklerden dolayı bu görüş benimsenerek bu tümörlerde bir alt tiplendirmeye gidilmemiş ve SMA pozitiflikleri myofibroblast farklılaşması olarak düşünülmüştür.

KEYS'lerin yaygın olarak tümör içi neoplastik dev hücreleri içerebileceği bildirilmektedir (Doddy ve ark., 1996; Couto ve ark., 2002). Bu dev hücrelerinin insanlarda yumuşak doku sarkomlarında olduğu gibi (Rosai, 1990; Jösten ve Rudolph, 1997) zayıf bir prognozu işaret edebileceği bildirilmektedir (Couto ve ark., 2002). Çalışmamızda olguların dört tanesinde tümör içi dev hücreleri dikkati çekmiştir. Bir fibrosarkom olgusunda ise dev hücrelerinin çok fazla çekirdek içerdiği ve sayıca da çok yoğun oldukları görülmüştür. Bu tümörde derece 3 olarak belirlenmiştir. Çok çekirdekli dev hücreleri içermesi ile başlangıçta bu tümörün malignant fibröz histiyositoma olabileceği düşünülmüştür. Nitekim kedilerde bu tür dev hücrelerinin gözlemlendiği enjeksiyon ile ilişkili (Doddy ve ark., 1996) veya ilişkili olmayan tümörler (Ozyigit ve ark., 2010) bazı araştırmacılar tarafından malignant fibröz histiyositoma olarak sınıflandırılmıştır. Doddy ve arkadaşları (1996) malignant fibröz histiyositoma tanısında histiyosit benzeri hücrelerin varlığıyla ilişkilendirmişlerdir fakat Madewell ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada fibrosarkom tanılı KEYS'lerde ultrastrüktürel olarak yüksek oranda (14/20) histiyosit benzeri hücre özellikleri bildirmiştir. Bunun yanında bazı araştırmacılar KEYS'lerde gözlenen bu dev hücrelerini tümör derecesiyle ilişkilendirmiş ve bu tümörleri yüksek dereceli fibrosarkom olarak teşhis etmişlerdir (Hendrick ve Brooks, 1994; Couto ve ark., 2002).

Çalışmamızda belirgin çok sayıda dev hücre varlığı ile karakterize edilen olguda gözlenen dev hücrelerinin yalnızca belirli bölgelerde yoğunlaşması ve tümör genelinin fibrosarkom görünümü sergilemesi nedeniyle, tümöre yüksek dereceli fibrosarkom tanısı konulmuştur. Bununla beraber KEYS'lerde, dev hücrelerini içeren yüksek dereceli fibrosarkomlar ile malignant fibröz histiyositomun daha ileri immunohistokimyasal paneller kullanılarak ayırıcı tanılarının aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

KEYS'lerin önemli histolojik özelliklerinden birisi de tümör çevresinde ve içerisinde gözlenen yoğun lenfosit ve makrofaj infiltrasyonları ile bazen karşılaşılan makrofajlar içerisindeki mavi-gri renkli materyallerdir (Hendrick ve Brooks, 1994; Madewell ve ark., 2001; Couto ve ark., 2002; Carneiro ve ark., 2019). Çalışmamızda lenfosit infiltrasyonları tüm olgularda ve genellikle periferik olarak gözlenmiştir. Bu hücrelerin daha çok tümör çevresinde görülmelerinin, tümör çevresindeki yoğun myofibroblastlardan kaynaklanabileceği ve lenfositlerin tümör dokusuna girişinin bu şekilde engellenebileceği ifade edilmiştir (Couto ve ark., 2002). Çalışmamızda SMA negatif bazı olgularda lenfositlerin tümör içerisine yayılma eğilimi gösterdiği fakat SMA pozitif myofibroblast benzeri hücrelerin artışı ile karakterize tümörlerin hepsinde lenfositlerin yalnızca periferik dokuda ve SMA pozitif mezenkimal doku içerisine hapsedilmiş şekilde bulundukları dikkati çekmiştir. Bu yönüyle bulgularımız, artan SMA pozitifliği ile lenfosit infiltrasyonlarının engellenmesi arasında bir ilişkinin olabileceği teorisini desteklemektedir. KEYS'lerde mavi-gri sitoplazmalı makrofajlar diğer gözlenebilecek bir özelliktir ve bu görünümün makrofajlar içerisindeki yabancı materyal (olasılıkla adjuvant) olduğu düşünülmektedir (Hendrick ve Brooks, 1994; Madewell ve ark., 2001; Couto ve ark., 2002). Fakat bu materyallere tüm olgularda rastlanılmamaktadır ve Couto ve arkadaşlarının (2002) çalışmasında 44 KEYS'ten 10 tanesinde rastlanılmıştır. Çalışmamızda da yalnızca bir fibrosarkom olgusunda belirgin şekilde bu tür makrofaj infiltrasyonları dikkati çekmiştir.

