

**T. C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Aydın GÜREL**

**KÖPEK MEME TÜMÖRLERİNİN FARKLI BOYAMA
YÖNTEMLERİ (PAPANICOLAOU VE MAY-
GRUNWALD-GIEMSA) İLE SİTOLOJİK TEŞHİSİ VE
HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

142312

**Veteriner Hekim
Funda YILDIZ**

İstanbul – 2004

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütü Sekreterliği' nce desteklenmiştir.

Proje No: T –985/19022002

İÇİNDEKİLER

1. TEŞEKKÜR
2. GİRİŞ VE AMAÇ
3. GENEL BİLGİLER
 - 3.1. Köpek Meme Bezleri ve Tümörleri Hakkında Genel Bilgiler
 - 3.1.1. Köpeklerde Meme Bezleri
 - 3.1.2. Köpek Meme Tümörleri Hakkında Genel Bilgiler
 - 3.1.2.1. Köpek Meme Tümörlerinde Etyoloji ve Prognoz
 - 3.1.2.2. Köpek Meme Tümörlerinin Histopatolojik Sınıflandırılması
 - 3.2. Sitolojik Teşhis Hakkında Genel Bilgiler
 - 3.2.1. Sitolojik Yöntemler
 - 3.2.1.1. Papanicolaou Boyası
 - 3.2.1.2. May-Grünwald-Giemsa Boyası
 - 3.2.2. Sitolojik Malignite Kriterleri
 - 3.2.3. Sitolojik Teşhisin Avantaj ve Dezavantajları
4. GEREÇ VE YÖNTEM
 - 4.1. Gereç
 - 4.2. Yöntem
 - 4.2.1. Laboratuvar Yöntemi
 - 4.2.2. Mikroskopik Değerlendirme Yöntemi
 - 4.2.3. İstatistiksel Yöntem
5. BULGULAR
 - 5.1. Histopatolojik Bulgular
 - 5.2. Sitolojik Bulgular
 - 5.3. İstatistiksel Bulgular

6. TARTIŞMA VE SONUÇ
7. ÖZET
8. SUMMARY
9. RESİMLER
10. KAYNAKLAR
11. ÖZGEÇMİŞ



1. TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince, bilimsel gelişimimdeki emeği, kazandırdığı çalışma alışkanlığı, bu çalışmadaki katkıları ve diğer tüm konulardaki değerli yardımlarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Aydın GÜREL' e; Patoloji Bilim Dalı'na adım atmamda büyük bir etkisi olan, emekliliği nedeniyle danışmanlığı bırakmak zorunda kalan, önceki Anabilim Dalı Başkanımız ve doktora danışmanım Sayın Prof. Dr. Tahsin YEŞİLDERE' ye; her türlü değerli katkıları için Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Seçkin Serdar ARUN ve Yard. Doç. Dr. İbrahim FIRAT'a; Anabilim Dalımızdaki tüm Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma; materyal temininde gösterdikleri hassasiyetten dolayı Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'ndan Araştırma Görevlisi Dr. Kutlay GÜRBULAK, Araştırma Görevlisi B. Hasan SONTAŞ ve Araştırma Görevlisi Seval TOYDEMİR'e; istatistiksel analizlerdeki yardımlarından dolayı Zootekni ve Genetik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Bülent EKİZ'e; bu teze sağladığı maddi destekten dolayı İ. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'ne; tüm öğrenim hayatım boyunca maddi manevi hiçbir desteği benden esirgemeyen sevgili babam, annem ve ablama ve moral desteği için en çok da eşim Atilla YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimle.

2. GİRİŞ VE AMAÇ

Sitolojik muayene vücudun çeşitli boşluklarında toplanan sıvılardan ya da vücudun değişik bölgelerindeki (gerek iç, gerekse dış) doku ve oluşan lezyonlardan, farklı bir çok yöntemlerle alınan örneklerin lam üzerine yayılması, boyama işlemlerinin ardından mikroskopik olarak incelenmesidir. Sitolojik muayenede doku yapısına bakılmaksızın her bir hücre kendi başına incelenir. Sitolojik teşhis, Klinik Patoloji açısından güvenilirliği yüksek, pratik, ekonomik ve oldukça hızlı bir laboratuvar teşhis yöntemidir.

Dişi köpeklerin meme bezlerinde gelişen neoplaziler deri tümörlerinden sonra en sık rastlanan neoplaziler olarak ikinci sırada yer almaktadır. Klinikte en çok karşılaşılan problemlerden biri olarak, bu probleme pratik bir ön teşhis metodu geliştirmek ve sık rastlanması nedeni ile yeterli sayıda materyal toplayabilmek için köpek meme tümörleri çalışmada materyal olarak seçilmiştir.

