



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

**KÖPEK HİSTİYOSİTİK TÜMÖRLERİNDE
ANGİOGENEZİS VE FOXP3+
LENFOSİT İNFİLTRASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Aynur ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK

BURDUR-2021

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

**KÖPEK HİSTİYOSİTİK TÜMÖRLERİNDE
ANGİOGENEZİS VE FOXP3+
LENFOSİT İNFİLTRASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Aynur ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0678-YL-20 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2021

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 ve Sayın Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a, özellikle tez çalışmamın uygulama aşamalarında yardımlarını, fikir ve tecrübelerini esirgemeyip çok büyük katkı sağlayan hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih BOZKURT'a, tez süresince yardımlarını fikirlerini esirgemeyerek her konuda destek olan çok değerli Sayın Öğr. Gör. Leyla Elif Özgü AYÖZGER'e, laboratuvarındaki bilgi birikimini her daim bizlerle paylaşan laboratuvar işlemlerini öğrenmemizde ve uygulamamızda çok katkısı olan Uzm. Biyolog Dilnur İLERİ'ye, eğitim öğretim hayatım boyunca ve geriye kalan tüm zamanlarda maddi manevi her koşulda yanımda olan aileme, tez çalışmam süresince desteğini fikir ve önerilerini esirgemeyen her zaman yanımda olan çok değerli Öğr. Gör. Muhammet Mükerrerem KAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Veteriner Hekim

Aynur ÇINAR

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.....	3
2.1. Histiyoitik Tümörlerin Köken Aldığı Hücreler	3
2.1.1. İnteristisyel Dendritik Hücreler.....	3
2.1.2. Langerhans Hücreleri.....	3
2.1.3. Makrofajlar	4
2.2. Kanin Histiyoitik Hastalıklar	5
2.2.1. Kutanöz Histiyoitoma.....	5
2.2.2. Kutanöz Langerhans Hücreli Histiyoitozis.....	6
2.2.3. Reaktif Histiyoitozis	6
2.2.3.1. Kutanöz Histiyoitozis	6
2.2.3.2. Sistemik Histiyoitozis	6
2.2.4. Histiyoitik Sarkoma/Malignant Histiyoitozis	7
2.2.4.1. Hemofagositik Histiyoitik Sarkom.....	8
2.2.4.2. Artiküler / Periariküler HS.....	9
2.2.4.3. Merkezi Sinir Sistemi Histiyoitik Sarkomu	10
2.2.4.4. Dendritik Hücre Lösemisi	10
2.3. FOXP3.....	11
2.4. Angiogenezis	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	13
3.1. İstatistiksel Analiz	15
4. BULGULAR	18
4.1. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Bulgular	18
4.2. İstatistiksel Bulgular	40
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİLLER

Şekil 3.1.	CD3 pozitif kontrol dokusu. Köpek dalağında çok sayıda CD3 pozitif T lenfositler, DAB, Bar=50µm.	16
Şekil 3.2.	E-kaderin pozitif kontrol dokusu. Tümörlü köpek derisinde epidermiste sitoplazmik sınırlarda yoğun E-kaderin pozitifliği, DAB, Bar=50µm.	17
Şekil 3.3.	VEGF pozitif kontrol dokusu. Tümöral doku içerisindeki damarlarda belirgin VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.	17
Şekil 4.1.	Lenfoma tanılı olduga dermiste yoğun neoplastik hücre infiltrasyonları, H&E, Bar=50µm.	19
Şekil 4.2.	Lenfoma tanılı olguda yoğun CD3 pozitif tümör hücreleri, DAB, Bar=100µm.	19
Şekil 4.3.	Lenfoma tanılı olguda dermiste yoğun neoplastik hücre infiltrasyonları, H&E, Bar=50µm.	20
Şekil 4.4.	Lenfoma tanılı olguda yoğun CD3 pozitif tümöral hücreler, DAB, Bar=100µm.	20
Şekil 4.5.	Kutanöz histiyositoma olgusunda tümör hücrelerinde yoğun sitoplazmik Iba-1 pozitifliği, AEC, Bar=50µm.	21
Şekil 4.6.	Kutanöz histiyositozis olgusunda tümör hücrelerinde yoğun sitoplazmik Iba-1 pozitifliği, AEC, Bar=50µm.	21
Şekil 4.7.	Histiyositik sarkoma olgusunda tümör hücrelerinin çok yoğun sitoplazmik Iba-1 pozitifliği, AEC, Bar=50µm.	22
Şekil 4.8.	Hemafagositik histiyositik sarkoma olgusunda çok yoğun sitoplazmik Iba-1 pozitif tümör hücreleri, AEC, Bar=50µm.	22
Şekil 4.9.	Kutanöz histiyositoma olgusunda tümör hücrelerinde orta derecede E-kaderin pozitifliği, DAB, Bar=20µm.	23
Şekil 4.10.	Histiyositik sarkoma olgusunda tümör hücrelerinde zayıf E-kaderin pozitifliği, DAB, Bar=20µm.	23
Şekil 4.11.	Kutanöz histiyositoma olgusunda epitelyotropizm gösteren ve dermiste yoğun olarak bulunan neoplastik hücreler, H&E, Bar=50µm.	24
Şekil 4.12.	Kutanöz histiyositom olgusunda dermiste ince fibrovasküler stroma ile çevrelenmiş neoplastik hücre kümeleri, H&E, Bar=50µm.	25
Şekil 4.13.	Kutanöz histiyositoziste dermiste çoğunlukla perivasküler yerleşim gösteren histiyositik proliferasyonları, H&E, Bar=50µm.	25
Şekil 4.14.	Kutanöz histiyositoziste ince fibrovasküler bağ dokuyla ayrılan histiyositik hücre proliferasyonları ve yoğun lenfosit infiltrasyonları, H&E, Bar=50µm.	26
Şekil 4.15.	Histiyositik sarkoma olgusunda belirgin anizokaryozis ve yoğun mitotik aktivite sergileyen atipik neoplastik hücre proliferasyonları, H&E, Bar=50µm.	26
Şekil 4.16.	Histiyositik sarkoma olgusunda belirgin anizokaryozis ve mitotik aktivite ile yer yer dev hücre oluşumları gösteren neoplastik hücre proliferasyonları, H&E, Bar=50µm.	27

Şekil 4.17.	Histiyoitik sarkoma olgusunda çok yoğun CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	28
Şekil 4.18.	Histiyoitik sarkoma olgusunda yoğun CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	28
Şekil 4.19.	Kutanöz histiyositom olgusunda hafif dereceli CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	29
Şekil 4.20.	Kutanöz histiyositom olgusunda orta dereceli CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=20µm.	29
Şekil 4.21.	Kutanöz histiyositom olgusunda çok yoğun CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	30
Şekil 4.22.	Kutanöz histiyositozis olgusunda çok yoğun CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	30
Şekil 4.23.	Hemafagositik histiyositik sarkoma olgusunda çok yoğun FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	31
Şekil 4.24.	Histiyoitik sarkoma olgusunda orta dereceli FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	31
Şekil 4.25.	Histiyoitik sarkoma olgusunda hafif FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	32
Şekil 4.26.	Kutanöz histiyositoma olgusunda yoğun FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	32
Şekil 4.27.	Kutanöz histiyositom olgusunda orta dereceli FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	33
Şekil 4.28.	Kutanöz histiyositom olgusunda hafif dereceli FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	33
Şekil 4.29.	Kutanöz histiyositozis olgusunda orta dereceli FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	34
Şekil 4.30.	Kutanöz histiyositozis olgusunda hafif dereceli FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.	34
Şekil 4.31.	Histiyoitik sarkoma olgusunda çok yoğun VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.	35
Şekil 4.32.	Histiyoitik sarkoma olgusunda yoğun VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.	35
Şekil 4.33.	Hemofagositik histiyositik sarkoma olgusunda hafif dereceli VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.	36
Şekil 4.34.	Kutanöz histiyositoma olgusunda çok yoğun VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.	36
Şekil 4.35.	Kutanöz histiyositoma olgusunda orta dereceli VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.	37
Şekil 4.36.	Kutanöz histiyositom olgusunda hafif dereceli VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.	37
Şekil 4.37.	Kutanöz histiyositozis olgusunda orta dereceli VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.	38

TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Çalışmada kullanılan antikorlara ait bilgiler.	16
Tablo 4.1.	Çalışmada kullanılan histiyositik tümörlü köpeklere ait bilgiler ve immunohistokimyasal boyama sonuçları.	39
Tablo 4.2.	CD3, FOXP3 ve VEGF skorlarına ait istatistiksel veriler.	40
Tablo 4.3.	CD3, FOXP3 ve VEGF skorlarının Pearson korelasyon testi karşılaştırmaları.	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

AEC	Aminoethyl carbazole
APC	Antijen Sunan Hücreler
BG	Birbeck granülleri
CCH	Köpek kutanöz histiyositoma
CH	Kutanöz histiyositozis
CRD	Karbonhidrat tanıma alanı
DAB	Diaminobenzidine
DC	Dendritik hücre
FLT3	FMS benzeri tirozin kinaz
FOXP3	Forkhead box P3
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
H&E	Hematoksilen & Eozin
HS	Histiyositik sarkoma
IBA1	İyonize kalsiyum bağlanma bağdaştırıcı molekülü 1
IL	İnterlökin
LC	Langerhans hücresi
LCH	Langerhans hücreli histiyositoz
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MH	Malign histiyositozis
MHC	Ana histouyumluluk kompleksi
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
PBS	Phosphate buffered saline
SH	Sistemik histiyositozis
TGF	Doku büyüme faktörü
TGF-β1	Transforme büyüme faktörü beta 1
TNF-α	Tümör nekroz fakültesi alfa
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ÖZET

Köpek Histiyositik Tümörlerinde Angiogenezis ve FOXP3+ Lenfosit İnfiltrasyonlarının Araştırılması

Köpeklerdeki histiyositik proliferatif bozukluklar kutanöz histiyositoz ve sistemik histiyositoz gibi reaktif hastalıkları ve kutanöz histiyositoma, histiyositik sarkoma ve dissemine histiyositik sarkoma (malignant histiyositoz) gibi neoplastik bozuklukları içerir. Çalışmamızda köpeklerdeki çeşitli histiyositik hastalıklarda FoxP3 pozitif T lenfositleri ile birlikte VEGF boyanma yoğunluğunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında 23 adet histiyositik tümör tanılı olgu değerlendirildi. Ayırıcı tanı amacıyla Iba-1, E-kaderin ve CD3 antikorları ile boyamalar yapıldı. Bunun sonucunda 2 olguda CD3 yoğun pozitifliğinden dolayı lenfoma tanısı konuldu. Histiyositik tümör tanısı ise Iba-1 yoğun pozitifliği gözlenen 12 olguda doğrulandı. Diğer 9 olguda ise Iba-1 pozitif histiyositik hücrelerin tümör dokusunda infiltrate şekilde bulunduğu görüldü. Iba-1 pozitif 12 olgunun histopatolojik incelemeleri sonucunda 4 olgu kutanöz histiyositoma, 3 olgu kutanöz histiyositozis ve 5 olgu histiyositik sarkoma (1 tanesi hemofagositik histiyositik sarkoma) olarak teşhis edildi. E-kaderin pozitifliğinin ise yalnızca bir kutanöz histiyositoma ve bir histiyositik sarkoma olgusunda bulunduğu görüldü. Iba-1 pozitif 12 olguda CD3 ve FoxP3 pozitif T lenfositler sayılarak skorlandı. Ayrıca VEGF boyamalarında değişen derecelerde pozitiflikler görüldü. İstatistiksel analizler sonucunda grup karşılaştırmasında yalnızca CD3 pozitif skor açısından histiyositik sarkoma ve kutanöz histiyositozis olgularında kutanöz histiyositoma olgularına göre anlamlı bir artış dikkati çekti. CD3, FoxP3 ve VEGF skorlamalarının korelasyon sonuçlarına göre ise yalnızca FoxP3 ve VEGF arasında orta dereceli negatif bir korelasyon gözlemlendi. Çalışma sonuçlarına göre köpek histiyositik tümörlerinde FoxP3 pozitif Treg'lerin sayıca artışının tümör gelişimini VEGF aracılı angiogenezi azaltmak suretiyle baskılayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Angiogenezis, FoxP3, Histiyositik tümör, Köpek.

ABSTRACT

Investigation of Angiogenesis and FOXP3+ Lymphocyte Infiltrations in Canine Histiocytic Tumors

Histiocytic proliferative disorders in dogs include reactive diseases such as cutaneous histiocytosis and systemic histiocytosis, and neoplastic disorders such as cutaneous histiocytoma, histiocytic sarcoma, and disseminated histiocytic sarcoma (malignant histiocytosis). In our study, it was aimed to evaluate the intensity of VEGF staining with FoxP3 positive T lymphocytes in various histiocytic diseases in dogs. Within the scope of the study, 23 cases diagnosed with histiocytic tumors were evaluated. Immunostaining with Iba-1, E-cadherin and CD3 antibodies was performed for differential diagnosis. As a result, lymphoma was diagnosed in 2 cases due to intense CD3 positivity. The diagnosis of histiocytic tumor was confirmed in 12 cases with intense Iba-1 positivity. In the other 9 cases, Iba-1 positive histiocytic cells were found to be infiltrated in the tumor tissue. As a result of histopathological examination of 12 Iba-1 positive cases, 4 cases were diagnosed as cutaneous histiocytoma, 3 cases as cutaneous histiocytosis and 5 cases as histiocytic sarcoma (1 haemophagocytic histiocytic sarcoma). E-cadherin positivity was found to be mild in only one cutaneous histiocytoma and one histiocytic sarcoma case. CD3 and FoxP3 positive T lymphocytes were counted and scored in 12 Iba-1 positive cases. In addition, varying degrees of positivity were observed in VEGF staining. As a result of statistical analyzes, a significant increase was observed in histiocytic sarcoma and cutaneous histiocytosis cases compared to cutaneous histiocytoma cases only in terms of CD3 positive score in group comparison. According to the correlation results of CD3, FoxP3 and VEGF scores, only a moderate negative correlation was observed between FoxP3 and VEGF. The results of the study suggest that the increase in the number of FoxP3 positive Tregs in canine histiocytic tumors may suppress tumor development by reducing VEGF-mediated angiogenesis.

Keywords: Angiogenesis, Dog, FoxP3, Histiocytic tumor.

1. GİRİŞ

Histiyoitler dokularda bulunan önemli bir lökosit alt kümesidir. Aynı zamanda bağışıklık sisteminin işleyişinde önemli bir rol üstlenirler. Histiyoitler CD34 kök hücre öncülerinden farklılaşarak makrofaj, Langerhans hücreleri (LC) ve interstisyel dendritik hücre (DC) soylarına ayrılırlar. Bu farklılaşma çeşitli sitokinlerin etkisi altında gerçekleşmektedir. Farklılaşmanın tamamlanmasının ardından yüzey antijenlerinin büyük bir kısmı ile birlikte immunglobulin ve tamamlayıcı moleküllerin bağlanabileceği yüzey reseptörlerini yapılarında barındırırlar. Langerhans hücreleri deri epiteli ile birlikte sindirim ve solunum sistemi ile genital kanalda bulunur. İnterstisyel DC'ler beyin dokusunda bulunmamalarına rağmen meningesler ve koroid pleksuslarla birlikte birçok organda perivasküler olarak yerleşim gösterirler. Yapılan çalışmalarda en çok incelenen DC'lerin deride yerleşim gösterenlerdir. Bunlar arasında ise interstisyel DC'ler olan epidermal LC'ler ve dermal DC'ler yer almaktadır. Lenf nodülü ve dalak gibi periferik lenfoid organlarda T hücrelerinden farklılaşarak meydana gelen DC'ler birbirine kenetlenmiş DC'ler olarak bilinir. Lenf düğümlerinde bulunan birbirine kenetlenmiş DC'ler yerleşik ve geçişli DC'ler şeklinde bulunur. Farklı dokulara göç eden DC'ler LC'lerden ve interstisyel DC'lerden oluşmaktadır ve dokulardaki lenfatik sisteme göç ederler. Köpek ve kedilerde görülen birçok histiyoitik hastalık LC hücrelerini ve DC hücrelerinin proliferasyonlarından kaynaklanmaktadır. Köpek ve kedilerde makrofajlardan köken aldığı tespit edilen tek histiyoitik hastalığın hemofagositik histiyoitik sarkom olduğu bildirilmiştir. DC gelişimini etkileyen faktörler arasında sitokinler ve FMS benzeri tirozin kinaz (FLT3) ligandı, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), kök hücre faktörü, tümör nekroz faktörü alfa (TNF-a), interlökin 4 (IL-4) ve transforme edici büyüme faktörü beta 1 (TGF-b1) gibi büyüme faktörleri yer almaktadır. Makrofaj gelişimi GM-CSF ve makrofaj koloni uyarıcı faktörden (M-CSF) etkilenmektedir. Kan monositleri GM-CSF'nin etkisi altındaki makrofajlara veya GM-CSF ve IL-4'ün etkisi altında DC'lere farklılaşabilir. Langerhans hücre farklılaşması önemli oranda TGF- β 1 stimülasyonuna bağlı olarak gelişir. Epidermal keratinositler LC'lerin dermal CD14+ öncül hücrelerinden farklılaşması için gerekli olan TGF- β 1'i salgılanmasını sağlarlar (Fulmer ve Mauldin, 2007; Merad ve ark., 2008; Shortman ve Liu, 2002; Janeway ve

ark., 1999a; D'Agostino ve ark., 2012; Moore ve ark., 1996; Shortman ve Naik, 2007; Affolter ve Moore, 2002a; Busch ve ark., 2008; Friedrichs ve Young, 2008; Larregina ve ark., 2001; Shortman ve Caux, 1997; Riedl ve ark., 2000; Moore, 2014).

Dendritik hücreler uyarılmamış T hücrelerinde immün yanıtların oluşmasında görev alan en güçlü antijen sunucu hücrelerdir. Köpekler ve kedilere özgü monoklonal antikorların üretilmesi özellikle deride bulunan DC'ler ve makrofajların tanımlanmasını sağlamıştır. Dendritik hücrelerin genellikle derinin dermis ve epidermis katmanlarında çok sayıda bulunduğu bildirilmiştir. Köpeklerde ve kedilerde bulunan DC'ler yüzeylerinde CD1a molekülleri ile birlikte major doku uyumluluk kompleksini (MHC) barındırırlar. MHC peptitlerin, lipidlerin ve glikolipitlerin T hücrelerine sunulmasından sorumludur. DC'ler antijen sunucu molekülleri yüzeylerinde bolca eksprese etmeleri sebebi ile en iyi antijen sunucu hücrelerden biri olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle DC'ler iyi bir şekilde antijen sunan hücreler (APC) olarak işlevlerini yerine getirmeleri için gerekli olan molekülleri eksprese ederler. Bunlardan CD1 proteinlerinin ekspresyonu deride DC'lerde büyük ölçüde sınırlandırılırken MHC sınıf I ve II daha geniş bir şekilde eksprese edilir (Moore ve ark., 1998; Ricklin ve ark., 2010; Saint-André Marchal ve ark., 1997; Woo ve Moore, 1997; Zaba ve ark., 2009; Loringh van Beeck ve ark., 2008; Moore, 2014).

Monosit ve makrofaj soyunun hücreleri işlev bakımından fagositiktir. Kemik iliğinden salındıktan sonra monositler kanda dolaşır ve dokularda olgun makrofajlar olarak sabitlenir. Histiyoitlerden ortaya çıkan olgun makrofajlar deri, dalak, akciğer (alveolar makrofajlar) ve karaciğer (Kupffer hücreleri) dahil olmak üzere vücudun çeşitli dokularında bulunur. Bu hücreler, aynı zamanda vücudun doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçası olarak da işlev gören retiküloendotelyal sistemin bir parçasını oluşturur (Pires ve ark., 2009).

Çalışmamızda köpeklerdeki çeşitli hastalıklarda FoxP3 pozitif lenfositleri ile birlikte VEGF boyanma yoğunluğunun ortaya konulması ve ayrıca FoxP3+ Treg'ler ile VEGF arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Histiyoitik Tümörlerin Köken Aldığı Hücreler

2.1.1. İnterstisyel Dendritik Hücreler

Dendritik hücreler, güçlü antijen sunan hücreler olarak hareket ederek adaptif immün yanıtın bir parçası olarak görev yapar. Kemik iliğinden ortaya çıktıktan sonra DC'ler kan yoluyla çeşitli kutanöz veya mukozal epitel bölgelerine göç eder. Geçiş gerçekleştikten sonra, DC'ler ya epitel içinde ya da dermis ve lamina propria içinde bulunur. Bu bölgelerde antijen işleme meydana gelir. Bir antijen işlendikten sonra DC'ler derinin ötesinde lenf düğümlerinin parakorteksine göç eder burada antijenleri bir bağışıklık tepkisi başlatmak için uyarılmamış T hücrelerine sunarlar (Moore ve ark., 1998).

Histiyoitik sarkomlar en sık interstisyel DC'lerin fenotipik profili olan hücrelerden türetilir. Reaktif histiyoitozlar lenfositlerden ve aktive interstisyel DC'lerden oluşan kompleks inflamatuvar bozukluklardır. İnterstisyel DC'ler, beyin hariç hemen hemen tüm dokularda ortaya çıkar. Meningslerde ve koroid pleksuslarında interstisyel DC'ler görülür (D'Agostino ve ark., 2012). İnterstisyel DC'ler, CD1a, CD11c, CD11b (alt küme) ve MHC sınıf II'yi eksprese eder. Deride dermal DC'ler interstisyel tiptedir ve ayrıca CD90 (Thy-1) eksprese ederler. Yerleşik uyarılmamış interstisyel DC'ler bazıları B7 ailesinin üyeleri olan CD80 ve CD86'yı içeren kostimulatör molekülleri düşük düzeylerde eksprese eder. İnterstisyel DC'ler güçlü APC'lerdir ve peptitlerin lipidlerin ve glikolipitlerin T hücrelerine (CD1a, MHC sınıfları I ve II) sunulmasında görev alan moleküllere sahiptirler (Moore, 2014).

2.1.2. Langerhans Hücreleri

Langerhans hücreleri, deri ve mukozal bölgelerin (dil, orofarinks, pulmoner bronşlar, vajina ve serviks) epitelinde yerleşik DC'lerdir (Merad ve ark., 2008). C tipi lektin langerin (CD207) LC'lerin yüzeyinde eksprese edilir. Langerinin içselleştirilmesi, LC'leri tanımlayan ve interstisyel DC'lerden ayıran bir sitoplazmik yapılar olan Birbeck'in granüllerinin (BG'ler) oluşumuna aracılık eder. BG'ler

farelerin, insanların, domuzların, kedilerin ve diğerlerinin LC'lerinde bulunmuştur (Merad ve ark., 2008; Nfon ve ark., 2008; Saint-André Marchal ve ark., 1997). Bu türlerin tümü fonksiyonel bir langerin molekülü ifade eder. Yukarıdakilerin tek istisnası köpektir. LC olduğu tahmin edilen köpek epidermal DC'lerde BG görülmemiştir (Moore ve Mariassy, 1986). Bununla birlikte gösterilen yapıların BG'lerin ayırt edici özelliklerinin bulunmadığı köpek epidermal LC'lerinde çelişkili BG raporları vardır (Marchal ve ark., 1993). BG'leri kedilerin LC'lerinde bulunur ve kedi pulmoner Langerhans hücre histiyositozisindeki (LCH) infiltrate histiyositlerde gösterilmiştir (Busch ve ark., 2008; Saint-André Marchal ve ark., 1997).

2.1.3. Makrofajlar

Makrofajlar tüm dokuların önemli bir bileşenidir (Moore, 2014). Kemik iliğinden serbest bırakıldığında, monositler kanda dolaşır ve dokularda olgun makrofajlar olarak sabitlenir. Histiyositlerden kaynaklanan olgun makrofajlar deri, dalak, akciğer (alveolar makrofajlar) ve karaciğer (Kupffer hücreleri) dâhil olmak üzere vücuttaki çeşitli dokularda bulunur. Bu hücreler aynı zamanda vücudun doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçası olarak da işlev gören retiküloendotelyal sisteminin bir parçasını oluşturur (Janeway ve ark., 1999b). Dokulardaki makrofajların tanımlanması immunofenotiplemeye dayanır. Makrofajlar normal dokularda β -2 integrinleri diferansiyel olarak eksprese eder. Örneğin çoğu dokuda makrofajlar CD11b / CD18 (Kupfer hücreleri, mikroglia, sinovyal tip A hücreleri) eksprese eder. Splenik kırmızı pulpa, kemik iliği ve lenf bezlerinin medüller sinusları gibi hematopoetik bölgelerdeki makrofajlar CD11d /CD18 eksprese eder (Danilenko ve ark., 1992; Danilenko ve ark., 1995). Makrofajların tanımlanmasında kullanılan diğer belirteçler arasında Mac387 (calprotectin), MHC sınıf II, CD163 ve CD204 bulunur (Ide ve ark., 2011). CD163 ve CD204 bazı türlerde DC alt tipleri tarafından da eksprese edilir (Marquet ve ark., 2011; Van der Vieren ve ark., 1995). Normal köpek DC'lerinde CD163 ve CD204'ün ekspresyonları bildirilmemiştir. Belirtilen belirteçlerden sadece CD11b formalinde tespit edilmiş dokularda değerlendirilemez (Moore, 2014).