PD-1 başlıca lenfositlerde eksprese olan fakat aynı zamanda NK hücreleri, monositler ve myeloid kökenli dendritik hücrelerde de ekspresyonu uyarılabilen bir immün kontrol noktası proteindir (Sharpe ve Pauken, 2018). PD-L1 ise tümör hücreleri, aktive olmuş immün hücreler ve tümör ilişkili makrofajlar gibi antijen sunan

hücrelerde eksprese edilen PD-1 ligantıdır (Mittendorf ve ark., 2014; Nascimento ve ark., 2020a). Çalışmamızda PD-1'in çoğunlukla tümör infiltrate eden lenfoid foliküllerde eksprese olduğu gözlenmiştir. Fakat bunun yanında bazı tümörlerde periferik yerleşimli makrofaj benzeri hücrelerde de pozitiflik dikkati çekmiştir. PD-L1'in de çoğunlukla tümör dokusunda ve makrofaj benzeri hücrelerde pozitifliği gözlenmekle birlikte, düşük oranda lenfoid foliküllerde de pozitifliğine rastlanmıştır. Bu pozitifliklerin aktive olmuş B hücreleri veya NK hücreleri olabileceği düşünülmüştür. Yine de bu hücrelerinin kökeninin çift immün boyamalar ile doğrulanmasına ihtiyaç vardır.

İnsanlarda kemik ve yumuşak doku sarkomlarında PD-1 ve PD-L1 ekspresyonlarının varlığı gösterilmiştir (Torabi ve ark., 2017). Veteriner hekimliğinde de, kedilerde meme karsinomlarında serum PD-1/PD-L1 düzeylerinin HER2 pozitif ve üçlü negatif (östrojen reseptör, progesteron reseptör ve HER2) tiplerinde artış gösterdiği ve bu hayvanlarda sistemik bir immunsupresyonun bulunduğu gösterilmiş ve bundan yola çıkılarak anti PD-L1 antikorları kullanılarak uygulanabilecek bir immunoterapinin bu alt tip kedi meme karsinomlarında etkili olabileceği görüşü öne sürülmüştür (Nascimento ve ark., 2020b). Nitekim T hücrelerindeki PD-1 reseptörüne bağlanarak PD-L1 blokasyonu sağlayan bir monoklonal antikor olan atezolizumab FDA tarafından PD-1/PD-L1'in eksprese edildiği bazı tümörlerde kullanım onayı almıştır (Mavratzas ve ark., 2019; Akinboro ve ark., 2022). Çalışmamızda indifferansiye sarkom dışında tüm tümörlerde PD-1 pozitifliği gözlemlendi. Pozitifliklerin şiddeti ve boyanan hücre yüzdeleri birlikte değerlendirildiğinde nihai skorun dört fibrosarkom ve mikzosarkom da 1, iki fibrosarkom olgusunda 2, diğer bir fibrosarkom, liposarkom ve rabdomyosarkom olgusunda ise 3 olduğu belirlendi. PD-L1'in ise bir fibrosarkom, indifferansiye sarkom ve mikzosarkom olgusu dışında tüm tümörlerde pozitifliğinin bulunduğu, nihai skorun ise iki fibrosarkom ve liposarkom olgusunda 1, üç fibrosarkom olgusu ile rabdomyosarkom olgusunda 2 olduğu görüldü. Sonuç olarak PD-1'in tümörlerin % 90,9'unda, PD-L1'in ise % 72,7'sinde değişen derecelerde pozitiflik sergilediği görüldü. Bu bilgiler ışığında PD-1/PD-L1 yolağının KEYS immunoterapisinde yeni bir hedef olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma ile elde edilen bilgiler ışığında bu tümörlere yönelik mevcut tedavilere ek olarak PD-1/PD-L1