Bu çalışmada köpeklerden alınan meme tümörlerinden, kazıma yöntemiyle hazırlanan sitolojik preparatların iki farklı sitolojik boyama yöntemiyle boyanması ve mikroskopik değerlendirme sonrasında elde edilen sonuçların histopatolojik sonuçlarla karşılaştırılması planlanmıştır. Amaçlarımız; neoplastik lezyonlarda sitolojik olarak malignite kriterlerini ortaya koymak, iki farklı sitolojik boyama yönteminin (Papanicolaou ve May-Grünwald-Giemsa) avantaj ve dezavantajlarını sergilemek, güvenilir, ekonomik ve hızlı bir ön teşhis metodu olarak sitolojik muayeneyi Anabilim Dalımızda rutin laboratuvar işlemi haline getirmektir. Beşeri Hekimlikte Patoloji Anabilim Dalı çatısı altında Bilim Dalı olarak çalışan Klinik Sitoloji'nin, Ülkemizde de Veteriner Patoloji de geliştirilmesi gerekliliği düşünüldüğünde, bu çalışmanın diğer meslektaşlara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

3. GENEL BİLGİLER

3. 1. Köpeklerde Meme Bezleri ve Tümörleri Hakkında Genel Bilgiler

3. 1. 1. Köpeklerde Meme Bezleri

Meme bezlerinin fonksiyonu yavruları beslemek için süt salgılamaktır. Meme bezleri ektodermal germ tabakasından oluşur. Meme bezlerinin gelişimi, epidermisin kalınlaşması ve meme kabartılarının şekillenmesiyle başlar. Bu zincir ventral bölgenin her iki yanına uzanır. Epitelyal hücreler altta bulunan mezenşime penetre olur ve katı tomurcuklar yapar. Bu tomurcuklardan duktus laktiferuslar gelişir. Duktus laktiferuslardan ise tekrar tomurcuk kollar ve intralobular kanallar oluşur. İntralobular kanallar daha sonra alveollere ayrılır. Bu şekilde oluşan meme bezinin lobullerinin her biri kendi salgı kanalına (duktus laktiferus) sahiptir ve ayrı ayrı meme başına açılırlar (52).

Meme bezlerinin sayısı türlere göre değişir. Köpekler genellikle vücudun her bir yanında beş adet meme bezine sahiptir (52). Her bir yandaki meme bezleri birbiri ile bağlantılıdır. Ancak sağ taraftaki meme bezleri ile sol taraftaki meme bezleri birbirinden ayrıdır. Anterior üç meme bezinin lenfatik drenajı ilk olarak aksiller lenf nodülü ile gerçekleştirilir. Posterior iki meme bezi ise süperfisiyal inguinal lenf nodülü ile drene edilir. Lenfatik ilişki 2. ve 3. , 4. ve 5. meme bezi arasında mevcuttur. Aynı zamanda 3. ve 4. meme bezi arasında da bulunabilir (22).

Meme kanalının duktus laktiferus'un şekillendiği distal kısmı çok katlı yassı epitel ile örtülmüştür. Duktus laktiferustan iki katlı epitelyum ile örtülmüş interlobular /ekskretor meme kanalları gelişirken, daha küçük intralobular/sekretorik kanallar ve alveoller tek katlı epitel hücreleri ile örtülüdür. Bu katmanın çevresinde bir kat myoepitelyal hücre yer alır, luminal yüzeyin bazal membranını oluşturur (4).

Meme bezinin faaliyetleri çeşitli hormonlar tarafından düzenlenir. Bunlardan steroid hormonlar en önemlileridir. Östrojen etkisi altında proöstrus ve östrus sırasında kanallar ve stroma proliferer olur. Metöstrus sırasında progesteron, alveollerin proliferasyon ve sekresyonunu uyarır. Köpeklerin genelde yılda iki kez siklusu vardır ve metöstrus dönemi yaklaşık 6-8 hafta sürer, çoğunlukla yalancı gebelik veya memeden süt salgılanması ile sonuçlanır. Geç metöstrus boyunca alveoller atrofiye uğrar ve yerini bağ doku alır (50, 71). Meme gelişimi ve laktasyon, pubertede görülür ve köpeklerde gebelikten bağımsızdır. İnsanlarda ise memenin gelişimi puberte ile başlar. Ancak, laktasyon gebelik ile ilişkilidir (71).

3. 1. 2. Köpek Meme Tümörleri Hakkında Genel Bilgiler

Tümör ya da neoplazi Willis'in tarifıyla "yeni oluşum" demektir. Bu oluşum, normal doku ve organlardaki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile doku ve organın her şekilde bütünlüğünün bozulması ve organizma aleyhine bir üremenin meydana gelmesi ile karakterizedir. Tümörün başlangıcı organizmada büyüme kontrollerine verilen cevabın kaybı ile ilgilidir. Bu sebeple, neoplastik hastalıklar canlılığın tarihi kadar eskidir ve bir çok canlı türünde görülmektedir (36).

Son yıllarda insanlara arkadaşlık eden köpek ve kedi gibi hayvanların yaşam süreleri uzamaktadır. Yaşlı hayvanların popülasyonları artarken, tümör insidensi de giderek artmaktadır (21).