2.2. Kanin Histiyoitik Hastalıklar

Köpeklerde histiyoitik hastalıklar içerisinde kanin kutanöz histiyoitoma (CCH), kutanöz langerhans hücre histiyoitozisi (LCH), reaktif histiyoitozis (kutanöz histiyoitozis [CH] ve sistemik histiyoitozis [SH]) ile histiyoitik sarkoma (HS) ve hemofagositik HS bulunur. Bunlardan CCH ve LCH'nin LC'lerden, CH ve SH'nin aktive interstisyel DC'lerden köken aldığı, yine HS'nin de interstisyel DC'lerden fakat farklı bir grup olarak gözlenen hemofagositik HS'nin makrofajlardan köken aldığı bilinmektedir (Moore, 2017).

2.2.1. Kutanoz Histiyoitoma

Kanin kutanöz histiyoitoma (CCH), köpeklerin yaygın, genellikle kendiliğinden gerileme gösteren, Langerhans hücresi kökenli benign bir epidermal neoplazisidir. Bununla birlikte kendiliğinden gerilemenin nedeni net bir şekilde açıklanmamıştır. İyi huylu ve kötü huylu tümörlerin kendiliğinden gerilemesi, insanlarda ve hayvanlarda farklı tümörlerde fark edilir ve genellikle tümör hücresi çoğalmasında bir azalmaya, apoptozun indüksiyonuna veya bağışıklık sisteminin aktivasyonuna atfedilir (Thomas ve Badini, 2011; Paredes, 2007; Mehl ve ark., 2001; Nicholls ve ark., 2001; Bonnette ve ark., 1999; Inoue ve ark., 2002; Yakovlev ve ark., 1999; Kurita ve ark., 2007; Mulligan, 1948; Taylor ve ark., 1969; Bender ve Muller, 1989; Hendrick ve ark., 1999; Affolter ve Moore, 2000a).

Histiyoitomalar için yaşa özgü insidans oranı 3 yıl sonra hızla düşmektedir. Ancak histiyoitomalar her yaşta köpeklerde görülmektedir. Histiyoitomalar tüm ırklarda görülür. Safkan köpekler, özellikle Boxer ve Dachshund ırkları yatkındır. Vücudun aynı veya farklı bölgelerinde histiyoitomaların nüksetme raporları nadirdir ve birden fazla tümörün ortaya çıkması olağandışı kabul edilir (Taylor ve ark., 1969).

Bu tümörler Langerhans hücre kökenlidir ve CD1, CD11c, MHC II ve E-kadherini eksprese ederler. Bu tümörler sıklıkla periferdeki lenfositlerin ve plazma hücrelerinin infiltrasyonunu içeren kubbe şeklinde bir görünüme sahiptir. Çoğunlukla yüzeysel dermal ödem görülür ve tümör hücreleri epidermise, epitelotropik

lenfomanın Pautriers mikro apselerine benzer bir şekilde sızar. Neoplastik hücreler tabakalar oluşturur ve tümör dokusu genellikle belirgin bir stroma içermez. Neoplastik hücreler orta ila bol miktarda eozinofilik sitoplazma ile oval-böbrek şekilli çekirdeklere sahiptir ve mitotik figürler sıktır. Düşük dereceli hücresel atipi vardır (Hendrick ve ark., 1999).

2.2.2. Kutanöz Langerhans Hücreli Histiyoitozis

Kutanöz langerhans hücreli histiyoitozis (LCH), birden fazla kutanöz lezyonun sürekli olarak gözlemlendiği bir hastalık spektrumunu kapsar. Bazı durumlarda lenf düğümü ve sistemik metastaz da gözlenir (Moore ve ark., 1996). Olguların yaklaşık yarısında kutanöz LCH'nin regresyona uğramaması ve yaygın ülserasyonlardan dolayı oluşan komplikasyonlara bağlı ötenazi uygulandığı bildirilmiştir (Moore, 2017).

2.2.3. Reaktif Histiyoitozis

2.2.3.1. Kutanöz Histiyoitozis

Kutanöz histiyoitoz (CH) ilk olarak 1986 yılında köpeklerde proliferatif bir histiyoitik hücre bozukluğu olarak bildirilmiştir. Daha yakın zamanlarda kutanöz ve sistemik histiyoitozda yer alan histiyoitik hücreler immünofenotipik olarak aktive edilmiş dermal dendritik hücreler olarak sınıflandırılmıştır. Bu hastalığın kesin etiyolojisi ve patogenezi bilinmemektedir ancak immün yanıt mekanizmalarının düzensizliği ve proinflamatuvar sitokinlerde (tümör nekroz faktörü-alfa, interlekin (IL)-6, IL-12, interferon-gama) bir artış gösterilmiştir. Etkilenen köpeklerin yaşları 2 ila 13 arasında değişmektedir (Mays ve Bergeron, 1986; Affolter ve ark., 2003; Moore, 1984; Affolter ve Moore, 2002b).

2.2.3.2. Sistemik Histiyoitozis

Sistemik histiyoitozis (SH) ilk olarak Bernese Dağ Köpekleri'nde tanımlanmış ve ailesel bir yatkınlık ortaya konulmuştur. Histiyoitik sarkomalar (HS) SH ile Bernese dağ köpeklerinin aynı ailelerinde meydana gelmiştir, ancak SH'nin HS'ye

ilerlemesi gözlenmemiştir. SH diğer birçok büyük cins köpeklerde ortaya çıkar. Genel olarak SH nadir görülen bir hastalıktır ve CH çok daha yaygındır. CH ilk olarak köpeklerde zamanla ilerleyip gerileyen dermatit ve etiyojisi bilinmeyen pannikülit olarak tanımlanmıştır ki bu lezyonlarda histiyositler baskın olarak görülmüştür (Mays ve Bergeron, 1986; Moore, 1984; Moore ve Rosin, 1986; Affolter ve Moore, 2000b).

Tipik kutanöz lezyonlar baş, boyun, ekstremiteler, skrotum ve gövdeye yerleşmiş çok sayıda kıllı veya alopesik plakları ve / veya nodülleri içerir. CH deri ve deri altı dokularla sınırlıyken SH ayrıca lenf düğümlerini, sklera, göz kapakları, burun boşluğu, karaciğer, dalak, kemik iliği ve akciğerleri de etkiler. Kutanöz lezyonlar CH ve SH vakalarında aynıdır ve kutanözden sistemik hastalığa ilerleme bildirilmiştir (Mays ve Bergeron, 1986; Moore, 1984; Moore ve Rosin, 1986; Affolter ve Moore, 2000a; Affolter ve Moore, 2000b).

2.2.4. Histiyositik Sarkoma/Malignant Histiyositozis

Histiyositik sarkoma (HS) ve malignant histiyositozis (MH) terimleriyle ilgili çok fazla kafa karışıklığı vardır. Lezyon soliterse veya metastaz yapmışsa HS terimi kullanılmalıdır. MH çok merkezli bir çoğalmayı tanımlar. Fakat yayılmış bir HS, MH'den ayırt edilemeyebilir (Anonim, 2008).

HS makrofaj veya dentritik hücrelerden köken alan ve nadir görülen bir malign neoplazidir. Klinik belirtiler tipik olarak spesifik değildir ve ateş, kilo kaybı, uyuşukluk, iştahsızlık gözlenir. Tümör bir uzuvda ortaya çıkarsa fark edilir şekilde büyüyen bir kitle dikkati çeker (Fry ve McGavin, 2007; Takahashi ve ark., 2014). Lokalize histiyositik sarkomlar en sık deri, deri altı ve ekstremitelerin ilgili yumuşak dokularında meydana gelen ve hızla büyüyen malign neoplazmalardır. Lokalize form için bildirilen diğer bölgeler arasında dalak, beyin, karaciğer, mide duvarı ve dil yer alır. Dalak, akciğer, karaciğer, lenf düğümleri, kemik iliği, merkezi sinir sistemi, böbrekler, iskelet kası, mide ve adrenal bezlerde de disemine HS formları bildirilmiştir. Deri tutulumu nadirdir (Brown ve ark., 2007).

Malignant histiyositozis (MH) idiyopatik periadneksiyal multinodüler granümatöz dermatit, kutanöz ve sistemik histiyositozis ve dalak histiyositozis / fibrohistiyositik nodülleri gibi bir grup histiyositik bozukluğu içerir (Vail, 2001). HS/MH büyük, yuvarlak, çok çekirdekli hücrelerle belirgin hücresel atipi olan malign histiyositlerle karakterizedir. Diğer bir yaygın bulgu tuhaf çok çekirdekli dev hücrelerin varlığıdır. Bu tümörler tuhaf ve yüksek derecede fagositik çok çekirdekli dev hücrelerinin histolojik olarak görülmesiyle diğer tümörlerden rahatlıkla ayırt edilebilir (Vail, 2001; Kerlin ve Hendrick, 1996; Hayden ve ark., 1993; Yamate ve ark., 2001).

HS/MH genellikle köpeklerde görülür ancak kedilerde bazı raporlar mevcuttur. En sık etkilenen ırklar Bernese Dağ Köpekleri, Golden, Labrador ve Flat Coated Retrieverler ve Rottweiler'dir ancak herhangi bir cinsten de tümörler ortaya çıkabilir (Brown ve ark., 2007). HS/MH ile ilgili olarak solunum semptomları konsültasyonların en sık nedenidir. Anemi rejeneratif hemolitik sürecin bir parçası olarak veya kemik iliği istilası ve eritrofagositozun neden olduğu rejeneratif olmayan bir anemi olarak görülebilir. Hiperkalsemi paraneoplastik bir sendrom olarak görülebilir. Histopatolojik incelemede bol miktarda eozinofilik sitoplazma, nükleer atipi, çok sayıda mitoz, çok çekirdekli hücreler, fagosit ve lenfositlerden bazı infiltrasyonlar, plazma hücreleri ve nötrofiller ile yuvarlak-oval hücrelerin çoğalması vardır. Hücreler lizozim, vimentin için pozitif ve sitokeratin A için negatiftir (Azakami ve ark., 2006; Anonim, 2008).

2.2.4.1. Hemofagositik Histiyositik Sarkom

Hemofagositik HS splenik kırmızı pulpadan ve kedi köpeklerde kemik iliği makrofajlarından kaynaklanır. Köpeklerde, hemofagositik HS'deki histiyositler splenik kırmızı pulpa ve kemik iliğinde makrofajlar tarafından yüksek oranda eksprese edilen bir löko-integrin olan CD11d / CD18'yi eksprese eder (Moore, 2014).

Makrofajlardan köken alan hemofagositik HS başlangıçta primer bölgelerde (dalak ve kemik iliği) kitle lezyonları oluşturmaz. Tipik olarak yaygın splenomegali tutarlı bir şekilde gözlenir. Büyük ölçüde genişlemiş dalakta net olarak

tanımlanamayan kitlesel lezyonlar da bulunabilir. Hemofagositik HS interstisel DC kökenli HS ile birlikte gözlenebilir. Bu durumlarda hem yaygın splenomegali hem de belirgin kitle oluşumları gözlenir (Moore ve ark., 2006).

2.2.4.2. Artiküler / Periartiküler HS

Artiküler HS uzuvlarda oluşan lokalize bir HS şeklidir. Lezyonlar eklemlerin içinde ve/veya appendiküler iskeletin eklemlerine bitişik olarak (periartiküler) ortaya çıkar. Artiküler HS köpeklerin eklemlerini etkileyen en yaygın tümördür ve aynı zamanda kedilerde çok daha düşük oranda görülür. Diz ve dirsek eklemi çoğunlukla etkilenir ve lezyonlar koksofemoral eklem ve karpusta oluşabilir. Köpeklerin yarısından fazlasını Rottweiler ırkı oluşturmuştur. İlerlemiş hastalıkta kemik istilası oluşabilir. İskelet lezyonları disemine HS'de artiküler HS ile aynı bölgelerde gözleendiğinden iskelet tutulumunun sinovyal dokuların yakınında çıkan bir yumuşak doku kitlesinin ardından olup olmadığını belirlemek önemlidir. Disemine HS'nin daha kötü bir prognozu varken, artiküler HS'nin erken saptanması ve tedavisi potansiyel olarak iyileştiricidir. Bununla birlikte, artiküler HS çoğunlukla yayılma yeteneğine sahiptir, çünkü histiyositler, özellikle çeşitli DC soyları, aktif olarak göç eden hücrelerdir. Bu durum artiküler HS'li köpeklerin ortalama sağkalım süresini etkiler (yaklaşık 5-8 ay) (Craig ve ark., 2002; Pinard ve ark., 2006; Klahn ve ark., 2011; Schultz ve ark., 2007; Affolter ve Moore, 2002a).

Artiküler HS belirgin bir görünüme sahiptir: sinoviyal yüzeyin altına yerleşmiş çok sayıda esmer nodüller şeklinde oluşur. Dolayısıyla, bu lezyonlar eklem içinde ve/veya periartiküler bir konumda sinoviyal boşluğun dışında başlar. Lezyonlar etkilenen eklemleri sarabilir. Mikroskopik olarak, lezyonlar mikronodüler bir büyüme paterni gösterir. Bu nodüller ilerledikçe kitleler halinde birleşebilir. Lezyonlar en sık sinoviyumun altından kaynaklanır ve sinoviyal yüzey tümörün üzerinde sağlam şekilde durur. Sitolojik olarak artiküler HS diğer bölgelerdeki HS'ye benzer sitolojik olarak atipik pleomorfik histiyositler baskındır. Bununla birlikte belirgin bir yangısal infiltrat lezyonlarda genellikle tanınır. Lenfositler (çoğunlukla T hücreleri) nötrofiller ve iyi diferensiye histiyositler yaygındır. Komşu sinoviyumun lenfosit plazma hücreleri ve histiyositlerle yangılanması da gözlenir (Craig ve ark., 2002).

2.2.4.3. Merkezi Sinir Sistemi Histiyoitik Sarkomu

Merkezi sinir sisteminde (MSS) HS primer olarak ya da disemine HS'nin metastatik yayılımının bir sonucu olarak şekillenebilir. Primer HS'nin ekstrakranial metastazı son derece nadirdir. MSS HS en sık leptomeninkslerden kaynaklanır ve lezyonlar çok sayıda karışık yangısal hücreden (lenfositler, histiyositler ve plazma hücreleri) ve atipik histiyositlerden oluşur. MSS lezyonları çoğunlukla fokal soliter subdural kitle olarak ve daha az oranda meningeal infiltrat olarak gözlenmektedir. Lezyonlar meningeslerde ortaya çıkarak tüm beyni kaplayabilir. Soliter kitle lezyonlarındaki neoplastik histiyositlerin MHC sınıf II moleküllerini Iba-1'i (iyonize kalsiyum bağlanma bağdaştırıcı molekülü 1) ve makrofajlar tarafından ifade edilen reseptörleri (CD163 ve CD204) eksprese ettiği gözlenmiştir. Bu makrofaj reseptörlerinin disemine meningeal HS'de eksprese edilmediği gözlenmiştir. MSS HS'deki neoplastik histiyositler tarafından interstisyel DC belirteçlerinin (CD1a, CD11c ve MHC II) eksprese edildiği gözlenmiştir (Ide ve ark., 2011; Affolter ve Moore, 2002a).

2.2.4.4. Dendritik Hücre Lösemisi

HS'de periferik kan tutulumu nadirdir. Köpeklerde 2 adet DC lösemisi raporu bildirilmiştir. Her iki durumda da periferik kanda çok sayıda atipik histiyosit gözlenmiştir (30.000 – 60.000 hücre/ml). Her iki köpekte de DC soyu (CD1 + CD11c + CD11d - MHCII +) hücrelerin yoğun immünofenotiplenmesi veya flow sitometri ile doğrulanmıştır. Etkilenen organların (kemik iliği, dalak, akciğer ve karaciğer) kitle oluşumu olmaksızın diffüz infiltrasyonu lösemik bir infiltratın özelliğidir. Bu aynı zamanda hemofagositik HS'nin sergilediği infiltrasyon modelidir. Bununla birlikte bu son hastalık periferik kan içermez ve CD11d'yi eksprese eden neoplastik histiyositler tarafından belirgin eritrofagositoz ve ekstravasküler hemolitik anemi ile ilişkilidir. CD11d her iki köpekte de neoplastik histiyositler tarafından eksprese edilmemiştir (Allison ve ark., 2008; Rossi ve ark., 2009; Moore ve ark., 2006).

2.3. FOXP3

Düzenleyici T hücrelerinin (Treg'ler) aktivitesinin FoxP3 transkripsiyon faktörünün ekspresyonu ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. FoxP3 düzenleyici T hücreleri (FoxP3 Treg), bağışıklık sisteminin homeostazında ve bağışıklık tepkisinin modülasyonunda önemli rol oynayan ayrı bir T lenfosit grubudur. Tregler periferik immün toleransın geliştirilmesi ve sürdürülmesinde kilit hücreler olarak görev yapmaktadırlar. Normalde bu hücreler zararlı otoimmün tepkilerin önlenmesi için çalışabilir ancak aynı zamanda anti-tümör bağışıklığı gibi faydalı bağışıklık tepkilerine de müdahale edebilir (Campbell ve Koch, 2011; Nishikawa ve Sakaguchi, 2014; Elkord ve ark., 2010; Piersma ve ark., 2008; Whiteside, 2014).

Genel olarak immün regülasyona düzenleyici sitokinler (örn., doku büyüme faktörü (TGF) - β , interleükin (IL) -10) veya hücreler arası etkileşimler aracılığıyla edebilir. Günümüzde düzenleyici özelliklere (Treg'ler) sahip özelleşmiş T yardımcı hücrelerinin bağışıklık düzenlemesinde önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. Bu hücrelerin tükenmesi veya ilgili transkripsiyon faktörlerinin mutasyonları sıçanlarda farelerde ve erkeklerde tarif edildiği gibi ciddi otoimmün hastalık vakaları ve kronik inflamatuvar bozukluklara neden olur. Düzenleyici kapasitelerinin yanı sıra Treg'ler, CD4, CD25 ekspresyonu ve düzenleyici özelliklerini stabilize etmede çok önemli bir rol oynayan yüksek düzeyde korunmuş transkripsiyon faktörü Forkhead box P3 (FoxP3) ile karakterize edilir (Lan ve ark., 2007; Sakaguchi ve ark., 2008; Sakaguchi ve ark., 1995; Moes ve ark., 2010; Brunkow ve ark., 2001; Fontenot ve ark., 2003).

2.4. Angiogenezis

Yeni damarların oluşumu ile tanımlanan ve mikrodamar yoğunluğu ile tahmin edilen anjiyogenezis memelilerde çeşitli tümörlerin büyümesi gelişimi ve metastazı için çok önemli bir olaydır. Normal anjiyogenezis ya da tümöral anjiyogenezis büyüme faktörleri ve bunların ilgili reseptörleri tarafından kontrol edilir. İntratümöral kompartmanda hipoksi (oksijen yokluğu) vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi pro-angiyojenik faktörlerin ekspresyonunu indükler ve endotel hücrelerinin proliferasyonu, göçü ve yeni kan damarı oluşumları ile sonuçlanır (Potente ve ark.,

2011; de Brot ve ark., 2015; Carvalho ve ark., 2016b; Punico ve ark., 2014; Terme ve ark., 2012; Yu ve Rak, 2003).

Angiyogenezis indüksiyonuna pro-inflamatuar sitokinler üreten Treg hücreleri ve hipoksi tarafından upregüle edilen VEGF dahil olmak üzere birçok hücre aracılık eder. Treg'ler hem dolaylı hem de doğrudan mekanizmalar yoluyla tümör angiyojenezine katkıda bulunabilir. Tregler, TNF α ve IFN γ olarak angiyoostatik sitokinleri serbest bırakan Th1 efektör T hücrelerinin aktivitelerini baskılayarak dolaylı olarak angiyojenezi destekleyebilir (Berk ve Muthuswamy, 2011; Facciabene ve ark., 2011; Punico ve ark., 2014; Yan ve ark., 2011; Casares ve ark., 2003). Bununla beraber Treg'ler ile angiogenezis arasında negatif bir ilişki olduğu da bildirilmiştir (Li ve ark., 2018).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada başlangıçta Anabilim Dalı arşivinden histopatolojik incelemeler ile köpek histiyositik tümör tanısı konulmuş 23 adet blok kullanıldı. Bu bloklardan mikrotom (Leica RM 2155) yardımı ile 5 µm kalınlığındaki kesitler histopatolojik boyama için lam (Menzel Gläser) üzerine alındı. Kesitler ksilollerde (Xylene - Merck Millipore:108661) deparafinize, alkol serilerinde de dehidre edildi. Kesitler histopatolojik analizler için Hematoksilen & Eozin (H&E) ile boyandı.

İmmunohistokimyasal olarak histiyositik tümörlerin tanısının doğrulanması amacıyla Iba-1, CD-3 ve E-kaderin antikorları ile boyamalar gerçekleştirildi. Bu boyamalar sonucunda daha önceden histiyositik tümör olarak teşhis edilen 2 adet olguda hemen tüm tümör hücrelerinde CD3 pozitifliği gözlemlendiği için lenfoma tanısı konuldu. Geri kalan 21 olgu için yapılan Iba-1 boyaması sonucunda 12 adet tümörde yoğun pozitiflik gözlenirken, 9 adet tümörde yalnızca tümör dokusu içerisine dağılım göstermiş histiyositlerde pozitiflik görüldü. Bu nedenle yalnızca 12 adet tümör histiyositik tümör tanısıyla çalışmaya dâhil edildi. Bu tümörlere ayrıca immunohistokimyasal olarak FoxP3 ve VEGF ile boyamalar yapıldı.

CD3, E-kaderin ve VEGF için uygulanan immunohistokimyasal boyamaları için ImmPRESS® Excel Amplified Polymer Staining Kit (Vector Lab, Anti-Mouse IgG, Peroxidase, MP-7602) kullanıldı. Bu amaçla parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2155) yardımı ile 5 µm kalınlığındaki kesitler (3-aminopropyl)triethoxysilane ile hazırlanmış lizinli lamlar üzerine alınıp, öncelikle etüvde 70 °C’de yarım saat bekletilmeyi takiben ksilollerde (Xylene - Merck Millipore:108661) deparafinize, alkol serilerinde de dehidre edildikten sonra antigen retrieval işlemine geçildi. Antigen retrieval için sitrat buffer (ph:6) solüsyonuna alınan lamlar otoklavda 120 derecede 15 dakika bekletildi. Bu işlemden sonra kesitler 20-30 dakika soğumaya bırakıldı. PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi için kesitlere BLOXALL® solüsyonu damlatılarak 15 dakika beklendi. İnkubasyon bitince kesitler tekrar PBS solüsyonuyla 5 dakika yıkamaya alınıp devamında nonspesifik bağlanmaları engellemek amacıyla %2,5’lik normal at serumu 20 dakika boyunca uygulandı. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadan antikor

sulandırıcı ile (Large Volume UltrAb Diluent Plus Thermo Scientific: TA-125-UDX) CD3 antikoru (Dako, M7254, Clone F7.2.38) için 1:25 oranında, E-kaderin (Dako, M3612, Clone NCH-38) için 1:25 oranında ve VEGF (Thermo, MA5-13182), Clone JH121) için 1:20 oranında sulandırılan primer antikolar ile dokular +4 °C’de bir gece inkube edildi. Primer antikor inkubasyonundan sonra PBS ile 5 dakika yıkanan kesitler üzerine Amplifier antibody 15 dakika, ardından da Impress Polymer Reagent 30 dakika boyunca uygulandı. Ardından immun reaksiyonun gösterilmesi için DAB (ImmPACT EqV Reagent) kullanıldı. DAB solüsyonunu kesitlere dökmeyi takiben ışık mikroskobu altında kontrollü olarak ve tüm kesitlere eşit süre tutulacak şekilde beklendi. Mayer’s hematoksilenle (Merck, 109249) 20 saniye zıt boyama yapılan kesitler kurutmaya bırakılarak entellan ile kapatılıp mikroskop altında incelendi. Pozitif kontrol olarak CD3 için köpek dalağı (Şekil 3.1), E-kaderin için köpek derisi (Şekil 3.2) ve VEGF için de tümörlerdeki damarlardaki boyanmalar (Şekil 3.3) dikkate alındı.

FoxP3 boyamaları için ImmPRESS® HRP Goat Anti-Rat IgG, Mouse adsorbed Polymer Detection Kit, Peroxidase (MP-7444-15) kiti kullanıldı. Boyama protokolü yukarıda anlatılanlara benzer olmakla birlikte 1/100 oranında sulandırılan primer antikor (Invitrogen, 14-5773-82, Clone FJK-16s) uygulanmasının ardından amplifier antibody aşaması olmaksızın direk olarak ImmPRESS Polymer Reagent aşaması uygulandı ve DAB (ImmPACT EqV Reagent) kullanıldı. Pozitif kontrol için köpek dalağı kullanıldı.

Iba-1 için boyamaları için yukarıdaki protokollerden farklı olarak 1/100 oranında sulandırılan primer antikor (Wako, 019-19741, polyclonal) sonrasında Goat-anti-Rabbit sekonder antikoru kullanıldı. Ayrıca kromojen olarak AEC (Thermo) uygulandı.

Histopatolojik ve immunohistokimyasal kesitlerin fotoğraflarının alınması için Olympus BX51 model mikroskop (Olympus Optical, Tokyo, Japonya) üzerine uyarlanmış bir Olympus DP70 kamera (Olympus, Tokyo, Japonya) kullanıldı. Her bir kesit için farklı büyütme oranlarında çok sayıda resim alındı.

