



T.C
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖPEK YUMUŞAK DOKU SARKOMLARINDA NÖTROFİL HÜCRE DİŞİ TUZAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Burak YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Volkan İPEK

BURDUR- 2023

T.C
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÖPEK YUMUŞAK DOKU SARKOMLARINDA NÖTROFİL
HÜCRE DIŞI TUZAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Burak YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Volkan İPEK

Bu araştırma “*Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü*” tarafından “0905-YL-23” proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR- 2023

TEŞEKKÜR

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



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	x
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xi
1. GİRİŞ	2
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Yumuşak Doku Tümörlerin Sınıflandırılması	2
2.2. Köpeklerde Malign Yumuşak Doku Sarkomları	2
2.2.1. Bağdoku Tümörleri	3
2.2.1.1. Fibrosarkom	3
2.2.1.2. Miksosarkom	4
2.2.1.3. Malign Fibröz Histiyositom	5
2.2.2. Adipoz Doku Tümörleri	5
2.2.2.1. Liposarkom	5
2.2.3. Vasküler Doku Tümörleri	6
2.2.3.1. Hemanjiyosarkom	6
2.2.3.2. Lenfanjiyosarkom	8
2.2.4. Perifer Sinir Tümörleri	9
2.2.4.1. Malign Perifer Sinir Kılıfı Tümörü	9
2.3. Tümörle İlişkili Nötrofiller	9
2.4. Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları	11
2.5. Netosis	11
2.5.1. Suicidal Netosis	12
2.5.2. Vital Netosis	13
2.6. Miyeloperoksidaz	14
2.7. Sitrüline Histon3	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Semi-Kantitatif Değerlendirme	22
3.2. Yalancı Floresan Görüntü Oluşturma	23
3.3. İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR	25
4.1. Histopatolojik Bulgular	25
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	39
4.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları	46
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	52
KAYNAKÇA	53
ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİLLER

Şekil 4.1.	Fibrom olgusunda birörneklik gösteren çekirdek yapısına sahip bağ doku proliferasyonu	26
Şekil 4.2.	Leyomiyom olgusunda benign özellikler sergileyen ve belirgin eozinofilik sitoplazmaya sahip kas doku proliferasyonu	26
Şekil 4.3.	Fibromikzosarkom olgusunda sitoplazmik mikzomatöz oluşumlar sergileyen ve malignite bulguları gösteren neoplastik proliferasyonlar	27
Şekil 4.4.	Fibromikzosarkom olgusunda belirgin atipi sergileyen fibrosarkom alanı ve yoğun nötrofil infiltrasyonları	27
Şekil 4.5.	Fibrosarkom olgusunda malign özellikler sergileyen ve farklı yönlerde uzantılar gösteren neoplastik proliferasyonlar	28
Şekil 4.6.	Fibrosarkom olgusunda belirgin eozinofilik sitoplazmaya sahip ve malign özellikler sergileyen neoplazi alanı ve tümör dokusu içerisinde dağınık olarak gözlenen nötrofiller	29
Şekil 4.7.	Fibrosarkom olgusunda yüksek hücresellik ve belirgin malign özellikler sergileyen, yüksek vaskülarize tümör dokusu	29
Şekil 4.8.	Hemangiosarkom olgusunda damar lümeni oluşturma eğilimi sergileyen, belirgin eozinofilik sitoplazmaya sahip endotelial proliferasyonlar ile yoğun mononükleer yangısal hücre infiltrasyonu	30
Şekil 4.9.	Çok sayıda intrasitoplazmik vakuollere sahip ve yer yer belirgin anizokaryozis gösteren çekirdek yapısına sahip proliferasyonlar	31
Şekil 4.10.	Çok sayıda intrasitoplazmik vakuoller içeren ve belirgin malign çekirdek malignite özellikleri sergileyen neoplazi alanı	31
Şekil 4.11.	Malignant fibröz histiyositom olgusunda belirgin bağ doku üremeleri ile birlikte çok çekirdekli dev hücrelerinin görünümü	32
Şekil 4.12.	Mikzosarkom olgusunda belirgin mikzomatöz sitoplazmik vakuoller içeren ve anizokaryozis sergileyen mezenkimal hücre proliferasyonları	33
Şekil 4.13.	Mikzosarkom olgusunda yüksek hücresellik ve malignite bulguları sergileyen tümör alanı	33
Şekil 4.14.	PDT olgusunda yer yer belirgin mikzoid görünüme sahip ve damar çevresinde çoğalmalar gösteren neoplazi alanı	34
Şekil 4.15.	PDT olgusunda damar yapıları çevresinde girdap benzeri şekilde proliferasyon gösteren ve düşük malignite özelliklerine sahip tümör alanı	35
Şekil 4.16.	PDT olgusunda damar çevrelerinde helezon yapıları sergileyen ve belirgin malignite özelliklerine sahip neoplazi alanı	35
Şekil 4.17.	PSKT olgusunda girdap benzeri yapı ile belirgin malignite bulguları sergileyen neoplazi alanı	36
Şekil 4.18.	PSKT olgusunda Antoni A tipi patern sergileyen neoplastik görünüm	37

Şekil 4.19.	Andiferensiye sarkom olgusunda zayıf diferensiyasyon sergileyen ve belirgin malinite özelliklerine sahip mezenkimal proliferasyonlar	38
Şekil 4.20.	Andiferensiye sarkom olgusunda belirgin malign özelliklere sahip, düzensiz anaplastik görünümde tümör alanı	38
Şekil 4.21.	Fibromikzosarkom olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoksilen boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immün floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler	41
Şekil 4.22.	Hemangiosarkom olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoksilen boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immün floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler	42
Şekil 4.23.	Malignant fibröz histiyositom olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoksilen boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immün floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler	43
Şekil 4.24.	Mikzosarkom olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoksilen boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immün floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler	44
Şekil 4.25.	PDT olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoksilen boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immün floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler	45
Şekil 4.26.	PDT olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoksilen boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immün floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler	46

TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Çalışmada kullanılan olgulara ait bilgiler	21
Tablo 4.1.	Olgulara ait tanımlar ve skorlar	40
Tablo 4.2.	NET skorlarının benign ve malign tümörlerde karşılaştırılması	46
Tablo 4.3.	Nekroz, nötrofil ve NET skorlarının tümör derecesine göre karşılaştırılması	47
Tablo 4.4.	Pearson korelasyon analizi sonuçları	47



SİMGELER ve KISALTMALAR

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazole
ANCA	Antinötrofil sitoplazmik antikorlar
CD8+ T	Sitotoksik T hücreleri
citH3	Sitrillüne histon h3
CXC	Kemokin
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HMGB1	Yüksek mobilite grup kutusu 1
HOCl	Hipokloröz Asit
IL-8	İnterlökin 8
LPS	Lipaz
MPO	Miyeloperoksidaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NE	Nötrofil Elastaz
NET	Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları
PAD4	Protein Arjinin Deiminaz
PDT	Perivasküler Damar Tümörü
PMA	Forbol-12-miristat-13-asetat
PSKT	Periferik sinir kılıfı tümörü
ROS	Reaktif oksijen türleri
TAN	Tümör İlişkili Nötrofiller
TGF-β	Transforme edici büyüme faktör-beta
TLR	Toll benzeri reseptörler
TNF	Tümör nekroz faktörü

ÖZET

Köpek Yumuşak Doku Sarkomlarında Nötrofil Hücre Dışı Tuzaklarının Araştırılması

Bu çalışmada köpek yumuşak doku sarkomlarında tümör derecesi ile nötrofil hücre dışı tuzaklarının (NET'ler) arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla 30 adet yumuşak doku tümörü bloğu kullanıldı. Olguların histopatolojik klasifikasyonun ardından tümörler fibröz doku tümörleri, yağ doku tümörleri, kas doku tümörleri, damar tümörleri, periferel sinir kılıf tümörleri ve damar duvarı tümörleri şeklinde sınıflandırıldı. Ayrıca tümörler benign ve malign olarak sınıflandırıldı. Tümör dokusunda NET'lerin ortaya konulması için sitrülline histon-3 (cith3) ve myeloperoksidaz antikorları ile boyamalar yapıldı. Boyamalar aynı kesitler üzerinde soldurma ve tekrar boyama yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Ardından boyanan kesitler program ile renklendirilerek, üst üste getirildi ve yalancı immun floresan görüntüler elde edildi. Tümör dokusunda NET'ler cith3 pozitif alanların varlığına göre skorlandı ve tümör derecesi ile karşılaştırıldı. Çalışmada kullanılan olgulara ait tanılar fibrom, leyomiyom, fibromikzosarkom, fibrosarkom, hemangiosarkom, liposarkom, malignant fibröz histiyositom, mikzosarkom, perivasküler duvar tümörü, periferel sinir kılıf tümörü ve andiferensiye sarkom şeklindeydi. Tümör derecesine göre olgular gruplandırıldı ve ardından gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma yapıldı ve NET açısından derece III tümörlerde derece I ve II tümörlere göre sayısal bir yükseklik olmakla birlikte anlamlı bir farklılık bulunmadığı görüldü. NET ile mitoz, diferensiyasyon, nekroz ve tümör derecesi arasındaki ilişkiye yönelik olarak yapılan Pearson korelasyon analizinde, NET ile tümör derecesi arasındaki korelasyonun önemsiz ($r = 0,277$) olduğu belirlendi. Benzer şekilde mitoz, diferensiyasyon ve nekroz ile NET arasında da korelasyon önemsiz olarak bulundu. Çalışma sonuçlarına göre NET'lerin benign tümörlere kıyasla yumuşak doku sarkomlarında anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Yine sarkomların histolojik derecelendirmeleri temel alındığında NET varlığının derece III tümörlerde sayısal olarak yüksek olduğu fakat bu farklılığın derece I ve II tümörlere kıyasla anlamlı olmadığı görülmüştür. Ek olarak, NET skorlarının sarkomlarda nekroz, diferensiyasyon, mitoz ve tümör derecesi ile anlamsız bir korelasyonu olduğu da gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çift immunhistokimya, Hücre dışı tuzak, Köpek, Nötrofil, Yumuşak doku sarkomu

ABSTRACT

Investigation of Neutrophil Extracellular Traps in Canine Soft Tissue Sarcomas

This study aimed to explore the relationship between tumor grade and neutrophil extracellular traps (NETs) in canine soft tissue sarcomas. For this purpose, 30 soft tissue tumor blocks were utilized. Following the histopathological classification of cases, tumors were categorized as fibrous tissue tumors, adipose tissue tumors, muscle tissue tumors, vascular tumors, peripheral nerve sheath tumors, and vascular wall tumors. Tumors were classified as either benign or malignant. To detect the presence of NETs in tumor tissue, sections were stained using citrullinated histone-3 (cith3) and myeloperoxidase antibodies. The staining was performed on the same sections using a fading and restaining method. The stained sections were then colorized with a program, overlaid, and pseudo-immunofluorescent images were obtained. The presence of cith3-positive areas was used to score NETs in tumor tissue and compare them with tumor grade. The study included cases diagnosed with fibroma, leiomyoma, fibromyxosarcoma, fibrosarcoma, hemangiosarcoma, liposarcoma, malignant fibrous histiocytoma, myxosarcoma, perivascular wall tumor, peripheral nerve sheath tumor, and undifferentiated sarcoma. The cases were classified based on tumor grade, and subsequently, statistical comparisons were conducted among the groups, revealing a numerical increase in grade III tumors compared to grades I and II tumors, but no significant difference in NETs. The Pearson correlation analysis was conducted to examine the relationship between NETs and mitosis, differentiation, necrosis, and tumor grade. The correlation between NETs and tumor grade was found to be insignificant ($r = 0.277$). Similarly, correlations between mitosis, differentiation, and necrosis with NETs were also found to be insignificant. The study results indicate that NETs were significantly higher in soft tissue sarcomas compared to benign tumors. Moreover, when sarcomas were graded histologically, the presence of NETs was slightly higher in grade III tumours, but this difference was not statistically significant compared to grades I and II tumours. Furthermore, the study found no significant correlation between NET scores and necrosis, differentiation, mitosis, and tumour grade in sarcomas.

Keywords: Dual immunohistochemistry, dog, extracellular trap, neutrophil, soft tissue sarcoma

1. GİRİŞ

Yumuşak doku sarkomları, biyolojik davranışları benzer ancak morfolojik özellikleri farklı olan bir tümör grubunu ifade eder. Bu tümörler hem insanlarda hem de hayvanlarda meydana gelir ve çeşitli tümör tiplerini içerir. Bu tümörlerin birçoğu kemiksiz bağ dokusundan köken almaktadır. Visseral ve nonvisseral bölgelerde ortaya çıkabilir (MacEwen ve Withrow, 2001).

Yumuşak doku sarkomları, yumuşak bağ dokulardan köken alan mezenkimal neoplazmlardır. Vücudun herhangi bir anatomik bölgesinde meydana gelebilirler, en sık deri ve deri altı dokularını içeren bölgelerde görülürler. Yumuşak doku sarkomları, köpeklerin deri ve deri altı tümörlerinin toplamının %8 ila 15'ini oluşturur ve özellikle orta yaşlıdan yaşlıya, orta ila büyük ırklardan olan köpekler arasında yaygındır (Dobson ve ark., 2002; Liptak, 2007).

Bu tümörler histolojik görünüm açısından çeşitli derecelerde farklılık gösterir ve adlandırıldıkları bağ dokusu (mezenkimal doku) tarafından köken aldığı dokuya göre isimlendirilirler (Ehrhart, 2005).

Yumuşak doku sarkoma başlığı altında gruplandırılan tümörlere verilen isimlendirme, fibrosarkom, hemanjioperisitomlar, liposarkom, rabdomyosarkom, leiomyosarkom, malign fibröz histiyositoma, malign sinir kılıfı tümörleri (nörofibrosarkom, schwannoma), miksosarkom, miksofibrosarkom, mezenkimal tümör ve iç şekilli hücre tümörü gibi türleri içermektedir. Genel olarak, bu tümörler düşük ila orta derecede metastatik olup, yerel olarak invazivdirler (Thrall ve Gillette, 1995; Mauldin, 1997; MacEwen ve Withrow, 2001).

Bağ doku kökenli diğer tümörler (osteosarkom, kondrosarkom, hemanjiyosarkom, lenfanjiyosarkom ve sinoviyal hücre sarkomu) genellikle daha yüksek metastatik oranları nedeniyle yumuşak doku sarkomları olarak kabul edilmez (Thrall ve Gillette, 1995; MacEwen ve Withrow, 2001).

Bu tümörler, fasiyal yüzey boyunca infiltrasyon gösterir. Koruyucu cerrahi eksizyon sonrasında bölgesel olarak nüks eder. Hematojen yollar aracılığıyla metastaz yapar ve psödokapsülle çevrelenmiştir (MacEwen ve Withrow, 2001).

Psödokapsül, tümörü çevreleyen normal dokudan ayırmış gibi görünebilir, ancak bu kapsül seviyesinde sınıra yakın olarak rezekte edilen tümörlerin bölgesel nüks oranı yüksektir. Genellikle köpek yumuşak doku sarkomları, vücut duvarından, ağız boşluğundan veya ekstremitelerden köken alan sert bir kitle olarak ortaya çıkar (Thrall ve Gillette, 1995; Bray, 2018).

Bu çalışmanın amacı, köpek yumuşak doku sarkomlarında tümör derecesi ile tümör infiltre nötrofiller ve NET'ler arasındaki ilişkiyi incelemektir. Çalışmada, toplam 30 adet köpek yumuşak doku tümörü örneği kullanılmıştır. Her bir örneğin histopatolojik özellikleri detaylı olarak analiz edilmiş ve NET'lerin varlığı araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçları, köpeklerde yumuşak doku sarkomlarının patogenezinin daha iyi anlaşılmasına ve dolayısıyla hastalığın yönetimi ve tedavisi için yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlamaya yönelik yeni çalışmalara öncülük etmeyi amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yumuşak Doku Tümörlerin Sınıflandırılması

Yumuşak doku tümörleri, mezenkimal tümörler aslında tanısıl patolojinin en zorlu alanlarından biridir ve bunun yanında sınıflandırma şemalarının iyileştirilmesi, hem patolojik tanı hem de terapötik seçeneklerin kalitesini artıran bir temel oluşturur (Sbaraglia ve Dei Tos, 2019). Yayınlanan veriler arasında sarkomda % 20 ila 30 arasında bir tanısıl yanlışlık oranı mevcut olsa da (Kissin ve ark., 1987; Thway ve ark., 2014), bu patoloğlardan kaynaklı değil başlıca nadirlik, içsel karmaşıklık, patolojik karmaşıklık gibi sorunlardan kaynaklanmaktadır ve morfolojinin immünohistokimya ve moleküler genetik ile entegrasyonu için sitogenetikçilerin doğrudan katılımı, çok sayıda sarkom uzmanı patoloğun sınıflandırma çalışmalarına katılımları, iyi huylu ve kötü huylu kategoriler arasında, yerel olarak agresif olabilen “orta” lezyon kategorisi gibi klinik patoloji kategorilerin kesin tanımlanması ve cerrahların, klinisyenlerin de katılımı ile mevcut sınıflandırmada yer alan ana ilerlemeleri gözden geçirilerek perspektifleri tartışılmaktadır (Sbaraglia ve ark., 2021).

2.2. Köpeklerde Malign Yumuşak Doku Sarkomları

Yumuşak doku sarkomları, benzer patolojik görünüm ve klinik davranışa dayalı olarak sınıflandırılan, heterojen bir tümör grubudur. Sarkomlar, mezenkimal dokulardan kaynaklanır ve köken aldığı hücre tipine benzer özellikler gösterirler. Bu tümörler, kas, yağ, nörovasküler, fasiyal ve fibroz dokuları da içeren bağ dokulardan köken alır. İyi huylu veya kötü huylu olarak görülür. Bu kategorideki kötü huylu neoplazmalar arasında fibrosarkom, periferik sinir kılıfı tümörü (PSKT; aynı zamanda kötü huylu schwannoma, nörofibrosarkoma veya hemanjioperisitoma olarak da bilinir), miksosarkoma, diferansiye edilmemiş sarkoma, liposarkoma, kötü huylu fibroz histiyositoma ve rabdomyosarkoma bulunur (DUDA, 1994; Thrall ve Gillette, 1995).

Yumuşak doku sarkomları vücudun herhangi bir anatomik bölgesinden kaynaklanabilir, ancak deri ve deri altı bölgeler en yaygın olanlardır. Genellikle,

psödokapsül içeren yumuşak veya sert tümörler olarak ortaya çıkarlar. Ancak histolojik sınırlarına göre kötü huylu olarak tanımlanmıştır ve yerel olarak invazivdirler. Cerrahi operasyonlar sonrasında lokal nüks sık görülür. Sarkomlar, vakaların %20'sine kadar hematojen metastaz eğilimindedir. Bölgesel lenf nodu metastazı genellikle olağandışıdır (sinoviyal hücre sarkoması hariç). Ölçülebilir veya hacimli (>5 cm çapında) tümörler genellikle kemoterapi ve radyasyon tedavisine zayıf yanıt gösterirler (Liptak, 2007).

Yumuşak doku sarkomları teşhis açısından bir zorluk oluşturur. Bu tümörlerin birçoğu, sadece kendi aralarında değil, aynı zamanda farklı histojenezlere sahip çeşitli diğer neoplazmlar arasında da örtüşen histolojik yapılarla sahiptir. İmmunohistokimyasal prosedürlerin geliştirilmesi, çeşitli doku belirteçlerine yönelik monoklonal ve poliklonal antikorların bulunabilirliği ve doku mikroarray teknolojisi, yumuşak doku sarkomalarının teşhisini insan patolojisinde ve sınırlı bir ölçüde veteriner patolojisinde iyileştirmiştir (Madewell ve Munn, 1991; Ordonez, 1993; Ciekot ve ark., 1994; Vail ve ark., 1994; Hogendoorn ve ark., 2004; Nilbert ve Engellau, 2004; Zhang ve Brooks, 2004).

Yumuşak doku sarkomu, benzer histolojik özelliklere ve biyolojik davranışa sahip bir dizi farklı tümörü tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir. Yumuşak doku sarkomlarının histojenezi tartışmalıdır ve rutin histolojik ve immünhistokimyasal analiz temelinde ayırt etmek zor olabilir. Bazı patologlar, fibrosarkom, PSKT ve hemanjioperisitoma gibi tümörleri ayırt etmedeki zorluk nedeniyle yumuşak doku sarkomu veya köpek yumuşak dokusunun iç şeklinde hücre tümörü gibi daha genel bir terimin kullanılmasını önermişlerdir (Dennis ve ark., 2011).

2.2.1. Bağdoku Tümörleri

2.2.1.1. Fibrosarkom

Fibrosarkom, malign fibroblastları ifade etmektedir. Birçoğu deri ve deri altı dokusu veya ağız boşluğundan kaynaklanır. Tümörler iyi diferansiye olabilir ve tümör hücreleri az miktarda sitoplazmaya sahip iç şeklinde görünümüne sahiptir. Daha

anaplastik tümörler ise çok sayıda mitotik figür ve belirgin hücrel pleomorfizmi gösteren sıkıca paketlenmiş iğ şeklinde fibroblastları içeren çok hücreli bir yapıya sahiptir (Goldschmidt, 2002).

Tümörler genellikle ırk veya cinsiyet eğilimi olmaksızın yaşlı köpeklerde ve kedilerde ortaya çıkar. Araştırmalarda Golden Retriever ve Doberman Pinscher ırklarında daha yüksek bir eğilim olduğu belirtilmektedir (Goldschmidt ve Shofer, 1992).

Ağız boşluğunda görülen, histolojik olarak düşük dereceli ancak biyolojik olarak yüksek dereceli bir fibrosarkoma formu farklıdır. Bu tür tümörler genellikle fazla büyüme ve kemik dahil olmak üzere daha derin dokuları invaze etme eğilimindedir. Metastaz, vakaların %20'sinde görülebilir (Ciekot ve ark., 1994). Metastaz nadir görülse de, bu tür tümörler infiltratif olup mikroskopik tümör hücreleri fasyal düzlemler boyunca invaze eder ve sıklıkla cerrahi çıkarma sonrasında nüksetme eğilimindedir (Liptak, 2007).

2.2.1.2. Miksosarkom

Fibroblast orijinli olup ender rastlanan, mukopolisakkaritten zengin, yoğun miksoid matriksleri bulunan ve orta yaşlı köpeklerde görülen genellikle gövdede veya ekstremitelerde ortaya çıkan fakat eklemlerde de nadir olarak bulunan tümörlerdir. Ancak, kalp, göz ve beyin gibi yerlerden köken alan miksosarkomlara dair raporlar da bulunmaktadır (Briggs ve ark., 1997; Foale ve ark., 2003; Richter ve ark., 2003). Bu tümörler genellikle kötü huylu olarak tanımlanmış sınırlara sahip ve invaziv büyüme eğilimindedir (Goldschmidt, 2002). Hücrel yoğunlukta artış ile nükleer pleomorfizm ve mitozun yüksek olması, miksosarkom tanısında önemlidir. Miksosarkomlar infiltratif yayılırlar ve sınırları belirgin değildir. Nüks görülebilir metastaza ender rastlanır (Williamson ve Middleton, 1998; Berrocal ve ark., 2001).

2.2.1.3. Malign Fibröz Histiyositom

Malign fibröz histiyositomlar, sıklıkla iskelet kaslarında ve yaşlı insanların deri bölgelerinde görülen mezodermal tümörlerdir. Viseral formu genellikle genç immunsupresif bireylerde daha yaygındır (Pérez-Martínez ve ark., 2000; Orlandi ve ark., 2003; Wiriosuparto ve ark., 2003). Histolojik ve immunohistolojik çalışmalara dayanarak, tümörlerin çoğunun fibroblastlardan ve/veya myofibroblastlardan kaynaklandığı, muhtemelen diferansiye olmamış mezodermal hücrelerden köken aldığı gösterilmiştir (Folpe ve ark., 1999; Morris ve ark., 2002; Do ve ark., 2009).