Meme bezlerinde tümörlere sıklıkla rastlanmaktadır. İnsanlar dahil olmak üzere, tüm memeli türleri içinde, meme tümörü insidensi en yüksek canlıların köpekler olduğu bildirilmiştir (12, 23). Köpeklerde meme bezi tümörleri deri tümörlerinden sonra en yaygın gözlenen tümörlerdir ve dişi köpeklerde diğer bütün tümörlerin arasında % 52'lik bir dilimi kapsamaktadır (10, 22, 50). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir araştırmaya göre meme tümörlerinin köpeklerde görülme sıklığı 105/100 000'tir ve bu rakam kadınlara göre üç kez yüksektir. Bununla birlikte kısırlaştırma yapılan genç hayvanlarda bu oranın

gerilediği bildirilmektedir (10, 29, 40). Erkek köpeklerde de meme tümörleri nadiren görülmektedir (50).

Meme tümörleri 2 yaşın altındaki köpeklerde nadir görülmekle birlikte, “kansere yaşı” olarak adlandırılan 5-6 yaşlarda insidens hızla artar. 10 – 11 yaşlarından sonra ise meme tümörü riski azalma eğilimindedir (40,50).

Bu tümörlerin yaklaşık % 50’si histopatolojik ve biyolojik olarak maligndir (22, 25, 65). Hastalık genellikle multisentriktir ve tek bir köpekte birden fazla tipte tümör bulunabilir (28). Meme tümörlerinin yaklaşık % 40’ı inguinal bölgedeki meme bezlerinden gelişir. % 60’ı ise anterior 4 çift meme bezinde eşit olarak gözlenir (10).

Safkan köpek ırklarının belli bir grubu meme tümörü riski altında bulunmaktadır. Bu köpeklerin çoğunluğu av köpekleri ırklarına dahildir. Yüksek risk grubu ırklar içerisinde, Pointer, English setter, German short-hair pointer, Irish setter, Britany spaniel, English springer spaniel, Labrador retriever, Great pyrenees, Samoyed, Alredale terrier, Miniature toy poodle ve Keeshond’lar; düşük risk grubu içinde ise Collie, Beagle, Chihuahua ve melez ırklar bildirilmiştir (50, 62, 65). Moulton (50) dişi safkan köpeklerde, epitelial malign tümörlerin ortaya çıkma riskinin melez ırklara göre önemli ölçüde yüksek olduğunu ifade etmiştir.

3. 1. 2. 1. Köpek Meme Tümörlerinde Etyoloji ve Prognoz

Köpeklerde spontan meme tümörlerinin ortaya çıkış nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte, yapılan çalışmalar bu konuda endokrin fizyolojinin önemini göstermektedir. I. Östrus siklusundan önce kısırlaştırılan dişilerde meme kanseri riski yaklaşık % 0.5, bir östrus siklusu geçirenlerde % 8, iki ya da daha fazla östrus siklusu geçirdikten sonra kısırlaştırılanlarda ise % 26 olarak bildirilmiştir (10, 65).

Köpek meme tümörlerinde östrojen ve progesteron için steroid reseptörlerin varlığı çeşitli çalışmalarda tanımlanmıştır (6, 17, 24, 26, 51, 59, 61). Östrus ve metöstrus sırasında meme tümörlerinin büyümesinin hızlandığı bilinmektedir. Prolaktin ve glukokortikoidler de yine dihidrotestesteron reseptörleri gibi tespit edilmiştir (29, 59).

Schaffer ve ark. (62), Beagle ırkı köpeklerin benign miks tümörlerinde progesteron oranının yüksek olduğunu bildirmiştir.

Rutteman ve ark. (59), yaptıkları çalışmada, sentetik progesteronlarla tedavi edilen köpeklerin meme bezlerinde aşırı büyüme hormonu reseptörü artışı olduğunu göstermişlerdir. Bu büyüme hormonu biyolojik olarak aktiftir ve meme bezindeki hiperplastik epitelyum odaklarından köken aldığı bulunmuştur.

Transforme genler ve onkogenlerin büyüme faktörleri için kodlandığı ve insanlarda meme kanserlerinde HER-2/c-erbB-2/neu onkogeninin epidermal büyüme faktörü(EGF) reseptör geni ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Köpek meme tümörlerinde gösterilen EGF reseptör ekspresyonu, steroid reseptörlerin yokluğu veya tümör büyümesinin agresifliği ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (30).

Meme tümörü oluşumunda onkogenler, steroid hormonlar ve büyüme faktörünün rolünün önemi her geçen gün artmaktadır. Hellmen (29), bu faktörlerin, köpek meme tümörlerinin patogenezisinde oynadıkları rolün haritasının henüz çizilmeye başladığını ifade etmiştir.

Theilen ve Madewell (65), primer olarak meme tümörü sebebi olmamakla birlikte, endokrin sistemin yanı sıra, virüs benzeri partiküller ve kimyasallar gibi diğer etyolojik ajanların da meme tümörü gelişimine neden olabileceğini bildirmiştir.