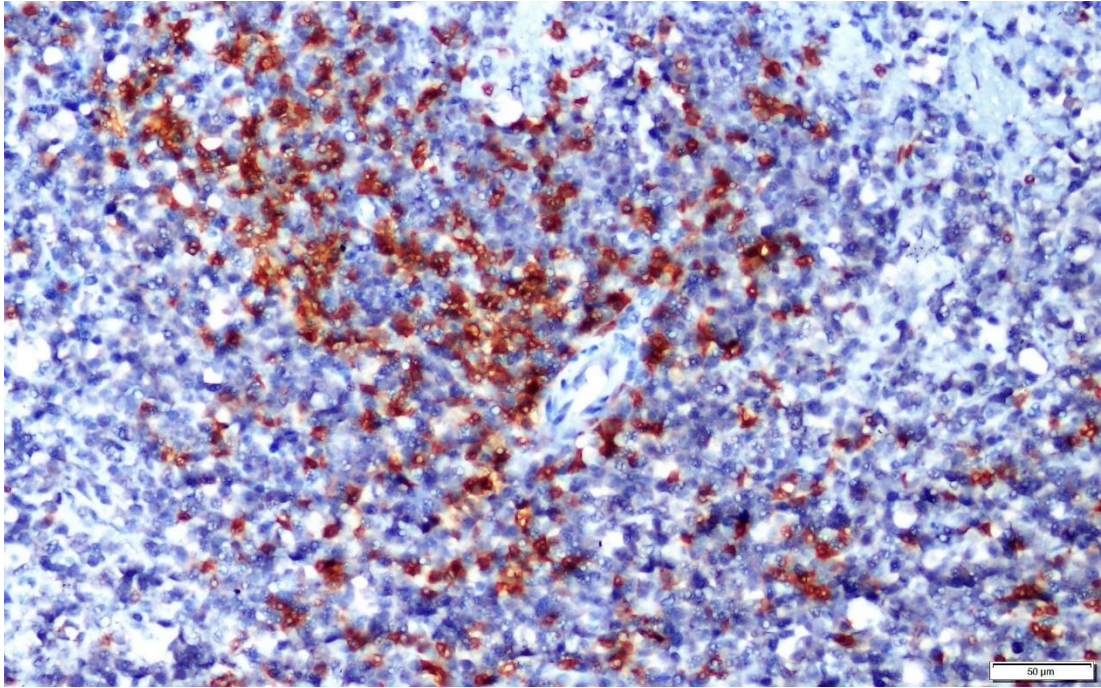
İmmunohistokimyasal boyamaların değerlendirilmesinde, Iba-1 ve E-kaderin için herhangi bir skorlama yapılmaksızın tümör dokuları pozitif veya negatif olarak değerlendirildi. Fakat CD3 ve FoxP3 boyamalarının değerlendirilmesinde tümör dokusu içerisinde rastgele dört adet 400x büyütme alanında pozitiflik gözlenen hücreler sayıldı. VEGF boyamalarının yoğunluğunun belirlenmesi ise yarı-kantitatif olarak 0-4 arasında skorlama yapılarak gerçekleştirildi. Buna göre boyanmanın dağılımı ve şiddeti göz önüne alınarak 0: pozitiflik yok, 1: hafif pozitif, 2: orta derece pozitif, 3: yoğun pozitif, 4: çok yoğun pozitif şeklinde skorlama yapıldı.

3.1. İstatistiksel Analiz

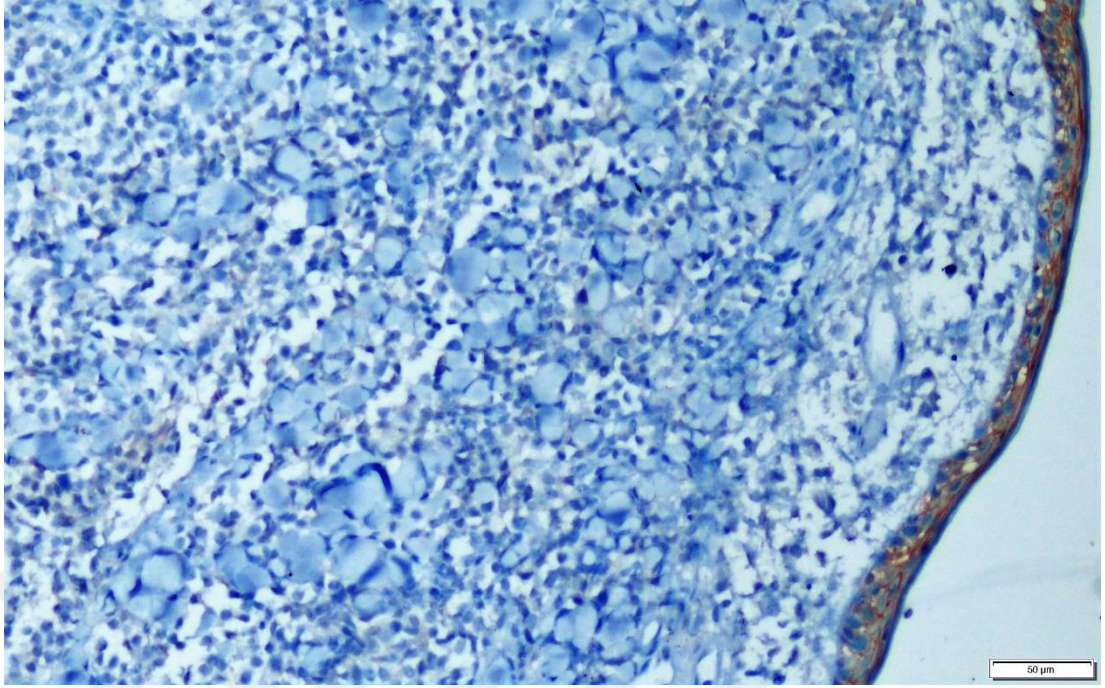
Elde edilen tüm sonuçların değerlendirilmesi uygun istatistiksel metodlar ile Minitab® 16.1.1 programı kullanılarak yapıldı. Elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemek için Ryan-Joiner normalite testi uygulandı. Kutanöz histiyositom, kutanöz histiyositozis ve histiyositik sarkomalar arasındaki CD3, FoxP3 ve VEGF immun skorların farklılığını ortaya koymak amacıyla one way ANOVA Tukey analizinden yararlanıldı. Ayrıca CD3, FoxP3 ve VEGF skorlarının arasındaki ilişkisiyi belirlemek amacıyla Pearson korelasyon testi yapıldı. Korelasyon r değeri aralıkları şu şekilde değerlendirildi: 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 (Hinkle et al. 2003; Mulaka 2012).

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan antikorlara ait bilgiler

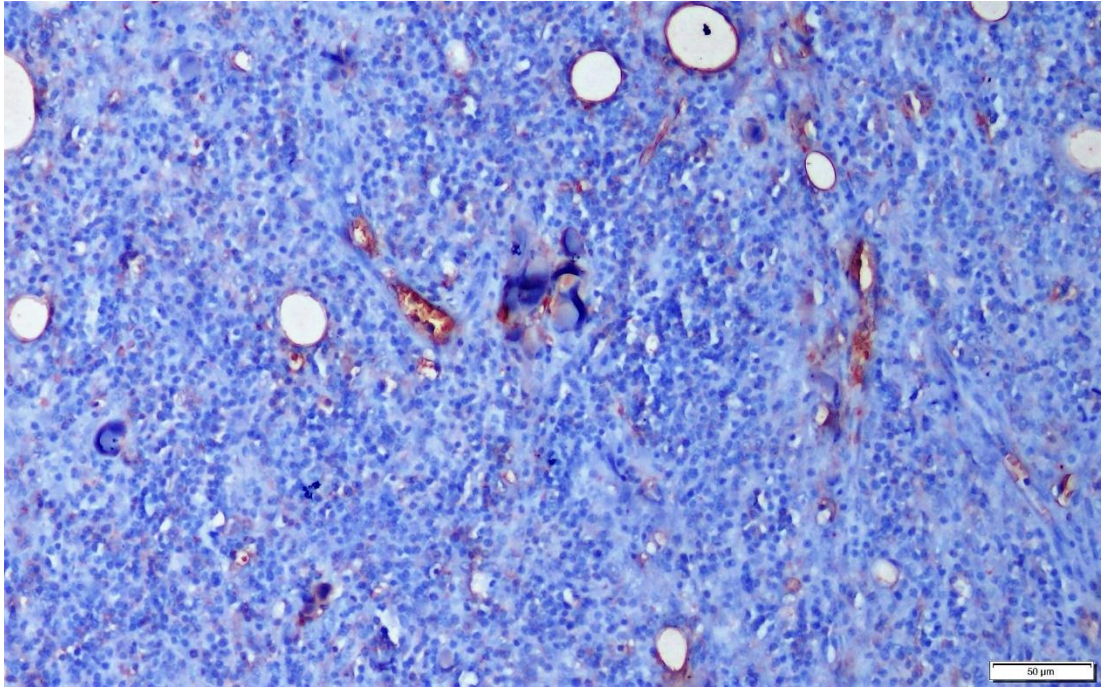
Antikor	Firma	Köken	Klon	Dilüsyon	Kromojen	Süre
CD3	Dako	Mouse	F7.2.38	1:25	DAB	Bir gece
E-kaderin	Dako	Mouse	NCH-38	1:25	DAB	Bir gece
FoxP3	Invitrogen	Rat	FJK-16s	1:100	DAB	Bir gece
Iba-1	Wako	Rabbit	Poly	1:100	AEC	Bir gece
VEGF	Thermo	Mouse	JH121	1:20	DAB	Bir gece



Şekil 3.1. CD3 pozitif kontrol dokusu. Köpek dalağında çok sayıda CD3 pozitif T lenfositler, DAB, Bar=50µm



Şekil 3.2. E-kaderin pozitif kontrol dokusu. Tümörlü köpek derisinde epidermiste sitoplazmik sınırlarda yoğun E-kaderin pozitifliği, DAB, Bar=50µm

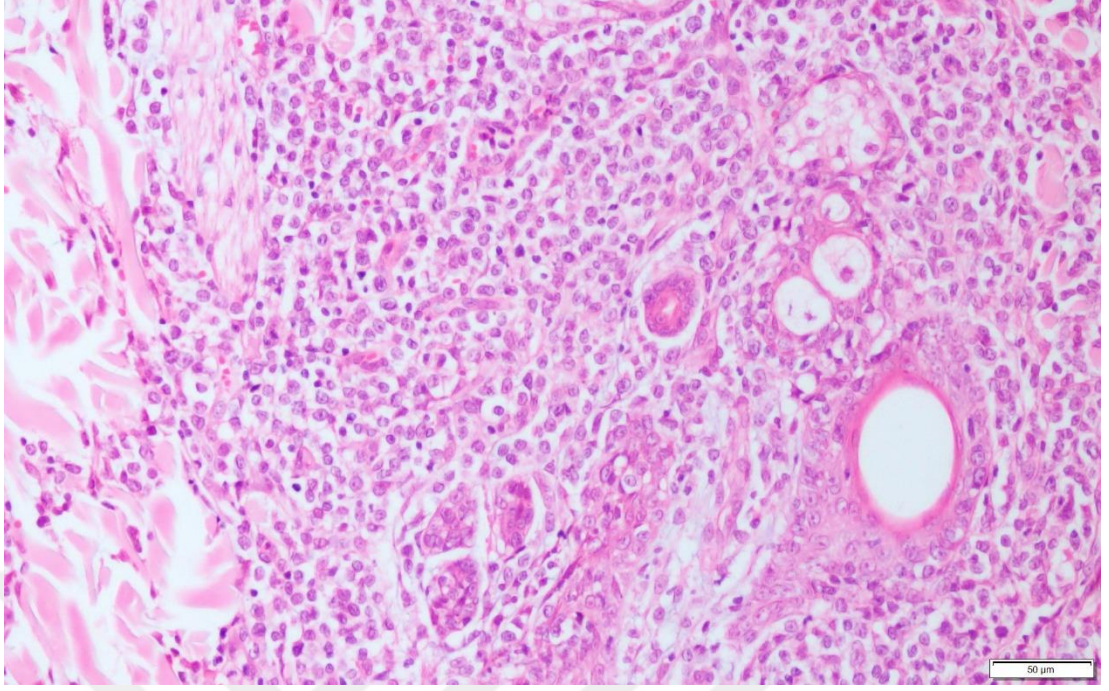


Şekil 3.3. VEGF pozitif kontrol dokusu. Tümöral doku içerisindeki damarlarda belirgin VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm

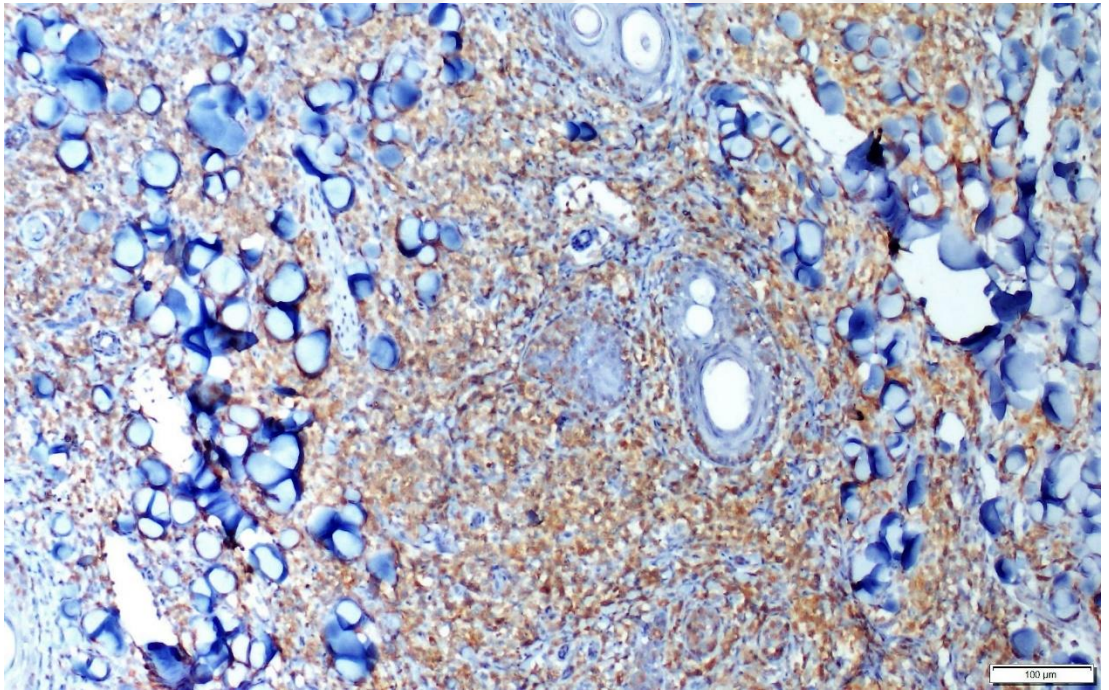
4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Bulgular

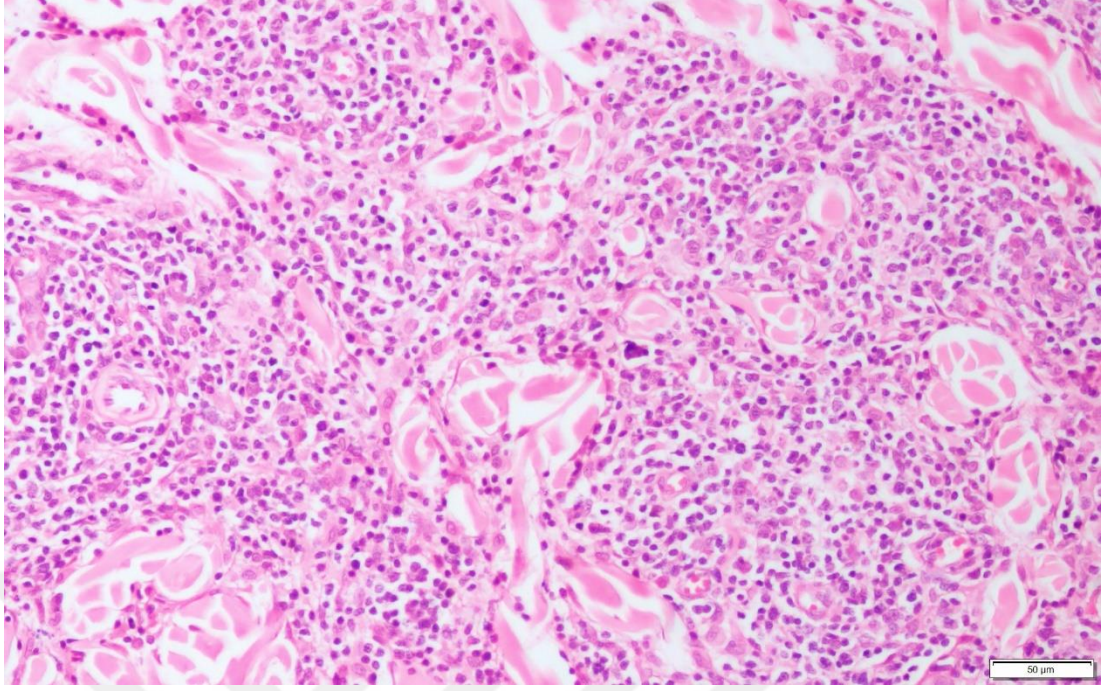
CD3 antikoru ile yapılan boyamalarda 23 olgudan 2 tanesinde yoğun pozitiflik nedeniyle tanı lenfoma olarak konuldu (Şekil 4.1-4.4). Geri kalan 21 olgunun 12 tanesinde yoğun Iba-1 pozitifliği gözlemlendi ve histiyositik tümör tanıları doğrulandı (Şekil 4.5-4.8). Diğer 9 olguda ise yalnızca tümör dokusu içerisinde değişen derecelerde Iba-1 pozitif histiyositik hücre infiltrasyonlarına rastlandı. Dolayısıyla bu 9 olgu çalışma kapsamında değerlendirmeyi. E-kaderin açısından yapılan değerlendirmede Iba-1 pozitifliği gözlenen yalnızca 2 olguda pozitiflik bulunduğu dikkati çekti (Şekil 4.9 ve 4.10). Bu olguların bir kutanöz histiyositom ve bir histiyositik sarkoma olduğu görüldü. E-kaderin negatifliği gözlenen ve epitelyotropizm göstermeyen olguların dentritik hücre kökenli kutanöz histiyositozis olduğu kanısına varıldı. Kutanöz histiyositom tanılı olgularda hafiften şiddetliye değişen derecelerde CD3 pozitif lenfosit infiltrasyonları gözlenirken, kutanöz histiyositozis ve histiyositik sarkoma tanılı olgularda CD3 pozitif lenfosit infiltrasyonlarının çok yoğun olduğu görüldü.



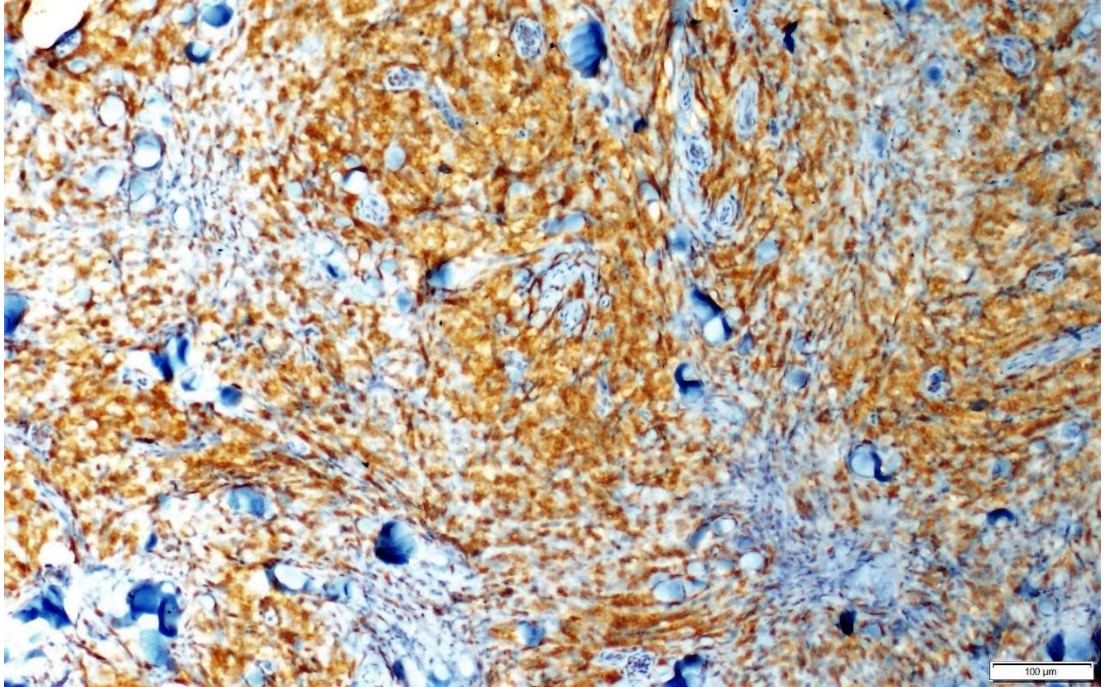
Şekil 4.1: Lenfoma tanılı olguda dermiste yoğun neoplastik hücre infiltrasyonları, H&E, Bar=50µm.



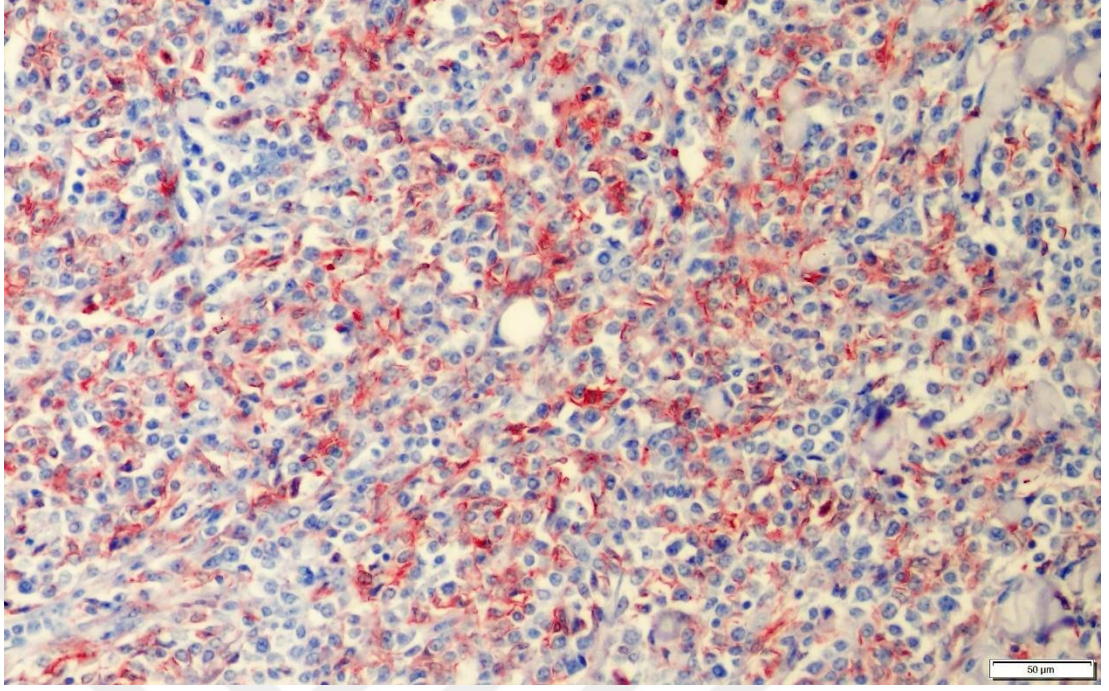
Şekil 4.2. Lenfoma tanılı olguda yoğun CD3 pozitif tümör hücreleri, DAB, Bar=100µm.



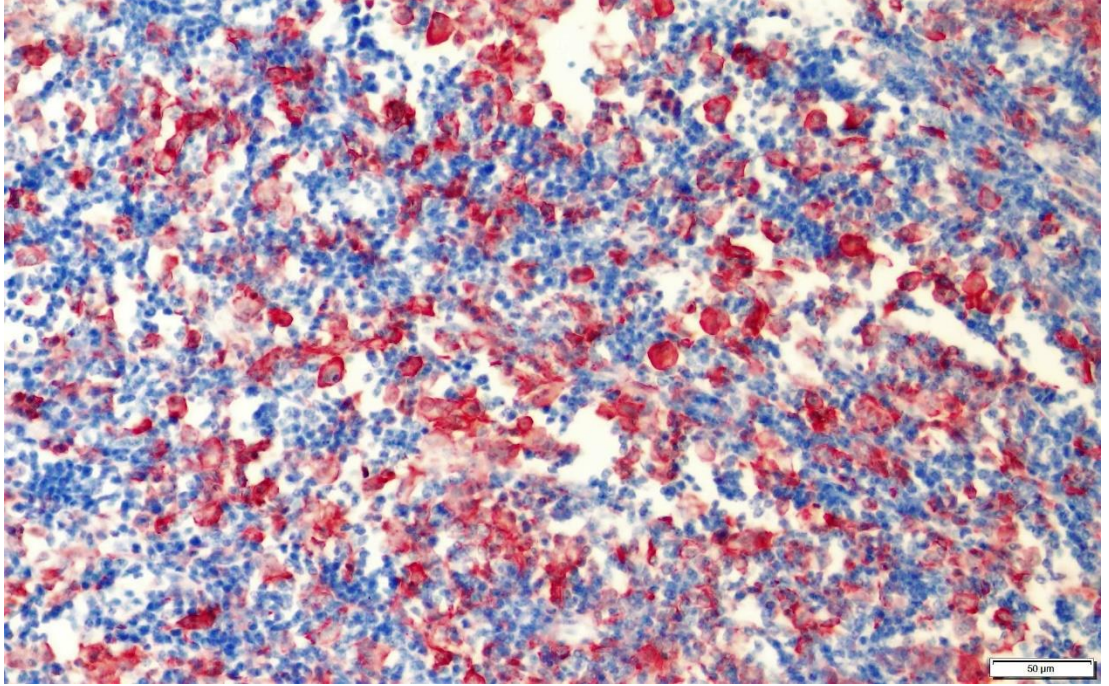
Şekil 4.3. Lenfoma tanılı olguda dermiste yoğun neoplastik hücre infiltrasyonları, H&E, Bar=50µm.