yolağının baskılanması stratejilerine dayanan tedavi seçenekleri de düşünülebilir. Bununla beraber tümörlerin genelinde PD-1 ve PD-L1'in orta ve yüksek düzeyde ekspresyonunun yalnızca düşük bir oranda bulunduğu görülmüştür (sırasıyla % 45,5 ve % 36,4). Bu nedenle daha çok sayıda KEYS olgusu ile bu immün kontrol noktalarının varlığına yönelik daha ileri çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Tıpta çoğu malignitelerde, tümör hücrelerinin PD-L1 ekspresyonunun zayıf prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Nomi ve ark., 2007; Mcdermott ve Atkins, 2013). Kedilerde PD-1 ve ligandı ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Kedi meme kanserinde artan PD-1 ve PD-L1 düzeylerinin zayıf prognozla ilişkili olduğu ve bu yönüyle insan Her2 pozitif metastatik meme kanseri dahil çeşitli kanser türlerinde korunmuş bir role sahip olabileceği bildirilmiştir (Nascimento ve ark., 2020a). Çalışmamızda PD-1 ve PD-L1'in birbirleriyle pozitif korelasyon gösterdiği belirlendi ($p < 0,05$). Tümör infiltrate eden lenfositlerin ise ne PD-1 ne de PD-L1 ile arasında bir ilişki belirlenemedi. Tümör derecesinin ise PD-1 ile düşük, PD-L1 ile ise orta dereceli bir pozitif korelasyonunun bulunduğu görüldü fakat bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). Bununla beraber azalan tümör farklılaşması ile PD-1'in orta dereceli ($p < 0,05$), PD-L1'in ise yüksek dereceli ($p < 0,01$) bir pozitif korelasyona sahip olduğu dikkati çekti. Bu bilgiler ışığında PD-1 ve PD-L1'in artan ekspresyonunun KEYS'lerde zayıf tümör farklılaşması ve dolayısıyla kötü prognozla ilişkili olabileceği sonucuna varıldı. Yine de daha yüksek oranda tümör dokusu ve sağ kalım oranlarının birlikte değerlendirileceği ileri çalışmalarla KEYS'lerde PD-1 ve PD-L1 ekspresyonlarının prognostik öneminin aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