Salda ve ark. (60) kedi ve köpeklerin dev hücreli anaplastik karsinomalarında yaptıkları çalışmada, bir çok köpek meme tümörünün kök hücrelerden köken aldığı, görüşünü destekleyen sonuçlar bildirmişlerdir.

Tümör oluşumu başlangıç, yükselme ve ilerlemeden oluşan çok basamaklı bir süreçtir. Meme displazileri, benign tümörler ve karsinomlar arasındaki geçiş muhtemelen bu olayları yansıtır. Bu geçiş bazı meme tümörlerinde gözlenebilir (29). Bununla birlikte, bütün atipik displaziler ve atipik benign tümörler de, yaygın morfolojinin tersine malign olmadıkları için, yukarıdaki olayları yansıtmayan morfolojide biyolojik olayların varlığı bildirilmiştir (11, 28, 33, 73).

Köpek meme tümörlerinin komplike histolojik tipleri, yerleşimi, tümör yaşı, biyolojik davranışları gibi çeşitli faktörler prognoz açısından güçlükler yaratmaktadır (11,28). Histolojik olarak malign teşhis edilen tümörler arasında bile biyolojik davranışları söz konusu olunca farklı düşünceler olabilir. Kedi meme karsinomlarının histolojik olarak derecelendirilmesinin prognostik öneme sahip olduğuna işaret eden araştırmacılar, köpeklerde klinik derecelendirmenin çok daha önemli olduğunu gösterilmiştir (28). Tümörün klinik görüntüsüne göre derecelendirme yapmak üzere World Health Organization (WHO) tarafından TNM (T; primer tümörün maksimum çapı, N; bölge lenf nodüllerinde invazyon, M; uzak metastaz) sistemi önerilmiştir (73).

Malign tümörlerin benign tümörlere oranı bir çok çalışmada 3/7 ya da 4/6 olarak gösterilmiştir (12, 30, 47, 73). Histopatolojik olarak benign ya da malign meme tümörü teşhis edilen pek çok olgunun prognozu çeşitli prospektif çalışmalarla incelenmiştir (10, 22, 30, 73). Bu çalışmalara (30, 73) göre tedavi edilen malign meme tümörüne sahip köpeklerin hayatta kalma zamanları 4-17 ay arasında değişmektedir. Brodey ve ark. (12), sarkomalı köpeklerin kompleks karsinomalı köpeklere göre hayatta kalma sürelerinin daha kısa, solid karsinomalı köpeklerde ise orta düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Hellmen ve ark. (30)'nın yaptıkları başka bir çalışmada, sarkomalar malignitesi en yüksek tümör tipi olarak bulunmuştur. Simple tip karsinomlar içinde; non-infiltrate, tubulopapiller, solid ve

anaplastik karsinomların sırasıyla malignite derecesi yükselmektedir (10). Benjamin ve ark. (7)'nin Beagle ırkı köpeklerde yaptıkları bir çalışmada, "duktuler karsinoma" en çok metastaz yapan ve en çok ölüme yol açan tümör tipi olarak belirlenmiştir. Meme tümörlerinin histopatolojik sınıflandırılması prognozu belirleme için yetersiz kalmaktadır ve değişik prognostik faktörlerle ilgili çalışmalar sürdürülmektedir (21, 59).

Son yıllarda prognoz ve sınıflandırma için hormonal (6, 17, 24, 51, 53, 59, 61) ve EGF(Epidermal Growth Factor) reseptörleri ekspresyonu (73), onkogen ekspresyonu (62) , hücre proliferasyonu antijenleri ekspresyonu (21, 24), çekirdekçik organizasyonu (11, 33), tümör hücreleri filamentleri (46) ve bazal membran proteinleri ekspresyonu (53), gibi faktörlerle pek çok araştırma yapılmıştır. Çeşitli analizler bu parametrelerin birbirinden bağımsız olmadıklarını göstermiştir. Ancak, histolojik tip ve klinik prognoz arasında bir korelasyon bulunmaya çalışılmışsa da, henüz güvenilir kriterler saptanamamıştır (30, 73).

3. 1. 2. 2. Köpek Meme Tümörlerinin Histopatolojik Sınıflandırılması

Tümörler ile ilgili temel olarak, histogenezis, tanımlayıcı morfoloji ve prognoz olmak üzere üç ayrı sınıflandırma yöntemi kullanılabilir (29).

Misdorp ve ark. (47), histogenetik sınıflandırmanın bir çok köpek meme tümöründeki belirgin olmayan hücre tiplerinin yanı sıra, kompleks ve miks tümörlerin histogenezisinde myoepitelyal hücrelerin oynadığı rolle ilgili çelişen görüşler nedeniyle ragbet görmediğini ifade etmişlerdir. Histogenezise dayanarak yapılan bir sınıflandırmada, tümörler sırasıyla adenoma, papilloma, lobular ya da duktuler karsinom olarak düzenlenmiştir. Fibro-, kondro-, osteosarkoma gibi bütün mezenşimal tümörler malign myoepitelyomlar olarak gruplanırlar (50). Myoepitelyal hücre ve mezenşimal doku içeren karsinomlar ise malign miks tümörler olarak isimlendirilmiştir (29). Yapılan başka bir sınıflandırmada, köpek meme tümörlerindeki mezenşimal dokunun heterotopik non-neoplastik bir doku olduğuna yönelik temele dayanmaktadır (50).