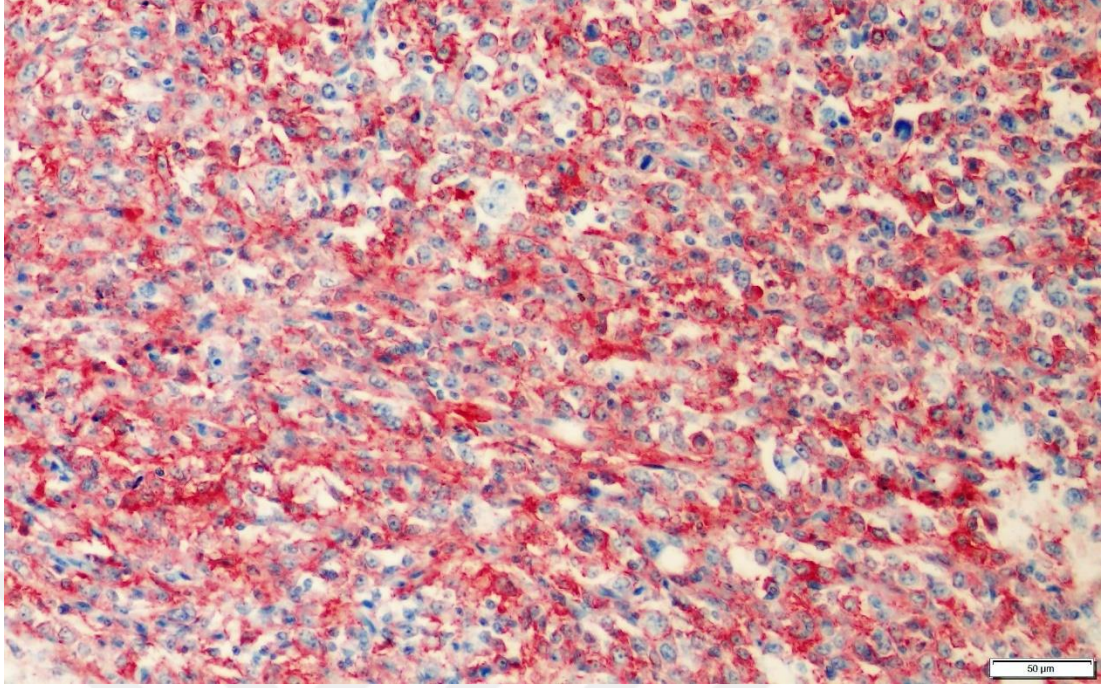
Şekil 4.4. Lenfoma tanılı olguda yoğun CD3 pozitif tümöral hücreler, DAB, Bar=100µm.



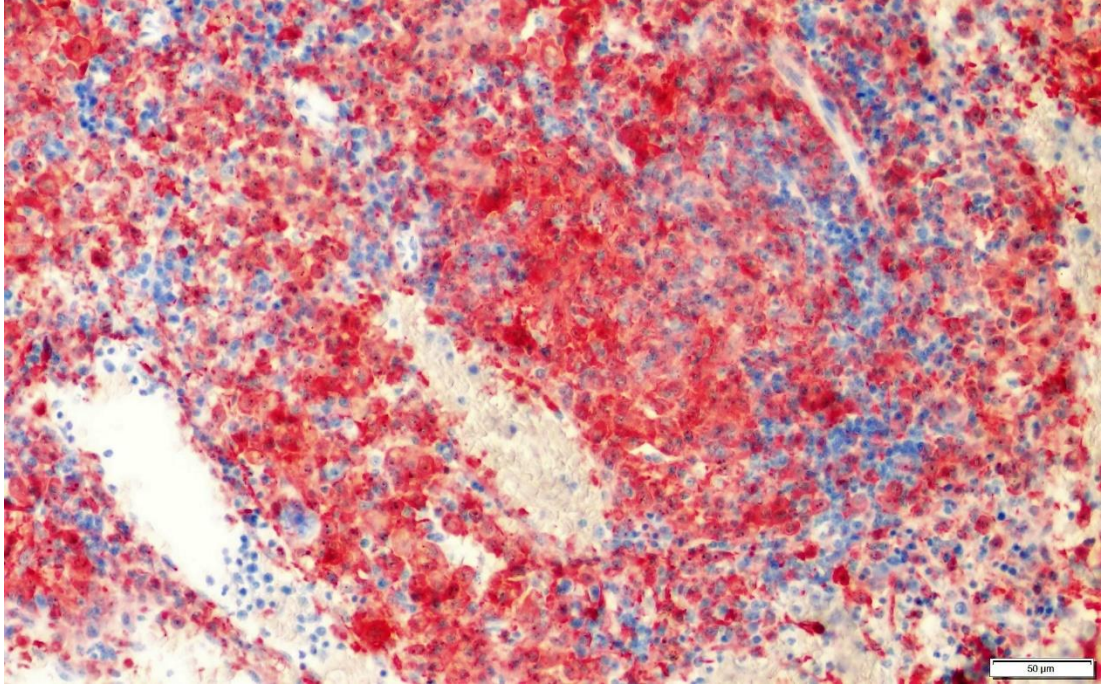
Şekil 4.5. Kutanöz histiyositoma olgusunda tümör hücrelerinde yoğun sitoplazmik Iba-1 pozitifliği, AEC, Bar=50µm.



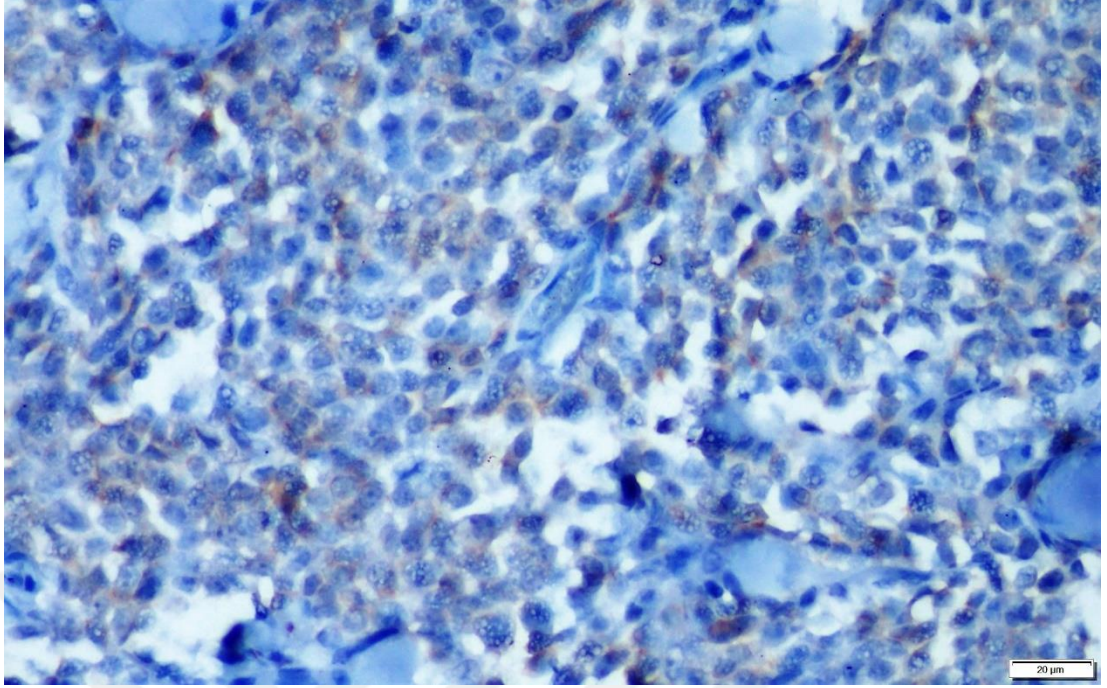
Şekil 4.6. Kutanöz histiyositozis olgusunda tümör hücrelerinde yoğun sitoplazmik Iba-1 pozitifliği, AEC, Bar=50µm.



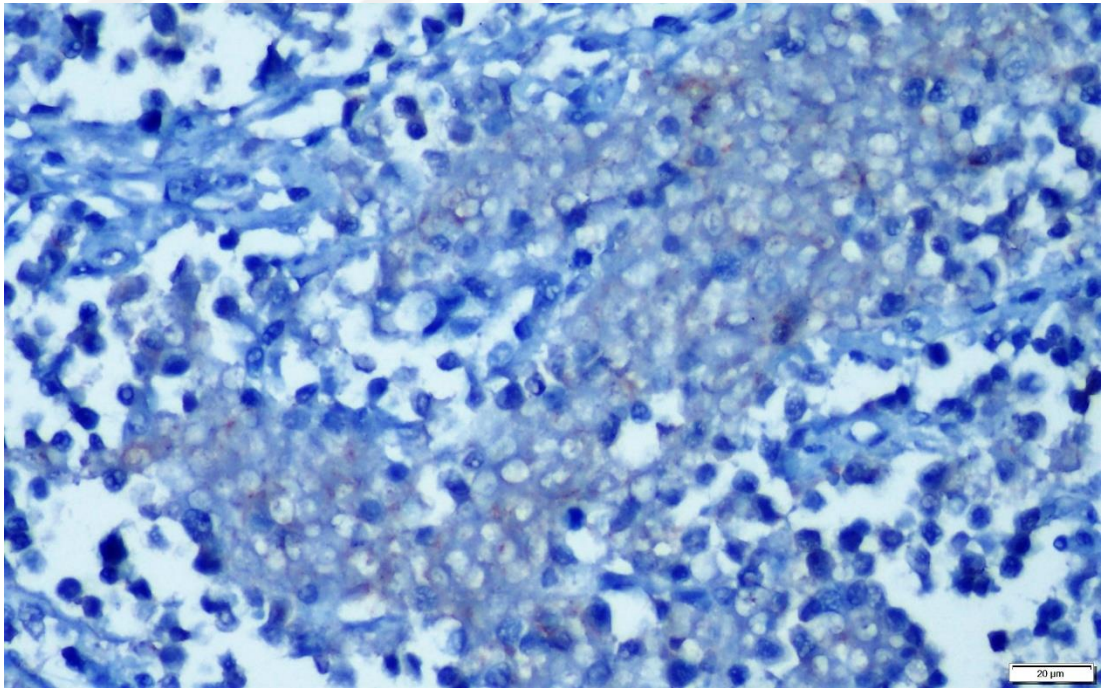
Şekil 4.7. Histiyoitik sarkoma olgusunda tümör hücrelerinin çok yoğun sitoplazmik Iba-1 pozitifliği, AEC, Bar=50µm.



Şekil 4.8. Hemafagositik histiyoitik sarkoma olgusunda çok yoğun sitoplazmik Iba-1 pozitif tümör hücreleri, AEC, Bar=50µm.

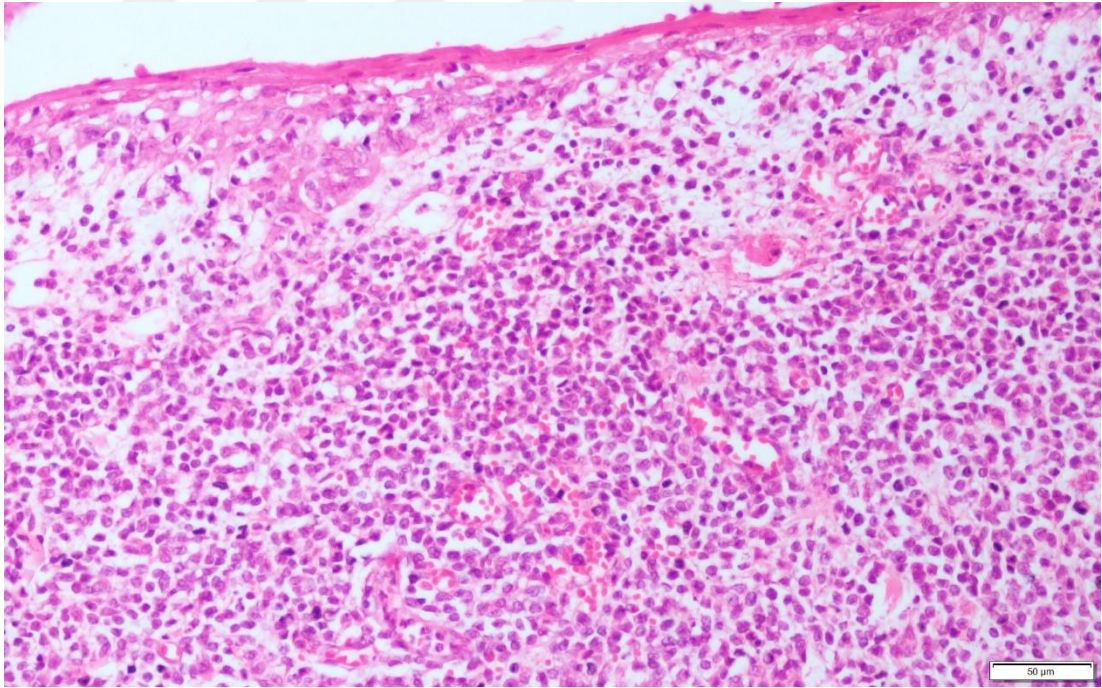


Şekil 4.9. Kutanöz histiyositoma olgusunda tümör hücrelerinde sitoplazmik sınırlarda orta dereceli E-kaderin pozitifliği, DAB, Bar=20µm.

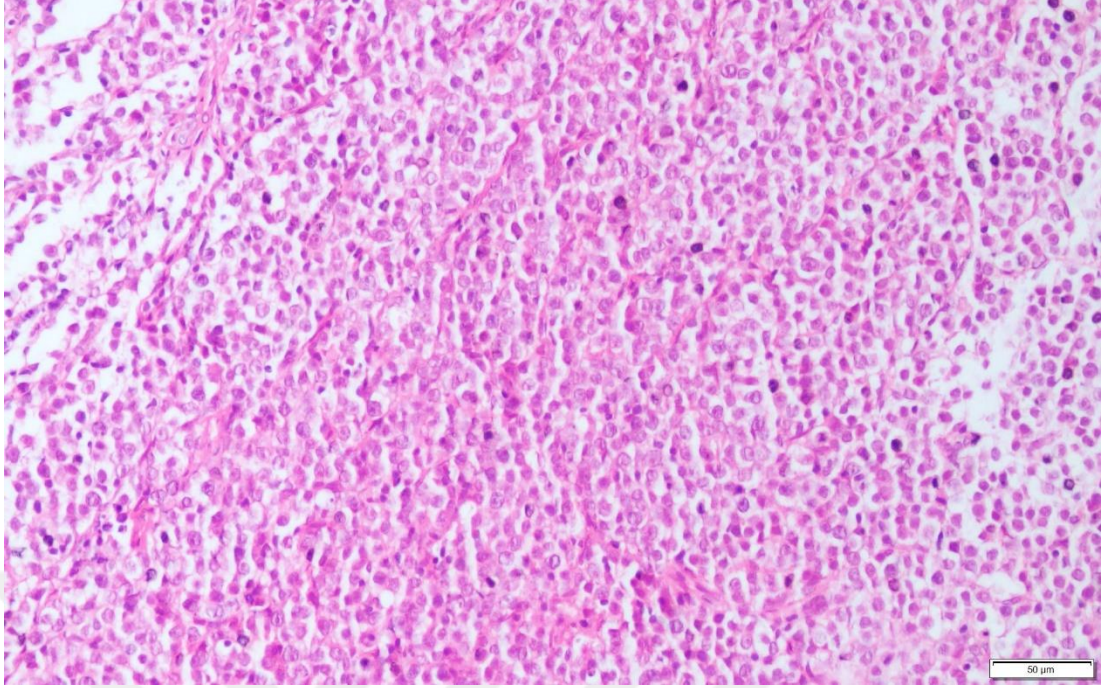


Şekil 4.10. Histiyoitik sarkoma olgusunda tümör hücrelerinde sitoplazmik sınırlarda zayıf E-kaderin pozitifliği, DAB, Bar=20µm.

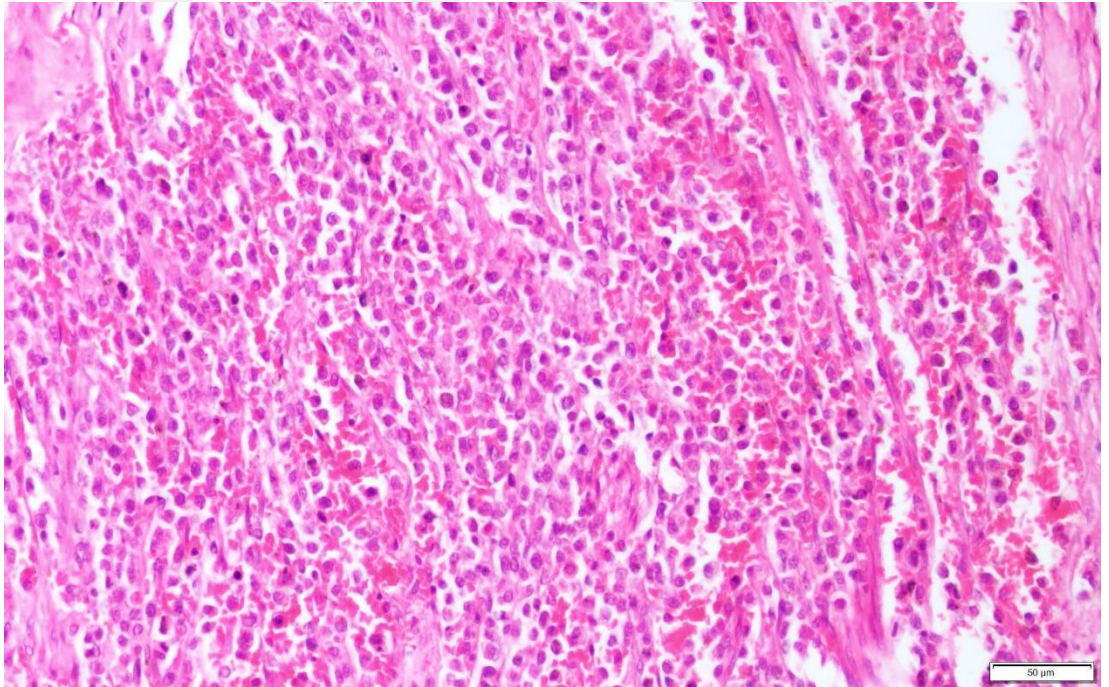
İmmunohistokimyasal olarak histiyositik kökeni doğrulanan 12 olgudan 4 tanesi kutanöz histiyositom, 3 tanesi kutanöz histiyositozis, 4 tanesi histiyositik sarkoma ve 1 tanesi hemofagositik HS olarak teşhis edildi. Benign histiyositik tümörlerde genel olarak yüzeysel dermisten derine doğru ilerleyen ve bazı olgularda subkutise ulaşan infiltrasyonlar görüldü. Neoplastik hücrelerin yuvarlak-oval çekirdeğe ve belirgin çekirdekçiğe sahip olduğu ve genellikle eozinofilik sitoplazmaya sahip oldukları dikkati çekti. Az sayıda mitotik figürlere ve hafif dereceli anizositozis ve anizokaryozise rastlandı. Epidermal tropizm gözlenen 4 olguda tanı kutanöz histiyositom olarak konuldu (Şekil 4.11 ve 4.12). Bu olgularda değişen derecelerde lenfosit infiltrasyonları dikkati çekti. Epitelyal tropizm gözlenmeyen 3 adet olguda ise tanılar kutanöz histiyositozis olarak konuldu (Şekil 4.13 ve 4.14). Bu olgularda çok yoğun lenfosit infiltrasyonu gözlemlendi. Histiyositik sarkoma tanılı olgularda genel olarak belirgin anizositozis ve anizokaryozis ile birlikte yer yer dev hücrelerinin varlığı görüldü (Şekil 4.15 ve 4.16). Çok sayıda mitotik figür dikkati çekti. Bu olgularda da yoğun lenfosit infiltrasyonlarına rastlandı.



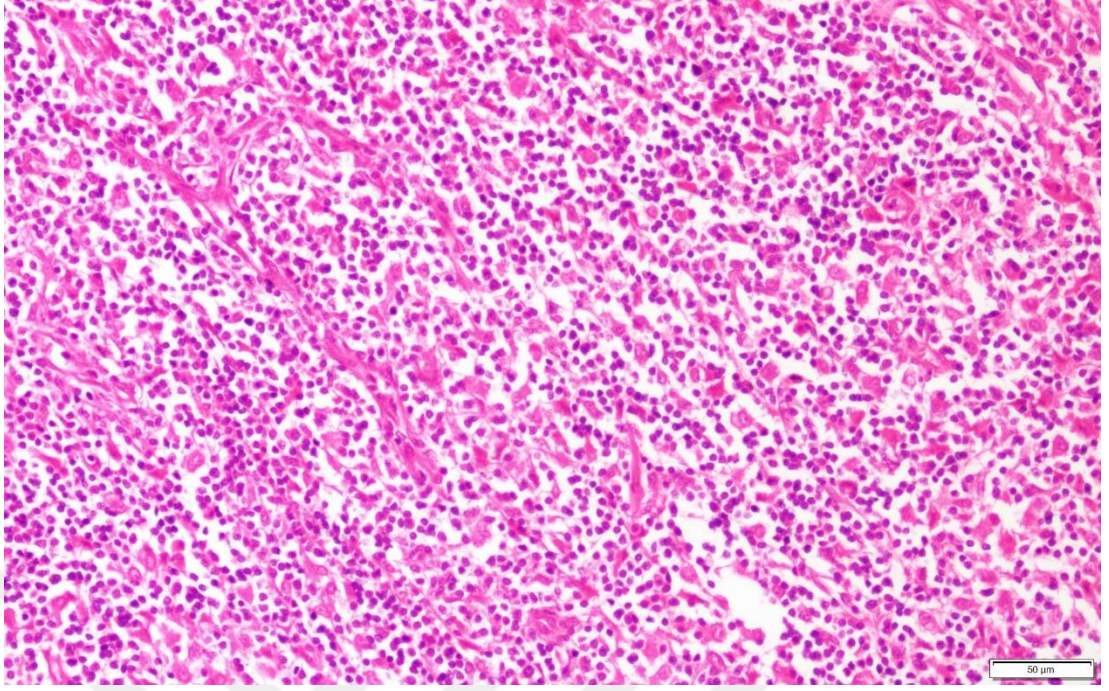
Şekil 4.11. Kutanoz histiyositoma olgusunda epitelyotropizm gösteren ve dermiste yoğun olarak bulunan neoplastik hücreler, H&E, Bar=50µm.



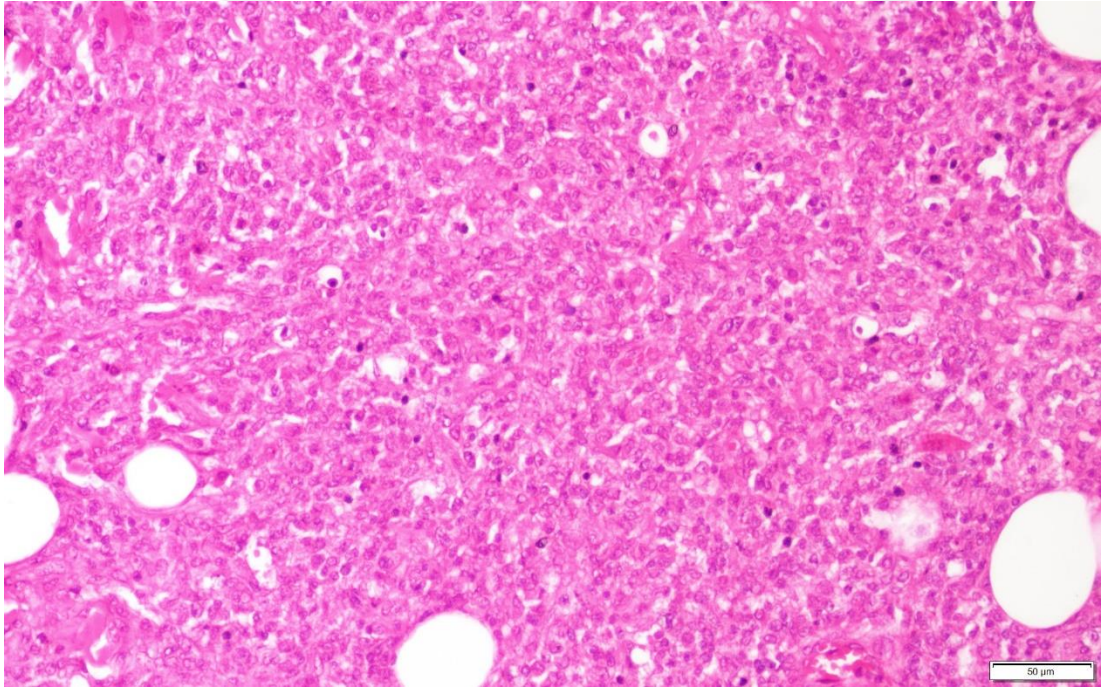
Şekil 4.12. Kutanöz histiyositom olgusunda dermiste ince fibrovasküler stroma ile çevrelenmiş neoplastik hücre kümeleri, H&E, Bar=50µm.