Malign fibröz histiyositom, neoplastik fibroblastlar, histiyositler ve çok çekirdekli dev hücrelerin sıkı demetler halinde olması ile karakterizedir (Baker ve Lumsden, 2000). Genellikle osteoklastları anımsatan büyük dev hücreler bulunmaktadır (Carip ve de Beaumont, 2002). Primer tümör hücreleri pleomorfik ve görünüşleri iğsi şeklindedir. Bir veya iki belirgin, düzensiz nükleolus içeren bir çekirdeğe sahiptir. Hücre dışı amorf eosinofilik materyal belirgin olabilir ve muhtemelen neoplastik hücreler tarafından reaktif kollajen üretimini temsil eder (Baker ve Lumsden, 2000).

2.2.2. Adipoz Doku Tümörleri

2.2.2.1. Liposarkom

Liposarkomlar, genellikle yaşlı köpeklerde lipoblastlardan kaynaklanan nadir görülen malign tümörlerdir (Baez ve ark., 2004). Araştırmalara göre, liposarkomlar lipomaların malign dönüşümünden kaynaklanmaz. Belirli nedenler bilinmemekle birlikte, bir köpekte yabancı cisim ile ilişkilendirilmiş liposarkom rapor edilmiştir (McCarthy ve ark., 1996). Liposarkomlar genellikle belirli bir ırk veya cinsiyet için bir eğilim göstermez (Baez ve ark., 2004).

Genellikle subkutan bölgelerde, özellikle karın altı ve uzuvlar boyunca yaygın olarak rapor edilirler, ancak kemik ve karın boşluğu gibi diğer primer bölgelerde de görülebilirler. Liposarkomlar, morfolojik görünüm ve sitolojik özelliklerinden dolayı

lipomlardan ayrılır. Liposarkomlar genellikle sert ve malign olarak tanımlanmıştır. Düşük metastatik potansiyele sahip olup yerel olarak invazivdirler. Metastatik bölgeler arasında akciğerler, karaciğer, dalak ve kemik bulunur (Goldschmidt, 2002; Baez ve ark., 2004).

Liposarkom histolojik olarak iyi diferansiye, miksoid, yuvarlak hücreli (veya kötü diferansiye), pleomorfik veya diferansiye olmamış olarak sınıflandırılır. Bu sınıflandırma şemasının klinik ve prognostik önemi insanlarda bulunmaktadır çünkü pleomorfik liposarkomlar yüksek metastatik orana sahiptir. Miksoid liposarkomlar genellikle ekstrapulmoner yumuşak doku yapılarına metastaz yapma eğilimindedir ve iyi diferansiye liposarkomaların metastaz yapma olasılığı düşüktür (Chang ve ark., 1989).

Köpeklerde yapılan retrospektif bir çalışmada, histolojik alt tipin prognostik bir değeri olmadığı, ancak pleomorfik liposarkomalı köpeklerde metastatik hastalığın daha yaygın olduğu bulunmuştur (Baez ve ark., 2004).

2.2.3. Vasküler Doku Tümörleri

2.2.3.1. Hemanjiyosarkom

Hemanjiyosarkomlar, son derece malign tümörlerdir. Kedilerde ve köpeklerde en yaygın primer bölgeler olarak dalak, sağ atriyal apendiks ve karaciğer görülür (MacEwen ve Withrow, 2001). Diğer primer bölgeler arasında deri, perikard, akciğer, böbrekler, ağız boşluğu, kas, kemik, ürogenital sistem ve periton, retroperiton yer almaktadır (MacEwen ve Withrow, 2001; Liptak ve ark., 2004).

Hemanjiyosarkom, malign vasküler endotel kökenli bir neoplazm olarak bilinen başka bir adıyla malign hemanjiyoendotelyoma veya anjiyosarkomadır. Hemanjiyosarkom, türler arasında köpeklerde daha sık görülür (Priester ve McKay, 1980; Spangler ve Culbertson, 1992). Hemanjiyosarkom, tüm nonkutanöz primer malign neoplazmların yaklaşık %5'ini ve köpeklerde tüm mezenkimal neoplazmların %12 ila %21'ini oluşturur (Dorn ve ark., 1968; MacVean ve ark., 1978; Bastianello,

1983). Hemanjiyosarkom, köpeklerde deri tümörlerinin %2.3 ila %3.6'sını ve splenik malignitelerin %45 ila %51'ini oluşturur (Spangler ve Culbertson, 1992; Day ve ark., 1995; Spangler ve Kass, 1997).

Köpeklerde, hemanjiyosarkomun en yaygın primer bölgesi dalaktır (Oksanen, 1978; Priester ve McKay, 1980; Brown ve ark., 1985; Srebernik ve Appleby, 1991; Schultheiss, 2004). Diğer sık görülen bölgeler arasında sağ atriyum, deri ve deri altı dokusu ile karaciğer bulunur (Priester, 1976; Hargis ve ark., 1992; Ward ve ark., 1994; Ware ve Hopper, 1999; Aupperle ve ark., 2007). Hemanjiyosarkomun görüldüğü bildirilen diğer bölgeler arasında akciğer, böbrek, ağız boşluğu, kas, kemik, idrar kesesi, sol ventrikül, uterus, dil, parmak ve retroperiton yer almaktadır (Pirkey-Ehrhart ve ark., 1995; Erdem ve Pead, 2000; Liptak ve ark., 2004a, 2004b; Locke ve Barber, 2006; Wobeser ve ark., 2007; Dennis ve ark., 2011).

Hemanjiyosarkomun yerleşim yeri, bir organ içinde birçok odaklı veya yaygın olarak yayılmış olabilir. Değişken boyutlarda, soluk gri ile koyu kırmızı veya mor renkte, yumuşak veya jelatinöz yapıda olup, genellikle kesit yüzeyi kan dolu veya nekrotik alanlar içerir. Kötü huylu olarak tanımlanmış, kapsülle çevrilmemiş ve genellikle yanındaki organlara yayılmıştır. Son derece dayanıksızdırlar ve çatlamaya ve kanamaya bağlı komplikasyonlar sıkça gözlenir. Histolojik olarak, hemanjiyosarkom değişken miktarda kan ve/veya tromboz içeren vasküler boşluklar oluşturan olgunlaşmamış, pleomorfik endotel hücrelerden oluşur (Gamlem ve Nordstoga, 2008).

Damar yapısı ile olan yakın ilişkisinden kaynaklanan, metastaz yapan hücrelerin ekstrasvazyonunu ve anjiyogenezini kolaylaştıran bir özellik olarak, köpek hemanjiyosarkomunu çok agresif biyolojik davranışa sahiptir ve hızla gelişen geniş metastazlar görülür (Ward ve ark., 1994). Metastaz genellikle hematojen veya çatlamayı takiben transabdominal implantasyon yoluyla gerçekleşir. En sık metastatik bölgeler karaciğer, omentum, mezenter ve akciğerlerdir (Brown ve ark., 1985; Waters ve ark., 1988).

Bir çalışma, splenik hemanjiyosarkomlu köpeklerin yaklaşık %25'inin aynı zamanda sağ atriyal tutulumu sahip olabileceğini öne sürdü (Waters ve ark., 1988). Ancak yazarın deneyimi, bu yüzdeninin başlangıçta önemli ölçüde daha düşük olduğunu göstermektedir (%5 veya daha az). Bildirilen diğer metastatik bölgeler böbrek, kas, periton, lenf nodları, adrenal bez, beyin ve diaframı içerir. Köpeklerde hemanjiyosarkom, beyine metastaz yapan en yaygın tümör olarak kabul edilir (Waters ve ark., 1989; Snyder ve ark., 2008).

Primer dermal hemanjiyosarkomlar, özellikle köpeklerin karın altındaki açık renkli veya az pigmentli cilt ile preputial bölgesine özgü bir eğilime sahiptir ve güneş ışınları, köpeklerde dermal hemanjiyosarkomların bir nedeni olarak öne sürülmüştür. Köpeklerdeki dermal hemanjiyosarkomlar, klinik olarak derinlik derecesine göre aşama belirlenerek sınıflandırılır. Aşama I tümörler dermis ile sınırlıdır, aşama II tümörler subkutanöz dokuya uzanır ve aşama III hemanjiyosarkomlar kas katmanını içerir (Ward ve ark., 1994).

2.2.3.2. Lenfanjiyosarkom

Lenfanjiyosarkomlar, lenfatik endotel hücrelerden köken alan genç köpeklerde ve kedilerde görülen nadir tümörlerdir (Kelly ve ark., 1981; Walsh ve Abbott, 1984; Goldschmidt, 2002). Genellikle yumuşak, kistik benzeri ve ödematöz olan lenfanjiyosarkomlar, deri altında meydana gelir. Çoğu durumda, klinik belirtiler geniş ödem ve lenfin deri yoluyla veya kistik kitle aracılığıyla drenajı ile ilişkilidir. Aspirasyon, sıvı dolu bir kütleyi ortaya çıkarabilir. Histopatolojik olarak, bu tümörler normal endotel hücrelerine benzemektedir ve vasküler kanallar nedeniyle hemanjiyosarkomlarla karıştırılabilir; ancak kırmızı kan hücreleri görülmez (Goldschmidt, 2002). Lenfanjiyosarkomlar genellikle orta ile yüksek metastatik potansiyele sahiptir (Diessler ve ark., 2003).

2.2.4. Perifer Sinir Tümörleri

2.2.4.1. Malign Perifer Sinir Kılıfı Tümörü

PSKT'ler, sinir kılıfı kökenli malign tümörlerdir ve nörofibrosarkom, malign schwannoma ve hemanjioperisitoma olarak adlandırılmıştır. Hemanjioperisitoma ile ilgili kafa karışıklığı, köpeklerde henüz kan damarı perisit kökeninin kanıtlanmamış olması gerçeğidir. Histolojik olarak çoğu hemanjioperisitoma, sinir kılıfı tümörlerinin özelliklerine sahip olacaktır (Goldschmidt, 2002).

İsimlendirmeye bakılmaksızın, bu tümörler vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkabilir. Bir PSKT, beyin veya omurilikten uzakta olan sinirleri içerebilir (periferik grup), veya beyin veya omuriliğe hemen komşu olan sinirleri (kök grup) veya brakial, lumbosakral pleksusu (pleksus grup) içerebilir (Brehm ve ark., 1995).

Gerçek periferik form, pleksus veya kök formundan çok daha tedavi edilebilirdir. Cerrahi sırasında kapsüllenmiş gibi görünseler de, bu tümörler fibrosarkomlara benzer ve histolojik kapsülleme olmadan kötü tanımlanmış tümörler olarak ortaya çıkar. Tümörlerin çoğu daha derin dokulara yapışık olup altta yatan fasya, kas ve deriye sızabilir. Bu tümörler malign kabul edilse de, düşük bir metastatik orana sahiptirler. Fibrosarkomlar gibi, PSKT'ler için konservatif cerrahiyi takiben lokal nüks yaygındır. Yavaş büyümeye eğilimli olup çapları başlangıçta 0,5 cm'den 10 ila 12 cm'ye kadar değişebilir. Bazı durumlarda, başlangıçta klinik muayene sırasında lipomlarla kolayca karıştırılabilirler (Goldschmidt, 2002).

2.3. Tümörle İlişkili Nötrofiller

Nötrofiller, organizmanın dış patojenlere karşı ilk savunmasında önemli bir rol oynayan ve tüm beyaz kan hücrelerinin %40-70' ini oluşturan bir granülosit türüdür (Malech ve ark., 2014; Ronchetti ve ark., 2021). Polimorfonükleer nötrofiller (PMN'ler), fagositoz, oksidatif patlamalar, antimikrobiyal araçların salınımı ve NET üretimi dâhil olmak üzere mekanizmaların bir birleşimini kullanarak patojenleri,

endojen veya eksojen faktörleri yok eder (Teng ve ark., 2017; Kaltenmeier ve ark., 2021).

Nötrofiller kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden farklılaşır ve tam olgunlaşmadan sonra kan dolaşımına girer. Nötrofiller kan dolaşımında 72 saatten fazla dolaşmazlar. Yerleşik makrofajlar tarafından fagosite edilmek üzere kemik iliğine dönerler ya da periferik dokularda apoptoza uğradıktan sonra fagosite edilirler (Vorobjeva ve Chernyak, 2020).

Tümörle ilişkili nötrofiller (TAN'lar), tümör mikroçevresindeki bağışıklık hücrelerinin önemli bir bölümünü oluşturur. Yüksek tümör içi nötrofil yoğunluğu, lenf düğümü bölgelerindeki metastaz ile ilişkilidir. Tümör ve tümör mikroçevresinin nötrofil alımını kontrol ettiği gösterilmiştir. TAN'ların tümör ilerlemesini düzenlediği ve tümör büyümesini kontrol ettiği bulunmuştur (Masucci ve ark., 2019; Chen ve ark., 2021).

Fridlender ve diğerlerine göre, tümörle ilişkilendirilmiş nötrofiller (TAN'lar), tümörlere göç etmiş nötrofiller olarak tanımlanır (Fridlender ve Albelda, 2012). TAN'ların lokalize açık hücreli böbrek karsinomunda genel sağkalım, nüks sonrası sağkalım ve kanser spesifik sağkalım için bağımsız prognostik faktörler olduğu bulunmuştur (Ghatalia ve ark., 2019). TAN'lar renal hücreli karsinomda genellikle immünsüpresif bir işlevi vardı ve TAN'ların varlığı, immünoterapi ve tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilen hastalarda bağımsız, olumsuz bir prognostik faktör olarak belirlendi (Wang ve ark., 2019). TAN'ların baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda (Trellakis ve ark., 2011) ve akciğer kanserinde (Banat ve ark., 2015) de bir prognostik faktör olduğu bulunmuştur. Nötrofillerin gliomlarda tümör derecesi ile korele olduğu (Fossati ve ark., 1999) ve pankreas tümörlerinin daha agresif tipleri ile ilişkili olduğu (Reid ve ark., 2011) gözlemlenmiştir (Gąsowska-Bajger ve ark., 2022).

Sitokinlerin etkisi altında, TAN'lar ya protumörojenik (N2) fenotip ya da proinflamatuvar/antitumörojenik (N1) fenotipe doğru polarizasyona uğrar. N2 fenotipe doğru polarizasyon, dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β)'ye bağlıdır, bu sırada TGF- β blokajı antitumörojenik N1 fenotipinin çekilmesine ve aktive edilmesine yol

açar (Fridlender ve ark., 2009). Antitumörojenik (N1) inflamatuvar nötrofiller, N2 TAN'lardan daha fazla reaktif oksijen türü (ROS) ve daha yüksek seviyelerde nitrik oksit, hidrojen peroksit ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) üretir (Mishalian ve ark., 2013). N1 TAN fenotipi aynı zamanda CD8+ T hücrelerini çeker ve aktive edebilir; ki bunlar herhangi bir tümör bağışıklık tepkisinin önemli katkıda bulunanlarıdır, diğer yandan N2 TAN'lar CD8+ T hücrelerinin fonksiyonunu inhibe eder (Fridlender ve ark., 2009).

2.4. Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları

Nötrofiller, antimikrobiyal aktivitelerini uygulamak için fagositoz ve degranülasyonun yanı sıra NET olarak adlandırılan hücre dışı ağ benzeri yapıların salınmasını içeren netosis olayını gerçekleştirir (Papayannopoulos, 2018; Burgener ve Schroder, 2020; Ronchetti ve ark., 2021). NET'ler, patojenleri yakalamak ve öldürmek için salınan antimikrobiyal enzimleri ve histonları içeren nükleer veya mitokondriyal DNA liflerinden yapılmış ağ benzeri yapılardır (Pruchniak ve Demkow, 2019; Kaltenmeier ve ark., 2021).

NET'ler, histonlar ve antimikrobiyal proteinlerle kaplanmış yoğunlaştırılmış kromatin filamentlerinden oluşur (Yipp ve Kubes, 2013; Ronchetti ve ark., 2021). NET'lerde nötrofil elastaz, miyeloperoksidaz, katepsin G, proteinaz 3, laktoferrin, jelatinaz, lizozim C, kalprotektin, nötrofil defensin ve katelisin proteinleri bulunur (Korkmaz ve ark., 2008; Kwak ve ark., 2022). NET'ler, antimikrobiyal rollerinin yanı sıra hem patojenler hem de bağışıklık hücreleri için fiziksel bir bariyer oluştururlar (Manda-Handzlik ve ark., 2020; Kaltenmeier ve ark., 2021).

2.5. Netosis

NET oluşum süreci klasik biçimde netosis olarak adlandırılır. Netosis, apoptoz ve nekrozdan farklı olarak düzenlenmiş hücre ölümü tipi olarak tanımlanır (Manda-Handzlik ve ark., 2020). NET'lerin oluşumu bakteri, mantar, protozoa, virüs gibi çeşitli patojenler ve lipopolisakkaritler (LPS) tarafından aktive edilebilir. Netosis, antikorlar, bağışıklık kompleksleri, sitokinler (TNF vb.), kemokinler (IL-8 vb.), mikrokristaller

ve diğerk fizyolojik uyarıanlar tarafından indüklenebilir (Vorobjeva and Pinegin, 2014; Tan ve ark., 2015; Vorobjeva ve Chernyak, 2020).

İki tip netosis karakterize edilmiştir. Suicidal netosis yavaş bir hücre ölüm yolu ile gerçekleşir. Vital netosis NET'lerin canlı hücrelerden hücre dışı boşluğa hızlı bir şekilde salınması ile oluşur (Yipp ve Kubes, 2013; Ronchetti ve ark., 2021).

2.5.1. Suicidal Netosis

Suicidal netosis, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine bağılı olan bir mekanizmadır. Forbol-12-miristat-13-asetat (PMA), antikorlar, kolesterol kristalleri, bakteriyel lipopolisakarit, interlökinler gibi bir dizi uyarının suicidal netosis'i indüklediğı gösterilmiştir (Jorch ve Kubes, 2017). İn vitro suicidal netosis'in ana aktivatörleri bitkiden türetilen doğal bir organik bileşik olan PMA ve IL-8'dir (Hoppenbrouwers ve ark., 2017).

1996'da yapılan önemli bir çalışmada PMA tarafından indüklenen apoptoz ve nekrozdan farklı olan nötrofil ölümünün yeni bir formu tanımlanmıştır. PMA, kromatin kompaktlığının kaybı ve nükleer zarfın sitoplazmik organellerle füzyonu dâhil olmak üzere nötrofilde morfolojik değışikliklere neden olur. PMA ile 3 saatlik inkübasyondan sonra DNA bozunma ürünlerinin PMN'lerden salındığı ve hücre ölümüne yol açan sürecin ROS üretimine bağılı olduğu gösterilmiştir (Takei ve ark., 1996; Cristinziano ve ark., 2022).

Suicidal netosis nötrofilleri etkili bir şekilde öldüren bir mekanizmadan oluşur ve parçalanarak yoğunlaştırılmış kromatin, histonlar ve litik enzimlerden oluşan filamentli yapıyı hücre dışı boşluğa salar. Suicidal Netosis'in bilinen aktivatörleri, PMA ve Fc reseptörüne bağılıanan antikorlardır. Hücre dışı sinyaller, NADPH oksidazın kalsiyuma bağılı aktivasyonuna ve ROS salınmasına yol açar. ROS, peptidil arjinin deiminaz 4'ü (PAD4) enziminin aktivasyonuna ve granüllerden Nötrofil Elastaz (NE) ve Miyeloperoksidazın (MPO) çekirdeğine translokasyonuna neden olur. PAD4, NE ve MPO'nun etkileri histonların sitrülinasyonuna ve ardından kromatin yoğunlaşmasının azalmasına neden olur. Nötrofillerin nükleer zarı yırtıldıktan sonra

enzimler ve histonlarla karışan kromatin, hücre zarının yırtılmasını takiben önce sitoplazmaya, sonra hücre dışı boşluğa salınır ve NET oluşturur (Ronchetti ve ark., 2021).

Suicidal netosis'te Raf/MEK/ERK sinyal iletim kaspazı aktive edilerek endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımı ve ROS'un ana kaynaklarından biri olan NADPH oksidaz alt birimlerinin fosforilasyonu şekillenir (Hakkim ve ark., 2011; Sarniak ve ark., 2016). MPO ve NE nötrofillerin azurofil granüllerinden salınır ve çekirdeğe yer değiştirir (Papayannopoulos ve ark., 2010; Metzler ve ark., 2014; Cristinziano ve ark., 2022).

Hücre içi kalsiyum seviyelerinin artması sitozolde kalsiyuma bağımlı bir enzim olan PAD4 aktive eder. Çekirdekte yer değiştiren PAD4, arjinin kalıntılarını sitriline dönüştürerek H2A, H3 ve H4 histonlarının deaminasyonunu katalize eder. Histonlar pozitif yüklerini ve kromatin kompaksiyonunu kaybeder (Neeli ve ark., 2009; Wang ve ark., 2009).

Sonuç olarak, nükleer ve mitokondriyal membranlar bütünlüğünü kaybederek sitoplazma ve karyoplazma içeriği birbirine karışır. Hücresel membran parçalanır ve hücre içi içerik hücre dışı boşluğa salınır. Bu aktivasyon yolunun sonucu olarak nötrofil ölür (Brinkmann, 2018; Cristinziano ve ark., 2022).

2.5.2. Vital Netosis

Suicidal netosis ile karşılaştırıldığında vital netosis NADPH oksidazdan ve ROS üretiminden bağımsız olarak gerçekleşir (Pilszczek ve ark., 2010; Kwak ve ark., 2022). NET'ler veziküller içinde bulunduğu için nötrofiller onları zar yırtılmadan serbest bırakabilir. Bu tür netosis geçiren nötrofiller canlı kaldığı için bu sürece vital netosis denir (Kwak ve ark., 2022).

Vital netosis'te NET oluşumunun ardından kemotaksis ve fagositoz dâhil olmak üzere temel işlevleri korur. Vital netosis'te NET oluşumu, trombositlerin nötrofillere bağlanması ve tamamlayıcı reseptörlerin veya Toll benzeri reseptörlerin

(TLR'ler) enfeksiyöz uyarılar tarafından bağlanması dâhil olmak üzere belirli uyarılara maruz kaldıktan sonra tanımlanmıştır (Clark ve ark., 2007; McDonald ve ark., 2012; Yipp ve ark., 2012; Byrd ve ark., 2013; Hilscher ve Shah, 2020). Vital netosis'te, PAD4 aktivasyonu, NADPH'den bağımsız olarak gerçekleşir (Leppkes ve ark., 2016; Jorch ve Kubes, 2017).

Vital netosis'te, nötrofil bozulmadan kalır ve bir vezikül sistemi aracılığıyla retikulumu serbest bırakır. NADPH oksidaz aktivasyonundan bağımsız görünmektedir. TLR2 veya tamamlayıcı reseptör tarafından tanınan, özellikle mikrobiyal enfeksiyonlar ve TLR4'ü bağlayan LPS ile aktive olan trombositler, bu ikinci yolun kanıtlanmış başlıca aktivatörleri arasındadır (Ronchetti ve ark., 2021).

2.6. Miyeloperoksidaz

Nötrofiller, çoğunlukla patojenlere karşı gösterdiği rolle bilinen doğal bağışıklık yanıtının önemli oyuncularıdır (Terstappen ve ark., 1990; Kolaczowska ve Kubes, 2013). Etki mekanizması, başlıca azurofil granüllerden oluşan içeriğin salınımına dayanmaktadır. Bu granüller, MPO ve diğer mikrobisidal proteinlerin bir kombinasyonu ile oluşmaktadır (Segal, 2005; Hansson ve ark., 2006; Borregaard ve ark., 2007; Häger ve ark., 2010; Scandolara ve Panis, 2020).

Katyonik molekül olan MPO, negatif yüklü yapılara patojen yüzeyinden bağlanır ve aktivasyonu ile nötrofil süperoksit üretimi sırasında solunum patlaması gerçekleşir (Furtmüller ve ark., 2006; Okada ve ark., 2016; Grishkovskaya ve ark., 2017; Nauseef, 2018). Nötrofil patlamasının sonucu olarak ortaya çıkan yan ürün olan hidrojen peroksit, MPO'nun aktivasyonu ve işlevi için gereklidir (Soubhye ve ark., 2016; Khan ve ark., 2018).

Reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminde ve fagositozda enzimatik rolünün yanı sıra, MPO degranülasyon ve nötrofil hücre dışı tuzakları (NET'ler) üretimine aktif olarak katılır. Bu süreç Netosis olarak bilinir ve proteinin pozitif yükü önemli bir rol oynar (Kargapolova ve ark., 2021).

Aktive olan nötrofiller, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazları aracılığıyla büyük miktarlarda süperoksit üretirler. Süperoksit, hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşerek özellikle MPO-katalizli reaksiyonlar tarafından oluşturulan çeşitli toksik oksijen türevlerinin oluşumuna yol açar. Hem NADPH oksidazı hem de MPO, NET oluşumunun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak, gereken spesifik reaktif oksijen türleri (ROS) henüz net değildir. Miyeloperoksidaz, H_2O_2 tarafından klorürün oksidasyonunu kataliz eder ve güçlü bir oksidan olan hipokloröz asidi (HOCl) oluşturur; bu, fagosomda oksidatif öldürmenin başlıca aracıdır (Winterbourn ve Kettle, 2013).

Miyeloperoksidaz (MPO), nötrofillerde yoğun olarak bulunan bir proteindir ve hücrenin kuru ağırlığının %5'ini oluşturur (Schultz ve Kaminker, 1962). Azurofilik granüllerde depolanan ve nötrofiller uyarıldığında salınan Miyeloperoksidaz (MPO), hidrojen peroksit varlığında klorür ve diğer halojenür iyonlarının oksidasyonunu katalize ederek hipokloröz asit ve etkili antimikrobiyal etkiye aracılık eden diğer oldukça reaktif ürünleri oluşturur (Klebanoff, 1968, 2005; Klebanoff ve Hamon, 1972; Harrison ve Schultz, 1976).

Cools-Lartigue ve arkadaşları, 2013 yılında dolaşan tümör hücrelerinin NET'ler tarafından vitroda yakalanabileceğini ilk kez tanımladılar. Bu, deneysel enfeksiyon sırasında metastazın bir teşvikçisi olabilir (Cools-Lartigue ve ark., 2013). O zamandan beri, birçok çalışma NET'lerin çeşitli kanser türlerindeki rolünü anlamaya odaklandı ve neden MPO-NET-ANCA ağının kanserde ortaya çıktığına dair mekanizma bilgileri önemli ölçüde ilerledi. Akciğer karsinom hücrelerinin, nötrofillerde toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ve yüksek mobilite grup kutusu 1 (HMGB1) proteinine bağımlı bir şekilde NET'lerin oluşumunu tetikleyebildiği gösterildi (Zhou ve ark., 2019). Ayrıca, dolaşan NET'lerin varlığı Rayes ve arkadaşları tarafından yakın zamanda tanımlanmıştır (Rayes ve ark., 2019). Bu çalışmada, ileri evre özofageal, mide ve akciğer kanseri olan hastalarda dolaşan NET'lerin varlığı, sağlıklı kontrol grubundan daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Yazarlar ayrıca fare modellerinde NET'lerin hastalık ilerlemesini düzenleyebileceğini göstermişlerdir; çünkü oluşumunun engellenmesi metastazların meydana gelme sıklığını azaltmıştır (Scandolara ve Panis, 2020).

Bu bulgular, nötrofillerin kanser yayılmasındaki rolünü güçlendirdi ve Netosis'e yönelik hedefleme, metastazları önlemek için umut vadeden bir strateji olabilir. Bunun yanı sıra, Jung ve arkadaşları (Jung ve ark., 2019), pankreas kanseri hücrelerinin NET'lerin oluşumunu tetikleyebildiğini ve bunun hücre migrasyonunu, invazyonu ve anjiyogenezin artmasından sorumlu olduğunu göstermiştir. Ayrıca, araştırmacılar pankreatobiliyer tümörlere sahip hastaların dolaşan NET'lerde artmış düzeylere sahip olduğunu gösterdi; bu, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hiperkoagülabilité ile ilişkilendirilen belirteçlerle uyumluydu ve başka bir çalışmada hastalık evresi ile ilişkilendirilmişti (Miller-Ocuin ve ark., 2019). Dolaşan NET'lerin ve kanser klinik evrelerinin ilişkisi, meme kanseri hastalarında da güçlendirilmiştir (Rivera-Franco ve ark., 2020). Toplamda, bu bulgular, NET'lerin kanserde hem metastatik süreci hem de vasküler olayları teşvik ederek çift bir rolü olduğunu göstermektedir (Scandolara ve Panis, 2020).

Malle ve diğerleri, miyeloperoksidazın nötrofillerin azurofil granüllerinde depolanan peroksidaz grubuna ait bir enzim olduğunu gösterdiler. Bu enzim, bu hücrelerdeki tüm proteinlerin %2 ila %5'ini oluşturur. Miyeloperoksidaz ayrıca monositler, Kupffer hücreleri ve glial hücrelerde de bulunur. Bu, vücudu patojenlere ve mikroorganizmalara karşı korumada hayati bir rol oynar. Malle ve diğerleri, miyeloperoksidazın inflamatuvar bölgelerde nötrofiller tarafından salgılanan sitotoksik ve bakterisidal bir protein olduğunu bildirdi. Bu protein, HOCl üreterek vücudu çeşitli patojenlere karşı korur (Malle ve ark., 2007).

Klebanoff, miyeloperoksidazı inflamatuvar bir reaksiyon sırasında nötrofiller tarafından fagositozun bir sonucu olarak salgılanan ana enzimlerden biri olarak tanımladı; bu nedenle, nötrofiller için immünohistokimyasal bir işaretçi olarak görev yapar (Klebanoff, 2005).

Zhu ve diğerlerinin, Qin ve diğerlerinin ve Cascorbi'nin çalışmaları, miyeloperoksidaz ekspresyon bozukluklarının ve çeşitli kanser risklerinin artmasının doğrudan miyeloperoksidaz gen polimorfizmleri ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Birçok epidemiyolojik çalışma, MPO G-463A polimorfizminin akciğer kanseri, meme kanseri, mesane kanseri, lenfoma, yemek borusu kanseri,

hepatoselüler karsinom ve laringeal kanser dahil olmak üzere birçok kanser riski üzerinde etkisi olduğunu göstermiştir (Cascorbi ve ark., 2000; Zhu ve ark., 2006; Qin ve ark., 2013; Gąsowska-Bajger ve ark., 2022).

Bir çalışmada (Stevens ve diğerleri) miyeloperoksidazın, genotoksik ara ürünleri ve prokarsinojenleri aktive ederek kanseri dolaylı olarak tetikleyebileceğini gösterdi. Belirli doymamış yağlar ve amino asitlerin (örneğin, serin ve treonin) metabolizması sonucunda, asidin bir türevi olan, protein asitlerini oluşturabilen akrolein gibi yan ürünler oluşturabilir. Akroleinin biyolojik etkileri, DNA'daki guanin ve proteazların, nükleer faktörlerin ve diğer proteinlerin önemli bölgelerindeki histidin, arginin, lizin ve sistein kalıntıları gibi biyolojik nükleofillere karşı reaktivitesinin bir sonucudur. Ortaya çıkan akrolein bileşikleri, bu makromoleküllerin işlevini bozabilir, bu da mutasyonlara, transkriptom lezyonlarına ve apoptozis modülasyonuna neden olabilir (Stevens ve Maier, 2008).

2.7. Sitrüline Histon3

Netozis sürecinde nötrofil granülositlerin DNA'sı, nötrofilin granüllerinde depolanan çeşitli enzimlerle birlikte salınır. Bu süreçte önemli bir enzim olan peptidilarginin deiminaz 4 (PAD4), Netozis sürecinde Histon 3'ün (H3cit) sitrülünmesi için önemlidir. Bu sürecin, apoptozis ve nekroz gibi diğer hücre ölüm mekanizmalarından bağımsız olarak nötrofile özgü olduğuna inanılmaktadır (Fuchs ve ark., 2012; Grilz ve ark., 2019).

Artan hücre içi kalsiyum seviyeleri, sitrülünasyondan sorumlu bir enzim olan peptidil arginin deiminaz 4 (PAD4) aktivasyonuna yol açar. Sitrülünasyon, arginin kalıntılarını sitrülline dönüştüren bir posttranslasyonel modifikasyondur. PAD4 daha sonra sitoplazmadan çekirdeğe translokasyon yapar ve histonların sitrülünasyonuna etki eder. PAD4 tarafından histon H3'ün arginin kalıntıları R2, R8 ve R17'de meydana gelen sitrülünasyon, pozitif yükün azalmasına ve kromatinin dekonkondansasyonuna neden olur (Neeli ve ark., 2008; Wang ve ark., 2009; Li ve ark., 2010).

Hücre serbest DNA'ya bağlanmış sitriline edilmiş histon H3'ün, NET'lerin bir belirtisi olarak kabul edildiği bilinmektedir. Sitriline edilmiş histon H3'ün (H3cit) varlığı, tümör taşıyan konaklardan, bakteriyel enfeksiyonlara sahip konaklardan türetilen NET'lerde ve çeşitli uyarıcılara yanıt olarak in vitro ortamlarda kanıtlanmıştır (Neeli ve ark., 2008; Demers ve ark., 2012; Li ve ark., 2020).

Histonlar, nükleozomlara nükleer DNA'yı bağlar ve paketler; bu nükleozomlar, hücre aktivasyonu veya hasarı sonucunda kana salınabilir (Xu ve ark., 2009; Allam ve ark., 2014). Bu bağlamda, bir dizi klinik çalışma dolaşan hücre serbest DNA (cfDNA) ve nükleozomların, çeşitli kanser türlerinde potansiyel kan işaretçileri olarak hizmet edebileceğini göstermektedir (Holdenrieder ve ark., 2001; Wu ve ark., 2002; Huang ve ark., 2006; Gahan, 2010).

Ekstrasellüler olarak salındıktan sonra, histonların konak üzerinde zararlı etkilerin aracılığını yapabileceği bildirilmiştir (Xu ve ark., 2009; Fuchs ve ark., 2011; Semeraro ve ark., 2011; Saffarzadeh ve ark., 2012; Huang ve ark., 2013). Bu durum, histonların hem prognostik işaretçiler hem de terapötik hedefler olarak potansiyel taşıdığını düşündürmektedir (Thalin ve ark., 2018).

Posttranslasyonel histon modifikasyonları, histonların yapısı ve fonksiyonu üzerinde derin etkilere neden olabilir ve çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Helin ve Dhanak, 2013). Sitrulline histone H3 (H3Cit), histone H3'ün N-terminindeki peptidilargininin sitrulline dönüşümü sonucu oluşan bir üründür. Histon kalıntısının pozitif yükünde meydana gelen sonraki azalma, negatif yüklü DNA'ya zayıf bir bağlanmaya neden olur ve bu da kromatinin dekonansasyonuna yol açar (Leshner ve ark., 2012).

Histon sitrullinasyonu, enzim peptidilarginin deiminaz 4 (PAD4) tarafından katalize edilir (Wang ve Wang, 2013) ve bu enzim çoğunlukla bağışıklık hücrelerinin sitoplazmasında bulunur; hücre aktivasyonu sonucu çekirdeğe transloke olabilen tek PAD izoformudur (Anzilotti ve ark., 2010). H3Cit'nin bağışıklık hücre kromatin dekonansasyonundaki bu önemli rolü, H3Cit'i, son zamanlarda tanımlanan dekonanse ve ağ benzeri nükleer kromatinin nötrofiller tarafından salınımının

merkezi bir belirteci haline getirmiştir ve buna nötrofil ekstrasellüler tuzaklar (NET'ler) denir (Wang ve ark., 2009; Li ve ark., 2010; Leshner ve ark., 2012). H3Cit, uyarıldığında nötrofillerin çekirdeğinde tespit edilebilir (Wang ve ark., 2009), ancak aynı zamanda NETozis sonucu kana salınabilir (Neeli ve ark., 2009). Ayrıca, PAD4'ün çeşitli tümör tiplerinde aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Chang ve Han, 2006).

Nötrofil aktivasyonu, NET oluşmaksızın nötrofil granül proteinlerinin, örneğin nötrofil elastaz (NE) ve miyeloperoksidaz (MPO) gibi, kana salınmasına neden olabilir (Klebanoff, 2005; Korkmaz ve ark., 2008); ancak NE ve MPO, dışarı atıldıktan sonra ağ benzeri NET yapılarına bağlı olarak gözlemlenmiştir (Brinkmann ve ark., 2004). Son veriler, NET'lerin birkaç enfeksiyöz olmayan ancak inflamatuvar hastalık durumunda (Jorch ve Kubes, 2017), kanser de dahil olmak üzere, merkezi bir rol oynadığını öne sürmektedir. NET'lerin tümör ilerlemesine (Arelaki ve ark., 2016; Demers ve ark., 2016; Guglietta ve ark., 2016), metastatik yayılma (Cools-Lartigue ve ark., 2013; Park ve ark., 2016; Tohme ve ark., 2016; Najmeh ve ark., 2017) ve kanserle ilişkili tromboza (Demers ve ark., 2012; Yang ve ark., 2015; Guglietta ve ark., 2016; Thalin ve ark., 2016) katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Tümör tarafından salınan inflamatuvar sitokinlerin, nötrofilleri NETozis yönünde çekmeye ve hazırlamaya katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Demers ve ark., 2012; Alfaro ve ark., 2016). H3Cit, fare (Boone ve ark., 2015; Demers ve ark., 2016) ve insan tümörlerinde (Arelaki ve ark., 2016; Park ve ark., 2016; Thalin ve ark., 2016; Tohme ve ark., 2016), aynı zamanda fare plazmasında (Demers ve ark., 2012) ve trombotik komplikasyonları olan bazı kanser hastalarında (Demers ve Wagner, 2014; Thalin ve ark., 2016) tespit edilmiştir (Thalin ve ark., 2018).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Anabilim Dalı arşivinden 30 adet köpek yumuşak doku tümörü bloğu kullanıldı (Tablo 3.1) ve örnekler normal ve lizinli lamlara alındı. Tümörlerin histolojik klasifikasyonları yapıldı (Hendrick, 1998; Gross ve ark., 2005; Avallone ve ark., 2007). Buna göre tümörler fibröz doku tümörleri, yağ doku tümörleri, kas doku tümörleri, damar tümörleri, periferik sinir kılıf tümörleri ve damar duvarı tümörleri şeklinde sınıflandırıldı. Ayrıca tümörler benign ve malign olarak sınıflandırıldı. Malign tümörlerin histolojik derecelendirmesi (grading) için tümör farklılaşması, mitotik skor ve tümör nekroz skorları değerlendirilerek nihai tümör derecesi ortaya konuldu.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan olgulara ait bilgiler

No	Tür	İrk	Cinsiyet	Yaş	Yerleşim	Yeni Tanı
1.	Köpek	Melez	Erkek	15	-	Fibrom
2.	Köpek	Melez	Dişi	14	Meme	Fibrom
3.	Köpek	Kopay	Erkek	6	Kalça	Fibrom
4.	Köpek	Kopay	Erkek	6	Kalça	Fibrom
5.	Köpek	Rus finosu	Erkek	10	Diş eti	Fibrom
6.	Köpek	-	-	-	-	Fibrom
7.	Köpek	Melez	Dişi	11	Vagina	Leyomiyom
8.	Köpek	Terrier	Dişi	16	Vagina	Leyomiyom
9.	Köpek	Melez	-	1.5	-	Fibromikzosarkom
10.	Köpek	Golden Retriever	Erkek	10	-	Fibromikzosarkom
11.	Köpek	Golden Retriever	Erkek	5.5	Boyun	Fibrosarkom
12.	Köpek	Rottweiler	Erkek	4	Alt dudak, sağ ön kol	Fibrosarkom
13.	Köpek	Alman Çoban Köpeği	Erkek	6	Diş eti	Fibrosarkom
14.	Köpek	Setter	Erkek	3	Sol ön bacak	Fibrosarkom
15.	Köpek	Terrier	Dişi	12	İntratorakal	Fibrosarkom
16.	Köpek	Melez	Dişi	6	Larinks	Hemangiosarkom
17.	Köpek	Melez	Dişi	7	Karın kası	Liposarkom
18.	Köpek	Husky	Dişi	7	Kuyruk kökü sokumundan	Liposarkom
19.	Köpek	Rottweiler	Erkek	7	Bacak ve sırt bölgesi	Malignant Fibroz Histiyositom
20.	Köpek	Golden Retriever	Dişi	9	Sol skapular bölge	Mikzosarkom
21.	Köpek	Melez	Dişi	17	Koltuk altı	Mikzosarkom
22.	Köpek	Melez	-	-	Perianal bölge	PDT
23.	Köpek	Husky	Erkek	5	Parmak arası	PDT
24.	Köpek	Alman Çoban Köpeği	Erkek	13	Skapula arkası	PDT
25.	Köpek	Terrier	Erkek	12	Perianal bölge	PSKT
26.	Köpek	Husky	Dişi	15	Tarsal bölge	PSKT
27.	Köpek	Melez	-	-	Ağız kenarı	PSKT
28.	Köpek	Melez	Erkek	6	Alt gözkapağı	Andiferensiye Sarkom
29.	Köpek	Melez	Erkek	13	Dalak	Andiferensiye Sarkom
30.	Köpek	Melez	Dişi	12	Femur laterali	Andiferensiye Sarkom

PDT: Perivasküler duvar tümörü; PSKT: Periferik sinir kılıf tümörü

Tümör örneklerinde nötrofil hücre dışı tuzakları (NET'ler) tespit etmek amacıyla, cith3 (sitrülline histon-3) ve myeloperoksidaz (MPO) antikolarıyla boyama işlemleri gerçekleştirildi. Bu süreçte, her iki antikoru aynı tümör kesitlerinde gözlemlemek için belirli bir yöntem izlendi, bu yöntem daha önceki çalışmalardan (Ezaki, 2000; Glass ve ark., 2009) esinlenerek modifiye edildi. İlk adımda, IHC boyama için parafin bloklarından alınan kesitler lizin kaplı lamellere yerleştirildi ve 120 °C'de 15 dakika süreyle sitrat tampon (pH: 6) içinde otoklavda inkübe edildi. Hazır immunohistokimya kiti (ImmPRESS® Excel Amplified Polymer Staining Kit, Anti-Rabbit IgG, Peroxidase, MP-7601, Vector Lab) ile cith3 antikoru (anti-histone H3, STJ11100254, St. John's Laboratory, 1:100 oranında) bir gece boyunca uygulandı. 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC, Thermo Scientific, TA-125-SA) kromojen kullanılarak boyanan kesitler, su bazlı yapıştırıcı ile sabitlendi ve mikroskop altında belirlenen koordinatlardan 20x büyütmeyle fotoğraflar çekildi. Fotoğraf çekimi sonrası lamelleri ayırmak için kesitler distile suya batırıldı ve AEC'nin soldurulması için sırasıyla %70, %95, %70 etil alkol ve distile sudan geçirildi. Daha sonra, daha önce bağlanan antikoları çıkarmak ve antijenleri tekrar ortaya çıkarmak için dokular, tekrar sitrat tampon (pH: 6) içinde mikrodalga fırında 2x5 dakika kaynatıldı. İkinci aşama bloklama için, %2,5 normal at serumu (Vectorlab) ile inkübe edildi ve fazlalığı alındıktan sonra MPO antikoru (anti-myeloperoksidase, STJA0005000, St. John's Laboratory, 1:500 oranında) bir gece boyunca uygulandı. AEC ile yeniden boyanan kesitler su bazlı yapıştırıcı ile sabitlendi ve daha önce çekilen fotoğrafların koordinatlarına göre tekrar fotoğraflar çekildi. Ardından lamellerin ayrılması ve AEC'nin soldurulması için yalnızca distile su ve alkol serilerinden geçirildi. Mayer hematoksilen (Mayer hemalum, 109249, Merck) ile 12 saniye çekirdek boyaması yapıldıktan sonra, preparatlar entellan ile sabitlenerek aynı koordinatlardan yeniden fotoğraflandı.

3.1. Semi-Kantitatif Değerlendirme

Farklılaşma için, normal yetişkin mezenkimal dokuya benzerlik gösteren tümörler skor 1, farklılaşma zayıf olmakla birlikte histolojik tiplendirmesi yapılabilen tümörler skor 2, tiplendirmesi yapılamayan indifferensiye sarkomlar ise skor 3 olarak değerlendirildi. Mitotik skor için 10 adet yüksek büyütme (400x) alanında 0-9 mitoz

skor 1, 10-19 mitoz skor 2, >19 mitoz ise skor 3 olarak değerlendirildi. Son olarak tümör nekroz skoru için, nekroz yok ise skor 0, nekroz < %50 ise skor 1, nekroz > %50 ise skor 2 olarak değerlendirildi. Ardından bu üç parametre için elde edilen skorlar toplanarak nihai tümör derecesi belirlendi. Buna göre, toplam skor 3 veya altında ise tümör derecesi I, 4-5 ise derece II, 6 veya daha yüksek ise derece III olarak belirlendi (Trojani ve ark., 1984; Dennis ve ark., 2011).

Tümör dokularında NET'ler, üç ayrı 20x büyütme alanında incelenerek sayıldı. Bu alanlardaki nötrofil yoğunluğu, 0 ile 4 arasında değerlendirilerek skorlandı. NET seviyelerinin tespiti için, cith3 ve MPO'nun her ikisinin de pozitif olduğu alanlar ile yalnızca cith3 pozitifliği gösteren ve parçalı çekirdekli hücreler dikkate alındı. Bu hücrelerin eozinofillerle karışmaması için, hematoksilen-eozin boyalı kesitler incelenerek eozinofil olmadıkları teyit edildi. Bu sayede NET'lerin her tümör örneğinde doğru şekilde belirlenmesi amaçlandı.

3.2. Yalancı Floresan Görüntü Oluşturma

Hem cith3 hem de MPO pozitifliklerinin aynı alanda gösterilmesi için aynı koordinatlardan kontrollü şekilde çekilen resimler Photoshop programında (Photoshop CS4 Version 11.0) hematoksilen-eozin kesit zeminde olacak şekilde “duplicate layer” seçeneği kullanılarak üst üste getirildi. Ardından “difference” modu altında katmanlar hafif şekilde hareket ettirilerek tam olarak hücrelerin üst üste gelmesi sağlandı. Cith3 ve MPO boyalı kesitler için “blending mode” bölümünde “difference” modu seçilerek farklı boyanmaların kırmızı ve yeşil renge boyanması sağlandı. Ardından katmanlar birleştirildi ve zeminin karartılması amacıyla “color replace” seçeneği kullanıldı. Son olarak da zeminin daha belirgin bir siyahlık almasını sağlamak amacıyla resim kontrastı artırıldı ve “yalancı floresan” görüntüler oluşturuldu.

3.3. İstatistiksel Analiz

Araştırmada toplanan verilerin normal dağılımı olup olmadığını anlamak için Ryan-Joiner normalite testi kullanıldı. Benign ve malign tümörler arasındaki NET skorlarını değerlendirmek için ikili T testi kullanıldı. Tümör derecelerine göre NET

skorlarının karşılaştırılması amacıyla, One Way Anova Posthoc Tukey testi uygulandı. Bunun yanı sıra, nötrofil ve NET skorlarının tümörün mitoz, tümör diferensiyasyonu ve nekroz gibi özellikleriyle olan ilişkisini ve aynı zamanda tümör derecesiyle ilişkisini incelemek için Pearson korelasyon analizi yapıldı. Bu analizde "r" değeri, 0 ile 0,3 arasında önemsiz, 0,3 ile 0,5 arasında düşük, 0,5 ile 0,7 arasında orta, 0,7 ile 0,9 arasında yüksek, 0,9 ile 1 arasında ise çok yüksek korelasyon olarak değerlendirildi (Hinkle ve ark., 2003; Mukaka, 2012).