Miks tümörlerdeki kıkırdak ve kemiğin kökeni ya epiteliyal hücreler, ya stromal hücreler ya da myoepiteliyal hücrelerin metaplazisinden kaynaklanabilir (50). Literatürde en çok atıf yapılan ve tanımlayıcı morfolojiye dayanan WHO'nun sınıflandırmasında epiteliyal tümörler myoepiteliyal hücrelerin yokluğuna ya da varlığına bağlı olarak simple ya da kompleks olmak üzere ikiye ayrılırlar. Karsinomlar ve malign mezenşimal tümörler histolojilerine göre gruplanırlar (28) .

Son yıllarda miks bir meme tümörüne katılan myoepiteliyal hücrelere dikkati çeken deneysel bir çok çalışma yapılmasına karşın meme bezindeki kompleks/miks ve mezenşimal tümörlerle ilgili hücreler şimdiye kadar açıklanmamıştır (29) . Ancak yapılan çalışmalar (12, 30) kompleks tümörlerin prognozunun saf tümörlere göre nispeten daha olumlu olduğunu göstermektedir. Moulton (50) 1974'de WHO tarafından yapılmış sınıflandırmada tümör çeşitlerinin simple ya da kompleks diye ikiye ayrılmasının gereksiz olduğunu ifade etmiştir. Buna paralel olarak WHO tarafından 1999'da tümörlerin histolojik tiplerinin prognostik önemini de vurgulayarak aşağıdaki yeni sınıflandırma yapılmıştır. Bu yeni sınıflandırmada kompleks tümörler ayrı bir kategoriye toplanmıştır (47).

WHO Tarafından Yayınlanan Köpek Meme Tümörlerinin Histopatolojik Sınıflandırması (1999) :

A. Malign Tümörler

- 1.1. Non-infiltran (In-situ) karsinoma
- 1.2. Kompleks karsinoma
- 1.3. Simple karsinoma
 - 1.3.1. Tubulopapiller karsinoma
 - 1.3.2. Solid karsinoma
 - 1.3.3. Anaplastik karsinoma
- 1.4. Karsinomaların özel tipleri
 - 1.4.1. Mekik hücreli (spindle cell) karsinoma
 - 1.4.2. Yassı hücreli (squamous cell) karsinoma
 - 1.4.3. Musinoz karsinoma
 - 1.4.4. Yağ hücreli (lipid-rich) karsinoma
- 1.5. Sarkoma

- 1.5.1. Fibrosarkoma
- 1.5.2. Osteosarkoma
- 1.5.3. Diğer sarkomalar
- 1.6. Karsinosarkoma
- 1.7. Benign tümörlerde karsinoma ya da sarkoma

B. Benign Tümörler

1. Adenoma
 - 1.1. Simple adenoma
 - 1.2. Kompleks adenoma
 - 1.3. Basaloid adenoma
2. Fibroadenoma
 - 2.1. Çok hücreli fibroadenoma
 - 2.2. Az hücreli fibroadenoma
3. Benign miks tümör
4. Duktal papilloma

C. Sınıflandırılmayan tümörler

D. Meme hiperplazileri / displazileri

1. Duktal hiperplazi
2. Lobular hiperplazi
 - 2.1. Epiteiyal hiperplazi
 - 2.2. Adenosis
3. Kistler
4. Duktal Ektazi
5. Fibrosklerosis
6. Jinekomasti

3. 2. Sitolojik Teşhis Hakkında Genel Bilgiler

Sitolojik muayene, dokunun yapısı ile ilgili olmaksızın bireysel olarak hücrelerin incelenmesidir (1, 13, 67). Diagnostik sitolojinin temel prensibi patolojik doku reaksiyonlarını yangı, hiperplazi ve neoplastik süreçler olarak tanımlamak ve sınıflandırmaktır (45, 58, 75).

Klinik muayene, gelişmekte olan ülkelerde pratisyen hekimler tarafından en sık kullanılan teşhis yöntemidir. Bir çok kolaylıklar sağlayan ultrason, radyografi, bilgisayarlı tomografi gibi teşhis yöntemlerine ise çoğunlukla ulaşamaz ya da hasta sahipleri ekonomik olarak karşılayamazlar. Sitolojik muayene bu noktada iyi bir alternatif olarak durmaktadır (66). Güvenli, ucuz, hızlı, uygulanması kolay, prosedürü hasta tarafından kolay tolare edilebilen ve anestezi gerektirmeyen bir teşhis yöntemi olarak sitolojik muayenenin popülaritesi giderek artmaktadır (2, 3, 14, 15, 35, 38, 49). Klinik muayeneye iyi bir yardımcı olarak kurgulanan bu yöntem kesin teşhise fırsat verdiği gibi bazen tedavi edici de olabilir (66, 68).