PD-1/PD-L1 eksprese eden tümörlerde, bu immun checkpoint'lerin baskılanması temeline dayanan tedavilerin uygulanması mümkün olabilmektedir. KEYS'lerde güncel olarak etkili bir tedavi yöntemi henüz bulunmamaktadır ve daha önce bu tümörlerde PD-1 ve PD-L1'in araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız sonucunda PD-1 ve PD-L1'in artan ekspresyonunun KEYS'lerde zayıf tümör farklılaşması ve dolayısıyla kötü prognozla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışma, KEYS'lerde PD-1/PD-L1 inhibisyonuna dayalı yapılabilecek çalışmalara öncülük etme potansiyelindedir. Böylece, ileride daha çok sayıda olgu içeren ve bu yolağın baskılanmasına yönelik tedavi stratejilerinin etkinliğinin araştırılacağı çalışmaların yapılması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Akinboro O, Larkins E, Pai-Scherf LH, ve ark. (2022).** FDA Approval Summary: Pembrolizumab, Atezolizumab, and Cemiplimab-rwlc as Single Agents for First-Line Treatment of Advanced/Metastatic PD-L1–High NSCLC. *Clin Cancer Res.*, **28**:2221–2228.
- Avallone G, Helmbold P, Caniatti M, Stefanello D, Nayak RC, Roccabianca P (2007).** The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization. *Vet Pathol.*, **44**:607–620.
- Banerji N, Kanjilal S (2006).** Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *Am J Vet Res.*, **67**:1766–1772.
- Banerji N, Kapur V, Kanjilal S (2007).** Association of germ-line polymorphisms in the feline p53 gene with genetic predisposition to vaccine-associated feline sarcoma. *J Hered.*, **98**:421–427.
- Baptista MZ, Sarian LO, Derchain SFM, Pinto GA, Vassallo J (2016).** Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol.*, **47**:78–84.
- Brennan PA, Umar T, Zaki GA, ve ark. (2000).** Are myoepithelial cells responsible for the widespread expression of inducible nitric oxide synthase in pleomorphic adenoma? An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.*, **29**:279–283.
- Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, ve ark. (1987).** A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature.*, **328**:267–270.
- Buracco P, Martano M, Morello E, Ratto A (2002).** Vaccine-associated-like fibrosarcoma at the site of a deep nonabsorbable suture in a cat. *Vet J.*, **163**:105–107.
- Burton G, Mason K V. (1997).** Do postvaccinal sarcomas occur in Australian cats? *Aust Vet J.*, **75**:102–106.
- Carminato A, Vascellari M, Marchioro W, Melchioti E, Mutinelli F (2011).** Microchip-associated fibrosarcoma in a cat. *Vet Dermatol.*, **22**:565–569.
- Carneiro CS, de Queiroz GF, Pinto ACBCF, Dagli MLZ, Matera JM (2019).** Feline injection site sarcoma: immunohistochemical characteristics. *J Feline Med Surg.*, **21**:314–321.
- Chijiwa K, Uchida K, Tateyama S (2004).** Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. *Vet Pathol.*, **41**:307–318.
- Cohen M, Wright JC, Brawner WR, Smith AN, Henderson R, Behrend EN (2001).** Use of surgery and electron beam irradiation, with or without chemotherapy, for treatment of vaccine-associated sarcomas in cats: 78 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc.*, **219**:1582–1589.
- Coindre J -M, De Mascarel A, Trojani M, De Mascarel I, Pages A (1988).** Immunohistochemical study of rhabdomyosarcoma. Unexpected staining with S100 protein and cytokeratin. *J Pathol.*, **155**:127–132.
- Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, Madewell BR (2002).** Feline Vaccine-associated Fibrosarcoma: Morphologic Distinctions. *Vet Pathol.*, **39**:33–41.
- Couto C, Macy D (1998).** Review of treatment options for vaccine-associated feline sarcoma. *J Am Vet Med Assoc.*, **213**:1426–1427.
- Coyne M, Reeves N, Rosen D (1997).** Estimated prevalence of injection-site sarcomas in cats during 1992. *J Am Vet Med Assoc.*, **210**:249–251.
- Cronin K, Page RL, Spodnick G, ve ark. (1998).** Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. *Vet Radiol Ultrasound.*, **39**:51–56.

Daly MK, Saba CF, Crochik SS, ve ark. (2008). Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat. *J Feline Med Surg.*, **10**:202–205.

Davidson EB, Gregory CR, Kass PH (1997). Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg.*, **26**:265–269.

Dillon CJ, Mauldin GN, Baer KE (2005). Outcome following surgical removal of nonvisceral soft tissue sarcomas in cats: 42 cases (1992–2000). *J Am Vet Med Assoc.*, **227**:1955–1957.

Dobromylskyj M (2022). Feline Soft Tissue Sarcomas: A Review of the Classification and Histological Grading, with Comparison to Human and Canine. *Anim* 2022, Vol 12, Page 2736 **12**:2736.

Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janovitz EB (1996). Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J Comp Pathol.*, **114**:165–174.

Dubielzig RR, Everitt J, Shadduck JA, Albert DM (1990). Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Vet Pathol.*, **27**:62–65.