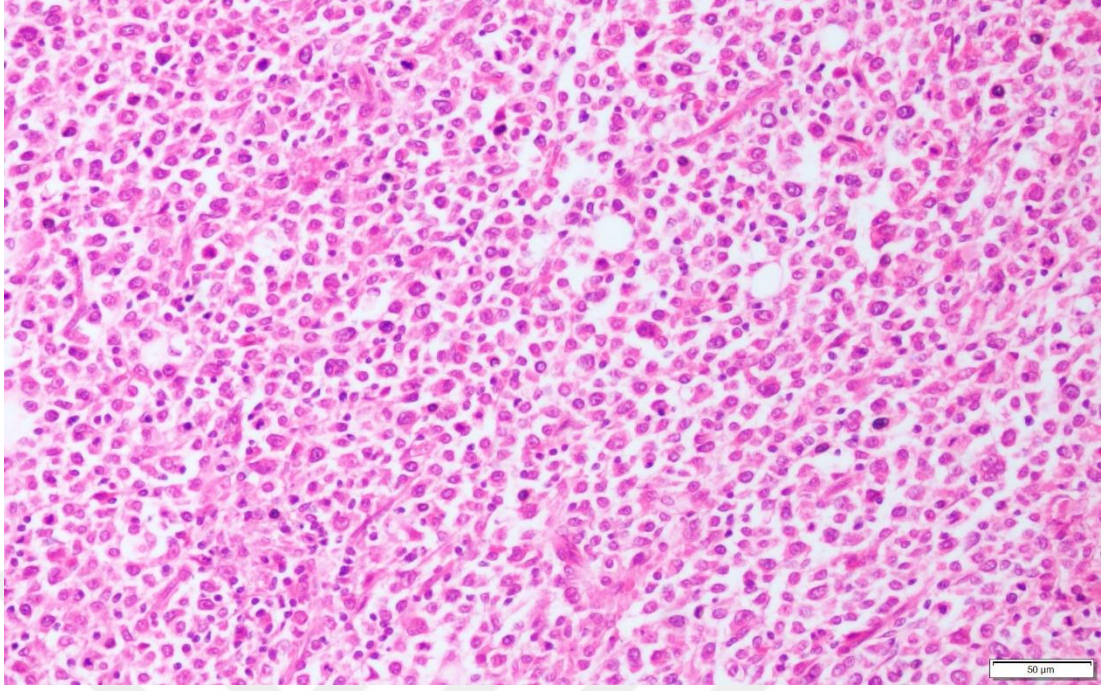
Şekil 4.13. Kutanöz histiyositoziste dermiste çoğunlukla perivasküler yerleşim gösteren histiyositik proliferasyonları, H&E, Bar=50µm.



Şekil 4.14. Kutanöz histiyositoziste ince fibrovasküler bağ dokuyla ayrılan histiyositik hücre proliferasyonları ve yoğun lenfosit infiltrasyonları, H&E, Bar=50µm.

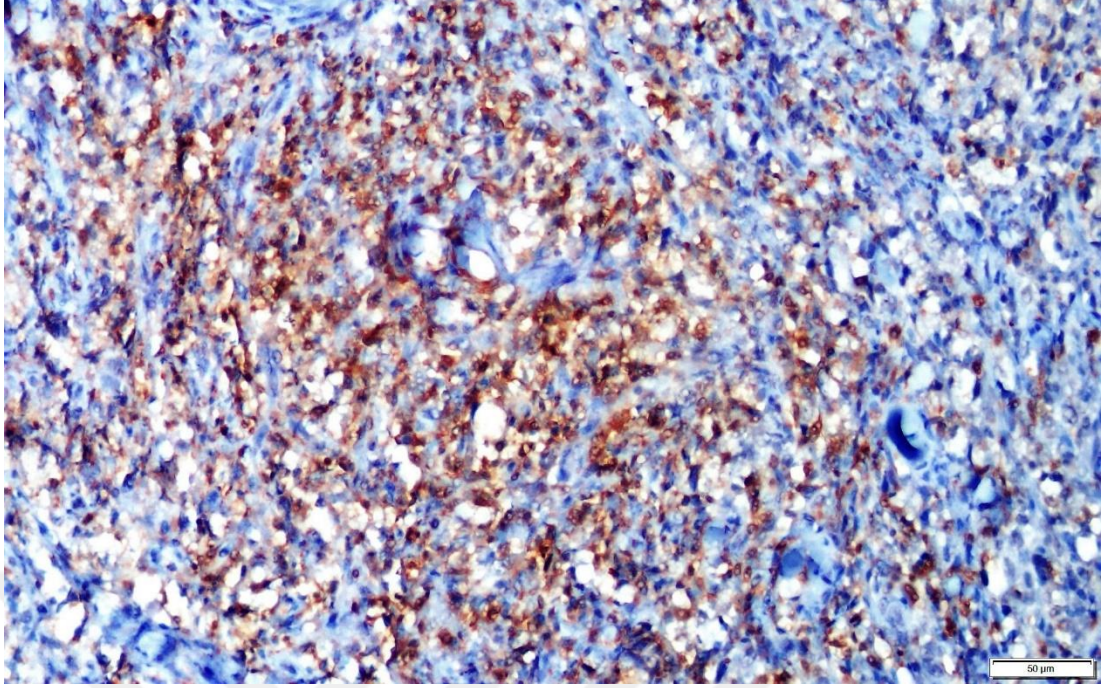


Şekil 4.15. Histiyoitik sarkoma olgusunda belirgin anizokaryozis ve yoğun mitotik aktivite sergileyen atipik neoplastik hücre proliferasyonları, H&E, Bar=50µm.

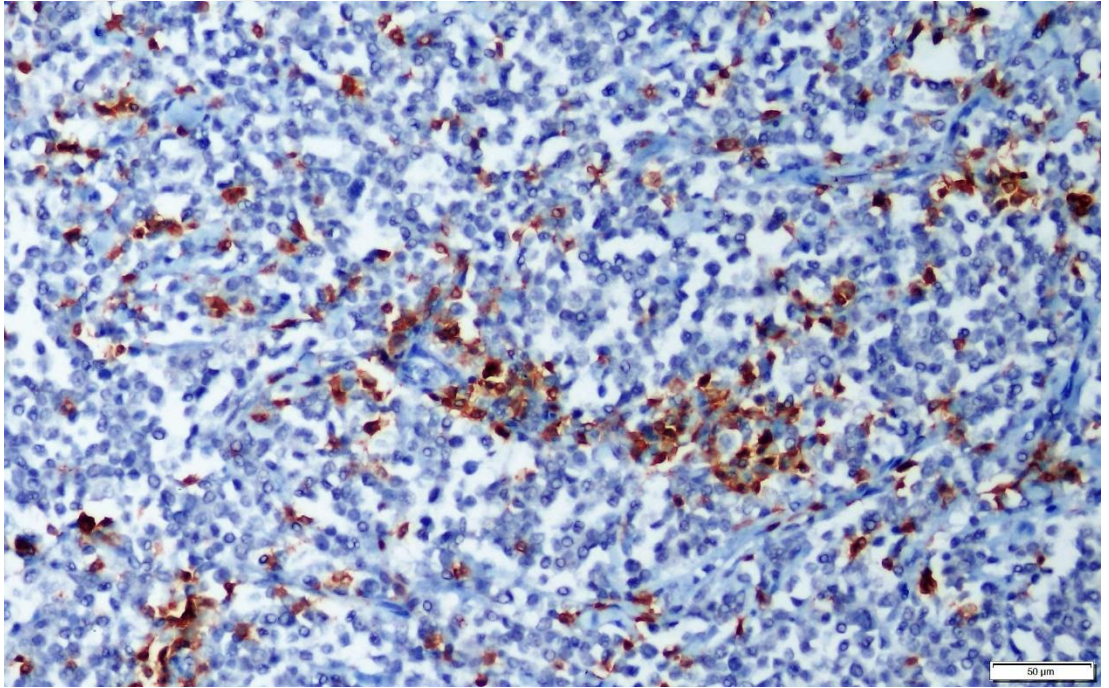


Şekil 4.16. Histiyoitik sarkoma olgusunda belirgin anizokaryozis ve mitotik aktivite ile yer yer dev hücre oluşumları gösteren neoplastik hücre proliferasyonları, H&E, Bar=50µm.

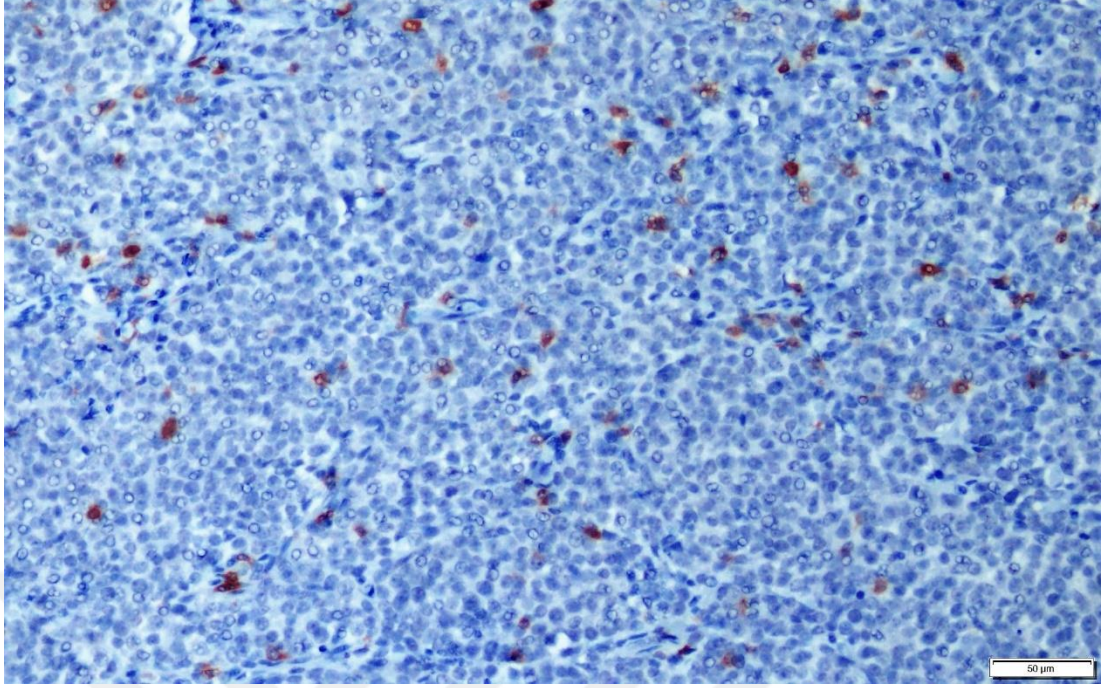
CD3 açısından yapılan skorlamada HS'ların dördünde skor 4 (Şekil 4.17), bir olguda ise 3 (Şekil 4.18) olarak belirlendi. Kutanöz histiyositomların birinde skor 1 (Şekil 4.19), ikisinde skor 2 (Şekil 4.20) ve birinde skor 4 (Şekil 4.21) olarak belirlendi. Kutanöz histiyositozis olgularının ise tümünde skor 4 olarak belirlendi (Şekil 4.22). FoxP3 açısından yapılan skorlamada HS tanılı olguların ikisinde skor 4 (Şekil 4.23), birinde skor 2 (Şekil 4.24) ve ikisinde skor 1 (Şekil 4.25) olarak belirlendi. Kutanöz histiyositomlarda bir olguda skor 3 (Şekil 4.26), bir olguda 2 (şekil 4.27) ve iki olguda 1 (şekil 4.28) olarak ortaya konuldu. Kutanöz histiyositozis olgularının ise ikisinde skor 2 (Şekil 4.29), birinde ise skor 1 (Şekil 4.30) olarak belirlendi. Son olarak VEGF pozitifliği açısından yapılan değerlendirmelerde histiyositik sarkoma olgularının birinde skor 1 (Şekil 4.31), üçünde skor 3 (Şekil 4.32) ve birinde skor 4 (Şekil 4.33) olarak, kutanöz histiyositomların birinde skor 1 (Şekil 4.34), ikisinde skor 2 (Şekil 4.35) ve birinde skor 4 (Şekil 4.36) olarak, kutanöz histiyositozis olgularının ise tümünde skor 2 (Şekil 4.37) olarak belirlendi. İmmün boyama pozitiflikleri ve skorları Tablo 1'de verilmiştir.



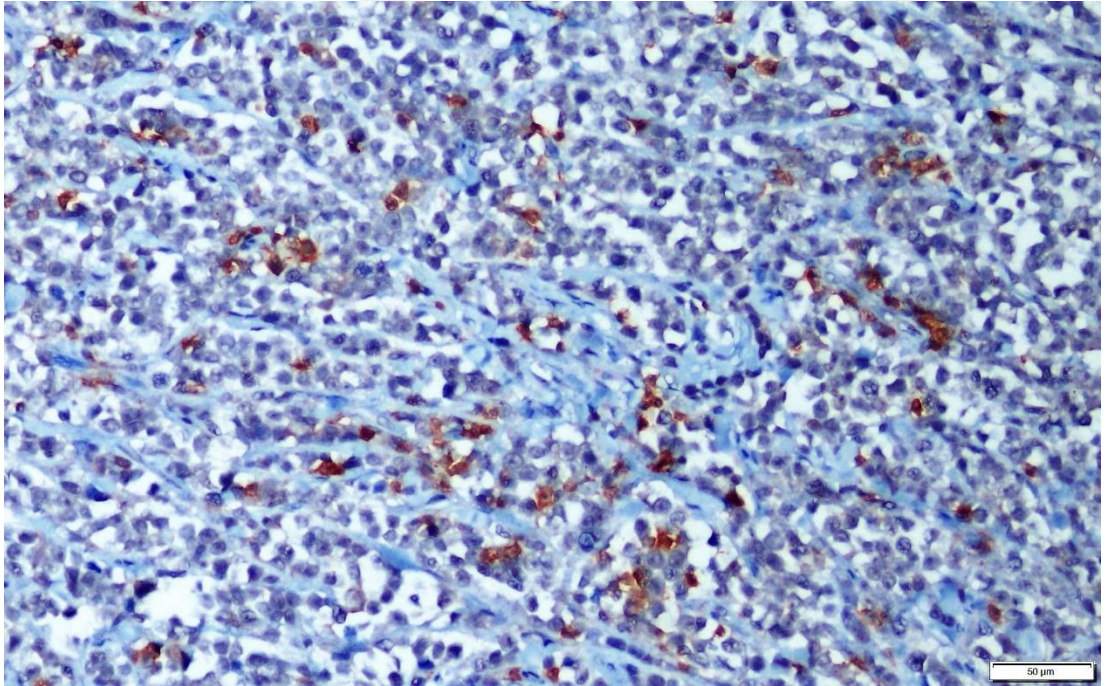
Şekil 4.17. Histiyositik sarkoma olgusunda çok yoğun CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



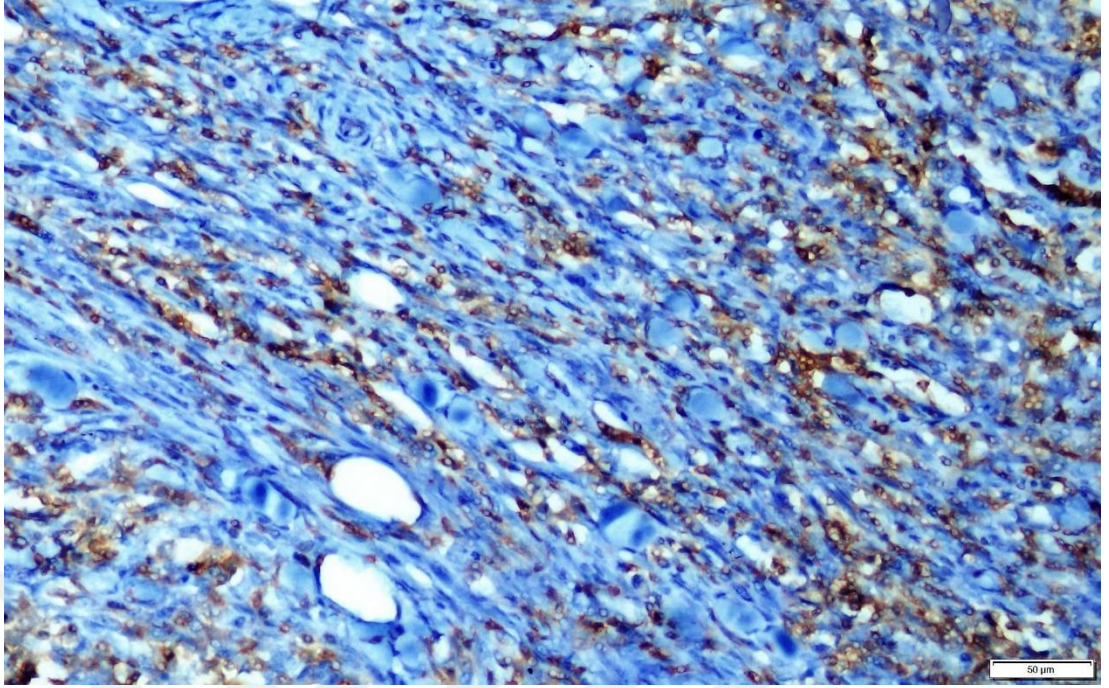
Şekil 4.18. Histiyositik sarkoma olgusunda yoğun CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



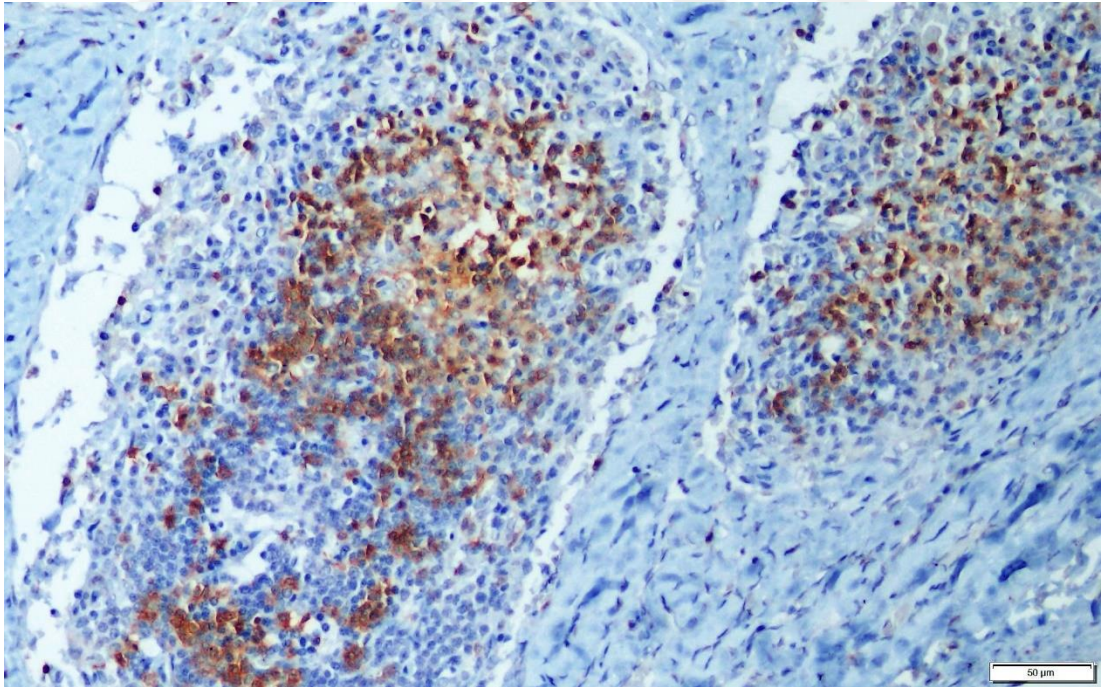
Şekil 4.19. Kutanöz histiyositom olgusunda hafif dereceli CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



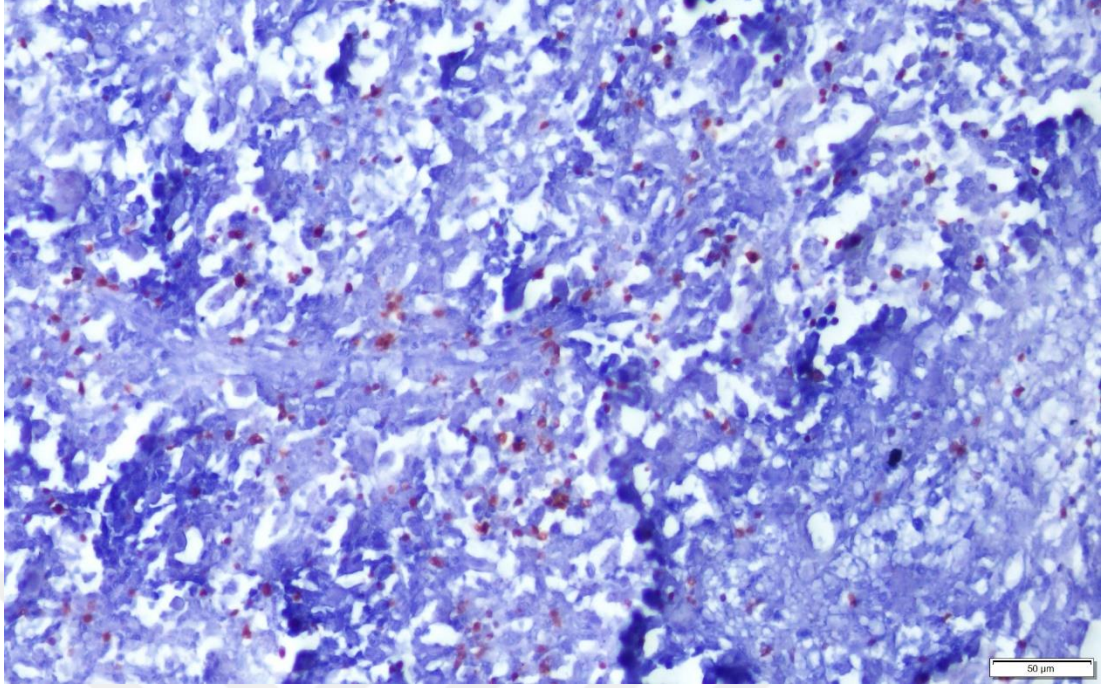
Şekil 4.20. Kutanöz histiyositom olgusunda orta dereceli CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



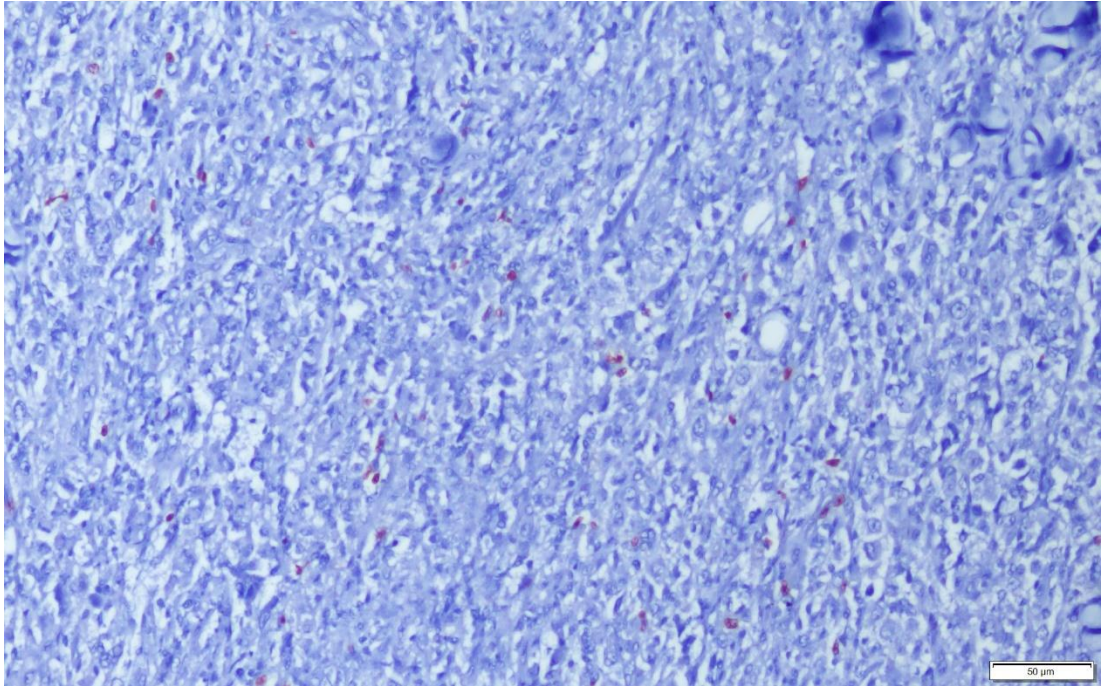
Şekil 4.21. Kutanöz histiyositom olgusunda çok yoğun CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



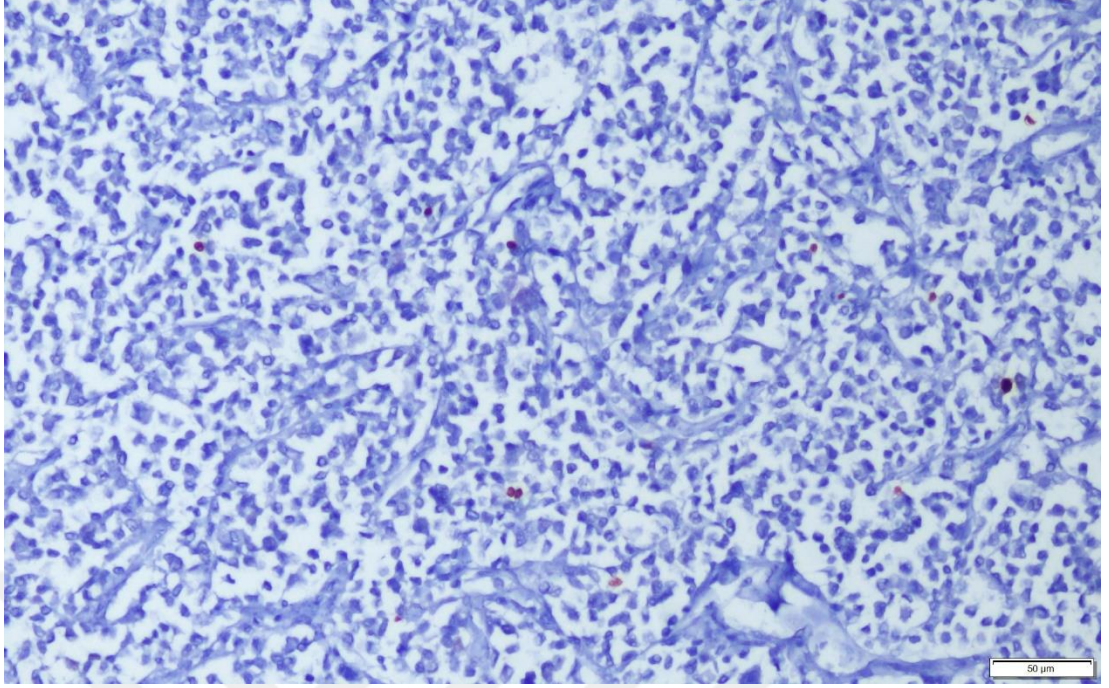
Şekil 4.22. Kutanöz histiyositozis olgusunda çok yoğun CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