Sitolojik muayene, uzun prosedür gerektirmeyen bir yöntem olarak, birkaç dakika içinde lezyonu tanımlayacak ve gerekli tedaviyi planlayacak kadar bulgu sağlayabilir (27, 32, 70). Sitolojik muayenenin en yaygın kullanıldığı alanlar deri ve deri altı kitleler ile lenfadenopatiler ve effüzyonlardır. Sitolojik muayene ile effüzyonların enfeksiyon, steril eksudat, lenf sıvısı, tümör effüzyonu ya da transudat olup olmadıkları hakkında bilgi edinilebilir (69). Eklem hastalıklarının araştırılmasında yine yararlı bir diagnostik indikatördür. Sitolojik muayene ile septik artrit, immün aracılı artropati ve dejeneratif eklem hastalıklarının ayrımı yapılabilir (69, 70). Karaciğer, dalak, böbrek ve bağırsaklardaki kitleler aspirasyon sitolojisi ile incelenebilir. Karaciğer hastalıklarının araştırılmasında, hepatik lipidosis, neoplazi ve kolangiohepatitisin ayırıcı tanısında yine sitoloji kullanılabilir (57). Burun akıntıları, bronşial yıkamalar ve akciğer aspirasyonları solunum yolu ile ilgili hastalıklar hakkında fikir verebilir (37). Tiroid karsinomalarının İİAB (İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi) ile incelendiği bir çalışmada (5), İİAB uygulanan hastaların, özellikle intraoperatif incelemelerle total tiroidektomi operasyonundan kurtarılacağı bildirilmiştir. Kranial ve mediastinal lenfomalar bu yöntemle kolayca

teşhis edilebilir. İdrarın sitolojik incelemesinde; idrar kesesi tümörlerinin hücreleri çoğunlukla idrara döküldüğü için tümöral olguları ortaya çıkartabilir (69, 72). Prostatik yıkamalar ve aspirasyonlar hiperplazi, neoplazi ve prostatitis için ayrıca tanıda önemlidir. Testisten alınan aspirasyon biopsi örnekleri enfeksiyon ya da neoplastik hastalıkların araştırılmasında kullanıldığı gibi azospermi sebeplerinin de ortaya çıkartılmasında önemli rol oynar (56, 72). Vajinal sitoloji özellikle menstrüel siklusun basamaklarını takip etmek ve genital sistem hastalıklarının tanısında yararlı bir yöntemdir (72). Deneyimli sitolojistler bazı spesifik tümörleri sitolojik olarak kolaylıkla teşhis edebildikleri gibi, çoğu neoplazi için de kesin olmayan bir ön teşhis yapabilirler. Sitoloji aynı zamanda metastazik ve nüks tümörlerin belirlenmesinde de kullanılabilir. Beyin-omurilik sıvısı, kan, kemik iliği v.b. organizmadaki bir çok yapıyı sitolojik olarak incelemek mümkündür (54, 70).

3. 2. 1. Sitolojik Teşhis Yöntemleri

Sitolojik örnekleri elde etmek için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bu metotlar şu şekilde gruplandırılabilir (2, 15, 20, 54, 69, 70, 75).

- Eksfoliyatif sitoloji : Dokuların yenilenme gereksiniminden doğan sürekli bir olay olan eksfoliyasyon, her dokunun kendi özelliğine, fonksiyonuna ve metabolik kapasitesine göre değişir. Dökülen hücreler doğal boşluklarda toplanır. Olası patolojik değişiklikler bu hücrelere de yansır. Ancak dejeneratif değişiklikleri de göz önünde bulundurmak gereklidir. Balgam, idrar v.b.
- Pamuklu çubuk yardımıyla yüzeyden örnek alma (swabbing) : Vajinal smear testi.
- Yıkama sıvıları : Batın yıkama sıvıları, bronşioalveolar lavaj v.b.
- Aspirasyon materyali : Hem sıvılar hem de katı yapılar için enjektör yardımıyla uygulanır.
- Kazıma (scraping) suretiyle yüzeylerden alınan materyal.
- Lamı dokuya değdirmek (touch) ya da bastırmak (impression) suretiyle yüzeylerden alınan materyal.
- Çok küçük doku parçacıklarının ezilmesi ile hazırlanan materyal.

Örnekleme tekniğinin seçimi lezyonun anatomik yapısına ve özelliğine bağlıdır (19). Eksfoliyatif sitoloji örnekleri ve yıkama sıvıları gibi materyallerde, konsantrasyon metotları muayene kolaylığı sağlar. Sitosantrifüj az miktarda hücre bulunan sıvılar için mükemmel kalitede preparatlar oluşturur (31). Kalın viskoz sıvılar ve katı doku aspiratları, lam üzerine yayma, ezme, bastırma ve kazıma gibi yerine göre değişik teknikleri gerektirir (54).