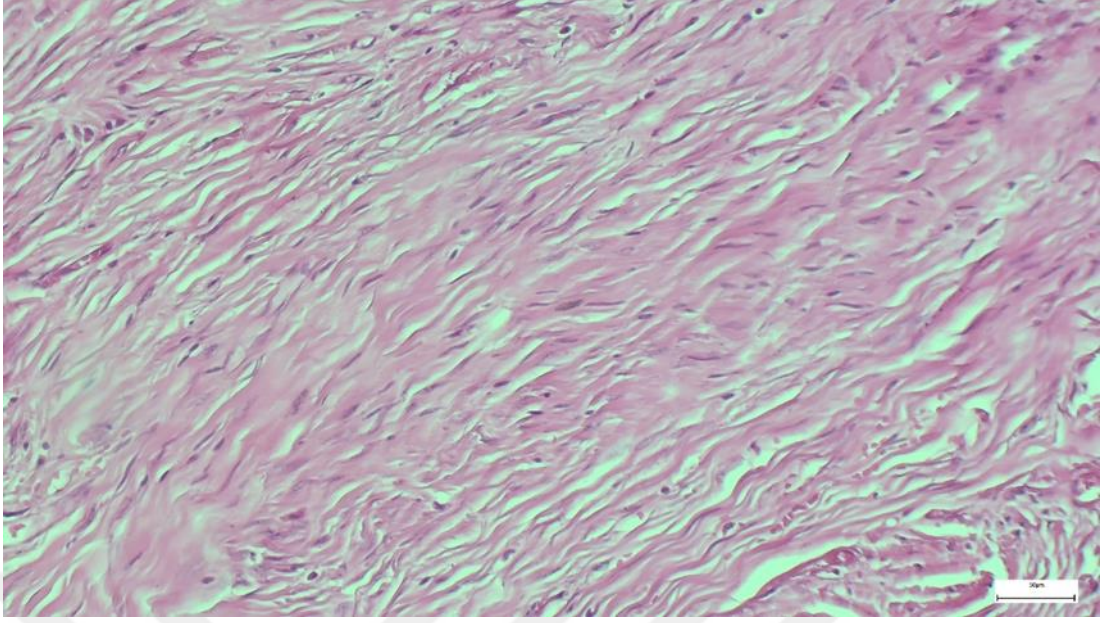
4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

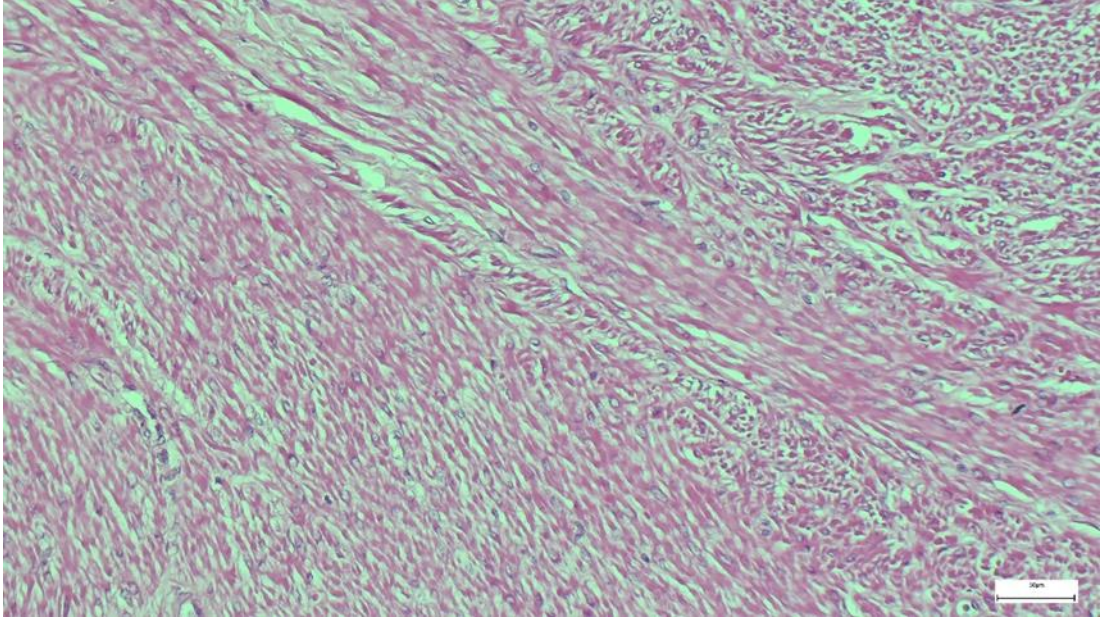
Çalışmada kullanılan olguların tanıları fibrom (n=6), leyomiyom (n=2), fibromikzosarkom (n=2), fibrosarkom (n=5), hemangiosarkom (n=1), liposarkom (n=2), malignant fibröz histiyositom (n=1), mikzosarkom (n=2), perivasküler duvar tümörü (PDT) (n=3), periferik sinir kılıf tümörü (n=3) ve andiferensiye sarkom (n=3) şeklinde belirlendi.

Benign tümörlerin histopatolojik analizinde, fibrom teşhisi alan örneklerde, benign karakteristikler gösteren, tipik mekik şekilli ve çekirdekleri birörneklik gösteren fibroblast artışları göze çarptı (Şekil 4.1). Leyomiyom tanısı konmuş örneklerde ise, benign nitelikler taşıyan ve belirgin pembe renkle boyanan myosit artışları belirlendi (Şekil 4.2).

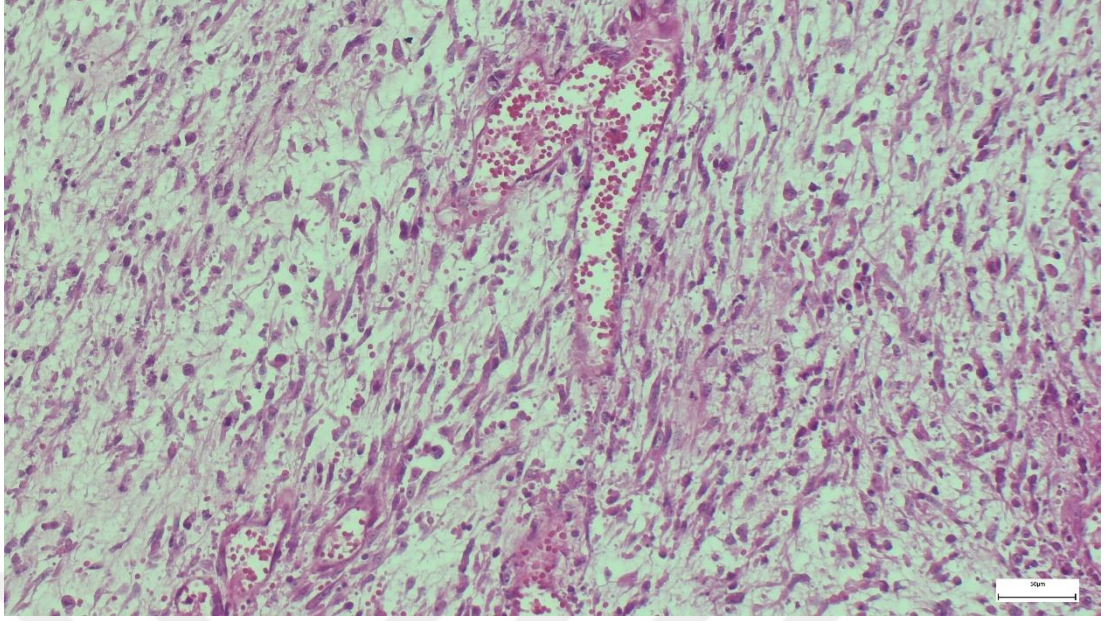
Malign tümörlerin histopatolojik değerlendirmesinde, fibromikzosarkom tanısı alan örneklerde malignite gösteren mekik şekilli hücre proliferasyonlarının farklı yönlerde doğru uzantılar sergilediği ve mikzoid bölgelerin yanı sıra, solid fibrosarkom alanlarının da varlığı gözlemlendi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Tümör dereceleri bir olgu için 2 ve diğeri için ise 3 olarak belirlendi.



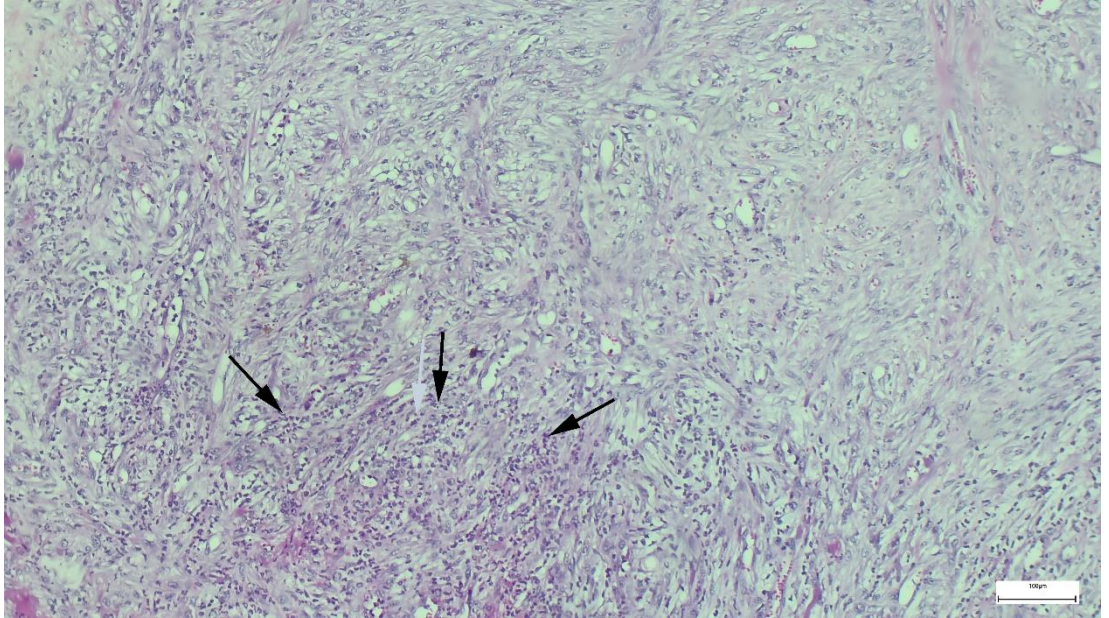
Şekil 4.1. Fibrom olgusunda birörneklik gösteren çekirdek yapısına sahip bağ doku proliferasyonu. H&E. Bar: 50 µm.



Şekil 4.2. Leyomiyom olgusunda benign özellikler sergileyen ve belirgin eozinofilik sitoplazmaya sahip kas doku proliferasyonu. H&E. Bar: 50 µm.

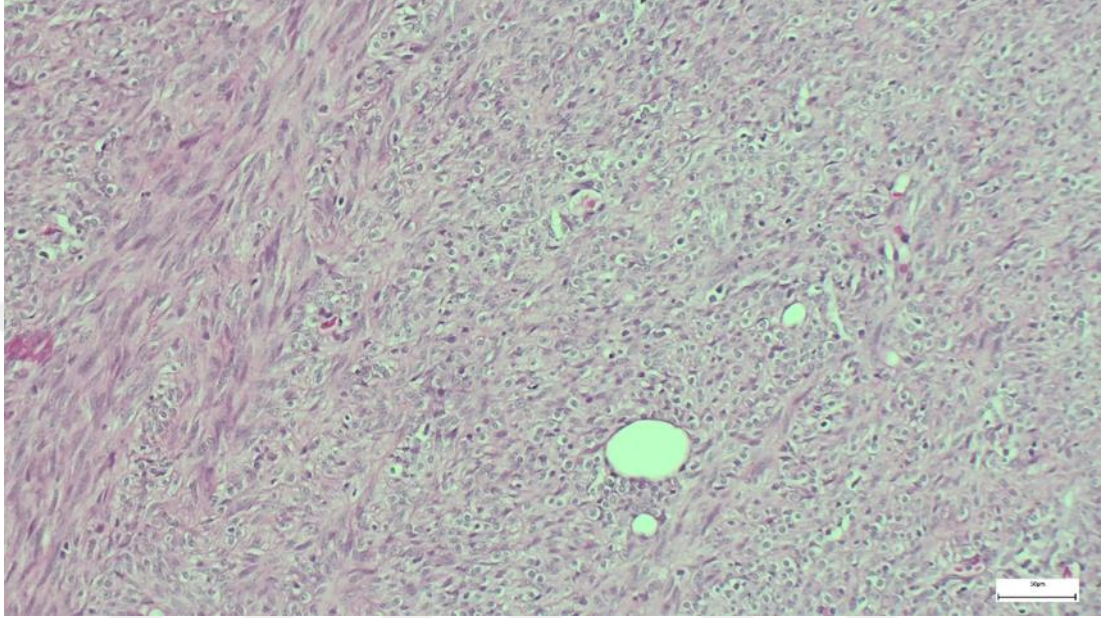


Şekil 4.3. Fibromikzosarkom olgusunda sitoplazmik mikzomatöz oluşumlar sergileyen ve malignite bulguları gösteren neoplastik proliferasyonlar. H&E. Bar: 50 µm.

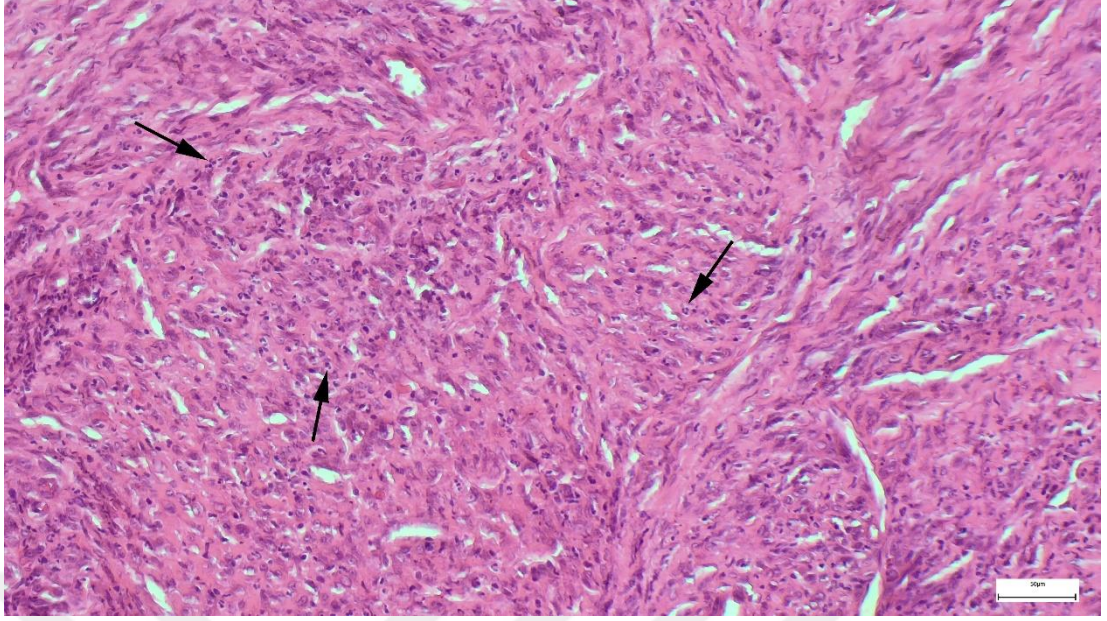


Şekil 4.4. Fibromikzosarkom olgusunda belirgin atipi sergileyen fibrosarkom alanı ve yoğun nötrofil infiltrasyonları (oklar). H&E. Bar: 100 µm.

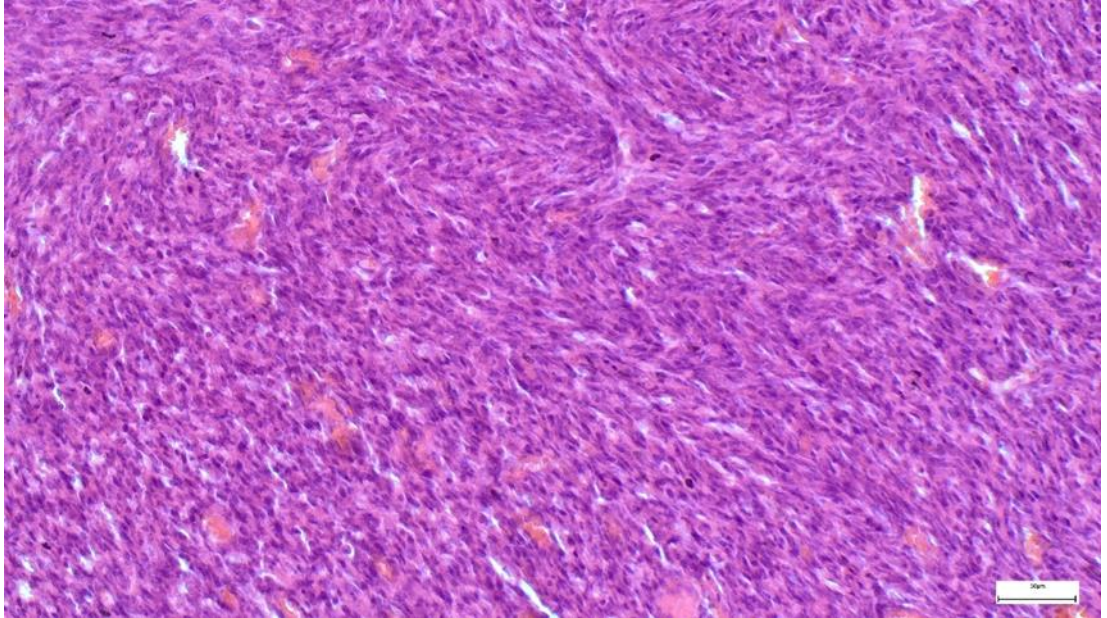
Fibrosarkom tanısı alan örneklerde, belirgin hücre boyutu ve çekirdek boyutu farklılıkları, çok çekirdekli yapılar ve sık mitotik figürler içeren, mekik biçimli neoplastik artışlar tespit edildi (Şekil 4.5-4.7). Olguların ikisinde tümör derecesi 1, ikisinde 2 ve birinde ise 3 olarak belirlendi.



Şekil 4.5. Fibrosarkom olgusunda malign özellikler sergileyen ve farklı yönlere uzantılar gösteren neoplastik proliferasyonlar. H&E. Bar: 50 µm.

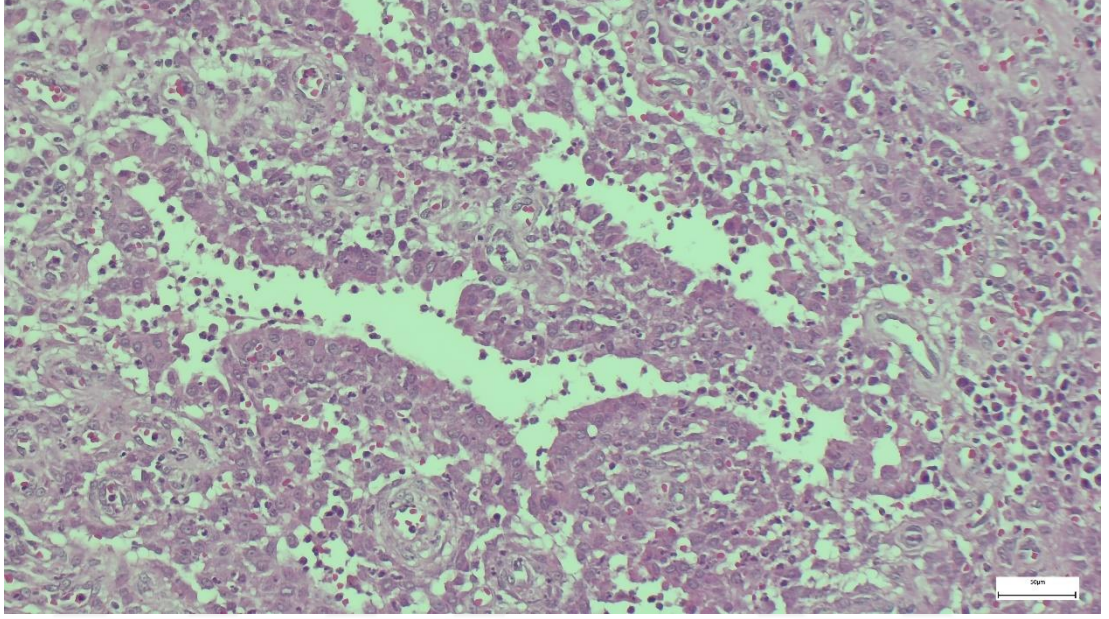


Şekil 4.6. Fibrosarkom olgusunda belirgin eozinofilik sitoplazmaya sahip ve malign özellikler sergileyen neoplazi alanı ve tümör dokusu içerisinde dağınık olarak gözlenen nötrofiller (oklar). H&E. Bar: 50 µm.



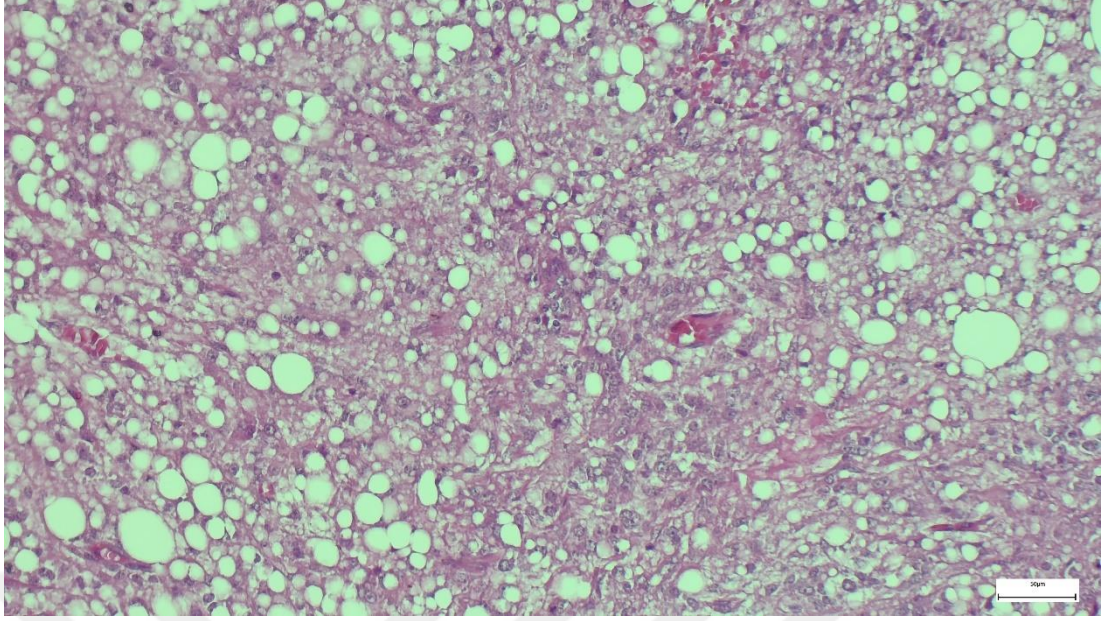
Şekil 4.7. Fibrosarkom olgusunda yüksek hücresellik ve belirgin malign özellikler sergileyen, yüksek vaskülarize tümör dokusu. H&E. Bar: 50 µm.

Hemangiosarkom tanılı olguda solid alanlar şeklide ve çoğunlukla da içlerinde az miktarda eritrosit bulunan lümenler oluşturma eğiliminde mekik şekilli, belirgin eozinofilik sitoplazmalı, orta dereceli anizokaryozis sergileyen ve genellikle merkezi tek bir çekirdekçiğe sahip neoplastik hücre proliferasyonları gözlemlendi (Şekil 4.8). Bu tümörün derecesi ise 2 olarak belirlendi.