Dubielzig RR, Hawkins KL, Miller PE (1993). Myofibroblastic sarcoma originating at the site of rabies vaccination in a cat. *J Vet Diagn Invest.*, **5**:637–638.

Eckstein C, Guscetti F, Roos M, Martín de Las Mulas J, Kaser-Hotz B, Rohrer Bley C (2009). A retrospective analysis of radiation therapy for the treatment of feline vaccine-associated sarcoma. *Vet Comp Oncol.*, **7**:54–68.

Eggers Carroll E, Dubielzig RR, Schultz RD (2002). Cats differ from mink and ferrets in their response to commercial vaccines: a histologic comparison of early vaccine reactions. *Vet Pathol.*, **39**:216–227.

Ellis JA, Jackson ML, Bartsch RC, ve ark. (1996). Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. *J Am Vet Med Assoc.*, **209**:767–771.

Esplin D, Bigelow M, McGill L, Wilson S (1999). Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat. *Vet Cancer Soc Newsl.*, **23**:8–9.

Esplin D, McGill L, Meininger A, Wilson S (1993). Postvaccination sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc.*, **202**:1245–1247.

Farese J, Withrow S (2013). Surgical oncology. In: *Small Animal Clinical Oncology*. 5th Ed. Withrow S, Vail D, Page R (editors). St. Louis: Elsevier; pp.149–150

Fujii Y, Tsuchiya T, Morita R, ve ark. (2013). Tumour endothelial marker-1 is expressed in canine Haemangiopericytomas. *J Comp Pathol.*, **149**:172–181.

Gaitero L, Añor S, Fondevila D, Pumarola M (2008). Canine cutaneous spindle cell tumours with features of peripheral nerve sheath tumours: a histopathological and immunohistochemical study. *J Comp Pathol.*, **139**:16–23.

Gatalica Z, Snyder C, Maney T, ve ark. (2014). Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **23**:2965–2970.

Giudice C, Stefanello D, Sala M, ve ark. (2010). Feline injection-site sarcoma: recurrence, tumour grading and surgical margin status evaluated using the three-dimensional histological technique. *Vet J.*, **186**:84–88.

Gobar GM, Kass PH (2002). World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc.*, **220**:1477–1482.

- Gonçalves CA, Leite MC, Guerra MC (2010).** Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* **2010**.
- Hahn KA, Endicott MM, King GK, Harris-King FD (2007).** Evaluation of radiotherapy alone or in combination with doxorubicin chemotherapy for the treatment of cats with incompletely excised soft tissue sarcomas: 71 cases (1989-1999). *J Am Vet Med Assoc.*, **231**:742–745.
- Hartmann K, Day MJ, Thiry E, ve ark. (2015).** Feline injection-site sarcoma: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.*, **17**:606–613.
- Hauck M (2003).** Feline injection site sarcomas. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.*, **33**:553–571.
- Hendrick MJ (1998).** Historical review and current knowledge of risk factors involved in feline vaccine-associated sarcomas. *J Am Vet Med Assoc.*
- Hendrick MJ, Brooks JJ (1994).** Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol.*, **31**:126–129.
- Hendrick MJ, Dunagan CA (1991).** Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-1989). *J Am Vet Med Assoc.*, **198**:304–305.
- Hendrick MJ, Goldschmidt MH (1991).** Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J Am Vet Med Assoc.*, **199**:968–968.
- Hendrick M, Goldschmidt M, Shofer F, Wang Y, Somlyo A (1992).** Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res.*, **52**:5391–5394.
- Hendrick M, Mahaffey E, Moore F, Vos J, Walder E (1998).** Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals, Vol. 2. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology.
- Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, ve ark. (1994).** Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *J Am Vet Med Assoc.*, **205**:1425–1429.
- Hendricks CG, Levy JK, Tucker SJ, ve ark. (2014).** Tail vaccination in cats: a pilot study. *J Feline Med Surg.*, **16**:275–280.
- Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, Shofer FS, Vail DM (2000).** Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). *J Am Vet Med Assoc.*, **216**:58–61.
- Hinkle D, Wiersma W, Jurs S (2003).** Applied Statistics for the Behavioral Sciences. 5th Ed. Boston: Houghton Mifflin.
- Hirschberger J, Kessler M (2001).** Das feline Fibrosarkom. *Tierärztliche Prax* **29**:66–71.
- Ipek V, Cangul IT, Akkoc A (2021).** Comparative Evaluation of the Cytological, Histopathological and Immunohistochemical Findings of Canine Cutaneous and Subcutaneous Masses. *Acta Vet Beogr.*, **71**:61–84.
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T (1992).** Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.*, **11**:3887–3895.
- Jas D, Soyer C, De Fornel-Thibaud P, ve ark. (2015).** Adjuvant immunotherapy of feline injection-site sarcomas with the recombinant canarypox virus expressing feline interleukine-2 evaluated in a controlled monocentric clinical trial when used in association with surgery and brachytherapy. *Trials Vaccinol.*, **4**:1–8.