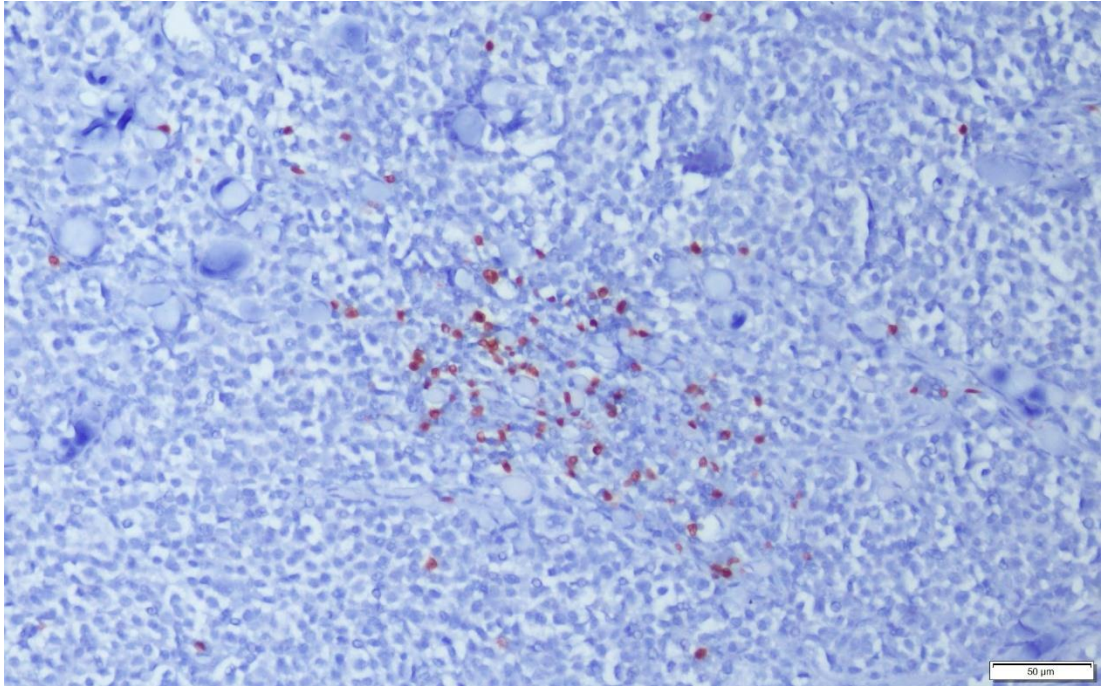
Şekil 4.23. Hemafagositik histiyositik sarkoma olgusunda çok yoğun FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



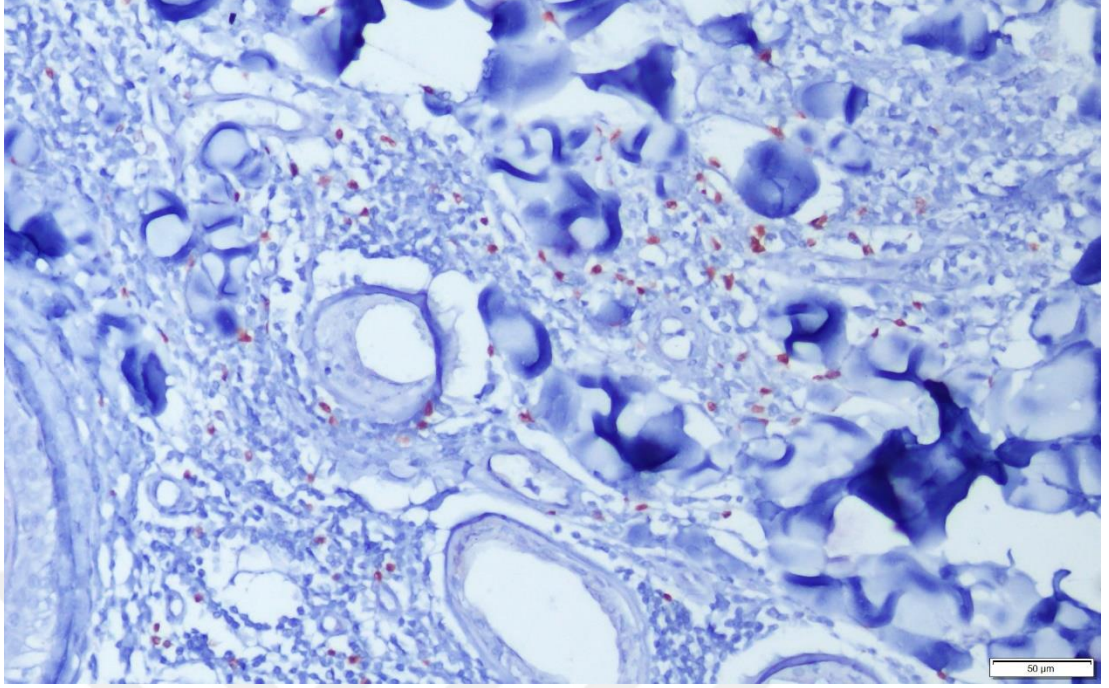
Şekil 4.24. Histiyoitik sarkoma olgusunda orta dereceli FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



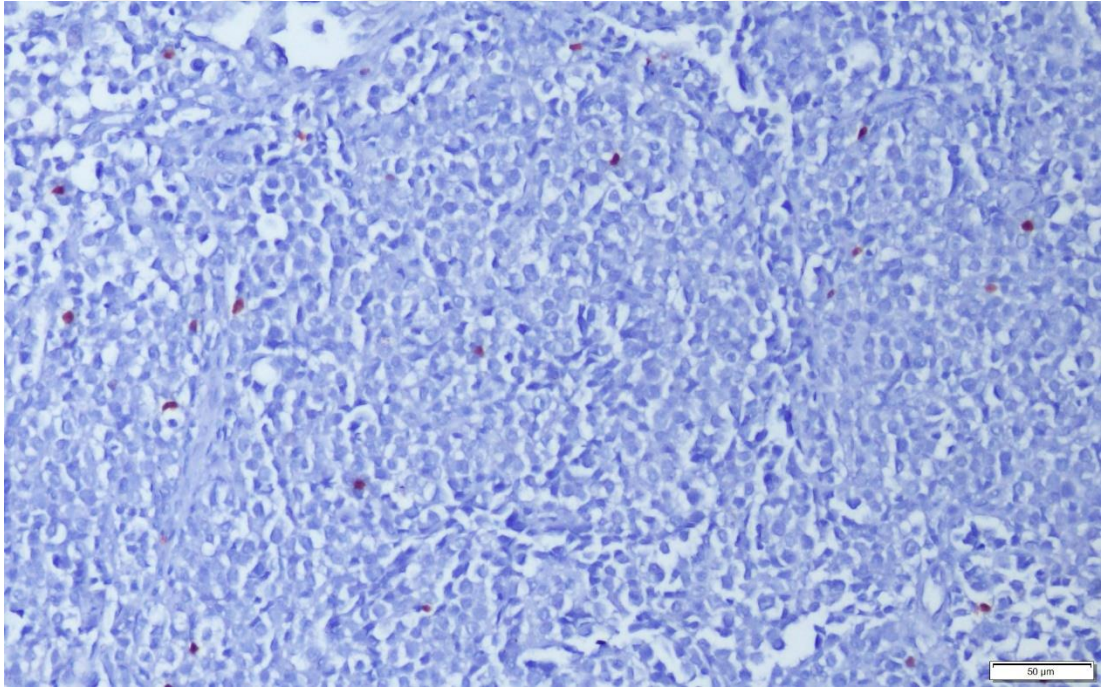
Şekil 4.25. Histiyoitik sarkoma olgusunda hafif FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



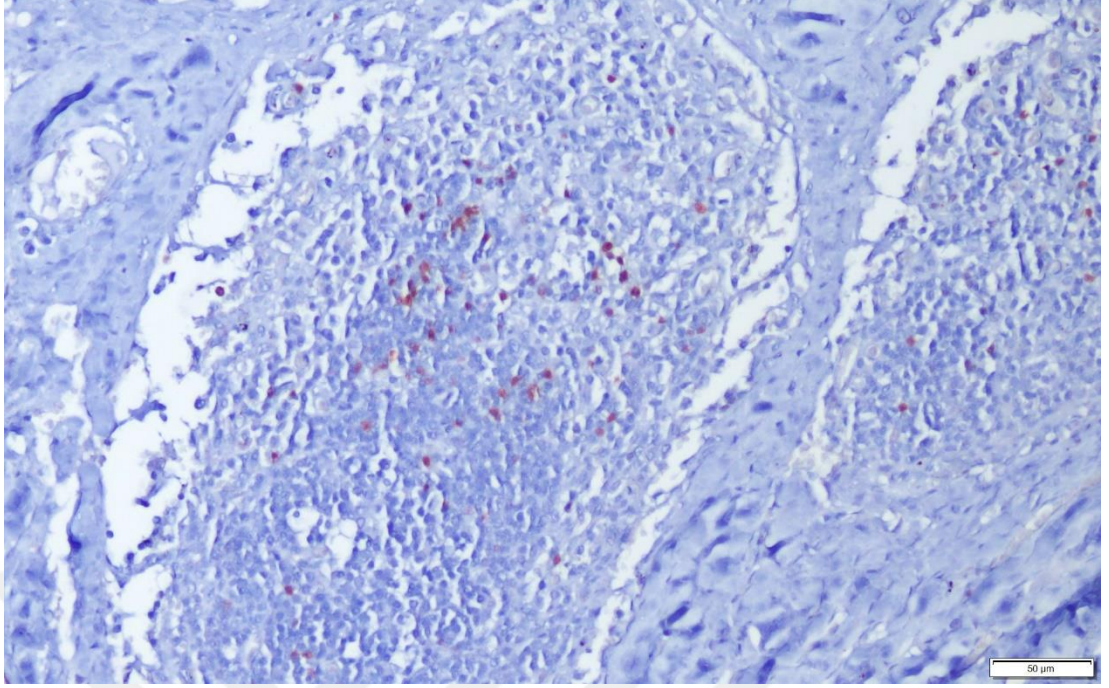
Şekil 4.26. Kutanöz histiyositoma olgusunda yoğun FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



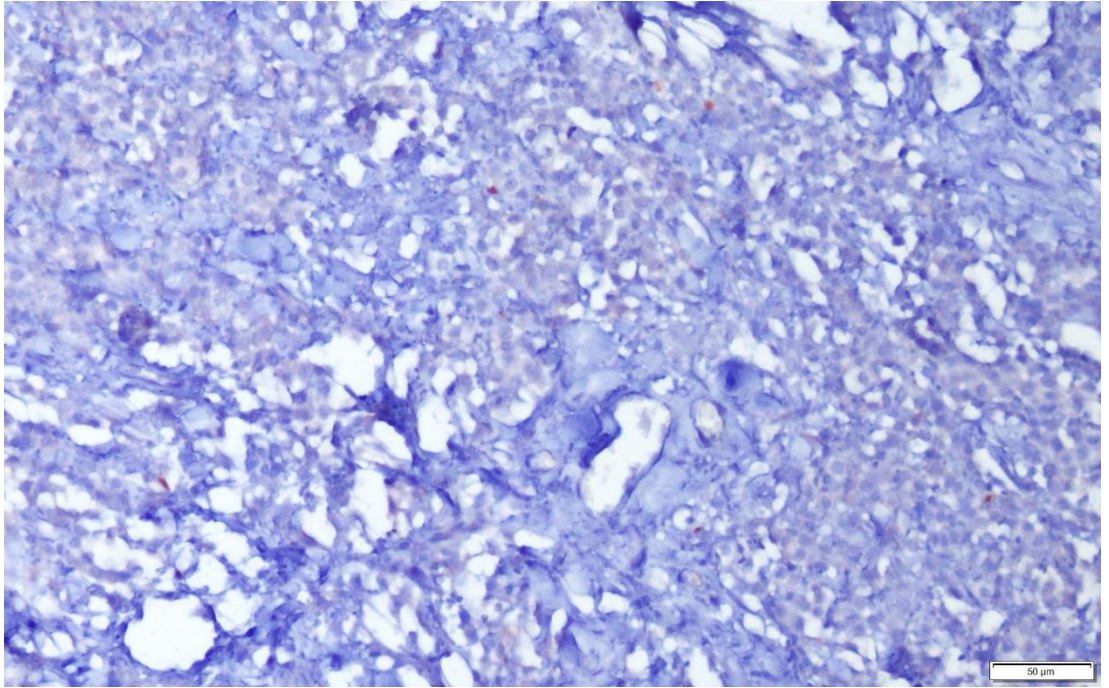
Şekil 4.27. Kutanöz histiyositom olgusunda orta dereceli FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



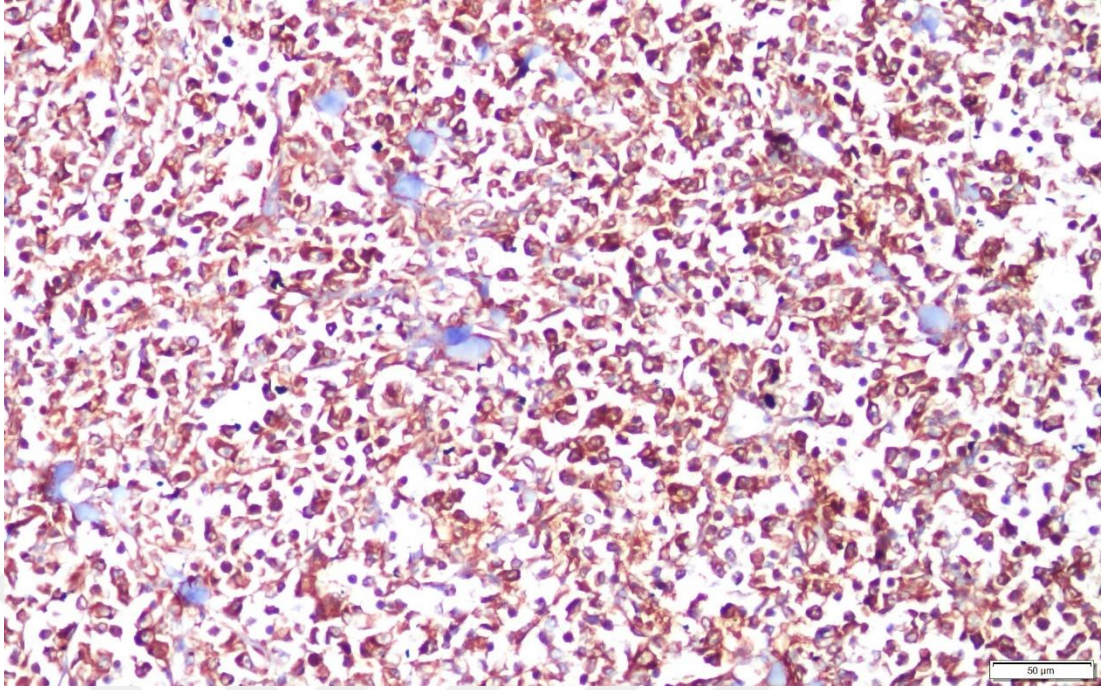
Şekil 4.28. Kutanöz histiyositom olgusunda hafif dereceli FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



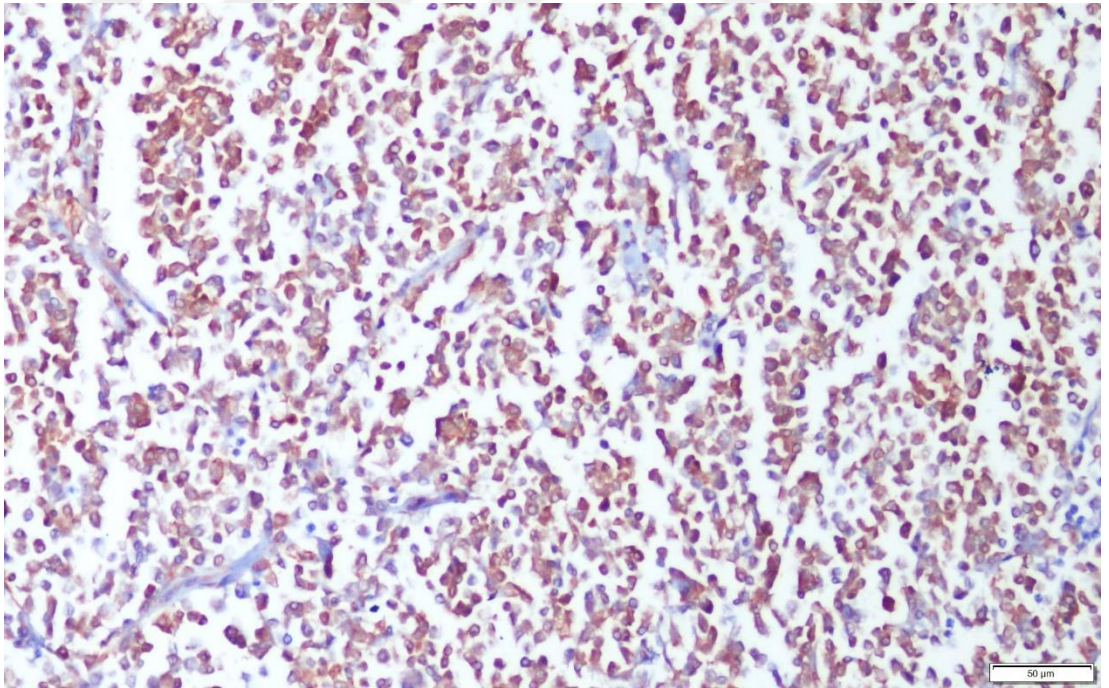
Şekil 4.29. Kutanöz histiyositozis olgusunda orta dereceli FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



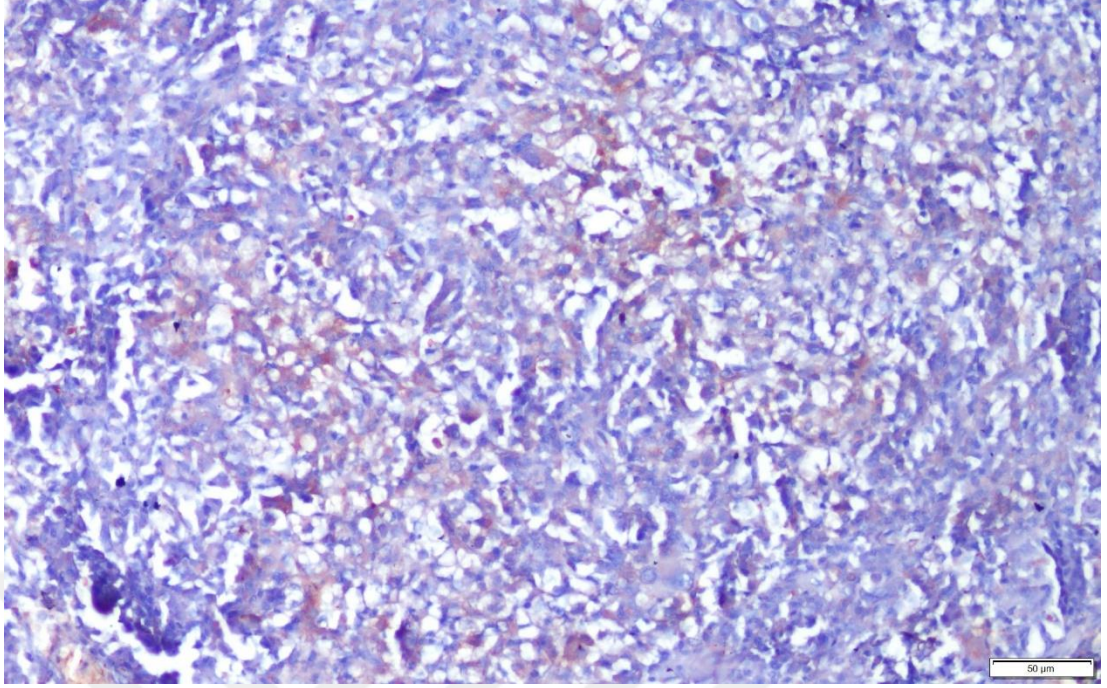
Şekil 4.30. Kutanöz histiyositozis olgusunda hafif dereceli FoxP3 pozitif hücre infiltrasyonları, DAB, Bar=50µm.



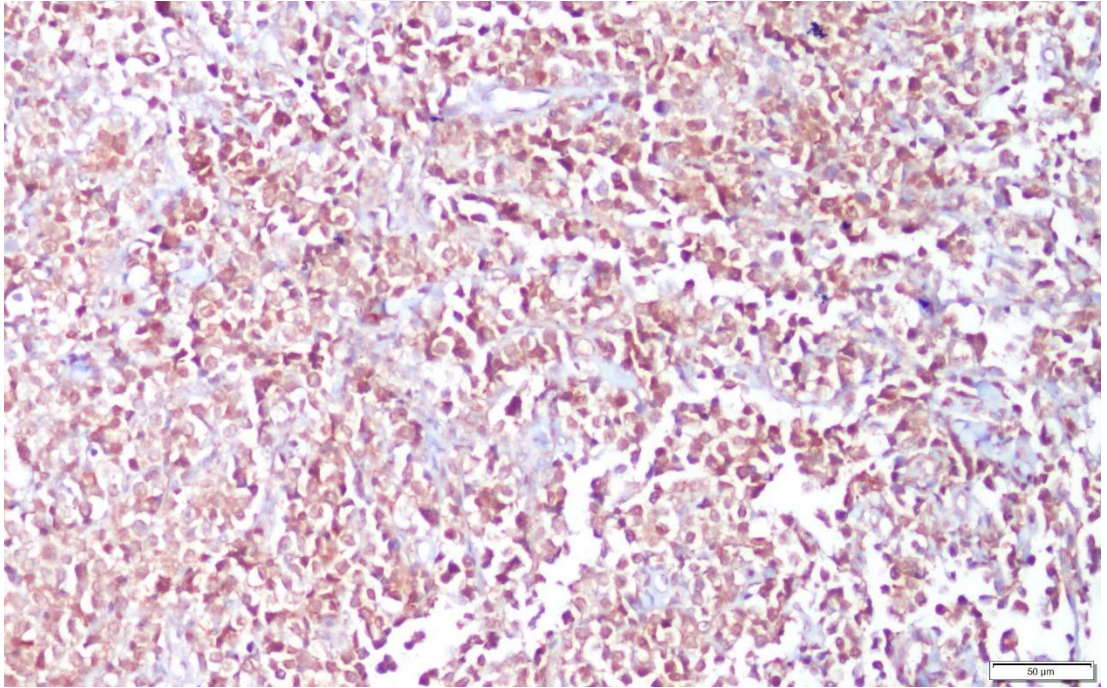
Şekil 4.31. Histiyoitik sarkoma olgusunda çok yoğun VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.



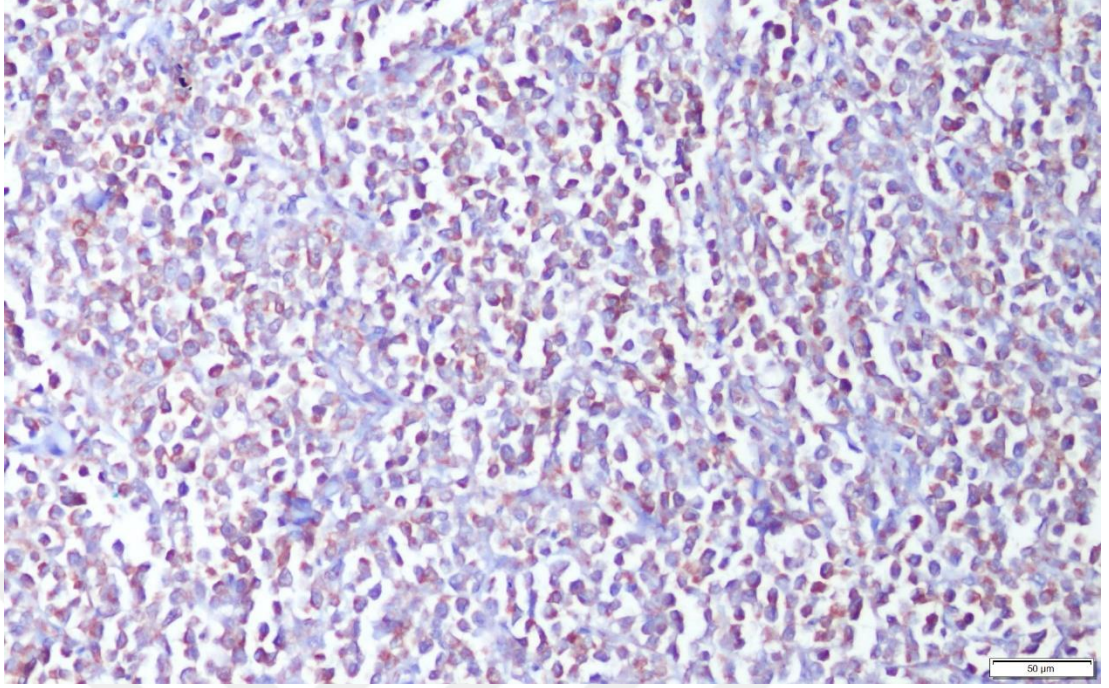
Şekil 4.32. Histiyoitik sarkoma olgusunda yoğun VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.