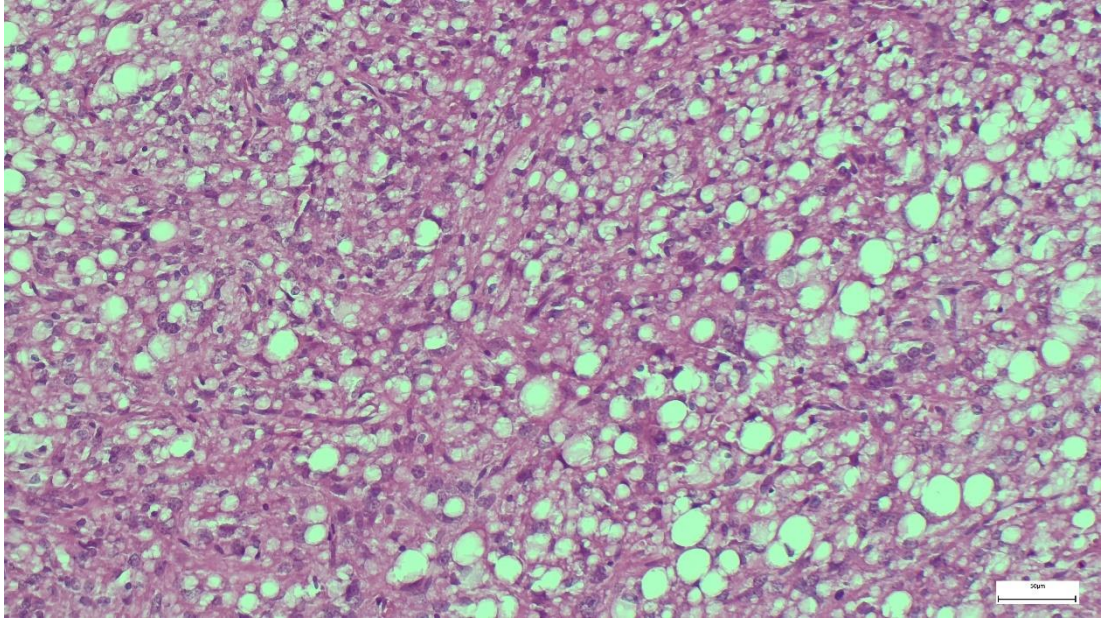


Şekil 4.8. Hemangiosarkom olgusunda damar lümeni oluşturma eğilimi sergileyen, belirgin eozinofilik sitoplazmaya sahip endotelyal proliferasyonlar. H&E. Bar: 50 µm.

Liposarkom tanısı konmuş vakalarda ise, belirgin malignite işaretleri gösteren ve çok sayıda sitoplazmik vakuoller içeren neoplastik artışlar tespit edildi (Şekil 4.9 ve 4.10). Tümör derecesi her iki olguda da 2 olarak belirlendi.



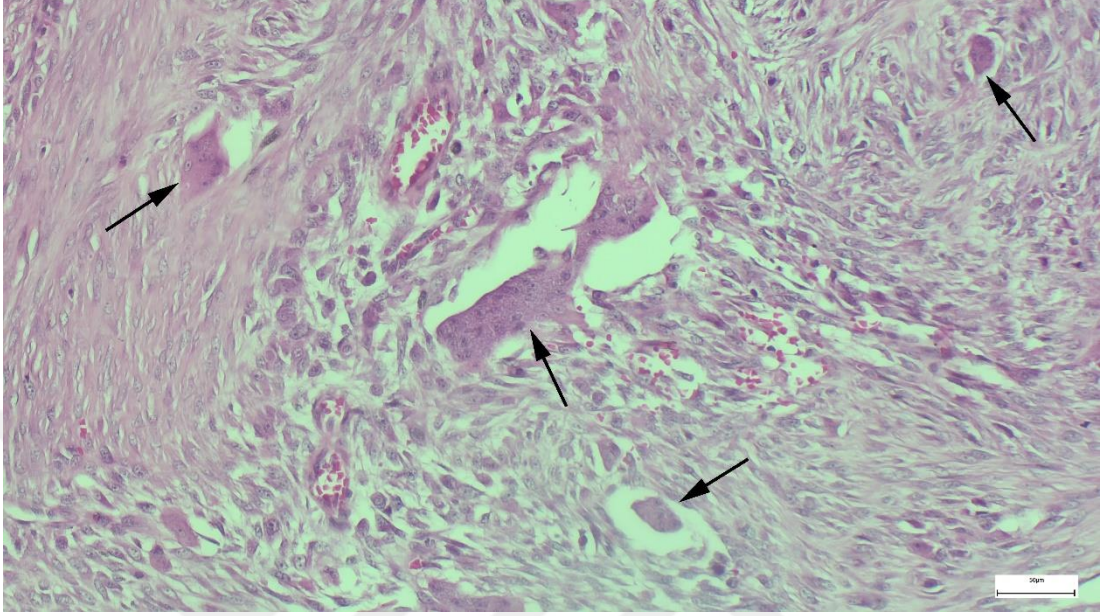
Şekil 4.9. Çok sayıda intrasitoplazmik vakuollere sahip ve yer yer belirgin anizokaryozis gösteren çekirdek yapısına sahip proliferasyonlar. H&E. Bar: 50 µm.



Şekil 4.10. Çok sayıda intrasitoplazmik vakuoller içeren ve belirgin malign çekirdek malignite özellikleri sergileyen neoplazi alanı. H&E. Bar: 50 µm.

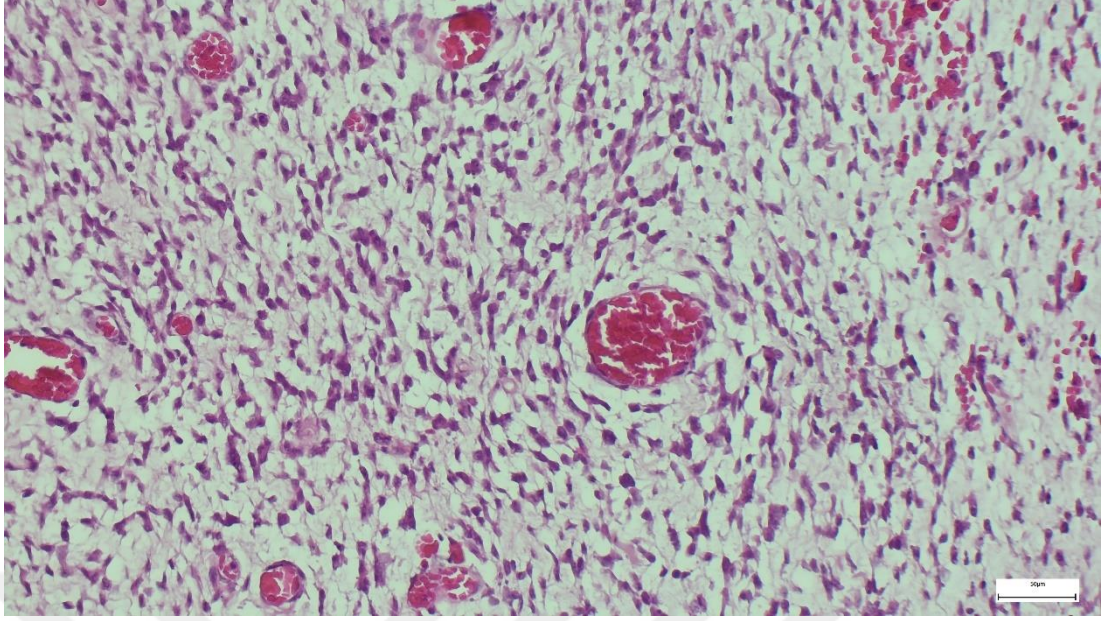
Malignant fibröz histiyositom olgusunda, çoğunlukla mekik şekilli ve belirgin anaplazi gösteren neoplastik mezenkimal hücre proliferasyonlarına rastlandı. Bu

hücreler arasında ise çok sayıda ve çok çekirdeklilik sergileyen dev hücre oluşumları dikkati çekti (Şekil 4.11). Tümör derecesinin ise 3 olduğu belirlendi.

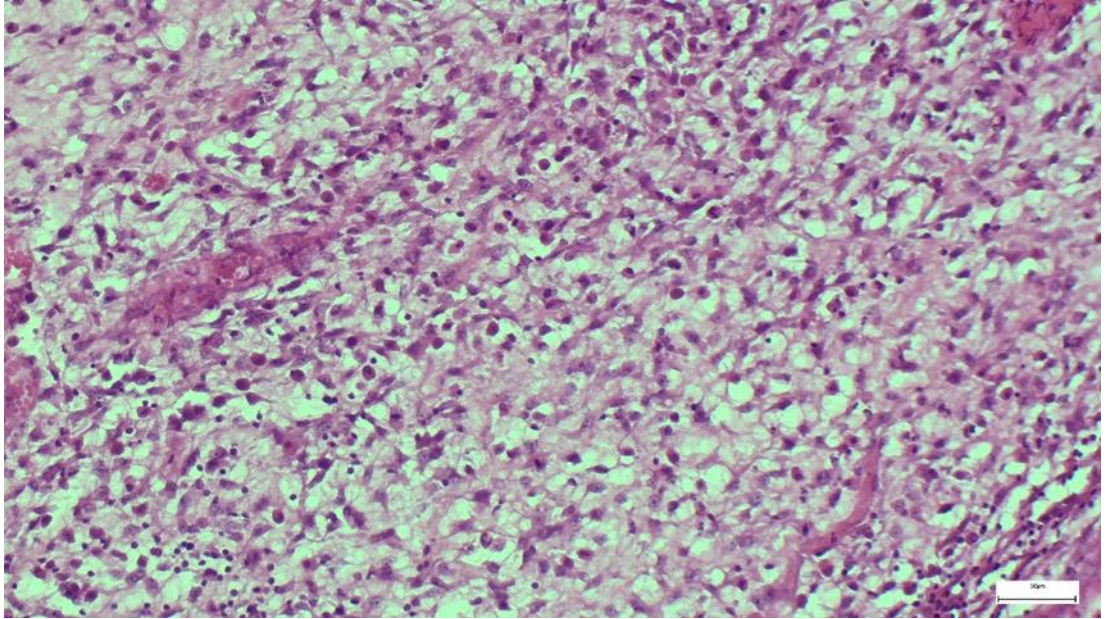


Şekil 4.11. Malignant fibröz histiyositom olgusunda belirgin bağ doku üremeleri ile birlikte çok çekirdekli dev hücrelerinin görünümü (oklar). H&E. Bar: 50 µm.

Mikzosarkom tanısı alan örneklerde, belirgin çekirdek boyutu farklılıkları gösteren, geniş müsinöz maddeli sitoplazmalara sahip, mekik şeklinde proliferasyonlar gözlemlendi (Şekil 4.12 ve 4.13). Tümör derecesi bir olguda 2, diğerinde ise 3 olarak belirlendi.



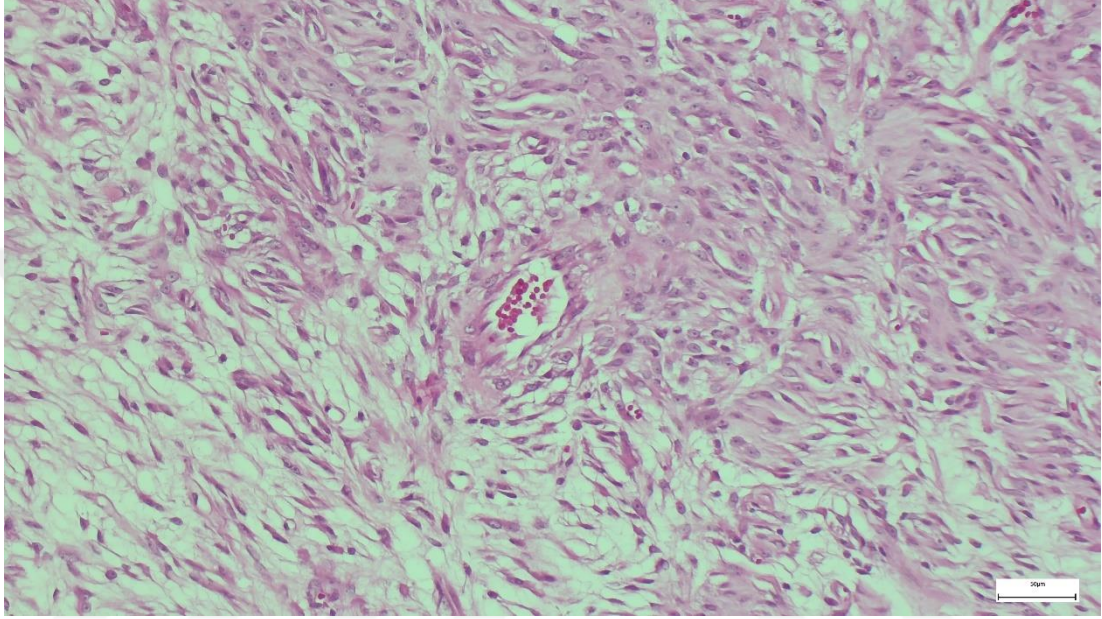
Şekil 4.12. Mikzosarkom olgusunda belirgin mikzomatöz sitoplazmik vakuoller içeren ve anizokaryozis sergileyen mezenkimal hücre proliferasyonları. H&E. Bar: 50 µm.



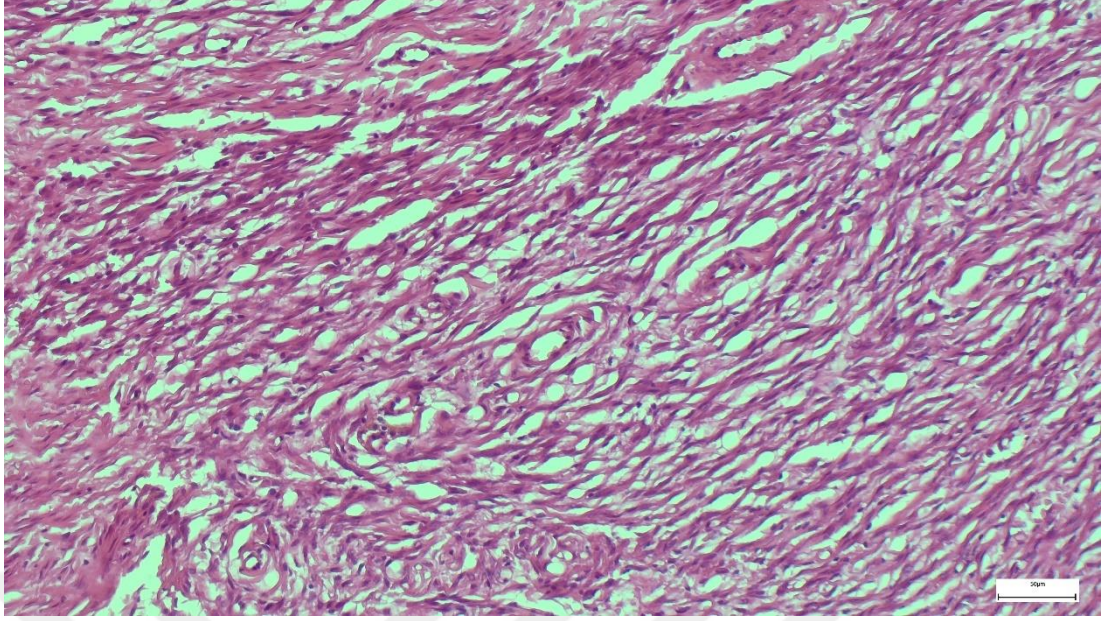
Şekil 4.13. Mikzosarkom olgusunda yüksek hücresellik ve malignite bulguları sergileyen tümör alanı. H&E. Bar: 50 µm.

PDT tanılı vakalarda, merkezi damarlar çevresinde spiral şekilde çoğalan neoplastik hücreler fark edildi. Bir olguda hücre sitoplazmalarının belirgin mikzoid

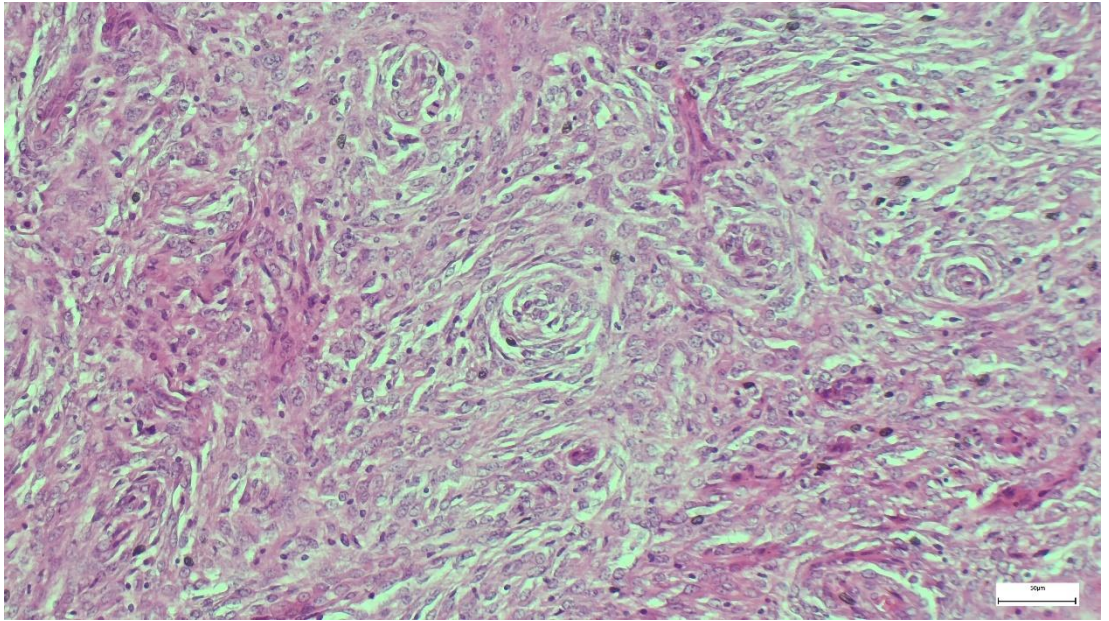
görünümde olduğu dikkati çekti ve tümör derecesi bu olguda 3 olarak belirlendi (Şekil 4.14). Diğer bir olguda ise hücrelerin genellikle hafif malignite bulguları sergilediği ve tümör derecesinin 1 olduğu belirlendi (Şekil 4.15). Diğer olguda ise hücresellik ve malignite bulgularının daha belirgin olduğu ve tümör derecesinin 3 olduğu tespit edildi (Şekil 4.16).



Şekil 4.14. PDT olgusunda yer yer belirgin mikzoid görünüme sahip (yıldız) ve damar çevresinde çoğalmalar gösteren neoplazi alanı. H&E. Bar: 50 μm.



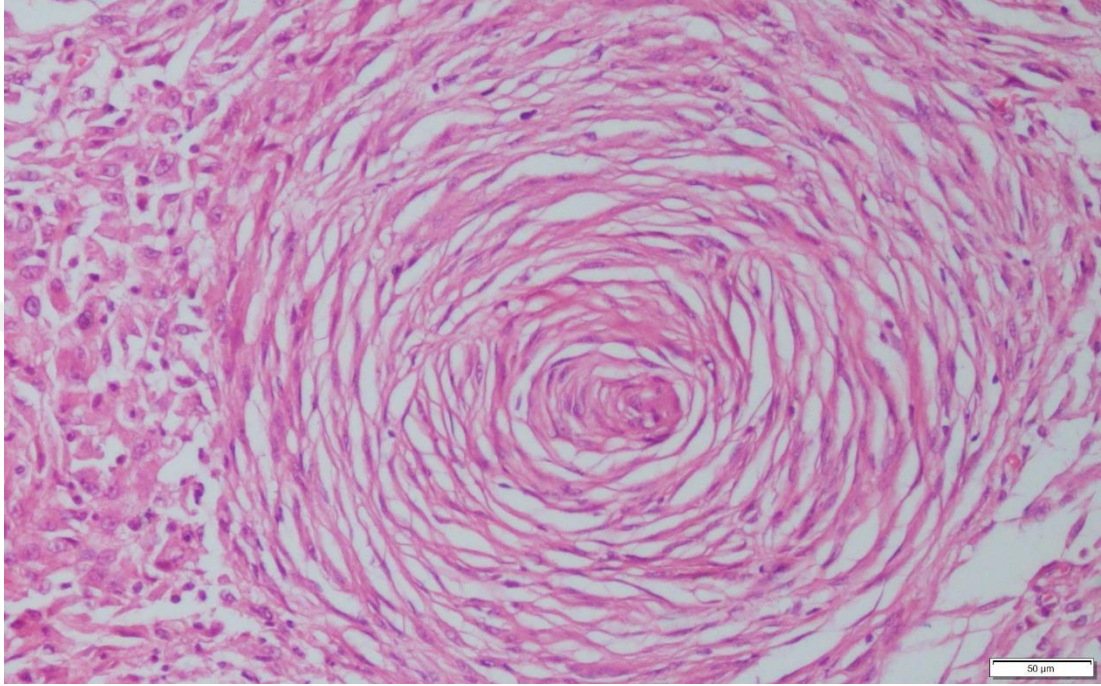
Şekil 4.15. PDT olgusunda damar yapıları çevresinde girdap benzeri şekilde proliferasyon gösteren ve düşük malignite özelliklerine sahip tümör alanı. H&E. Bar: 50 µm.



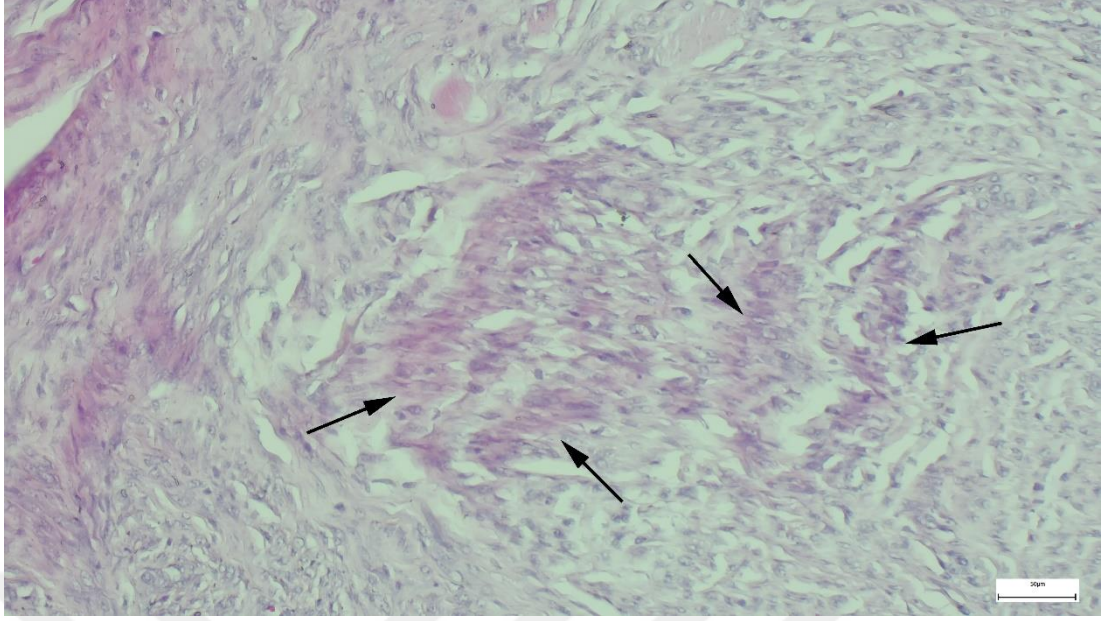
Şekil 4.16. PDT olgusunda damar çevrelerinde helezon yapıları sergileyen ve belirgin malignite özelliklerine sahip neoplazi alanı. H&E. Bar: 50 µm.

Malign PSKT tanısı alan iki örnekte çok sayıda belirgin helezoni yapılar dikkat çekti; bu yapıların merkezlerinde damar yapıları bulunmuyordu (Şekil 4.17). Bu

olgular için tümör derecesi 1 ve 2 olarak belirlendi. Diğer vakada ise, iç içe geçmiş demetler ve belirgin yarıklanmalar içeren, Antoni A ve B tipi patern sergileyen mekik biçimli neoplastik artışlar gözlemlendi (Şekil 4.18). Bu olguda ise tümör derecesi 1 olarak belirlendi.