Materyalin yüzeyini kazıma ya da lama değdirme gibi yöntemler özellikle yüzeysel kitleler, cerrahi ya da nekropsi materyalleri için uygulanabilir niteliktedir (54, 69). Bu tekniklerde materyalin yüzeyinde eksudasyon yoğun ise önce kurutma kağıdı ile kurulamak gerekir. Yüzeydeki eksudasyon hücrelerin lama yapışmasına engel olabilir (15, 27). Kazıma tekniğinde, bir bisturi yardımıyla lezyonlu yüzey hafifçe kazınarak toplanan örnek lam üzerine yayılır. Lamı değdirme ya da bastırma tekniğinde ise kurulan materyal yüzeyine, lam hafifçe dokundurularak geri çekilmelidir. Eğer doku lam üzerine kuvvetle bastırılıp sürtülürse yoğun biçimde artifakt oluşabilir (69).

Pamuklu çubukla örnek alma (swabbing), mukozal yüzeyler için idealdir. Bu metotta, swap örnek alınacak yüzeyde hafifçe yuvarlanır. Eğer yüzey kuru ise swap fizyolojik tuzlu su ile ıslatılabilir. Yapışan hücreler swapın tekrar lam üzerinde yuvarlanması suretiyle aktarılır (15, 69).

Yüzeysel ya da derin anatomik bölgelerdeki kitleler için çoğunlukla İİAB tercih edilir (3, 5, 35, 43). Palpe edilebilen meme kitlelerinin teşhisinde İİAB'nin ilk olarak 1930'da Martin ve Ellis tarafından kullanıldığı bildirilmiştir (3). İİAB' nin özellikle tıpta palpe edilebilen meme kitlelerinin muayenesinde, hastayı fazla rahatsız etmeyen ve güvenli bir metot olmasından dolayı popülaritesi giderek arttığı bir çok araştırmacı tarafından ifade edilmektedir (3, 8, 43, 63, 66). İİAB' nin uygulanması oldukça kolaydır. Kitle eğer yüzeyde ise iki parmak arasında tespit edildikten sonra, uygun kalınlıkta (A21-A25'e no'lu iğneler) iğne tutturulmuş, 6'lık ya da 12 cc'lik bir enjektörle kitleye girilir. Aspirasyon, enjektörün pistonu ile hızlı bir negatif basınç uygulayarak yapılır. Bundan sonra piston ilk pozisyonuna

geri döner. Çeşitli bölgelerde pozisyon tekrar edilerek iğnenin sonuna kadar aspire edilir. Bu şekilde enjektöre yeteri kadar materyal toplanacaktır. Aynı bölgeden çok defa aspirasyon yapmak kanamaya neden olabileceğinden kaçınılmalıdır (15). Kitle eğer vücut içinde yer alıyorsa ultrason kılavuzluğunda aspirasyon yapılmalıdır (69).

Wellman (70), örnekleme tekniklerinin kanama, enfeksiyon, komşu dokularda hasar ya da tümör hücrelerinin bulaştırılması gibi bir takım komplikasyonları olabileceğini, ancak bu komplikasyonların nadiren gözlemlendiğini bildirmiştir.

Doğru ve güvenilir bir teşhis için preparat kalitesi çok önemlidir. Örnekleme teknikleri bazen hücrelerin hasarına yol açabilir. Oluşan artefaktlar ise olgunun doğru yorumlanmasına engel olabilir (54). Villiers ve Dunn (69), yıkama sıvıları ve aspiratlarda minimal düzeyde artefakt oluşurken, en fazla artefaktın kazıma, bastırma gibi tekniklerde meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Örnekler lama alındıktan sonra uygulanacak boya prosedürüne göre tespit edilmelidir. Sitolojik örneklerin rutin fiksasyon ve boyanmasında temel olarak iki farklı metot kullanılmaktadır (9, 20, 67).

- Yaş fiksasyon
- Havada kurutma

Yaş fiksasyon Papanicolaou (PAP), Sano trikrom ya da Hematoksilen&Eosin (H&E) gibi boyalarla birlikte kullanılmaktadır. Ancak bu yöntem veteriner sitolojide pek yaygın değildir (27) . Boon ve ark. (9), yaptıkları çalışmada veteriner sitolojide yaygın olmayan bu yöntemi özellikle neoplastik yapıların sitolojik teşhisi için önermişlerdir.

Yaş fiksasyonda en çok kullanılan fiksatif %95' lik etanoldür. Eşdeğer fiksatif olarak %100' lük metanol, %95' lik denatüre alkol, %80' lik propanol ve %80'lik isopropanol kullanılabilir. Ayrıca alkol ya da polietilen glikol içeren ticari sprey fiksatifler de pratikte kullanılmaktadır. Preparasyon sırasında bazen yaş fiksasyon öncesi hücrelerin

özellikle lama bakan yüzeylerinde kuruma artifaktı meydana gelebilir. Sprey fiksatifler, hücreleri bu tip kuruma hasarına karşı da korurlar (20, 32, 58). Eroğlu (20), fiksasyon süresinin 20-30 dk' dan az olmamakla birlikte, fiksatif solüsyonda örneklerin 10 günden fazla bırakılmaması gerektiğini ifade etmiştir.