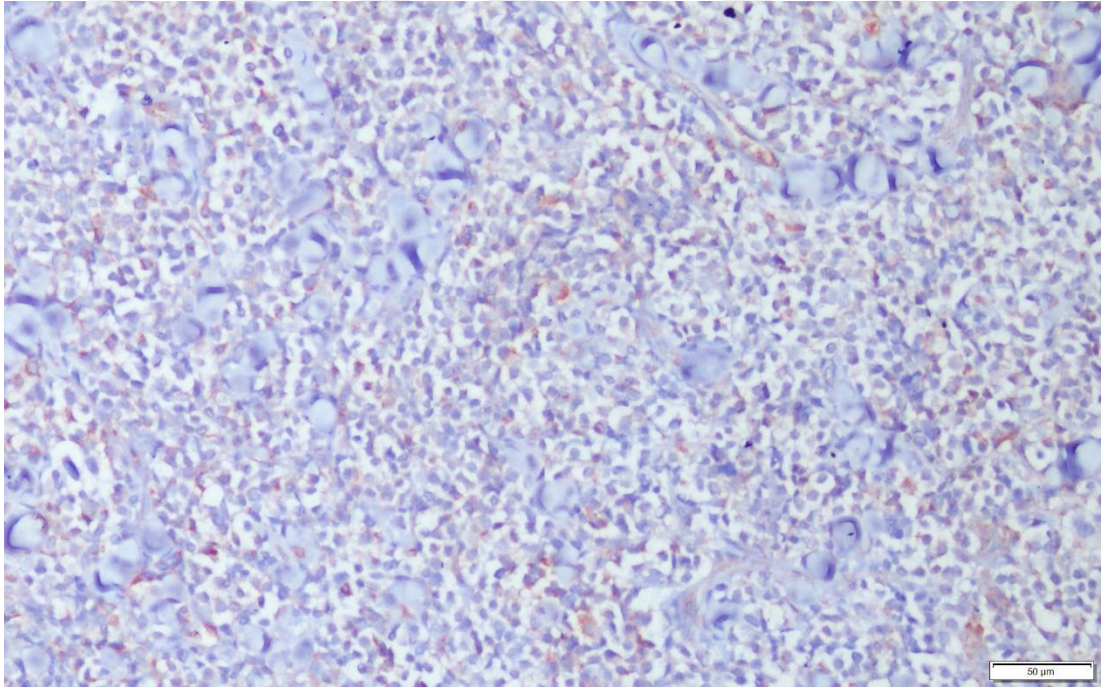
Şekil 4.33. Hemofagositik histiyositik sarkoma olgusunda hafif dereceli VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.



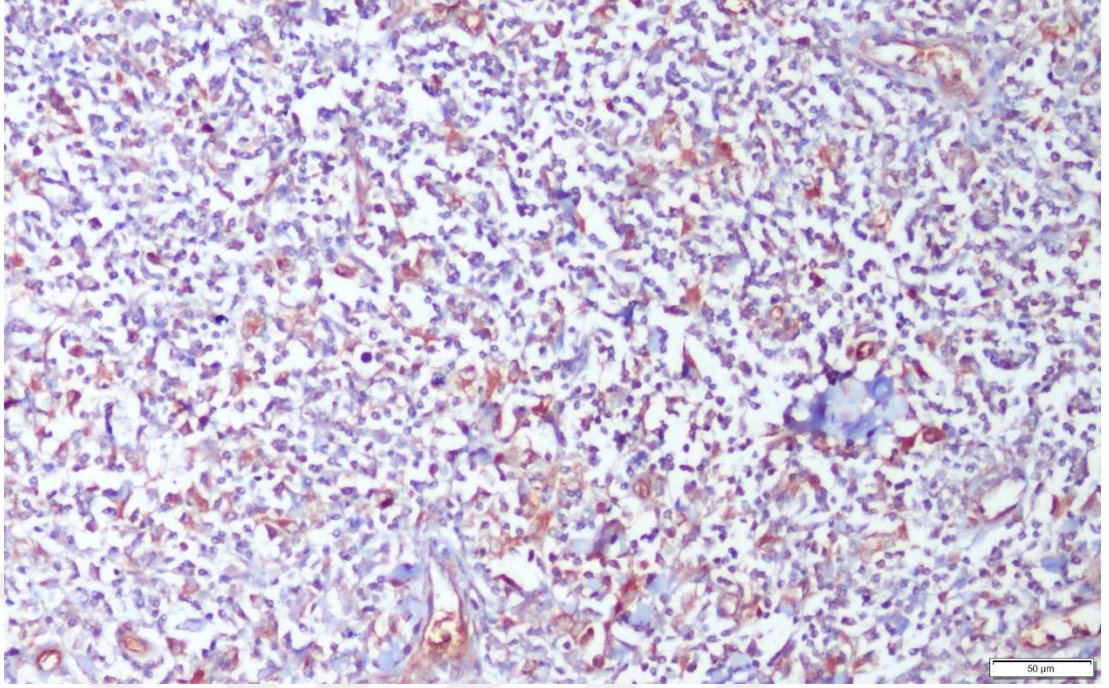
Şekil 4.34. Kutanöz histiyositoma olgusunda çok yoğun VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.



Şekil 4.35. Kutanöz histiyositoma olgusunda orta dereceli VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.



Şekil 4.36. Kutanöz histiyositom olgusunda hafif dereceli VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50µm.



Şekil 4.37. Kutanöz histiyositozis olgusunda orta dereceli VEGF pozitifliği, DAB, Bar=50

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan histiyositik tümörlü köpeklerle ait bilgiler ve immunohistokimyasal boyama sonuçları.

No	Tür	İrk	Cinsiyet	Yaş	Yerleşim	Tanı	Iba-1	E-Cadherin	CD3 Skoru	FoxP3 Skoru	VEGF Skoru
1.	Köpek	-	Dişi	1 yaş	Sol ön ekstremité	CCH	+	+	1	3	1
2.	Köpek	Mix	Erkek	3 yaş	Oküler	CCH	+	-	2	1	4
3.	Köpek	-	Erkek	4 yaş	Oküler	CCH	+	-	2	1	2
4.	Köpek	French Bulldog	Erkek	6 yaş	Sağ ve sol kalça bölgesi	CCH	+	-	4	2	2
5.	Köpek	Sivas Kangalı	Erkek	6 yaş	Arka ekstremité çok sayıda	CH	+	-	4	2	2
6.	Köpek	-	Erkek	4 ay	Dudak	CH	+	-	4	2	2
7.	Köpek	-	Dişi	11 yaş	Vagina	CH	+	-	4	1	4
8.	Köpek	Mix	Dişi	1 yaş	Konjunktiva	HS	+	-	4	1	4
9.	Köpek	-	-	-	Boyun bölgesi	HS	+	-	4	4	3
10.	Köpek	Terrier	Dişi	14 yaş	Yanak bölgesi	HS	+	+	3	1	3
11.	Köpek	-	-	-	Deri	HS	+	-	4	2	3
12.	Köpek	-	-	10 yaş	Dalak	Hemofagositik HS	+	-	4	4	1

CCH / CH : Köpek kutanöz histiyositoma / Kutanöz histiyositozis
HS / Hemofagositik HS : Histiyositik sarkoma / Hemofagositik histiyositik sarkom

4.2. İstatistiksel Bulgular

Kutanöz histiyositom, kutanöz histiyositozis ve HS olgularındaki CD3 skorları açısından yapılan istatistiksel karşılaştırmada kutanöz histiyositozis ve HS olgularında CD3 yoğunluğunun kutanöz histiyositomaya göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi ($P<0,05$). FoxP3 ve VEGF skorları açısından yapılan karşılaştırmalarda ise bu tümörler arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Bulgular Tablo 4.2’de sunulmuştur.

Pearson korelasyon analizine göre CD3 ve FOXP3 ile CD3 ve VEGF arasında anlamlı bir ilişki bulunmazken, FoxP3 ve VEGF arasında -0,595 r değeri ile orta derecede anlamlı bir negatif bir korelasyon tespit edildi ($P<0,05$). Bulgular Tablo 4.3’te sunulmuştur.

Tablo 4.2. CD3, FOXP3 ve VEGF skorlarına ait istatistiksel veriler.

Group	CD3	FOXP3	VEGF
CCH	2,250±0,629 ^b	1,750±0,479 ^a	2,250±0,629 ^a
CH	4,000±0,000 ^a	1,667±0,333 ^a	2,667±0,667 ^a
HS	3,800±0,200 ^a	2,400±0,678 ^a	2,800±0,490 ^a
P value	0,024*	0,788	0,709

* $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

a,b: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan veriler anlamlıdır.

CCH / CH : Köpek kutanöz histiyositoma / Kutanöz histiyositozis

HS : Histiyositik sarkoma

Tablo 4.3. CD3, FOXP3 ve VEGF skorlarının Pearson korelasyon testi karşılaştırmaları.

		CD3	FOXP3
FOXP3	Pearson correlation	0,150	
	Sig. (2-tailed)	0,641	
VEGF	Pearson correlation	0,208	-0,595
	Sig. (2-tailed)	0,516	0,041

5. TARTIŞMA

Köpeklerde iyi tanımlanmış farklı histiyositik proliferatif hastalıklar bulunmaktadır. CCH Langerhans hücre özelliğindedir ve kendiliğinden regrese olabilen iyi huylu bir tümördür. Bunun yanında kutanöz Langerhans hücre histiyositozisi ise multiple kutanöz lezyonlardan, lenf yumrularına ve iç organlara yayılabilen karakterde farklı bir hastalık grubu olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat bireysel deri lezyonları CCH ile benzerlikler göstermektedir. Bu tümörler dışında reaktif histiyositozis (kutanöz ve sistemik) interstisyel dendritik hücrelerin aktivasyonu sonucu oluşan proliferatif bir bozukluktur. Reaktif histiyositozis yoğun lenfositten zengin infiltrasyonlara sahiptir. HS'da interstisyel dendritik hücrelerden köken alan kompleks ve kötü huylu bir tümördür ve dalak, lenf yumrusu, akciğer, kemik iliği, deri, subkutis, beyin ve artiküler bölgelerde şekillenebilir. HS'lar interstisyel dendritik hücrelerden köken almakla birlikte farklı bir varyant olan hemofagositik HS dalağın kırmızı pulpasındaki makrofajlardan köken almaktadır (Moore, 2017). Çalışmamızda üç histiyositom, dört CH, dört HS ve bir hemofagositik HS tanısı konulmuştur. Histopatolojik olarak histiyositomlar epidermotropik özellik sergiler ve genellikle epidermal invazivdirler (Moore, 2017). Bir vaka çalışmasında kutanöz histiyositomlarda %60 üzeri bir oranda histiyositlerin bireysel veya kümeler halinde epidermisi invaze ettikleri gözlenmiştir (Moore ve ark., 1996). Epidermal invazyon özelliği CH olgularında ise gözlenmemekte, bunun yerine bu tümörlerde derin dermiste ve subkutiste perivasküler histiyosit infiltrasyonları daha öne çıkmaktadır (Moore, 2017). Biz de çalışmamızda histopatolojik olarak benign karakter sergileyen histiyositik hastalıklarda epidermal invazyon varlığını değerlendirdik ve bu durumun gözleendiği olgularda CCH tanısı koyduk. Aksine epidermal invazyonun bulunmadığı ve perivasküler infiltrasyonların dikkati çektiği olgularda ise CH tanısı konuldu.

Histiyositik tümörler LC, DC ve makrofajlardan köken alabilir. Bu tümörlerin ayırıcı tanısında öncelikle histiyositik kökenin doğrulanması gerekmektedir. Çalışmamızda bu amaçla Iba-1 (ionized calcium binding adaptor protein) ve E-kaderin kullanılmıştır. Iba-1 spesifik olarak mikrogiaları da içeren monosit/makrofaj soyundaki hücrelerde eksprese olmaktadır (Schulze ve ark., 2008; Kohler, 2007). Iba-

Iba-1'in tüm kanin histiyositik tümörlerinde pozitif olduğu bildirilmektedir (Moore, 2017). Iba-1'in CCH, HS ve reaktif histiyositoziste güçlü pozitif olduğu fakat diğer yuvarlak hücre tümörlerinde (melanoma, lenfoma, mastositoma ve plazmasitoma) negatif olduğu gösterilmiştir (Pierezan ve ark., 2014). Çalışmamızda 21 adet histiyositik tümör tanımlı tümörden yalnızca 12 tanesinde tümöral hücrelerin yoğun Iba-1 pozitifliği gösterdiği fakat 9 tanesinde yalnızca tümör dokusu içerisinde değişen oranlarda histiyositik hücre infiltrasyonları bulunduğu dikkati çekti. Iba-1'in güvenilir bir histiyositik hücre belirteci olmasından dolayı bu 9 tümör çalışmadan çıkarıldı.

Lökositler arasında, E-kaderin sunumu LC'ye özgüdür ve spesifik olarak histiyositomların tanısında kullanılır (Moore, 2004). E-kaderin ekspresyonu CCH'daki Langerhans hücre farklılaşmasının değerli bir göstergesi olmakla birlikte bu tümörlerdeki E-kaderin ekspresyonunun insidensi bilinmemektedir, bununla beraber E-kaderin ekspresyonu göstermeyen kutanöz histiyositomların varlığı bilinmektedir (Moore, 2014). Ramos-Vara ve Miller (2011) 116 köpek yuvarlak hücre tümöründe E-kaderin varlığını incelemiş ve 95 olguda (13 kutanöz histiyositom, 54 plazmasitom, 14 mastositom, 10 epitelyotropik lenfom ve 5 histiyositik sarkom) E-kaderin pozitifliği gözlemişlerdir. Hirako ve arkadaşları (2015) bir Pembroke Welsh Corgi ırkı köpekte Langerhans hücre kökenli primer kutanöz HS rapor etmişler ve bu tümörün Iba-1 ile birlikte E-kaderin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Pazdzior-Czapula ve arkadaşları (2015) iki histiyositik sarkomda E-kaderin pozitifliği bildirmişlerdir. Ipek ve arkadaşlarının (2021) çalışmasında 3 HS'da E-kaderin pozitifliği gözlenmiş fakat 4 CCH'dan üçünde ve bir malignant histiyositoziste E-kaderin negatif olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde dört histiyositom olgusundan yalnızca birinde E-kaderin pozitifliği görülmüştür. CH tanımlı olgularda E-kaderin negatif bulunurken, 5 HS'dan yalnızca birinde E-kaderinin pozitif olduğu görülmüştür.

FoxP3, X kromozomu kodlu, hücre içi forkhead transkripsiyon faktörü, doğal Treg'lerin baskılayıcı fenotipi için temel bir faktör olarak tanımlanmıştır ve fare Treglerinin oldukça spesifik bir işaretleyicisidir. FoxP3 ayrıca insan Treg'lerinde istikrarlı bir şekilde upregüle edilir (Fontenot ve ark., 2003; Walker ve ark., 2003). Treg'lerin insan ve hayvan kanserindeki rolüne yoğun bir ilgi vardır (Beyer ve Schultze

2006; Biller ve ark., 2010). İnsan kanser hastalarında periferik kanda, lenf nodüllerinde ve çeşitli neoplazilerde CD4 + CD25 + FoxP3 + Treg sayısında artış gözlenmiştir ve bu artış genellikle kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (Bates ve ark., 2006; Biller ve ark., 2010; Curiel, 2007; O'Neill ve ark., 2009; Tominaga ve ark., 2010; Wolf ve ark., 2003). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda prognostik bir değer bulunamamış (Grabenbauer ve ark., 2006) fakat bazı çalışmalarda tümörlerdeki FOXP3+ Treg varlığının daha olumlu bir prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Carreras ve ark., 2006). Treg'lerin sağlıklı ve kanser taşıyan köpeklerde varlığı da belgelenmiştir; Melanom, osteosarkom, meme bezi adenokarsinomu ve lenfomalı köpeklerin periferik kanlarında artan sayıda Treg'lere sahip oldukları gösterilmiştir (Biller ve ark., 2010; O'Neill ve ark., 2009; Tominaga ve ark., 2010). Treg'lerin varlığı köpeklerin tümöral dokularında da araştırılmıştır (Miller ve ark., 2006; Oh ve ark., 2012). Köpek neoplazmalarındaki Treg'lerin sayısı, kanserli köpeklerin periferik kanındaki Treg'lere kıyasla önemli ölçüde fazla bulunmuştur, bunun nedeni olarak ise neoplastik hücrelerin varlığının, tümör infiltrasyonlu bölgelere Treg'lerin lokal proliferasyonunu ya da seçici göçünü indüklediği düşünülmektedir (Oh ve ark., 2012). Canine CD4+ FoxP3+ Treg'lerin, immünoşüpresif özellikteki IL-10 ve TGF-beta üretimini artırdığı gösterilmiştir, ancak köpek Treg'lerin prognostik etkileri ile ilgili çalışmalar hala sınırlıdır (Abrams ve ark., 2009). Çalışmamızda histiyositoma, CH ve HS'lar arasında FoxP3 pozitif lenfosit yoğunluğu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bundan dolayı FoxP3 pozitif Treg'lerin malignite ile bir ilişkisi ortaya konulamamıştır. Belluco ve arkadaşları (2020) kanin kutanöz histiyositomlarda CD3 ve FoxP3 pozitif lenfosit infiltrasyonları arasında bir korelasyon olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda da CD3 ve FoxP3 pozitif lenfosit infiltrasyonları arasındaki korelasyonun önemsiz olduğu görülmüştür.

Geçtiğimiz yıllarda insan onkolojisinde yapılan çalışmalar kanser hastalarında Treg'in rolüne odaklanmıştır. Histopatolojik analizler sonucunda, bağışıklık hücrelerinin sıklıkla tümör mikro ortamına sızdığını doğrulanmıştır (Carvalho ve ark., 2014; Sakai ve ark., 2018). İnsan kanserlerinde kötü prognoza sahip ve yüksek Treg infiltrasyonlarının bulunduğu raporlarda, CD4+ CD25+ T hücrelerinin anti-tümöral aktiviteyi azalttıkları ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, asıl mekanizmalar tam olarak

anlaşılmamıştır (Liu ve ark., 2016; Sakaguchi ve ark., 2008; Sakai ve ark., 2018; Wang ve ark., 2012). Bu hücrelerin bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi, daha önce tarif edildiği gibi, zararlı olabilecek şiddetli immun yanıt oluşumunu önler, ancak aynı zamanda neoplastik büyümeyi ve yayılmayı destekleyici özellikler de gösterir (Biller ve ark., 2007). İnsanlarda olduğu gibi, köpeklerde de seminom, intestinal lenfoma, meme karsinomu ve HS dahil olmak üzere çok sayıda tümörde çok sayıda infiltrate Treg'ler gözlenmiştir (Carvalho ve ark., 2016a; Kim ve ark., 2013; Maeda ve ark., 2016; Marcinowska ve ark., 2017). Ayrıca meme karsinomunda daha yüksek bir Treg infiltrasyonu, yüksek histolojik derece, lenfatik invazyon ve doku nekrozu gibi zayıf prognostik faktörlerle ilişkilendirilmiştir (Kim ve ark., 2012; Sakai ve ark., 2018). Başka bir çalışmada, sağlıklı köpeklerin periferik kanındaki CD4 + FoxP3 + T hücreleri tanımlanmıştır. Bu çalışmada T hücrelerinin %4,3'ü CD4+ FoxP3+ olarak belirlenmiş ve bu değer kanserden etkilenen köpeklerde %7,5 oranında tespit edilmiştir. Benzer bir artış, normal yüzdenin %9.8 olduğu ve tümörlü lenf düğümlerindeki yüzdenin %17.1 olduğu lenf düğümlerinde de gösterilmiştir (Biller ve ark., 2007). Garden ve arkadaşlarının (Garden ve ark., 2011) yaptıkları bir çalışmada tüm tümör türlerinde metastaz varlığı, CD4+ FoxP3+ hücrelerinin yüksek oranda infiltrasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda histiyositom ve CH olgularında düşük/orta dereceli FoxP3 pozitif lenfosit infiltrasyonları varken, iki HS olgusunda yüksek dereceli infiltrasyon görülmüştür. Tümörler arasında bu tür bir farklılık bulunmakla birlikte bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu nedenle FoxP3 pozitif lenfosit infiltrasyonlarının direk olarak maligniteyle ilişkisi olmadığı düşünülmüştür. Bununla beraber CD3 pozitif T hücrelerinin CH ve HS da histiyositom olgularına göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu da FoxP3 pozitifliği göstermese de T lenfosit yoğunluğunun malignite ile ilişkili olabileceğine işaret edebilir. Nitekim Marcinowska ve arkadaşları (2017) histiyositik sarkomlu 40 köpekte yaptıkları çalışmada CD3 ve FoxP3 infiltrasyonlarını değerlendirmiş ve FoxP3 infiltrasyonlarının disemine ve daha malign özellik gösteren splenik HS'ya nazaran daha iyi prognoz gösteren yumuşak doku HS'larında daha yüksek bir yüzdelikte bulunduğunu gözlemişlerdir. Çalışmamızda düşük numune sayısı nedeniyle bu tür bir karşılaştırma yapılamamakla birlikte, dalakta gözlenen hemofagositik HS olgusunda

FoxP3 skoru yüksek olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber bir yumuşak doku HS'sında da skor yüksek olarak bulunmuştur.

Li ve arkadaşları (2018) FoxP3'ün meme tümörlerinde angiogenezi VEGF'yi downregüle etmek suretiyle baskıladığını bildirmişlerdir. Bununla beraber bazı çalışmalarda FoxP3'ün çeşitli kanserlerde angiogenezin artışı ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Giatromanolaki ve ark., 2008; Zhan ve ark., 2012) Luznik ve arkadaşları (2020) Treg'lerin angiogenezisteki rollerini değerlendirdikleri bir derlemede, Treg'lerin angiogenezisteki rollerinin doku ve hastalık spesifik olarak değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Geçmiş çalışmalara bakıldığında Treg'lerin malignitelerde ve reproduktif patolojilerde artan angiogenezisle fakat tersine doku iskemisi, kronik yangı ve oküler dokularda angiogeneziste düşüş ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Fakat bu tür çalışmaların genellikle yalnızca korelasyon düzeyinde kaldığı ve FoxP3 ile angiogenezis arasındaki ilişkinin henüz tam netlik kazanmadığını da vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda ise kanin histiyositik hastalıkların tümünde düşükten yükseğe değişen oranlarda FoxP3 infiltrasyonları görüldü. FoxP3 ve VEGF skorlamalarının korelasyon analizi sonucunda ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ve orta dereceli bir negatif korelasyon belirlendi. Bu bulgu Li ve arkadaşlarının (2018) çalışmasıyla uyumlu olarak kanin histiyositik hastalıklarda FoxP3+ Treg'lerin VEGF aracılı angiogenezi baskıladığına işaret edebilir. Muir ve arkadaşları (2017) kanin B lenfomalarında FoxP3+ hücrelerin varlığının neoplastik hücre proliferasyonu belirteci olan Ki67 ile bir ilişkisinin olmadığını ortaya koymuşlardır. Carreras ve arkadaşları (2006) da foliküler lenfomalarda FoxP3+ Treg'lerin artan yaşam süresiyle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu bilgiler ışığında FoxP3+ Treg'ler bazı kanser türlerinde kötü prognozla ilişkiliyken, bazılarında da belirsiz veya daha iyi bir prognozla ilişkili olabildiği görülmektedir. Çalışmamızda prognoz açısından vaka takibi maalesef yapılamamış fakat olguların malignitesi ve angiogenezis düzeyleri açısından bir yorumlamaya gidilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut bazı kanser tedavilerinin Treg'in varlığını ve işlevini etkilediği ve etkilerini azalttığı gösterilmiştir. Bunlara örnek olarak bir bağışıklık baskılayıcı ilaç olan düşük doz siklofosfamid; hücresel DNA sentezini inhibe eden fludarabin ve gempitabin; mitotik bir inhibitör olan paklitaksel; ve tirozin-kinaz inhibitörleri olarak verilebilir (Hatzioannou ve ark., 2017). Treg tarafından eksprese edilen molekülleri hedefleyen spesifik tedaviler de deneysel modellerde tanımlanmıştır ve insanlarda klinik denemeler devam etmektedir (Bulliard ve ark., 2014; Curti ve ark., 2013). Treg'lerin her ne kadar birçok malignitede artan angiogenezis ile ilişkili olduğu bildirilse de, mevcut bazı çalışmalarda görüldüğü gibi hem malignite hem de çeşitli hastalık durumlarında FoxP3+ hücre infiltrasyonları, azalmış VEGF ve dolayısıyla da azalmış angiogenezis ile ilişkili olabilir. Bu nedenle FoxP3+ Treg'lerin hedefleneceği tedavi seçeneklerinin dokuya ve hastalığa spesifik olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda her ne kadar kanin histiyositik tümörlerde FoxP3 ile VEGF arasında negatif bir korelasyon olabileceği gösterilmişse de, daha yüksek sayıda tümör dokusunda FoxP3+ hücre infiltrasyonları ile angiogenezis ve prognoz arasındaki ilişkinin net olarak ortaya konulabileceği, moleküler düzeyde daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Abrams VK, Hwang B, Lesnikova M, Gass MJ, Wayner E, Castilla-Llorente C, Nash RA (2009).** A novel monoclonal antibody specific for canine CD25 (P4A10): selection and evaluation of canine Tregs. *Vet Immunol Immunopath.*, **135**, 257–265.
- Affolter VK, Leutenegger CM, Berger-Pusterla J (2003).** *Canine reactive histiocytosis: a dysregulation of the immune-system, characterization of the cytokine milieu.* In: Loeffler A. (Eds), Proceedings North American Veterinary Dermatology Forum: Veterinary Dermatology, p:14-216.
- Affolter VK, Moore PF (2000a).** *Canine cutaneous histiocytic diseases.* In: Bonagura JD. (Eds), Kirk's Current Veterinary Therapy XIII: Small Animal Practice. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, p:588–91.
- Affolter VK, Moore PF (2000b).** Canine cutaneous and systemic histiocytosis: reactive histiocytosis of dermal dendritic cells. *Am. J. Dermatopathol.*, **22**, 40–48.
- Affolter VK, Moore PF (2002a).** Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. *Vet Pathol.*, **39**, 74–83.
- Affolter VK, Moore PF (2002b).** *Histiocytes in skin disease.* In: Thoday KL, Foil CS, Bond R. (Eds), Advances in Veterinary Dermatology, 4th edn. Oxford, UK: Blackwell Science, p:111–30.
- Allison RW, Brunner JD, Breshears MA, Avery AC, Moore PF, Affolter VK, Vernau W (2008).** Dendritic cell leukemia in a Golden Retriever. *Vet. Clin. Pathol.*, **37**, 190–197.
- Anonim (2008).** Wednesday Slide Conference, Conference 24. <https://www.askjpc.org/wsko/> (Erişim Tarihi: 21.05.2019)
- Azakami D, Bonkobara M, Washizu T, Iida A, Kondo M, Kato R, Niikura Y, Iwaki S, Tamahara S, Matsuki N, Ono K (2006).** Establishment and biological characterization of canine histiocytic sarcoma cell lines. *J. Vet. Med. Sci.*, **68**, 1343–1346.
- Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH (2006).** Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.*, **24**, 5373–5380.
- Belluco S, Sammarco A, Sapin P, Lurier T, Marchal T (2020).** FOXP3, CD208, and CD206 Expression in Canine Cutaneous Histiocytoma. *Los Angeles.*, **57**, 599–

607.