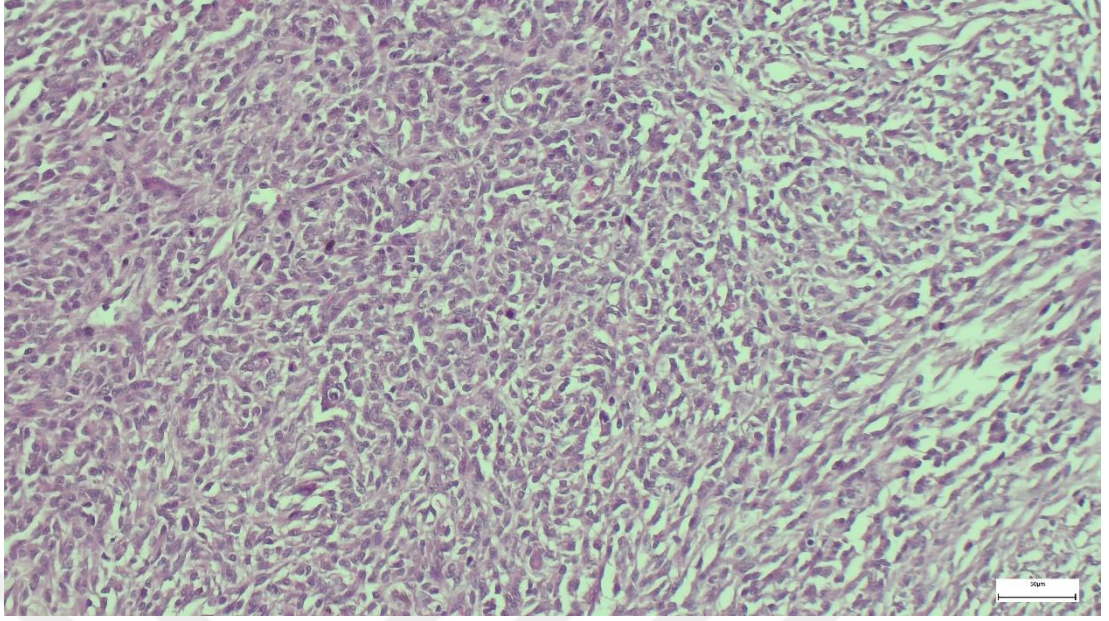


Şekil 4.17. PSKT olgusunda girdap benzeri yapı ile belirgin malignite bulguları sergileyen neoplazi alanı. H&E. Bar: 50 µm.

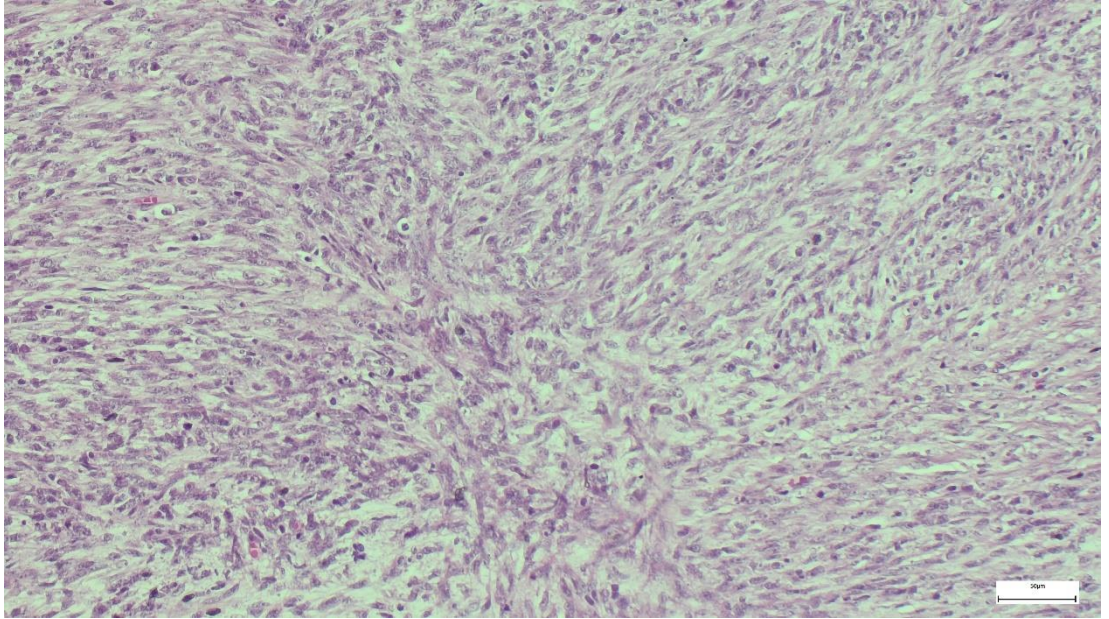


Şekil 4.18. PSKT olgusunda Antoni A tipi patern sergileyen neoplastik görünüm (oklar). H&E. Bar: 50 µm.

Andiferensiye sarkom vakalarında, az farklılaşmış, genellikle mekik biçimli, pleomorfik, çekirdek boyutu farklılıkları gösteren ve bol mitotik figür içeren solid üremeler saptandı (Şekil 4.19 ve 4.20).



Şekil 4.19. Andiferensiye sarkom olgusunda zayıf diferensiyasyon sergileyen ve belirgin malinite özelliklerine sahip mezenkimal proliferasyonlar. H&E. Bar: 50 µm.



Şekil 4.20. Andiferensiye sarkom olgusunda belirgin malign özelliklere sahip, düzensiz anaplastik görünümde tümör alanı. H&E. Bar: 50 µm.

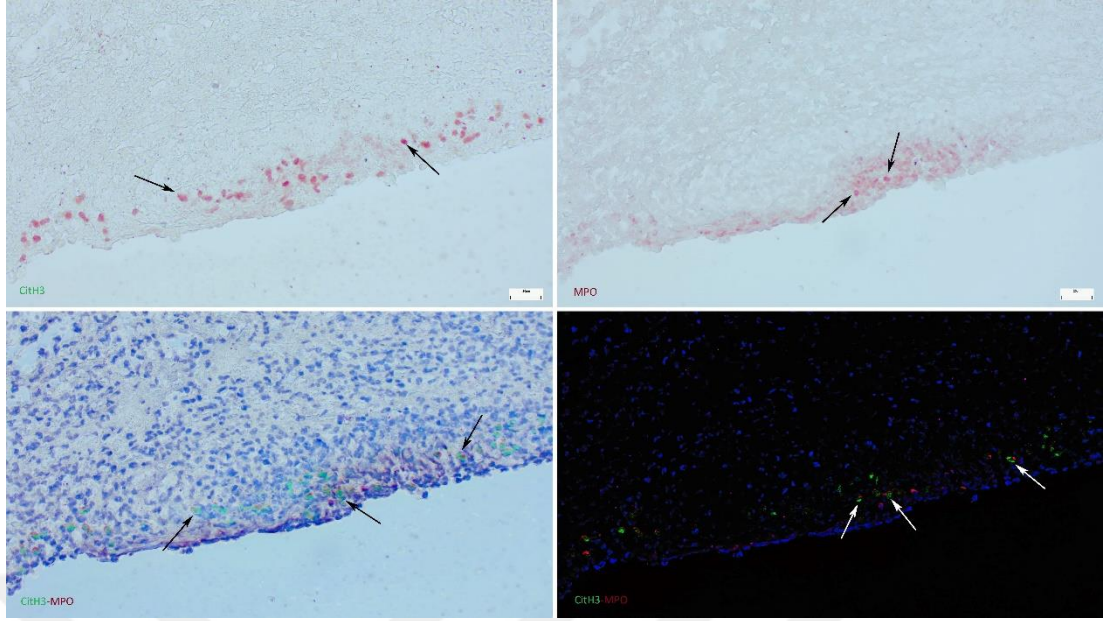
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

NET'ler açısından yapılan incelemelerde; fibrom tanılı olgulardan yalnızca bir tanesinde skor 1 iken, diğer beş olguda 0 olarak belirlendi. Leyomiyom tanılı olgulardan birisinde skor 0 iken, diğerinde 1 olarak belirlendi. Fibromikzosarkom olgularından birisinde skor 1 iken, diğerinde 4 olarak; fibrosarkom olgularından ikisinde skor 0, birisinde skor 1 ve ikisinde ise skor 2 olarak belirlendi. Hemangiosarkom olgusunda skorun 3 olduğu görüldü. Liposarkom olgularında skor 0 olarak, malignant fibröz histiyositom olgusunda ise 2 olarak belirlendi. Mikzosarkom olgularından birinde skor 0, diğerinde 2 olarak tespit edildi. PDT olgularının ikisinde skor 0, birisinde ise 3 olarak belirlendi. PSKT olgularında ise bir olguda skor 0, diğerlerinde ise 1 olarak belirlenirken, andiferensiye sarkom olgularının hepsinde skor 0 olarak belirlendi. Tümörlerde NET skorları ve histolojik derecelendirme skorlarına ait bilgiler Tablo 4.1'de sunulmuştur.

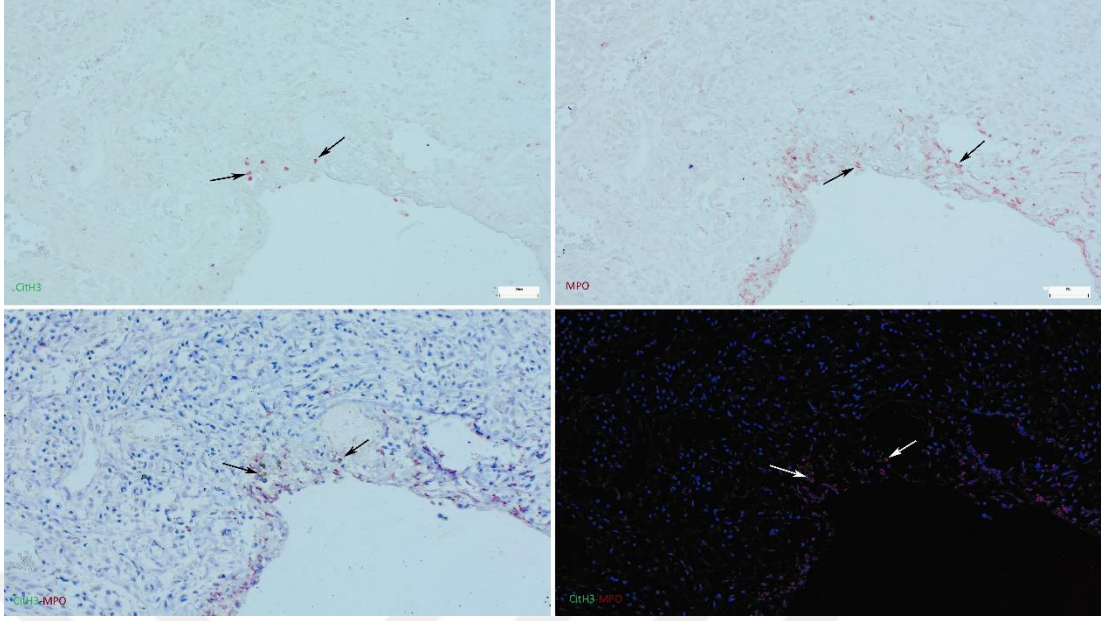
Tablo 4.1. Olgulara ait tanılar ve skorlar

Yeni Tanı	NET	Mitoz	Diferensiyasyon	Nekroz	Derece
Fibrom	0	-	-	-	-
Fibrom	0	-	-	-	-
Fibrom	0	-	-	-	-
Fibrom	1	-	-	-	-
Fibrom	0	-	-	-	-
Fibrom	0	-	-	-	-
Leyomiyom	0	-	-	-	-
Leyomiyom	1	-	-	-	-
Fibromikzosarkom	1	1	2	1	2
Fibromikzosarkom	4	2	3	1	3
Fibrosarkom	0	1	2	1	2
Fibrosarkom	2	2	1	0	1
Fibrosarkom	1	1	1	1	1
Fibrosarkom	0	1	2	1	2
Fibrosarkom	2	3	2	1	3
Hemangiosarkom	3	1	3	0	2
Liposarkom	0	1	2	1	2
Liposarkom	0	1	2	1	2
Malignant Fibroz	2	3	3	2	3
Histiyositom					
Mikzosarkom	0	3	1	1	2
Mikzosarkom	2	2	2	2	3
PDT	0	3	2	1	3
PDT	0	1	2	0	1
PDT	3	1	3	2	3
PSKT	0	1	2	0	1
PSKT	1	1	2	1	2
PSKT	1	1	2	0	1
Andiferensiye sarkom	0	3	3	0	3
Andiferensiye Sarkom	0	2	3	1	3
Andiferensiye Sarkom	0	2	3	1	3

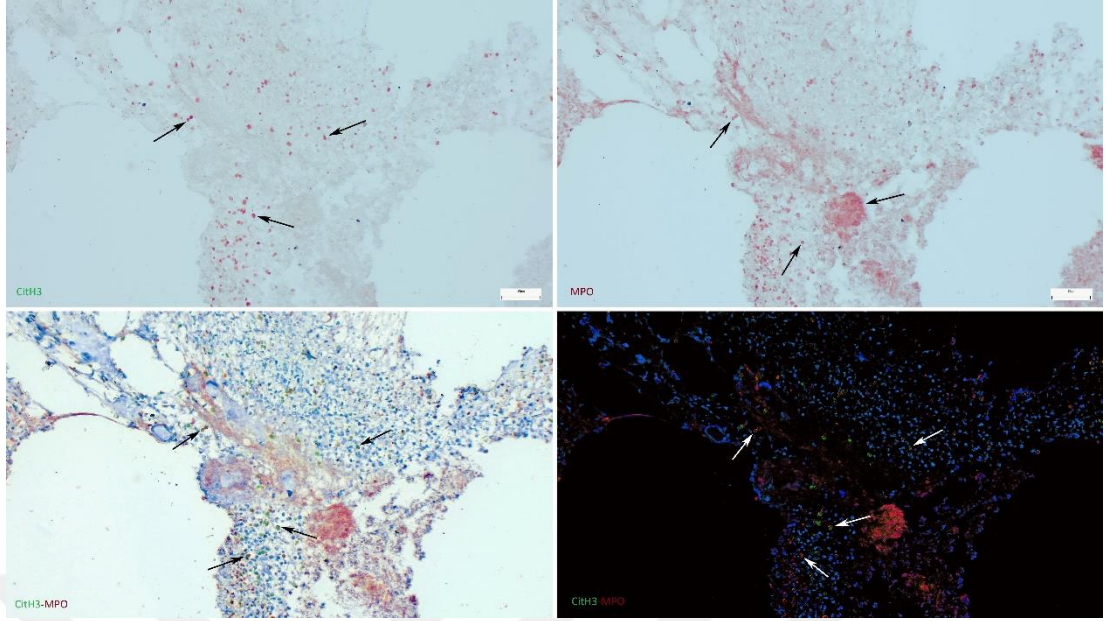
İmmunohistokimyasal boyamalara ait görüntüler ile bunların renklendirmesi ve birleştirilmesi sonrası elde edilen fotoğraflar Şekil 4.21-4.26’de gösterilmiştir.



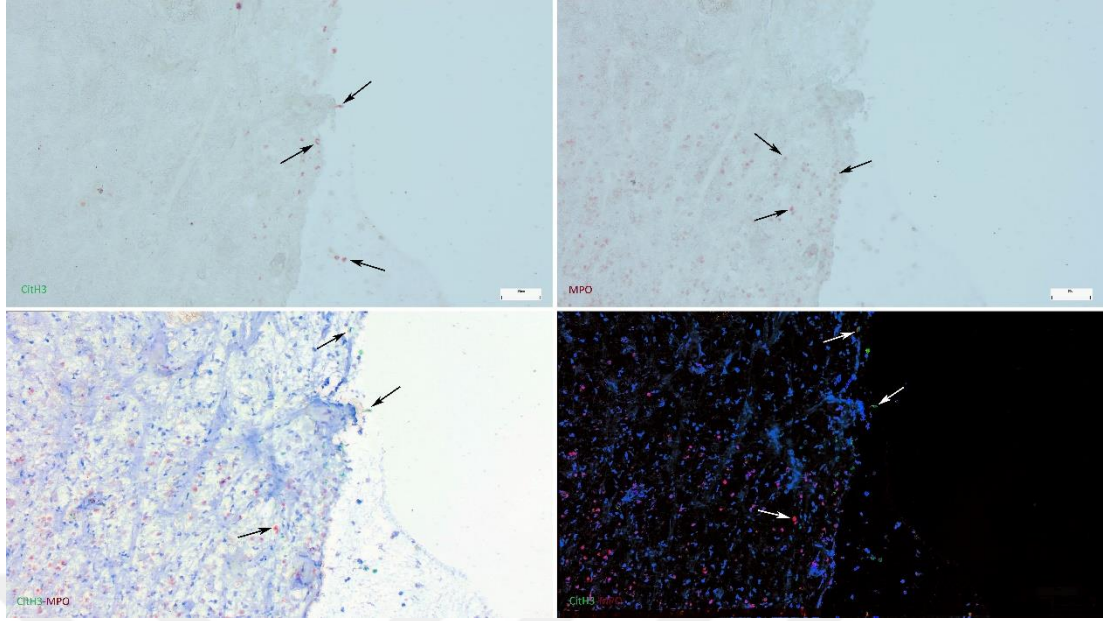
Şekil 4.21. Fibromikzosarkom olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoksilen boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immun floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler (oklar). Bar: 20µm.



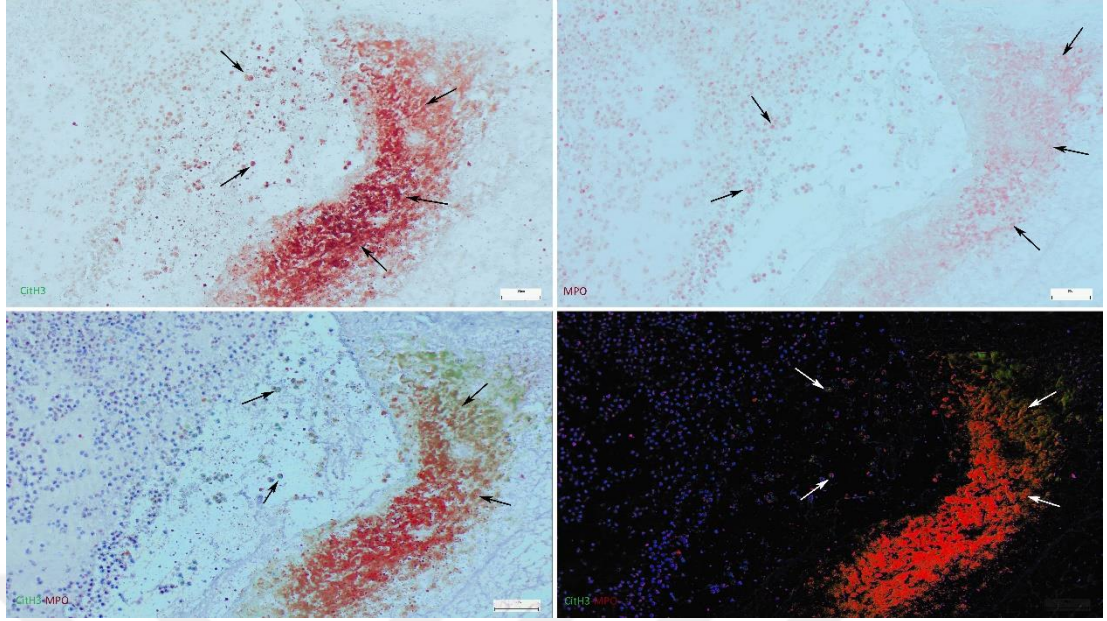
Şekil 4.22. Hemangiosarkom olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoक्सilen boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immün floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler (oklar). Bar: 50µm.



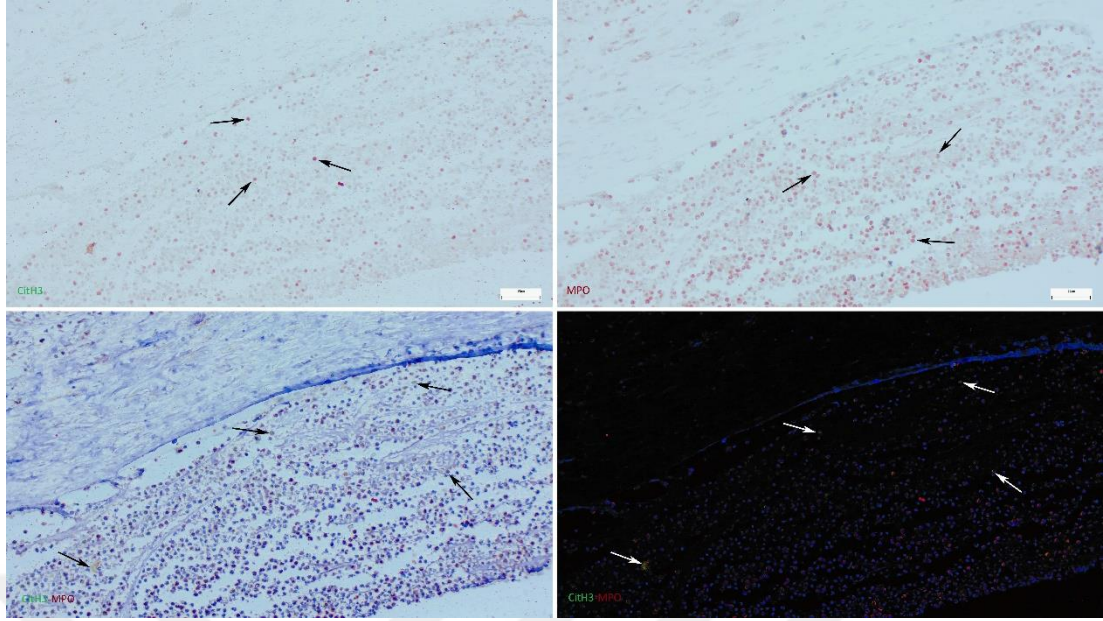
Şekil 4.23. Malignant fibröz histiyositom olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoksilen boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immun floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler (oklar). Bar: 50µm.



Şekil 4.24. Mikzosarkom olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoxilen boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immun floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler (oklar). Bar: 50µm.



Şekil 4.25. PDT olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoxilen boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immun floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler (oklar). Bar: 50µm.



Şekil 4.26. PDT olgusunda CitH3 ve MPO pozitiflikleri (AEC kromojen) ile hematoksilin boyalı zeminde birleştirilmiş (CitH3-MPO) ve renklendirilmiş görünüm ve yalancı immün floresan görünümünde ortak pozitiflik veren hücreler (oklar). Bar: 50µm.

4.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Benign ve malign tümörlerdeki NET karşılaştırması amacıyla yapılan ikili T testi sonucunda, malign tümörlerde NET skorunun benign olanlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($P = 0,023$).

Tablo 4.2. NET skorlarının benign ve malign tümörlerde karşılaştırılması

Tümör	NET
Benign	$0,250 \pm 0,164$
Malign	$1,000 \pm 0,263$

Tümör derecesine göre olgular gruplandırıldı ve gruplardaki verilerin normal dağılım gösterdiği belirlendi. Ardından One-way-Anova testi Tukey analizi ile gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma yapıldı ve NET açısından derece III tümörlerde derece I ve II tümörlere göre sayısal bir yükseklik olmakla birlikte anlamlı bir farklılık

bulunmadığı görüldü ($P = 0,379$). İstatistiksel verilere ait bilgiler Tablo 4.2.'de sunulmuştur.

Tablo 4.3. Nekroz, nötrofil ve NET skorlarının tümör derecesine göre karşılaştırılması

Tümör Derecesi	NET
Derece I	$0,800 \pm 0,374$
Derece II	$0,625 \pm 0,375$
Derece III	$1,444 \pm 0,503$

NET ile mitoz, diferensiyasyon, nekroz ve tümör derecesi arasındaki ilişkiye yönelik olarak yapılan Pearson korelasyon analizinde, NET ile tümör derecesi arasındaki korelasyonun önemsiz ($r = 0,277$) olduğu belirlendi. Benzer şekilde mitoz, diferensiyasyon ve nekroz ile NET arasında da korelasyon önemsiz olarak bulundu. İstatistiksel sonuçlara ait veriler Tablo 4.3.'te sunulmuştur.

Tablo 4.4. Pearson korelasyon analizi sonuçları.