Jourdier TM, Moste C, Bonnet MC, Delisle F, Tafani JP, Devauchelle P, Tartaglia J, Moingeon P (2003). Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene Ther.*, **10**: 2126-2132.

Jösten M, Rudolph R (1997). Methods for the differentiation of giant cells in canine and feline neoplasias in paraffin sections. *Zentralbl Veterinarmed A.*, **44**:159–166.

Kalat M, Mayr B, Schleger W, Wagner B, Reifinger M (1991). Chromosomal hyperdiploidy in a feline sarcoma. *Res Vet Sci.*, **51**:227–228.

Kamarlis RK, Lubis MND, Hernowo BS, Kar AS (2018). Immunoexpression of P63 and SOX2 in triple-negative breast cancers, Indonesia. *F1000Research* 6.

Kass P, Barnes W, Spangler W, Chomel B, Culbertson M (1993). Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc.*

Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML (2000). Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res.*, **61**:1037–1041.

Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML (2001c). Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res.*, **62**:1990–1994.

Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, ve ark. (2001a). Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res.*, **62**:833–839.

Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham ML, Jackson ML (2001b). Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen. *Am J Vet Res.*, **62**:828–832.

Kidney BA, Haines DM, Ellis JA, Burnham ML, Jackson ML (2002). Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from feline vaccine site-associated sarcomas for feline foamy virus DNA. *Am J Vet Res.*, **63**:60–63.

Kim A, Lee SJ, Kim YK, ve ark. (2017). Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in tumour cell and tumour infiltrating lymphocytes of HER2-positive breast cancer and its prognostic value. *Sci Reports* 2017 71 **7**:1–10.

Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, ve ark. (2002). Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Vet Radiol Ultrasound.*, **43**:473–479.

Kobayashi M, Sakai H, Hirata A, ve ark. (2004). Expression of myogenic regulating factors, Myogenin and MyoD, in two canine botryoid rhabdomyosarcomas. *Vet Pathol.*, **41**:275–277.

Kuntz CA, Dernel WS, Powers BE, Devitt C, Straw RC, Withrow SJ (1997). Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986-1996). *J Am Vet Med Assoc.*, **211**:1147–1151.

Lester S, Clemett T, Burt A (1996). Vaccine site-associated sarcomas in cats: clinical experience and a laboratory review (1982-1993). *J Am Anim Hosp Assoc.*, **32**:91–95.

Madewell BR, Griffey SM, McEntee MC, Leppert VJ, Munn RJ (2001). Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). *Vet Pathol.*, **38**:196–202.

De Man MMG, Ducatelle R V. (2007). Bilateral subcutaneous fibrosarcomas in a cat following feline parvo-, herpes- and calicivirus vaccination. *J Feline Med Surg.*, **9**:432–434.

Martano M, Morello E, Buracco P (2011). Feline injection-site sarcoma: Past, present and future perspectives. *Vet J.*, **188**:136–141.

Martano M, Morello E, Iussich S, Buracco P (2012). A case of feline injection-site sarcoma at the site of cisplatin injections. *J Feline Med Surg.*, **14**:751–754.

Martano M, Morello E, Ughetto M, ve ark. (2005). Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *Vet J.*, **170**:84–90.