Bender WM, Muller GM (1989). Multiple resolving cutaneous histiocytoma in a dog. *J Am Vet Med Assoc.*, **194**, 535-537

Berk E, Muthuswamy R (2011). Treg-mediated angiogenesis and tolerance is programmed by hypoxia in the tumor microenvironment. *Immunotherapy.*, **3**, 1429.

Beyer M, Schultze JL (2006). Regulatory T cells in cancer. *Blood.*, **108**, 804-811.

Biller BJ, Elmslie RE, Burnett RC, Avery AC, Dow SW (2007). Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, **116**, 69–78.

Biller BJ, Guth A, Burton JH, Dow SW (2010). Decreased ratio of CD8+ T cells to regulatory T cells is associated with decreased survival in dogs with osteosarcoma. *J Vet Intern Med.*, **24**, 1118–1123.

Bonnette SG, Kittrell FS, Stephens LC, Meyn RE, Medina D (1999). Interactions of apoptosis, proliferation and host age in the regression of the mouse mammary preneoplasia, TM3, carrying an unusual mutation in p53. *Carcinogenesis.*, **20**, 1715-1720.

Brown CC, Baker DC, Baker IK (2007). *Histiocytic sarcomas*. In: Maxie MG. (Eds), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, 5th. Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, p:770

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.*, **27**, 68-73.

Bulliard Y, Jolicoeur R, Zhang J, Dranoff G, Wilson NS, Brogdon JL (2014). OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcγRs, leading to antitumor efficacy. *Immunology and Cell Biology.*, **92**, 475–480.

Busch MDM, Reilly CM, Luff JA, Moore PF (2008). Feline Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis with Multiorgan Involvement. *Vet. Pathol.*, **45**, 816–824.

Campbell DJ, Koch MA (2011). Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, **11**, 119–130.

Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, Montserrat E, Campo E, Banham AH (2006). High numbers of tumour-infiltrating

FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood.*, **108**, 2957–2964.

Carvalho MI, Pires I, Prada J, Gregório H, Lobo L, Queiroga FL (2016a). Intratumoral FoxP3 expression is associated with angiogenesis and prognosis in malignant canine mammary tumors. *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, **178**, 1–9.

Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL (2014). A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. *BioMed Research International.*, 2014.

Carvalho MI, Silva-Carvalho R, Pires I, Prada J, Bianchini R, Jensen-Jarolin E, Queiroga FL (2016b). A comparative approach of tumour-associated inflammation in mammary cancer between humans and dogs. *Biomed Res Int.*, 2016:4917387.

Casares N, Arribillaga L, Sarobe P, Dotor J, Lopez-Diaz de Cerio A, Melero I, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ (2003). CD4⁺/CD25⁺ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4⁺ T cells with IFN- γ -dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination. *J. Immunol.*, **171**, 5931–5939.

Craig LE, Julian ME, Ferracone JD (2002). The Diagnosis and Prognosis of Synovial Tumors in Dogs: 35 Cases. *Vet. Pathol.*, **39**, 66–73.

Curiel TJ (2007). Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest.*, **117**, 1167–1174.

Curti BD, Kovacsics-Bankowski M, Morris N, Walker E, Chisholm L, Floyd K, Walker J, Gonzalez I, Meeuwssen T, Fox BA, Moudgil T, Miller W, Haley D, Coffey T, Fisher B, Delanty-Miller L, Rymarchyk N, Kelly T, Crocenzi T, Bernstein E, Sanborn R, Urban WJ, Weinberg AD (2013). OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Research.*, **73**, 7189–7198.

D’Agostino PM, Gottfried-Blackmore A, Anandasabapathy N, Bulloch K (2012). Brain dendritic cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol.*, **124**, 599–614.

Danilenko DM, Moore PF, Rossitto PV (1992). Canine leukocyte cell adhesion molecules (LeuCAMs): characterization of the CD11/CD18 family. *Tissue Antigens.*, **40**, 13–21.

Danilenko DM, Rossitto PV, Van der Vieren M, Le Trong H, McDonough SP, Affolter VK, Moore PF (1995). A novel canine leukointegrin, alpha d beta 2, is expressed by specific macrophage subpopulations in tissue and a minor CD8+ lymphocyte subpopulation in peripheral blood. *J. Immunol.*, **155**, 35–44.

de Brot S, Ntekim A, Cardenas R, James V, Allegrucci C, Heery DM, Bates DO, Ødum N, Persson JL, Mongan NP (2015). Regulation of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.*, **22**, R107–R123.

Elkord E, Alcantar-Orozco EM, Dovedi SJ, Tran DQ, Hawkins RE, Gilham DE (2010). T regulatory cells in cancer: recent advances and therapeutic potential. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **10**, 1573–1586.

Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, Gimotty PA, Gilks CB, Lal P, Zhang L, Coukos G (2011). Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature.*, **475**, 226–230.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.*, **4**, 330–336.

Friedrichs KR, Young KM (2008). Histiocytic sarcoma of macrophage origin in a cat: case report with a literature review of feline histiocytic malignancies and comparison with canine hemophagocytic histiocytic sarcoma. *Vet. Clin. Pathol.*, **37**, 121–128.

Fry MM, McGavin MD (2007). *Histiocytic neoplasia*. In: McGavin MD, Zachary JF. (Eds), *Pathologic Basis of Veterinary Diseases*, 4th. Ed. China; Mosby Elsevier. p:803-804.

Fulmer AK, Mauldin GE (2007). Canine histiocytic neoplasia: An overview. *Can. Vet. J.*, **48**, 1041.

Garden OA, Pinheiro D, Cunningham F (2011). All creatures great and small: Regulatory T cells in mice, humans, dogs and other domestic animal species. *International Immunopharmacology.*, **11**, 576-88.

Giatromanolaki A, Bates GJ, Koukourakis MI, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL, Banham AH (2008). The presence of tumor-infiltrating FOXP3+ lymphocytes correlates with intratumoral angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol. Academic Press.*, **110**, 216–21.

- Grabenbauer GG, Lahmer G, Distel L, Niedobitek G (2006).** Tumour-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.*, **12**, 3355–3360.
- Hatzioannou A, Alissafi T, Verginis P (2017).** Myeloid-derived suppressor cells and T regulatory cells in tumors: unraveling the dark side of the force. *Journal of Leukocyte Biology.*, **102**, 407-421.
- Hayden DW, Waters DJ, Burke BA, Manivel JC (1993).** Disseminated malignant histiocytosis in golden retriever: clinicopathologic, ultrastructural, and immunohistochemical findings. *Vet Pathol.*, **20**, 256–264.
- Hendrick M, Mahaffey E, Moore PF, Vos (1999).** *Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals.* In: World Health Organization Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, F. Schulman. (Eds), Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, p:29–31.
- Hirako A, Sugiyama A, Sakurai M, Ozaki K, Sakai H, Takeuchi T, Morita T, Moore PF (2015).** Cutaneous histiocytic sarcoma with E-cadherin expression in a Pembroke Welsh Corgi dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, **27**, 589-595.
- Ide T, Uchida K, Kagawa Y, Suzuki K, Nakayama H (2011).** Pathological and Immunohistochemical Features of Subdural Histiocytic Sarcomas in 15 Dogs. *J. Vet. Diagnostic Investig.*, **23**, 127–132.
- Inoue T, Yoneda K, Kakurai M, Fujita S, Manabe M, Demitsu T (2002).** Alteration of mast cell proliferation/apoptosis and expression of stem cell factor in the regression of mastocytoma – report of a case and a serial immunohistochemical study. *J Cutan Pathol.*, **29**, 305-312.
- Ipek V, Cangul IT, Akkoc A (2021).** "Comparative Evaluation of the Cytological, Histopathological and Immunohistochemical Findings of Canine Cutaneous and Subcutaneous Masses". *Acta Veterinaria.*, **71**, 61-84.
- Janeway CA, Travers P, Walport M (1999a).** *Principles of innate and adaptive immunity.* In Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, C. Janeway, and P. Travers. (Eds), New York: Garland Publ, p:11–20.

- Janeway CA, Travers P, Walport M (1999b).** *Infection and innate immunity*. In: Janeway CA, Travers P. (Eds), *The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Publ, p:363–374.
- Kerlin RL, Hendrick MJ (1996).** Malignant fibrous histiocytoma and malignant histiocytosis in the dog: convergent or divergent phenotypic differentiation. *Vet Pathol*, **33**, 713–716.
- Kim JH, Chon SK, Im KS, Kim NH, Cho KW, Sur JH (2013).** Infiltrating Foxp3+ Regulatory T cells and histopathological features in canine classical and spermatocytic seminomas. *Reproduction in Domestic Animals.*, **48**, 218–222.
- Kim JH, Hur JH, Lee SM, Im KS, Kim NH, Sur JH (2012).** Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. *Veterinary Journal.*, **193**, 222–227.
- Klahn SL, Kitchell BE, Dervisis NG (2011).** Evaluation and comparison of outcomes in dogs with periarticular and nonperiarticular histiocytic sarcoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **239**, 90–96.
- Kohler C (2007).** Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis. *Cell Tissue Res.*, **330**, 291–302.
- Kurita M, Hirano K, Ebihara S, Takushima A, Harii K, Fujino T, Fujioka Y (2007).** Spontaneous regression of cervical lymph node metastasis in a patient with mesopharyngeal squamous cell carcinoma of the tongue: Possible association between apoptosis and tumor regression. *Int J Clin Oncol.*, **12**, 448–454.
- Lan RY, Mackay IR, Gershwin ME (2007).** Regulatory T cells in the prevention of mucosal inflammatory diseases: patrolling the border. *J Autoimmun.*, **29**, 272–280.
- Larregina AT, Morelli AE, Spencer LA, Logar AJ, Watkins SC, Thomson AW, Falo LD (2001).** Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells. *Nat. Immunol.*, **2**, 1151–1158.
- Li X, Gao Y, Li J, Zhang K, Han J, Li W, Hao Q, Zhang W, Wang S, Zeng C, Zhang W, Zhang Y, Li M, Zhang C (2018).** FOXP3 inhibits angiogenesis by downregulating VEGF in breast cancer. *Cell Death Dis* 2018 97. *Nature Publishing Group.*, **9**, 1–12.

- Liu S, Liu D, Li J, Zhang D, Chen Q (2016).** Regulatory T cells in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine.*, **45**, 635–639.
- Looringh van, Beeck FA, Zajonc DM, Moore PF, Schlotter YM, Broere F, Rutten VPMG, Willemse T, Van Rhijn I (2008).** Two canine CD1a proteins are differentially expressed in skin. *Immunogenetics.*, **60**, 315–324.
- Lužnik Z, Anchouche S, Dana R, Yin J (2020).** Regulatory T Cells in Angiogenesis. *J Immunol. American Association of Immunologists.*, **205**, 2557–65.
- Maeda S, Ohno K, Fujiwara-Igarashi A, Uchida K, Tsujimoto H (2016).** Changes in Foxp3-Positive Regulatory T Cell Number in the Intestine of Dogs With Idiopathic Inflammatory Bowel Disease and Intestinal Lymphoma. *Veterinary Pathology.*, **53**, 102–112.
- Marchal T, Dezutter-Dambuyant C, Magnol J (1993).** Birbeck granule-containing dendritic cells present in dog epidermis are equivalent of human epidermal Langerhans cells. *Eur. J. Dermatology.*, **3**, 149–152.
- Marcinowska A, Constantino-Casas F, Williams T, Hoather T, Blacklaws B, Dobson J (2017).** T lymphocytes in histiocytic sarcomas of flat-coated retriever dogs. *Veterinary pathology.*, **54**, 605–610.
- Marquet F, Bonneau M, Pascale F, Urien C, Kang C, Schwartz-Cornil I, Bertho N (2011).** Characterization of Dendritic Cells Subpopulations in Skin and Afferent Lymph in the Swine Model. *PLoS One.*, **6**, e16320.
- Mays MB, Bergeron JA (1986).** Cutaneous histiocytosis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **188**, 377–381.
- Mehl ML, Withrow SJ, Seguin B, Powers BE, Dernell WS, Pardo AD, Rosenthal RC, Dolginow SZ, Park RD (2001).** Spontaneous regression of osteosarcoma in four dogs. *J Am Vet Med Assoc.*, **219**, 614–617.
- Merad M, Ginhoux F, Collin M (2008).** Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 935–947.
- Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellström M, Egevad L, Pisa P (2006).** CD4⁺ CD25^{high} T cells are enriched in the tumour and peripheral blood of prostate cancer patients. *J Immunol.*, **177**, 7398–7405.
- Moes N, Rieux-Laucat F, Begue B, Verdier J, Neven B, Patey N, Torgerson TT,**

- Picard C, Stolzenberg MC, Ruemmele C (2010).** Reduced expression of FOXP3 and regulatory T-cell function in severe forms of early-onset autoimmune enteropathy. *Gastroenterology.*, **139**, 770-778.
- Moore PF (1984).** Systemic Histiocytosis of Bernese Mountain Dogs. *Vet. Pathol.*, **21**, 554–563.
- Moore PF (2004).** The histiocytic disease complex. Annual Meeting of the American College of Veterinary Internal Medicine, Minneapolis, Minnesota, USA, 437- 438.
- Moore PF (2014).** A Review of Histiocytic Diseases of Dogs and Cats. *Vet. Pathol.*, **51**, 167–184.
- Moore PF (2017),** *Canine and Feline Histiocytic Diseases*. In: Meuten DJ. (Eds), *Tumors in Domestic Animals*, 5th. Ed. Iowa: Wiley Blackwell, p: 322-336.
- Moore PF, Affolter V, Olivry T, Schrenzel M (1998).** *The use of immunological reagents in defining the pathogenesis of canine skin diseases involving proliferation of leukocytes*. In: *Advances in Veterinary Dermatology*, K. Kwotchkha, T. Willemse, and C. von Tschamer. (Eds), Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, p:77–94.
- Moore PF, Affolter VK, Vernau W (2006).** Canine Hemophagocytic Histiocytic Sarcoma: A Proliferative Disorder of CD11d+ Macrophages. *Vet. Pathol.*, **43**, 632–645.
- Moore PF, Mariassy A (1986).** Dendritic (Langerhans cells) in canine epidermis: ultrastructure and distribution. *Anat. Histol. Embryol.*, **15**, 178–179.
- Moore PF, Rosin A (1986).** Malignant Histiocytosis of Bernese Mountain Dogs. *Vet. Pathol.*, **23**, 1–10.
- Moore PF, Schrenzel MD, Affolter VK, Olivry T, Naydan D (1996).** Canine cutaneous histiocytoma is an epidermotropic Langerhans cell histiocytosis that expresses CD1 and specific beta2-integrin molecules. *Am J Pathol.*, **148**, 1699–1708.
- Muir CF, Priestnall SL, Hibbert A, Brown C, Garden OA, Scase T (2017).** Prevalence of FoxP3+ Cells Does Not Correlate With Ki67 Expression in Canine Diffuse Large B-cell Lymphoma. *J Comp Pathol. W.B. Saunders.*, **157**, 15–22.
- Mulligan RM (1948).** Neoplastic diseases of dogs. 11. Mast cell sarcoma, lymphosarcoma, histiocytoma. *Arch Pathol.*, **54**, 147-166
- Nfon CK, Dawson H, Toka FN, Golde WT (2008).** Langerhans cells in porcine skin. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **126**, 236–247.

- Nicholls PK, Moore PF, Anderson DM, Moore RA, Parry NR, Gough GW, Stanley MA (2001).** Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. *Virology.*, **283**, 31-39.
- Nishikawa H, Sakaguchi S (2014).** Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.*, **27**, 1–7.
- O'Neill K, Guth A, Biller B, Elmslie R, Dow S (2009).** Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumour type. *J Vet Intern Med.*, **23**, 875–881.
- Oh SY, Ryu HH, Yoo DY, Hwang IK, Kweon OK, Kim WH (2012).** Evaluation of FOXP3 expression in canine mammary gland tumours. *Vet Comp Oncol.*, **12**, 1–9.
- Paredes BE (2007).** Regression in malignant melanoma. Definition, etiopathogenesis, morphology and differential diagnosis. *Pathologie.*, **28**, 453-463.
- Pazdzior-Czapula K, Rotkiewicz T, Otrocka-Domagala I, Gesek M, Śmiech A (2015).** Morphology and immunophenotype of canine cutaneous histiocytic tumours with particular emphasis on diagnostic application. *Veterinary Research Communications.*, **39**, 7-17.
- Pierezan F, Mansell J, Ambrus A, Rodrigues Hoffmann A (2014).** Immunohistochemical expression of ionized calcium binding adapter molecule 1 in cutaneous histiocytic proliferative, neoplastic and inflammatory disorders of dogs and cats. *Journal of comparative pathology.*, **151**, 347-351.
- Piersma SJ, Welters MJ, van der Burg SH (2008).** Tumor-specific regulatory T cells in cancer patients. *Hum. Immunol.*, **69**, 241–249.
- Pinard J, Wagg CR, Girard C, Kiupel M, Bédard C (2006).** Histiocytic Sarcoma in the Tarsus of a Cat. *Vet. Pathol.*, **43**, 1014–1017.
- Pires I, Queiroga FL, Alves A, Silva F, Lopes C (2009).** Decrease of E-cadherin expression in canine cutaneous histiocytoma appears to be related to its spontaneous regression. *Anticancer Res.*, **29**, 2713-2717.
- Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P (2011).** Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.*, **146**, 873–887.
- Pucino V, De Rosa V, Procaccini C, Matarese G (2014).** Regulatory T cells, leptin and angiogenesis. *Chem. Immunol. Allergy.*, **99**, 155–169.

- Ramos-Vara JA, Miller MA (2011).** Immunohistochemical expression of E-cadherin does not distinguish canine cutaneous histiocytoma from other canine round cell tumors. *Veterinary Pathology.*, **48**, 758-763.
- Ricklin ME, Roosje P, Summerfield A (2010).** Characterization of Canine Dendritic Cells in Healthy, Atopic, and Non-allergic Inflamed Skin. *J. Clin. Immunol.*, **30**, 845–854.
- Riedl E, Stöckl J, Majdic O, Scheinecker C, Rappersberger K, Knapp W, Strobl H (2000).** Functional involvement of E-cadherin in TGF-beta 1-induced cell cluster formation of in vitro developing human Langerhans-type dendritic cells. *J. Immunol.*, **165**, 1381–1386.
- Rossi S, Gelain ME, Comazzi S (2009).** Disseminated histiocytic sarcoma with peripheral blood involvement in a Bernese Mountain dog. *Vet. Clin. Pathol.*, **38**, 126–130.
- Saint-André Marchal I, Dezutter-Dambuyant C, Willett BJ, Woo JC, Moore PF, Magnol JP, Schmitt D, Marchal T (1997).** Immunophenotypic characterization of feline Langerhans cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **58**, 1–16.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995).** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.*, **155**, 1151-1164.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008).** Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.*, **133**, 775-787.
- Sakai K, Maeda S, Yamada Y, Chambers JK, Uchida K, Nakayama H, Yonezawa T, Matsuki N (2018).** Association of tumour-infiltrating regulatory T cells with adverse outcomes in dogs with malignant tumours. *Veterinary and Comparative Oncology.*, **1**, 1–7.
- Schultz RM, Puchalski SM, Kent M, Moore PF (2007).** Skeletal lesions of histiocytic sarcoma in nineteen dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound*, **48**, 539–543.
- Schulze JO, Quedenau C, Roske Y, Adam T, Schuler H, Behlke J, Turnbull AP, Sievert V, Scheich C, Mueller U, Heinemann U, Buessow K (2008).** Structural and functional characterization of human Iba proteins. *FEBS J.*, **275**, 4627-4640.
- Shortman K, Caux C (1997).** Dendritic Cell Development: Multiple Pathways to

Nature's Adjuvants. *Stem Cells*, **15**, 409–419.

Shortman K, Liu YJ (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.*, **2**, 151–161.

Shortman K, Naik SH (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 19–30.

Takahashi M, Tomiyasu H, Hotta E, Asada H, Fukushima K, Kanemoto H, Fujino Y, Ohno K, Uchida K, Nakayama H (2014). Clinical characteristics and prognostic factors in dogs with histiocytic sarcomas in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **76**, 661–666.

Taylor DO, Dorn CR, Luis OH (1969). Morphologic and biologic characteristics of the canine cutaneous histiocytoma. *Cancer Res.*, **29**, 83–92.

Terme M, Colussi O, Marcheteau E, Tanchot C, Tartour E, Taieb J (2012). Modulation of immunity by antiangiogenic molecules in cancer. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012: 492920.

Thomas JA, Badini M (2011). The role of innate immunity in spontaneous regression of cancer. *Indian J Cancer.*, **48**, 246–251.

Tominaga M, Horiuchi Y, Ichikawa M, Yamashita M, Okano K, Jikumaru Y, Nariai Y, Kadosawa T (2010). Flow cytometric analysis of peripheral and tumour infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. *J Vet Diagn Invest.*, **22**, 438–441.

Vail DM (2001). *Histiocytic disorders*. In: Stephen JW, MacEwen EG. (Eds), *Small Animal Clinical Oncology*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, p:667–671.

Van der Vieren M, Le Trong H, Wood CL, Moore PF, St John T, Staunton DE, Gallatin WM (1995). A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity.*, **3**, 683–690.

Walker R, Kasproicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Landeghen MV, Buckner JH, Ziegler SF (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺ CD25⁺ T cells. *J Clin Invest.*, **112**, 1437–1443.

Wang W, Hodgkinson P, McLaren F, MacKinnon A, Wallace W, Howie S, Sethi T (2012). Small cell lung cancer tumour cells induce regulatory T lymphocytes, and patient survival correlates negatively with FOXP3⁺ cells in tumour infiltrate. *International Journal of Cancer.*, **131**.

- Whiteside TL (2014).** Induced regulatory T cells in inhibitory microenvironments created by cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **14**, 1411–1425.
- Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B (2003).** Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res.*, **9**, 606–612.
- Woo JC, Moore PF (1997).** A feline homologue of CD1 is defined using a feline-specific monoclonal antibody. *Tissue Antigens*, **49**, 244–251.
- Yakovlev A, Boucher K, DiSario J (1999).** Modeling insight into spontaneous regression of tumors. *Math Biosci.*, **155**, 45–60.
- Yamate J, Maeda M, Tsukamoto Y, Benn SJ, Laithwaite JE, Allan A, Kannan Y, Ide M, Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S, LaMarre J (2001).** Macrophage-like cell line (HS-P) from a rat histiocytic sarcoma. *J Comp Pathol.*, **124**, 183–191.
- Yan M, Jene N, Byrne D, Millar EK, O'Toole SA, McNeil CM, Bates GJ, Harris AL, Banham AH, Sutherland RL, Fox SB (2011).** Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers. *Breast Cancer Res.*, **13**, R47.
- Yu JL, Rak JW (2003).** Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Res.*, **5**, 83–88.
- Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA (2009).** Resident and “Inflammatory” Dendritic Cells in Human Skin. *J. Invest. Dermatol.*, **129**, 302–308.
- Zhan HL, Gao X, Zhou XF, Pu XY, Wang DJ (2012).** Presence of Tumour-infiltrating FOXP3⁺ Lymphocytes Correlates with Immature Tumour Angiogenesis in Renal Cell Carcinomas. *Asian Pacific J Cancer Prev. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.*, **13**, 867–72.