		NET	Mitoz	Diferensiyasyon	Derece
Mitoz	r değeri	0,046			
	p değeri	0,839			
Diferensiyasyon	r değeri	0,290	0,109		
	p değeri	0,190	0,630		
Nekroz	r değeri	0,241	0,182	0,173	
	p değeri	0,279	0,419	0,441	
Derece	r değeri	0,243	0,591	0,656	0,613
	p değeri	0,277	0,004	0,001	0,002

5. TARTIŞMA

Nötrofiller, antimikrobiyal aktivitelerini uygulamak için fagositoz ve degranülasyonun yanı sıra NET olarak adlandırılan hücre dışı ağ benzeri yapıların salınmasını içeren netosis olayını gerçekleştirir (Papayannopoulos, 2018; Burgener ve Schroder, 2020; Ronchetti ve ark., 2021). NET'ler, patojenleri yakalamak ve öldürmek için salınan antimikrobiyal enzimleri ve histonları içeren nükleer veya mitokondriyal DNA liflerinden yapılmış ağ benzeri yapılardır (Pruchniak ve Demkow, 2019; Kaltenmeier ve ark., 2021). NET'ler, histonlar ve antimikrobiyal proteinlerle kaplanmış yoğunlaştırılmış kromatin filamentlerinden oluşur (Yipp ve Kubes, 2013; Ronchetti ve ark., 2021). NET'lerde nötrofil elastaz, miyeloperoksidaz, katepsin G, proteinaz 3, laktoferrin, jelatinaz, lizozim C, kalprotektin, nötrofil defensin ve katelisidin proteinleri bulunur (Korkmaz ve ark., 2008; Kwak ve ark., 2022). NET'ler, antimikrobiyal rollerinin yanı sıra hem patojenler hem de bağışıklık hücreleri için fiziksel bir bariyer oluştururlar (Manda-Handzlik ve ark., 2020; Kaltenmeier ve ark., 2021). Çalışmamızda NET'lerin ortaya konulması için NET belirteci olarak yaygın olarak kullanılan sitrülline histon-3 (cith3) ve MPO kullanıldı. Farklı çalışmalarda NET gösterilmesi için MPO ve nötrofil elastaz bir arada ya da cith3 ile DNA boyaları ile birlikte kullanılmıştır.

Histone sitrülinasyonu ve NETosis sürecindeki rolü, özellikle çeşitli hastalıklarla olan bağlantıları açısından immünolojide önemli bir çalışma alanıdır. Histone sitrülinasyonu, aktivasyon geçiren nötrofillerde gerçekleşen histon kuyruklarının modifikasyonunu içerir ve bu süreç, Neutrophil Ekstraselüler Tuzakları (NET'ler) gelişiminde hayati bir öneme sahiptir. NET'ler, patojenleri tuzağa düşürmek ve nötralize etmek için nötrofiller tarafından salınan dekonpanse kromatin ve granüler proteinlerin ağlarıdır. NET oluşumu, arginin amino asidini sitrülline dönüştüren peptidil arginin deiminaz 4 (PAD4) enziminin aktivasyonu ile yakından ilişkilidir ve netozisin göstergesi olarak kabul edilir (Neeli ve ark., 2008; Leshner ve ark., 2012). PAD4 tarafından indüklenen histon sitrülinasyonu, çeşitli insan patolojileri için yeni bir biyomarker olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak, fazla miktarda NET, inflamatuvar yanıtlara ve doku hasarına yol açabilir. PAD4 aracılı NETosis süreci, bu zararlı etkilerle bağlantılıdır. Ayrıca, PAD4 ve histon sitrülinasyonu (H3Cit), otoimmünite,

kanser, tromboz ve hatta COVID-19 gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Jorch ve Kubes, 2017; Papayannopoulos, 2018; Zuo ve ark., 2020). Myeloperoksidaz (MPO) da NETosis sürecinde önemli bir rol oynar. MPO, nötrofiller tarafından salınan ve DNA içeren yapılarda bulunan intraselüler faktörlerden biridir. NET'ler, enfeksiyon kontrolü, konakçı savunması ve trombozda merkezi bir role sahiptir (Borissoff ve ark., 2013; Yalavarthi ve ark., 2015; Dyer ve ark., 2018). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda belirtilen iki proteine yönelik inceleme yapıldı. Bir önceki çalışmamızda (Karaman, 2023) aynı doku kesitinin CitH3 ile boyandıktan sonra soldurma ve antijen geri kazanma işleminden sonra yeniden MPO ile boyanma metodunu kullandık. Belirtilen bu metodu Glass ve ark. (2009) çalışmasında belirtilen yöntem olan asidik potasyum permanganat uygulamasına ek diğer bazı çalışmalarda kullanılan ısı etkisi ile antijen açığa çıkarma işlemini de ekleyerek gerçekleştirdik (Ezaki, 2000). Bu iki yöntemin bir arada kullanımının antikor çözündürmede başarılı sonuç verdiğini çalışmamızda da doğruladık. Fakat bu çalışmamızda asidik potasyum permanganat uygulamasını kaldırarak yalnızca sitrat tampon içerisinde ısı etkisiyle yeniden antijen kazandırma işlemi uygulandı ve bu yöntemin de tek başına önceki antikor bağlanmalarını başarılı bir şekilde ortadan kaldırdığı görüldü.

Soldurma ve tekrar boyama metodu ile dokularda dökülmelerin yaşanması ihtimali mevcuttur, ayrıca aynı bölgeden resimlerin alınması işlemleri çift immunohistokimya ya da immunfloresan yöntemlerine göre daha zahmetlidir. Bununla beraber bu çalışmada doku dökülmelerinin minimum düzeyde olduğu ve genel olarak doku bütünlüğünün son hematoksilen boyalı preparatlara kadar iyi bir şekilde korunduğu görülmüştür. Bir önceki çalışmamızda uygulanan asidik potasyum permanganat uygulamasının kaldırılmasıyla da bu dökülmelerin daha da azaldığı düşünülmüştür. Bu yöntemin uygulanabilirliği çok sayıda antikor kullanılarak da daha önce doğrulanmıştır ve 12 farklı boyamaya kadar aynı kesitlere farklı antikorların uygulandığı bildirilmiştir (Tsujikawa ve ark., 2017). Daha önce de gösterildiği gibi bu yöntemin çok sayıda antikor kullanılarak da gerçekleştirilmesi, floresan boyamaların problemli olduğu özellikle de formalin tespitli parafin blok kesitleri için oldukça kullanışlı bir yöntem olarak görünmektedir.

Kanser ve bağışıklık sistemi arasındaki ilişki karmaşıktır. Kanser hücreleri, inflamasyon yoluyla tümörün gelişmesini ve yayılmasını hızlandırır ve bu süreçte bağışıklık sisteminden kaçmayı başarır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Tümörlerin çevresinde bulunan bağışıklık hücreleri, tümörün büyümesi, yayılması ve tedaviye verilen yanıtta önemli rol oynar (Ja ve Dt, 2015; Galdiero ve ark., 2016; Binnewies ve ark., 2018). Özellikle nötrofiller, tümör mikroçevresinde önemli bir rol üstlenir. Bu hücreler, tümör tarafından salınan belirli kimyasallar tarafından tümöre çekilir (Negus ve ark., 1997). Nötrofiller, iki tipe ayrılır: N1 ve N2. N1 tipi nötrofiller, antikor bağımlı hücre öldürme ve T hücre aktivasyonu yoluyla tümöre karşı etkilidir, buna karşın N2 tipi nötrofiller, bağışıklık sisteminin tümörle savaşmasını engeller (Fridlender ve ark., 2009; Brandau ve ark., 2013; Coffelt ve ark., 2015). Tümörle ilişkili nötrofiller, tümörün gelişmesine katkıda bulunabilir. Bu, kan damarlarının oluşumunu teşvik etmek, hücre dışı matriksin yıkılmasını artırmak ve bağışıklık sistemini baskılamak gibi yollarla olabilir (De Larco ve ark., 2004; Nozawa ve ark., 2006; Youn ve Gabrilovich, 2010). Bunun yanı sıra, bu hücrelerin tümöre karşı etkili olabileceği de bilinmektedir. Bu, doğrudan hücre öldürme, hücre aracılı öldürme ve T hücrelerini aktive etme yoluyla gerçekleşir (Dissemond ve ark., 2003; Fridlender ve ark., 2009; Guettinger ve ark., 2010; Hubert ve ark., 2011). İnsanlarda, bazı kanser türlerinde (örneğin hepatoselüler karsinom, bronkoalveoler karsinom, kolorektal karsinom, baş ve boyun kanserleri) nötrofil varlığının zayıf bir prognozla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Wislez ve ark., 2003; Jensen ve ark., 2009; Kuang ve ark., 2011; Trellakis ve ark., 2011; Rao ve ark., 2012). Ancak, mide kanseri gibi bazı diğer türlerde, nötrofillerin varlığı daha iyi bir prognozla ilişkili olabilir (Caruso ve ark., 2002). Bu, kanser türüne ve bağışıklık sisteminin durumuna göre değişkenlik gösterir.

Köpek yumuşak tümörlerinde yapılan bir çalışmamızda nötrofillerin maligniteyle ilişkili olmadığı fakat makrofaj infiltrasyonlarının artmasında rol oynayabileceği rapor edilmiştir (Savaş ve İpek, 2021). Köpek meme tümörlerinde NET varlığını aynı metotla incelediğimiz bir çalışmamızda ise (Karaman, 2023) NET'lerle tümör derecesi arasında düşük dereceli negatif bir korelasyon ($r = -0,361$) gözlenmiştir. Mevcut çalışmamızda ise NET'lerin benign tümörlere kıyasla yumuşak doku sarkomlarında anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Yine sarkomların

histolojik derecelendirmeleri temel alındığında NET varlığının derece III tümörlerde sayısal olarak yüksek olduğu fakat bu farklılığın derece I ve II tümörlere kıyasla anlamlı olmadığı görülmüştür. Ek olarak, NET skorlarının sarkomlarda nekroz, diferensiyasyon, mitoz ve tümör derecesi ile anlamsız bir korelasyonu olduğu da gözlenmiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tümör kaynaklı NET oluşumunun, tümör hücrelerinin çoğalmasına yardımcı olduğu, tümöre izin veren bir ortama katkıda bulunduğu, sistemik enfeksiyon varlığında tümör ilerlemesini şiddetlendirdiği ve ayrıca kanserle ilişkili trombozu teşvik ettiği gösterilmiştir. Ayrıca NET'ler, tümör hücresi mobilizasyonundaki rolleri, dolaşımdaki tümör hücresi yapışması ve metastatik büyümeyi teşvik etme rolleri ile metastatik yeteneği güçlendirir. Netosis hakkındaki mevcut çalışmalara göre, NET'lerin kanser ilerlemesinin birçok adımında rol oynadığı sonucuna varılmaktadır ancak birçok önemli fonksiyonel detay hala açıklanmayı beklemektedir. Köpek yumuşak doku sarkomlarında nötrofil hücre dışı tuzaklarıyla ilgili yapılmış bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle bu tez çalışmasının, köpeklerin yumuşak doku sarkomlarına yönelik daha spesifik ve çok sayıda örnek ile NET temelli biyobelirteç kullanımının ve NET hedefli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik yapılacak yeni çalışmaların önünü açması beklenmektedir.

KAYNAKÇA

Alfaro C, Teijeira A, Oñate C, Pérez G, Sanmamed MF, Andueza MP, Alignani D, Labiano S, Azpilikueta A, Rodriguez-Paulete A, Garasa S, Fusco JP, Aznar A, Inogés S, De Pizzol M, Allegretti M, Medina-Echeverz J, Berraondo P, Perez-Gracia JL, Melero I (2016). Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Clinical Cancer Research*, **22**, 3924–3936.

Allam R, Kumar SVR, Darisipudi MN, Anders H-J (2014). Extracellular histones in tissue injury and inflammation. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, **92**, 465–472.

Anzilotti C, Pratesi F, Tommasi C, Migliorini P (2010). Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. *Autoimmunity Reviews*, **9**, 158–160.

Arelaki S, Arampatzioglou A, Kambas K, Papagoras C, Miltiades P, Angelidou I, Mitsios A, Kotsianidis I, Skendros P, Sivridis E, Maroulakou I, Giatromanolaki A, Ritis K (2016). Gradient Infiltration of Neutrophil Extracellular Traps in Colon Cancer and Evidence for Their Involvement in Tumour Growth. *PloS One*, **11**, e0154484.

Aupperle H, März I, Ellenberger C, Buschatz S, Reischauer A, Schoon H-A (2007). Primary and secondary heart tumours in dogs and cats. Elsevier *Journal of Comparative Pathology*, **136**, 18–26.

Avallone G, Helmbold P, Caniatti M, Stefanello D, Nayak RC, Roccabianca P (2007). The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization. *Veterinary Pathology*, **44**, 607–620.

Baez JL, Hendrick MJ, Shofer FS, Goldkamp C, Sorenmo KU (2004). Liposarcomas in dogs: 56 cases (1989–2000). *Am Vet Med Assoc Journal of the American Veterinary Medical Association*, **224**, 887–891.

Baker R, Lumsden JH (2000). *Color atlas of cytology of the dog and cat*. Mosby, Inc.

Banat G-A, Tretyn A, Pullamsetti SS, Wilhelm J, Weigert A, Olesch C, Ebel K, Stiewe T, Grimminger F, Seeger W, Fink L, Savai R (2015). Immune and Inflammatory Cell Composition of Human Lung Cancer Stroma. *PloS One*, **10**, e0139073.

Bastianello SS (1983). A survey on neoplasia in domestic species over a 40-year period from 1935 to 1974 in the Republic of South Africa. VI. Tumours occurring in dogs. Published by The Government Printer, Pretoria.

Berrocal A, Millan Y, Ordas J, Martin de las Mulas J (2001). A Joint Myxoma in a Dog. *Journal of Comparative Pathology*, **124**, 223–226.

Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, Coussens LM, Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Hedrick CC, Vonderheide RH, Pittet MJ, Jain RK, Zou W, Howcroft TK, Woodhouse EC, Weinberg RA, Krummel MF (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*, **24**, 541–550.

Boone BA, Orlichenko L, Schapiro NE, Loughran P, Gianfrate GC, Ellis JT, Singhi AD, Kang R, Tang D, Lotze MT, Zeh HJ (2015). The receptor for advanced glycation end products (RAGE) enhances autophagy and neutrophil extracellular traps in pancreatic cancer. *Cancer Gene Therapy*, **22**, 326–334.

Borrisoff JI, Joosen IA, Versteylen MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Gallant M, Martinod K, Ten Cate H, Hofstra L, Crijns HJ, Wagner DD, Kietselaer BLJH (2013). Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **33**, 2032–2040.

Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. Elsevier *Trends in Immunology*, **28**, 340–345.

Brandau S, Dumitru CA, Lang S (2013). Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Seminars in Immunopathology*, **35**, 163–176.

Bray J (2018). Soft tissue sarcoma in the dog: an update. *In Practice*, **40**, 383–395.

Brehm DM, Vite CH, Steinberg HS, Haviland J, Van Winkle T (1995). A retrospective evaluation of 51 cases of peripheral nerve sheath tumors in the dog. American Animal Hospital Association *Journal of the American Animal Hospital Association*, **31**, 349–359.

Briggs OM, Kirberger RM, Goldberg NB (1997). Right atrial myxosarcoma in a dog. *AOSIS Journal of the South African Veterinary Association*, **68**, 144–146.

Brinkmann V (2018). Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *Journal of Innate Immunity*, **10**, 414–421.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann H, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS., Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. American Association for the Advancement of Science *Science*, **303**, 1532–1535.

Brown NO, Patnaik AK, MacEwen EG (1985). Canine hemangiosarcoma: retrospective analysis of 104 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **186**, 56–58.

Burgener SS, Schroder K (2020). Neutrophil Extracellular Traps in Host Defense. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **12**, a037028.

Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS (2013). An Extracellular Matrix–Based Mechanism of Rapid Neutrophil Extracellular Trap

Formation in Response to *Candida albicans*. *The Journal of Immunology*, **190**, 4136–4148.

Carip C, de Beaumont T (2002). [Malignant histiocytofibroma of the small intestine in a young immune deficient patient]. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)*, **31**, 214–216.

Caruso RA, Bellocco R, Pagano M, Bertoli G, Rigoli L, Infrerrera C (2002). Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc*, **15**, 831–837.

Cascorbi I, Henning S, Brockmöller J, Gephart J, Meisel C, Müller JM, Loddenkemper R, Roots I (2000). Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant--463A of the myeloperoxidase gene. *Cancer Research*, **60**, 644–649.

Chang HR, Hajdu SI, Collin C, Brennan MF (1989). The prognostic value of histologic subtypes in primary extremity liposarcoma. *Cancer*, **64**, 1514–1520.

Chang X, Han J (2006). Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors. *Molecular Carcinogenesis*, **45**, 183–196.

Chen Q, Zhang L, Li X, Zhuo W (2021). Neutrophil Extracellular Traps in Tumor Metastasis: Pathological Functions and Clinical Applications. Multidisciplinary Digital Publishing Institute *Cancers*, **11(13)**, 2832.

Ciekot PA, Powers BE, Withrow SJ, Straw RC, Ogilvie GK, LaRue SM (1994). Histologically low-grade, yet biologically high-grade, fibrosarcomas of the mandible and maxilla in dogs: 25 cases (1982-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **204**, 610–615.

Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, DeVinney R, Doig CJ, Green FHY, Kubes P (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nature Publishing Group *Nature Medicine*, **4(13)**, 463–469.

Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau C-S, Verstegen NJM, Ciampricotti M, Hawinkels LJAC, Jonkers J, de Visser KE (2015). IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*, **522**, 345–348.

Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, Bourdeau F, Kubes P, Ferri L (2013). Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. American Society for Clinical Investigation *The Journal of Clinical Investigation*, **123**, 3446–3458.

Cristinziano L, Modestino L, Antonelli A, Marone G, Simon H-U, Varricchi G, Galdiero MR (2022). Neutrophil extracellular traps in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, **79**, 91–104.

Day MJ, Lucke VM, Pearson H (1995). A review of Pathological diagnoses made from 87 canine splenic biopsies. *Journal of Small Animal Practice*, **36**, 426–433.

De Larco JE, Wuertz BRK, Furcht LT (2004). The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **10**, 4895–4900.

Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, Scadden DT, Wagner DD (2012). Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. Proceedings of the National Academy of Sciences *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 13076–13081.

Demers M, Wagner DD (2014). NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **40**, 277–283.

Demers M, Wong SL, Martinod K, Gallant M, Cabral JE, Wang Y, Wagner DD (2016). Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth. *Oncoimmunology*, **5**, e1134073.

Dennis MM, McSporran KD, Bacon NJ, Schulman FY, Foster RA, Powers BE (2011). Prognostic Factors for Cutaneous and Subcutaneous Soft Tissue Sarcomas in Dogs. *Veterinary Pathology*, **48**, 73–84.

Diessler ME, Castellano MC, Massone AR, Portiansky EL, Allende MG, Idiart JR, Gimeno EJ (2003). Cutaneous Lymphangiosarcoma in a Young Dog: Clinical, Anatomopathological and Lectin histochemical Description. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, **50**, 452–456.

Dissemond J, Weimann TK, Schneider LA, Schneeberger A, Scharffetter-Kochanek K, Goos M, Wagner SN (2003). Activated neutrophils exert antitumor activity against human melanoma cells: reactive oxygen species-induced mechanisms and their modulation by granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. *The Journal of Investigative Dermatology*, **121**, 936–938.

Do SH, Hong IH, Park JK, Ji AR, Kim TH, Kwak DM, Jeong KS (2009). Two different types of malignant fibrous histiocytomas from pet dogs. *Journal of Veterinary Science*, **10**, 169–171.

Dorn CR, Taylor DON, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. Oxford University Press *Journal of the National Cancer Institute*, **40**, 307–318.

DUDA RB (1994). Biology of mesenchymal tumors. Villejuif: Association pour le développement de la communication cancérologique *Biology of mesenchymal tumors*, **7**, 52–62.

Dyer MR, Chen Q, Haldeman S, Yazdani H, Hoffman R, Loughran P, Tsung A, Zuckerbraun BS, Simmons RL, Neal MD (2018). Deep vein thrombosis in mice is regulated by platelet HMGB1 through release of neutrophil-extracellular traps and DNA. *Scientific Reports*, **8**, 2068.

Ehrhart N (2005). Soft-Tissue Sarcomas in Dogs: A Review. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **41**, 241–246.

Erdem V, Pead MJ (2000). Haemangiosarcoma of the scapula in three dogs. *Journal of Small Animal Practice*, **41**, 461–464.

Ezaki T (2000). Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: its potential drawbacks and optimization for double immunostaining. *Micron (Oxford, England: 1993)*, **31**, 639–649.

Foale RD, White R a. S, Harley R, Herrtage ME (2003). Left ventricular myxosarcoma in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, **44**, 503–507.

Folpe AL, Morris RJ, Weiss SW (1999). Soft tissue giant cell tumor of low malignant potential: a proposal for the reclassification of malignant giant cell tumor of soft parts. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc*, **12**, 894–902.

Fossati G, Ricevuti G, Edwards SW, Walker C, Dalton A, Rossi ML (1999). Neutrophil infiltration into human gliomas. *Acta Neuropathologica*, **98**, 349–354.

Fridlender ZG, Albelda SM (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*, **33**, 949–955.

Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: ‘N1’ versus ‘N2’ TAN. *Cancer Cell*, **16**, 183–194.

Fuchs TA, Bhandari AA, Wagner DD (2011). Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. *Blood*, **118**, 3708–3714.

Fuchs TA, Brill A, Wagner DD (2012). Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **32**, 1777–1783.

Furtmüller PG, Zederbauer M, Jantschko W, Helm J, Bogner M, Jakopitsch C, Obinger C (2006). Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **445**, 199–213.

Gahan PB (2010). Circulating nucleic acids in plasma and serum: diagnosis and prognosis in cancer. *The EPMA journal*, **1**, 503–512.

Galdiero MR, Varricchi G, Marone G (2016). The immune network in thyroid cancer. *Oncoimmunology*, **5**, e1168556.

Gamlem H, Nordstoga K (2008). Canine vascular neoplasia – histologic classification and immunohistochemical analysis of 221 tumours and tumour-like lesions. *APMIS*, **116**, 19–40.

Gąsowska-Bajger B, Gąsowska-Bodnar A, Bodnar L (2022). Properties and functions of myeloperoxidase and its role in ovarian cancer. *Medical Science*, **16**, 3.

Ghatalia P, Gordetsky J, Kuo F, Dulaimi E, Cai KQ, Devarajan K, Bae S, Naik G, Chan TA, Uzzo R, Hakimi AA, Sonpavde G, Plimack E (2019). Prognostic impact of immune gene expression signature and tumor infiltrating immune cells in localized clear cell renal cell carcinoma. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, **7**, 139.

Glass G, Papin JA, Mandell JW (2009). SIMPLE: a sequential immunoperoxidase labeling and erasing method. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, **57**, 899–905.

Goldschmidt MH (2002). Tumors of the skin and soft tissues. Iowa State Press *Tumors in domestic animals.*, 45–117.

Goldschmidt MH, Shofer FS (1992). Skin tumors of the dog and cat. Pergamon Press Ltd *Skin tumors of the dog and cat.*

Grilz E, Mauracher L-M, Posch F, Königsbrügge O, Zöchbauer-Müller S, Marosi C, Lang I, Pabinger I, Ay C (2019). Citrullinated histone H3, a biomarker for neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of mortality in patients with cancer. *British Journal of Haematology*, **186**, 311–320.

Grishkovskaya I, Paumann-Page M, Tscheliessnig R, Stampfer J, Hofbauer S, Soudi M, Sevenikar B, Oostenbrink C, Furtmüller PG, Djinić-Carugo K, Nauseef WM, Obinger C (2017). Structure of human promyeloperoxidase (proMPO) and the role of the propeptide in processing and maturation. Elsevier *Journal of Biological Chemistry*, **292**, 8244–8261.

Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK (2005). Skin Diseases of the Dog and Cat, 2nd Edit. *Mosby Year Book, St Louis*, 815–836.

Guettinger Y, Barbin K, Peipp M, Bruenke J, Dechant M, Horner H, Thierschmidt D, Valerius T, Repp R, Fey GH, Stockmeyer B (2010). A recombinant bispecific single-chain fragment variable specific for HLA class II and Fc alpha RI (CD89) recruits polymorphonuclear neutrophils for efficient lysis of malignant B lymphoid cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **184**, 1210–1217.