Mavratzas A, Seitz J, Smetanay K, Schneeweiss A, Jäger D, Fremd C (2019). Atezolizumab for use in PD-L1-positive unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0468> **16**:4439–4453.

Mayr B, Bockstahler B, Loupal G, Reifinger M, Schleger W (1996). Cytogenetic variation between four cases of feline fibrosarcoma. *Res Vet Sci.*, **61**:268–270.

Mayr B, Eschborn U, Kalat M (1991). Near triploidy in a feline fibrosarcoma. *Zentralbl Veterinarmed A.*, **38**:617–620.

Mayr B, Reifinger M, Alton K, Schaffner G (1998). Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. *Vet Res Commun.*, **22**:249–255.

Mayr B, Schaffner G, Kurzbauer R, Schneider A, Reifinger M, Loupal G (1995). Mutations in tumour suppressor gene p53 in two feline fibrosarcomas. *Br Vet J.*, **151**:707–713.

Mcdermott DF, Atkins MB (2013). PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Med.*, **2**:662.

McEntee MC, Page RL (2001). Feline Vaccine-Associated Sarcomas. *J Vet Intern Med.*, **15**:176–182.

Mino-Kenudson M (2016). Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression by immunohistochemistry: could it be predictive and/or prognostic in non-small cell lung cancer? *Cancer Biol Med.*, **13**:157–170.

Mittendorf EA, Philips A V., Meric-Bernstam F, ve ark. (2014). PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res.*, **2**:361–370.

Morrison W, Starr R (2001). Vaccine-associated feline sarcomas. *J Am Vet Med Assoc.*, **218**:697–702.

Mucha D, Laberke S, Meyer S, Hirschberger J (2014). Lack of association between p53 SNP and FISS in a cat population from Germany. *Vet Comp Oncol.*, **12**:130–137.

Mulaka M (2012). A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.*, **24**:69–71.

Munday JS, Banyay K, Aberdein D, French AF (2011). Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated cat. *J Feline Med Surg.*, **13**:988–991.

Munday JS, Stedman NL, Richey LJ (2003). Histology and immunohistochemistry of seven ferret vaccination-site fibrosarcomas. *Vet Pathol.*, **40**:288–293.

Nambiar PR, Haines DM, Ellis JA, Kidney BA, Jackson ML (2000). Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am J Vet Res.*, **61**:1277–1281.

Nambiar PR, Jackson ML, Ellis JA, Chelack BJ, Kidney BA, Haines DM (2001). Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas. *Vet Pathol.*, **38**:236–238.

Nascimento C, Urbano AC, Gameiro A, Correia J, Ferreira F (2020a). Serum PD-1/PD-L1 Levels, Tumor Expression and PD-L1 Somatic Mutations in HER2-Positive

and Triple Negative Normal-Like Feline Mammary Carcinoma Subtypes. *Cancers (Basel)*, **12**:1–16.

Nascimento C, Urbano AC, Gameiro A, Ferreira J, Correia J, Ferreira F (2020b). PD-1 and PD-L1 are diagnostic biomarkers and PD-L1 a promising therapeutic target in HER2-positive and triple negative normal-like feline mammary carcinoma subtypes. *bioRxiv* **12**:1386.

Nieto A, Sánchez MA, Martínez E, Rollán E (2003). Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor-alpha in feline vaccine-associated sarcomas. *Vet Pathol.*, **40**:651–658.

Nomi T, Sho M, Akahori T, ve ark. (2007). Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.*, **13**:2151–2157.

Oiseth SJ, Aziz MS (2017). Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat.*, **3**:250–261.

Ozyigit MÖ, Nak D, Yilmaz R, Nak Y, Simsek G (2010). Malignant fibrous histiocytoma (giant cell type) of soft parts in the abdominal mammary region of a female Ankara (Angora) cat. *Turkish J Vet Anim Sci.*, **34**:471–475.

Phelps HA, Kuntz CA, Milner RJ, Powers BE, Bacon NJ (2011). Radical excision with five-centimeter margins for treatment of feline injection-site sarcomas: 91 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc.*, **239**:97–106.

Rassnick KM, Moore AS, Northrup NC, ve ark. (2006). Phase I trial and pharmacokinetic analysis of ifosfamide in cats with sarcomas. *Am J Vet Res.*, **67**:510–516.

Rizeq MN, Van De Rijn M, Hendrickson MR, Rouse R V. (1994). A comparative immunohistochemical study of uterine smooth muscle neoplasms with emphasis on the epithelioid variant. *Hum Pathol.*, **25**:671–677.

Romanelli G, Marconato L, Olivero D, Massari F, Zini E (2008). Analysis of prognostic factors associated with injection-site sarcomas in cats: 57 cases (2001-2007). *J Am Vet Med Assoc.*, **232**:1193–1199.

Rosai J (1990). Liver cell carcinoma with osteoclast-like giant cells: Nonepitheliogenic giant cells in diverse malignancies. *Hepatology.*, **12**:782–783.

Saba C (2017). Vaccine-associated feline sarcoma: current perspectives. *Vet Med Res Reports Volume.*, **8**:13–20.

Sandler I, Teeger M, Best S (1997). Metastatic vaccine associated fibrosarcoma in a 10-year-old cat. *Can Vet J.*, **38**:374.

Schultze A, Frank L, Hahn K (1997). Repeated physical and cytologic characterizations of subcutaneous postvaccinal reactions in cats. *Am J Vet Res.*, **58**:719–724.

Schürch W, Bégin LR, Seemayer TA, ve ark. (1996). Pleomorphic soft tissue myogenic sarcomas of adulthood. A reappraisal in the mid-1990s. *Am J Surg Pathol.*, **20**:131–147.

Séguin B (2002). Feline injection site sarcomas. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, **32**:983–995.

Sharpe AH, Pauken KE (2018). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol.*, **18**:153–167.

Shaw SC, Kent MS, Gordon IK, ve ark. (2009). Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1990-2006). *J Am Vet Med Assoc.*, **234**:376–380.

Skalli O, Gabbiani G, Babai F, Seemayer TA, Pizzolato G, Schurch W (1988). Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft tissue tumor differentiation and origin. II. Rhabdomyosarcomas. *Am J Pathol.*, **130**:515.

Slater DN, Underwood JCE, Durrant TE, Gray T, Hopper IP (1982). Aluminium hydroxide granulomas: light and electron microscopic studies and X-ray microanalysis. *Br J Dermatol.*, **107**:103–108.

Speil C, Rzepka R (2011). Vaccines and vaccine adjuvants as biological response modifiers. *Infect Dis Clin North Am.*, **25**:755–772.

Srivastav A, Kass PH, McGill LD, Farver TB, Kent MS (2012). Comparative vaccine-specific and other injectable-specific risks of injection-site sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc.*, **241**:595–602.

Starr R (1998). Vaccine-Associated Feline Sarcoma Task Force: a new model for problem solving in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc.*, **213**:1428–1429.

Suzman DL, Pelosof L, Rosenberg A, Avigan MI (2018). Hepatotoxicity of immune checkpoint inhibitors: An evolving picture of risk associated with a vital class of immunotherapy agents. *Liver Int.*, **38**:976–987.

Torabi A, Amaya CN, Wians FH, Bryan BA (2017). PD-1 and PD-L1 expression in bone and soft tissue sarcomas. *Pathology.*, **49**:506–513.

Tsushima F, Yao S, Shin T, et al. (2007). Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. *Blood.*, **110**:180–185.

Vascellari M, Melchiotti E, Bozza MA, Mutinelli F (2003). Fibrosarcomas at presumed sites of injection in dogs: characteristics and comparison with non-vaccination site fibrosarcomas and feline post-vaccinal fibrosarcomas. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.*, **50**:286–291.

Yao S, Zhu Y, Chen L (2013). Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat Rev Drug Discov.*, **12**:130–146.

Zabielska-Koczywas K, Wojtalewicz A, Lechowski R (2017). Current knowledge on feline injection-site sarcoma treatment. *Acta Vet Scand* **59**.