Guglietta S, Chiavelli A, Zagato E, Krieg C, Gandini S, Ravenda PS, Bazolli B, Lu B, Penna G, Rescigno M (2016). Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis. *Nature Communications*, **7**, 11037.

Häger M, Cowland JB, Borregaard N (2010). Neutrophil granules in health and disease. *Journal of Internal Medicine*, **268**, 25–34.

Hakim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, Waldmann H (2011). Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. Nature Publishing Group *Nature Chemical Biology*, **2**(7), 75–77.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646–674.

Hansson M, Olsson I, Nauseef WM (2006). Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **445**, 214–224.

Hargis AM, Ihrke PJ, Spangler WL, Stannard AA (1992). A Retrospective Clinicopathologic Study of 212 Dogs with Cutaneous Hemangiomas and Hemangiosarcomas. *Veterinary Pathology*, **29**, 316–328.

Harrison JE, Schultz J (1976). Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **251**, 1371–1374.

Helin K, Dhanak D (2013). Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature*, **502**, 480–488.

Hendrick MJ (1998). *Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals*. Washington, D.C.

Hilscher MB, Shah VH (2020). Neutrophil Extracellular Traps and Liver Disease. Thieme Medical Publishers *Seminars in Liver Disease*, **40**, 171–179.

Hinkle DE, Wiersma W, Jurs SG (2003). *Applied statistics for the behavioral sciences*. vol 663 Houghton Mifflin Boston.

Hogendoorn PCW, Collin F, Daugaard S, Paolo Dei Tos A, Fisher C, Schneider U, Sciort R (2004). Changing concepts in the pathological basis of soft tissue and bone sarcoma treatment. *European Journal of Cancer*, **40**, 1644–1654.

Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Fertig G, Fürst H, Schalthorn A, Schmeller N, Untch M, Seidel D (2001). Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *International Journal of Cancer*, **95**, 114–120.

Hoppenbrouwers T, Autar ASA, Sultan AR, Abraham TE, Cappellen WA van, Houtsmuller AB, Wamel WJB van, Beusekom HMM van, Neck JW van, Maat MPM de (2017). In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. Public Library of Science *PLOS ONE*, **12**, e0176472.

Huang H, Chen H-W, Evankovich J, Yan W, Rosborough BR, Nace GW, Ding Q, Loughran P, Beer-Stolz D, Billiar TR, Esmon CT, Tsung A (2013). Histones activate

the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **191**, 2665–2679.

Huang ZH, Li LH, Hua D (2006). Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer Letters*, **243**, 64–70.

Hubert P, Heitzmann A, Viel S, Nicolas A, Sastre-Garau X, Oppezio P, Pritsch O, Osinaga E, Amigorena S (2011). Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. *Cancer Research*, **71**, 5134–5143.

Ja J, Dt F (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science Science (New York, N.Y.)*, 348.

Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, von der Maase H (2009). Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 4709–4717.

Jorch SK, Kubes P (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. Nature Publishing Group *Nature Medicine*, **3(23)**, 279–287.

Jung HS, Gu J, Kim J-E, Nam Y, Song JW, Kim HK (2019). Cancer cell-induced neutrophil extracellular traps promote both hypercoagulability and cancer progression. Public Library of Science *PLOS ONE*, **14**, e0216055.

Kaltenmeier C, Simmons RL, Tohme S, Yazdani HO (2021). Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cancer Metastasis. Multidisciplinary Digital Publishing Institute *Cancers*, **23(13)**, 6131.

Karaman G (2023). *Köpek meme tümörlerinde nötrofil hücre dışı tuzaklarının araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur/Türkiye

Kargapolova Y, Geißen S, Zheng R, Baldus S, Winkels H, Adam M (2021). The Enzymatic and Non-Enzymatic Function of Myeloperoxidase (MPO) in Inflammatory Communication. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, **10**, 562.

Kelly WR, Wilkinson GT, Allen PW (1981). Canine Angiosarcoma (Lymphangiosarcoma): A Case Report. *Veterinary Pathology*, **18**, 224–227.

Khan AA, Alsahli MA, Rahmani AH (2018). Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. Multidisciplinary Digital Publishing Institute *Medical Sciences*, **2(6)**, 33.

Kissin MW, Fisher C, Webb AJ, Westbury G (1987). Value of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of soft tissue tumours: A preliminary study on the excised specimen. *British Journal of Surgery*, **74**, 479–480.

Klebanoff SJ (1968). Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *Journal of Bacteriology*, **95**, 2131–2138.

Klebanoff SJ (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, **77**, 598–625.

Klebanoff SJ, Hamon CB (1972). Role of myeloperoxidase-mediated antimicrobial systems in intact leukocytes. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, **12**, 170–196.

Kolaczowska E, Kubes P (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nature Publishing Group *Nature Reviews Immunology*, **3(13)**, 159–175.

Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F (2008). Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*, **90**, 227–242.

Kuang D-M, Zhao Q, Wu Y, Peng C, Wang J, Xu Z, Yin X-Y, Zheng L (2011). Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, **54**, 948–955.

Kwak S-B, Kim SJ, Kim J, Kang Y-L, Ko CW, Kim I, Park J-W (2022). Tumor regionalization after surgery: Roles of the tumor microenvironment and neutrophil extracellular traps. Nature Publishing Group *Experimental & Molecular Medicine*, **6(54)**, 720–729.

Leppkes M, Maueröder C, Hirth S, Nowecki S, Günther C, Billmeier U, Paulus S, Biermann M, Munoz LE, Hoffmann M, Wildner D, Croxford AL, Waisman A, Mowen K, Jenne DE, Krenn V, Mayerle J, Lerch MM, Schett G, Wirtz S, Neurath MF, Herrmann M, Becker C (2016). Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. Nature Publishing Group *Nature Communications*, **1(7)**, 10973.

Leshner M, Wang S, Lewis C, Zheng H, Chen XA, Santy L, Wang Y (2012). PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Frontiers in Immunology*, **3**, 307.

Li M, Lin C, Leso A, Nefedova Y (2020). Quantification of Citrullinated Histone H3 Bound DNA for Detection of Neutrophil Extracellular Traps. *Cancers*, **12**, 3424.

Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine*, **207**, 1853–1862.

Liptak J, Dernell W, Withrow S (2004a). Haemangiosarcoma of the urinary bladder in a dog. *Australian Veterinary Journal*, **82**, 215–217.

Liptak JM (2007). *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology.*, 483.

- Liptak JM, Dernell WS, Ehrhart EJ, Rizzo SA, Rooney MB, Withrow SJ (2004b).** Retroperitoneal sarcomas in dogs: 14 cases (1992–2002). *Am Vet Med Assoc Journal of the American Veterinary Medical Association*, **224**, 1471–1477.
- Locke JE, Barber LG (2006).** Comparative Aspects and Clinical Outcomes of Canine Renal Hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **20**, 962–967.
- MacEwen EG, Withrow SJ (2001).** *Small animal clinical oncology*. WB Saunders.
- MacVean DW, Monlux AW, Anderson PS, Silberg SL, Roszel JF (1978).** Frequency of Canine and Feline Tumors in a Defined Population. *Veterinary Pathology*, **15**, 700–715.
- Madewell BR, Munn RJ (1991).** The soft tissue sarcomas: Immunohistochemical and ultra-structural distinctions. In *Proceedings of the 9th Annual Convention of the American College of Veterinary Internal Medicine*, p: 717–729.
- Malech HL, DeLeo FR, Quinn MT (2014).** The Role of Neutrophils in the Immune System: An Overview. In *Neutrophil Methods and Protocols* (ed. M. T. Quinn and F. R. DeLeo) Methods in Molecular Biology, p: 3–10 Totowa, NJ: Humana Press.
- Malle E, Furtmüller PG, Sattler W, Obinger C (2007).** Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology*, **152**, 838–854.
- Manda-Handzlik A, Bystrzycka W, Cieloch A, Glodkowska-Mrowka E, Jankowska-Steifer E, Heropolitanska-Pliszka E, Skrobot A, Muchowicz A, Ciepiela O, Wachowska M, Demkow U (2020).** Nitric oxide and peroxynitrite trigger and enhance release of neutrophil extracellular traps. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **77**, 3059–3075.
- Masucci MT, Minopoli M, Carriero MV (2019).** Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Frontiers in Oncology*, **9**, 1146.
- Mauldin GN (1997).** Soft Tissue Sarcomas. Elsevier *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, **27**, 139–148.
- McCarthy PE, Hedlund CS, Veazy RS, Prescott-Mathews J, Cho DY (1996).** Liposarcoma associated with a glass foreign body in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **209**, 612–614.
- McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P (2012).** Intravascular Neutrophil Extracellular Traps Capture Bacteria from the Bloodstream during Sepsis. *Cell Host & Microbe*, **12**, 324–333.
- Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V (2014).** A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. Elsevier *Cell Reports*, **8**, 883–896.

Miller-Ocuin JL, Liang X, Boone BA, Doerfler WR, Singhi AD, Tang D, Kang R, Lotze MT, Zeh HJ (2019). DNA released from neutrophil extracellular traps (NETs) activates pancreatic stellate cells and enhances pancreatic tumor growth. *Oncoimmunology*, **8**, e1605822.

Mishalian I, Bayuh R, Levy L, Zolotarov L, Michaeli J, Fridlender ZG (2013). Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, **62**, 1745–1756.

Morris JS, McInnes EF, Bostock DE, Hoather TM, Dobson JM (2002). Immunohistochemical and histopathologic features of 14 malignant fibrous histiocytomas from Flat-Coated Retrievers. *Veterinary Pathology*, **39**, 473–479.

Mukaka MM (2012). Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal: The Journal of Medical Association of Malawi*, **24**, 69–71.

Najmeh S, Cools-Lartigue J, Rayes RF, Gowing S, Vourtzoumis P, Bourdeau F, Giannias B, Berube J, Rousseau S, Ferri LE, Spicer JD (2017). Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via β 1-integrin mediated interactions. *International Journal of Cancer*, **140**, 2321–2330.

Nauseef WM (2018). Biosynthesis of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **642**, 1–9.

Neeli I, Dwivedi N, Khan S, Radic M (2009). Regulation of Extracellular Chromatin Release from Neutrophils. *Journal of Innate Immunity*, **1**, 194–201.

Neeli I, Khan SN, Radic M (2008). Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **180**, 1895–1902.

Negus RP, Stamp GW, Hadley J, Balkwill FR (1997). Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *The American Journal of Pathology*, **150**, 1723–1734.

Nilbert M, Engellau J (2004). Experiences from tissue microarray in soft tissue sarcomas. Taylor & Francis *Acta Orthopaedica Scandinavica*, **75**, 29–34.

Nozawa H, Chiu C, Hanahan D (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 12493–12498.

Okada SS, de Oliveira EM, de Araújo TH, Rodrigues MR, Albuquerque RC, Mortara RA, Taniwaki NN, Nakaya HI, Campa A, Moreno ACR (2016). Myeloperoxidase in human peripheral blood lymphocytes: Production and subcellular localization. *Cellular Immunology*, **300**, 18–25.

Oksanen A (1978). Haemangiosarcoma in dogs. Elsevier *Journal of Comparative Pathology*, **88**, 585–595.

Ordóñez NG (1993). Immunocytochemistry in the diagnosis of soft-tissue sarcomas. *Cancer Bull*, **45**, 13–23.

Orlandi A, Bianchi L, Ferlosio A, Innocenzi I, Spagnoli LG (2003). The origin of osteoclast-like giant cells in atypical fibroxanthoma. *Histopathology*, **42**, 407–410.

Papayannopoulos V (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Nature Publishing Group *Nature Reviews Immunology*, **2(18)**, 134–147.

Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, **191**, 677–691.

Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, Maiorino L, Fein MR, Jorns J, Schott AF, Kinugasa-Katayama Y, Lee Y, Won NH, Nakasone ES, Hearn SA, Küttner V, Qiu J, Almeida AS, Perurena N, Kessenbrock K, Goldberg MS, Egeblad M (2016). Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. American Association for the Advancement of Science *Science Translational Medicine*, **8(361)**, 361ra138.

Pérez-Martínez C, García Fernández RA, Reyes Avila LE, Pérez-Pérez V, González N, García-Iglesias MJ (2000). Malignant fibrous histiocytoma (giant cell type) associated with a malignant mixed tumor in the salivary gland of a dog. *Veterinary Pathology*, **37**, 350–353.

Pilczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FHY, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P (2010). A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology*, **185**, 7413–7425.

Pirkey-Ehrhart N, Withrow SJ, Straw RC, Ehrhart EJ, Page RL, Hottinger HL, Hahn KA, Morrison WB, Albrecht MR, Hedlund CS (1995). Primary rib tumors in 54 dogs. American Animal Hospital Association *Journal of the American Animal Hospital Association*, **31**, 65–69.

Priester WA (1976). Hepatic angiosarcomas in dogs: an excessive frequency as compared with man. Oxford University Press *Journal of the National Cancer Institute*, **57**, 451–454.

Priester WA, McKay FW (1980). *The occurrence of tumors in domestic animals*. vol, **54** US Department of Health and Human Services, Public Health Service

Pruchniak MP, Demkow U (2019). Potent NETosis inducers do not show synergistic effects in vitro. *Termedia Central European Journal of Immunology*, **44**, 51–58.

Qin X, Deng Y, Zeng Z-Y, Peng Q-L, Huang X-L, Mo C-J, Li S, Zhao J-M (2013). Myeloperoxidase polymorphism, menopausal status, and breast cancer risk: an update meta-analysis. *PloS One*, **8**, e72583.

Rao H-L, Chen J-W, Li M, Xiao Y-B, Fu J, Zeng Y-X, Cai M-Y, Xie D (2012). Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PloS One*, **7**, e30806.

Rayes RF, Mouhanna JG, Nicolau I, Bourdeau F, Giannias B, Rousseau S, Quail D, Walsh L, Sangwan V, Bertos N, Cools-Lartigue J, Ferri LE, Spicer JD (2019). Primary tumors induce neutrophil extracellular traps with targetable metastasis-promoting effects. *JCI Insight*, **4**, e128008.

Reid MD, Basturk O, Thirabanasak D, Hruban RH, Klimstra DS, Bagci P, Altinel D, Adsay V (2011). Tumor-infiltrating neutrophils in pancreatic neoplasia. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc*, **24**, 1612–1619.

Richter M, Stankeova S, Hauser B, Scharf G, Spiess BM (2003). Myxosarcoma in the eye and brain in a dog. *Veterinary Ophthalmology*, **6**, 183–189.

Rivera-Franco MM, Leon-Rodriguez E, Torres-Ruiz JJ, Gómez-Martín D, Angles-Cano E, de la Luz Sevilla-González M (2020). Neutrophil Extracellular Traps Associate with Clinical Stages in Breast Cancer. *Pathology oncology research: POR*, **26**, 1781–1785.

Ronchetti L, Boubaker NS, Barba M, Vici P, Gurtner A, Piaggio G (2021). Neutrophil extracellular traps in cancer: not only catching microbes. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **40**, 231.

Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, Lohmeyer J, Preissner KT (2012). Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. Public Library of Science *PLOS ONE*, **7**, e32366.

Sarniak A, Lipińska J, Tytman K, Lipińska S (2016). Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation. Index Copernicus *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, **70**, 1150–1165.

Savaş O, İpek V (2021). Investigation of Calprotectin Positive Leukocytes in Canine Soft Tissue Tumors. Bursa Uludağ University *Journal of Research in Veterinary Medicine*, **2(40)**, 77–87.

Sbaraglia M, Bellan E, Tos APD (2021). The 2020 WHO Classification of Soft Tissue Tumours: news and perspectives. Pacini Editore *Pathologica*, **113**, 70.

Sbaraglia M, Dei Tos AP (2019). The pathology of soft tissue sarcomas. *La radiologia medica*, **124**, 266–281.

Scandolara TB, Panis C (2020). Neutrophil traps, anti-myeloperoxidase antibodies and cancer: Are they linked? *Immunology Letters*, **221**, 33–38.

Schultheiss PC (2004). A Retrospective Study of Visceral and Nonvisceral Hemangiosarcoma and Hemangiomas in Domestic Animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **16**, 522–526.

Schultz J, Kaminker K (1962). Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **96**, 465–467.

Segal AW (2005). How Neutrophils Kill Microbes. *Annual Review of Immunology*, **23**, 197–223.

Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, Dale GL, Friese P, Esmon NL, Esmon CT (2011). Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*, **118**, 1952–1961.

Snyder JM, Lipitz L, Skorupski KA, Shofer FS, Van Winkle TJ (2008). Secondary Intracranial Neoplasia in the Dog: 177 Cases (1986–2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **22**, 172–177.

Soubhye J, Meyer F, Furtmüller P, Obinger C, Dufrasne F, Antwerpen PV (2016). Characterization of chemical features of potent myeloperoxidase inhibitors. *Future Science Future Medicinal Chemistry*, **8**, 1163–1177.

Spangler WL, Culbertson MR (1992). Prevalence, type, and importance of splenic diseases in dogs: 1,480 cases (1985-1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **200**, 829–834.

Spangler WL, Kass PH (1997). Pathologic Factors Affecting Postsplenectomy Survival in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **11**, 166–171.

Srebernik N, Appleby EC (1991). Breed prevalence and sites of haemangioma and haemangiosarcoma in dogs. *The Veterinary Record*, **129**, 408–409.

Stevens JF, Maier CS (2008). Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, **52**, 7–25.

Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F (1996). Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of Leukocyte Biology*, **59**, 229–240.

Tan IJ, Peeva E, Zandman-Goddard G (2015). Hormonal modulation of the immune system — A spotlight on the role of progestogens. *Autoimmunity Reviews*, **14**, 536–542.

Teng T-S, Ji A, Ji X-Y, Li Y-Z (2017). Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *Hindawi Journal of Immunology Research*.

Terstappen LW, Safford M, Loken MR (1990). Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia*, **4**, 657–663.

Thalin C, Demers M, Blomgren B, Wong SL, von Arbin M, von Heijne A, Laska AC, Wallén H, Wagner DD, Aspberg S (2016). NETosis promotes cancer-associated arterial microthrombosis presenting as ischemic stroke with troponin elevation. *Thrombosis Research*, **139**, 56–64.

Thalin C, Lundström S, Seignez C, Daleskog M, Lundström A, Henriksson P, Helleday T, Phillipson M, Wallén H, Demers M (2018). Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. *PloS One*, **13**, e0191231.

Thrall DE, Gillette EL (1995). Soft-tissue sarcomas. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*, **10**, 173–179.

Thway K, Wang J, Mubako T, Fisher C (2014). Histopathological Diagnostic Discrepancies in Soft Tissue Tumours Referred to a Specialist Centre: Reassessment in the Era of Ancillary Molecular Diagnosis. Hindawi *Sarcoma*.

Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, Wang Y, Simmons RL, Huang H, Tsung A (2016). Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Research*, **76**, 1367–1380.

Trellakis S, Farjah H, Bruderek K, Dumitru CA, Hoffmann TK, Lang S, Brandau S (2011). Peripheral blood neutrophil granulocytes from patients with head and neck squamous cell carcinoma functionally differ from their counterparts in healthy donors. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, **24**, 683–693.

Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, de Mascarel A, Goussot JF, David M, Bonichon F, Lagarde C (1984). Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *International Journal of Cancer*, **33**, 37–42.

Tsujikawa T, Kumar S, Borkar RN, Azimi V, Thibault G, Chang YH, Balter A, Kawashima R, Choe G, Sauer D, El Rassi E, Clayburgh DR, Kulesz-Martin MF, Lutz ER, Zheng L, Jaffee EM, Leyshock P, Margolin AA, Mori M, Gray JW, Flint PW, Coussens LM (2017). Quantitative Multiplex Immunohistochemistry Reveals Myeloid-Inflamed Tumor-Immune Complexity Associated with Poor Prognosis. *Cell Reports*, **19**, 203–217.

Vail DM, Powers BE, Getzy DM, Morrison WB, McEntee MC, O’Keefe DA, Norris AM, Withrow SJ (1994). Evaluation of prognostic factors for dogs with synovial sarcoma: 36 cases (1986-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **205**, 1300–1307.

Vorobjeva NV, Chernyak BV (2020). NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1178–1190.

- Vorobjeva NV, Pinegin BV (2014).** Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1286–1296.
- Walsh KM, Abbott DP (1984).** Lymphangiosarcoma in two cats. Elsevier *Journal of Comparative Pathology*, **94**, 611–614.
- Wang J, Liu L, Bai Q, Ou C, Xiong Y, Qu Y, Wang Z, Xia Y, Guo J, Xu J (2019).** Tumor-infiltrating neutrophils predict therapeutic benefit of tyrosine kinase inhibitors in metastatic renal cell carcinoma. *Oncoimmunology*, **8**, e1515611.
- Wang S, Wang Y (2013).** Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta.*, 1126–1135.
- Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA (2009).** Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*, **184**, 205–213.
- Ward H, Fox LE, Calderwood-Mays MB, Hammer AS, Couto CG (1994).** Cutaneous Hemangiosarcoma in 25 Dogs: A Retrospective Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **8**, 345–348.
- Ware WA, Hopper DL (1999).** Cardiac Tumors in Dogs: 1982–1995. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **13**, 95–103.
- Waters DJ, Caywood DD, Hayden DW, Klausner JS (1988).** Metastatic pattern in dogs with splenic haemangiosarcoma: Clinical implications. *Journal of Small Animal Practice*, **29**, 805–814.
- Waters DJ, Hayden DW, Walter PA (1989).** Intracranial Lesions in Dogs With Hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **3**, 222–230.
- Williamson MM, Middleton DJ (1998).** Cutaneous soft tissue tumours in dogs: classification, differentiation, and histogenesis. *Veterinary Dermatology*, **9**, 43–48.
- Winterbourn CC, Kettle AJ (2013).** Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxidants & Redox Signaling*, **18**, 642–660.
- Wiriosuparto S, Krassilnik N, Gologan A, Cohen J-M, Wenig B (2003).** Malignant fibrous histiocytoma, giant cell type, of the breast mimicking metaplastic carcinoma. A case report. *Acta Cytologica*, **47**, 673–678.
- Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, Antoine M, Soler P, Cadranet J (2003).** Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Research*, **63**, 1405–1412.
- Wobeser BK, Kidney BA, Powers BE, Withrow SJ, Mayer MN, Spinato MT, Allen AL (2007).** Diagnoses and Clinical Outcomes Associated with Surgically Amputated

Canine Digits Submitted to Multiple Veterinary Diagnostic Laboratories. *Veterinary Pathology*, **44**, 355–361.

Wu T-L, Zhang D, Chia J-H, Tsao K, Sun C-F, Wu JT (2002). Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, **321**, 77–87.

Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature Medicine*, **15**, 1318–1321.

Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, Mazza LF, Morris AE, Núñez-Álvarez C, Hernández-Ramírez D, Bockenstedt PL, Liaw PC, Cabral AR, Knight JS (2015). Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, **67**, 2990–3003.

Yang C, Sun W, Cui W, Li X, Yao J, Jia X, Li C, Wu H, Hu Z, Zou X (2015). Procoagulant role of neutrophil extracellular traps in patients with gastric cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **8**, 14075–14086.

Yipp BG, Kubes P (2013). NETosis: how vital is it? *Blood*, **122**, 2784–2794.

Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, de Boisleury Chevance A, Zhang K, Conly J, Kubes P (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. Nature Publishing Group *Nature Medicine*, **9(18)**, 1386–1393.

Youn J-I, Gabrilovich DI (2010). The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *European Journal of Immunology*, **40**, 2969–2975.

Zhang P, Brooks JSJ (2004). Modern pathological evaluation of soft tissue sarcoma specimens and its potential role in soft tissue sarcoma research. *Current Treatment Options in Oncology*, **5**, 441–450.

Zhou J, Yang Y, Gan T, Li Y, Hu F, Hao N, Yuan B, Chen Y, Zhang M (2019). Lung cancer cells release high mobility group box 1 and promote the formation of neutrophil extracellular traps. Spandidos Publications *Oncology Letters*, **18**, 181–188.

Zhu H, Yang L, Zhou B, Yu R, Tang N, Wang B (2006). Myeloperoxidase G-463A polymorphism and the risk of gastric cancer: a case-control study. *Carcinogenesis*, **27**, 2491–2496.

Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, Blair C, Weber A, Barnes BJ, Egeblad M, Woods RJ, Kanthi Y, Knight JS (2020). Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI insight*, **5**, e138999, 138999.