Wright's, May-Grünwald-Giemsa (MGG) ve Diff-Quick gibi Romanowsky tip boyaların fiksasyon metodu havada kurutmaya dayalıdır ve veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılmaktadır (9, 15, 27, 58, 75). Havada kurutma hücrelerin yassılaşıp çaplarının büyümesine neden olur (27, 58). Optimal sonuçlar için hücreler mümkün olduğunca hızlı kurutulmalıdır. Ancak kurutma ısı 37 °C'yi geçmemelidir. Havada kurutma diğer preparasyon tekniklerine göre daha güvenilirdir (32). Hücreler şeffaf boyanmadıklarından dolayı ve de artifaktan kaçınmak için havada kurutma preparatlarını mutlaka ince bir kat olarak yaymak gerekir. Hızlı kurutma, mor çekirdek, mavi sitoplazma, mavi çekirdekçik ve pembe eritrositlerle karakterize Romanowsky efekti için gereklidir. Gecikmiş ya da yetersiz kurutmanın, özellikle sıvı örnekler için, yetersiz boya alma, hücrelerin yeterince yayılmaması, hücre ve çekirdek zarlarının yırtılması gibi artifaktlara neden olabileceği bildirilmiştir (9).

Jörundsson ve ark. (32), etkili bir boyanma için fiksasyondaki en önemli faktörlerin; hücrenin korunması, kararlılığının sağlanması, hücre içeriğinin kaybının önlenmesi, gerekli reaktif bölgelerin boyanması ve boyaların hücre zarına geçmesinin sağlanması olduğunu ifade etmişlerdir.

Havada kurutma ve yaş fiksasyon arasındaki önemli farklılıklar çeşitli araştırmacılar (2, 9, 27, 58) tarafından şu şekilde bildirilmiştir: Yaş fiksasyon yapılan preparatlar için örnekleme tekniğinin çok önemi yoktur. Artifakt, yayma yapıldıktan sonra preparatta kuruma olursa gözlenir. Hücre kaybı fazladır. Hücrelerin boyutları küçülür ve hücreler üç boyutlu olarak izlenir. Havada kurutma yönteminde ise örnekleme tekniği önemlidir. Gecikmiş tespit ya da sıvı örneklerin yetersiz kuruması artifakt oluşturabilir. Havada

kurutma yönteminde hücre kaybı azdır. Hücre boyutları büyür ve hücreler iki boyutlu gözlenir.

Thrall (67), ısıtarak asla fiksasyon yapılmaması gerektiğini, bunun hücrelerin yıkımlanmasına neden olabileceğini, ayrıca boyanmamış preparatların formalin solüsyonuna maruz kalmasının kötü boyanmış, teşhis yapılamayan preparatla sonuçlanacağını, aynı şekilde lamların temizleme yağları ile bulaşmasının hücrelerin çizgili yırtık görünüm kazanmasına yol açacağını bildirmektedir.

3. 2. 1. 1. Papanicolaou Boyası

Biyolojik boyaların amacı yapılar arasındaki kontrastı artırarak, onları daha iyi anlaşılır hale getirmektir (32). Eksfoliyatif sitoloji tıp bilimine George Papanicolaou'nun çabalarıyla kazandırılmış bir uzmanlık alanıdır. George Papanicolaou şaşırtıcı orijinallikte bilimsel çalışmalarıyla yeni bir alan yaratmış ve erken kanser teşhisinde etkileyici bir metot kazandırmıştır. En büyük başarılarından biri, 20. yy'ın belki de en başarılı görüntüleme tekniği olan servikal smear testini geliştirmesidir. 1928'de yayınlanan "Yeni kanser teşhisi" başlıklı makalesi sitoloji alanında bir kilometre taşı sayılmaktadır. Kendi adıyla anılan boyama yöntemini ilk başta hormonal sitolojiye uygulamıştır. Ancak daha sonraki yıllarda bütün ilgisini kanserin sitolojik teşhisine yöneltmiş ve bu konuda büyük ilerlemeler sağlamıştır. 1954 yılında "Eksfoliyatif Sitoloji Atlası"nı tamamlamış ve yayınlamıştır (74).

PAP boyama yönteminde çekirdeği boyayan bazik yapıdaki hematoksilendir. Sitoplazma ise iki zıt boya olan Orange G ve Eosin Azure ile boyanır. Çekirdek ve sitoplazma boyama solüsyonları arasında kimyasal bir etkileşim bulunmamaktadır. PAP formülasyonundaki boyalar asit ya da baz yapılarına göre elektrostatik olarak çekirdek ve sitoplazmaya bağlanırlar ve tuz formuna dönüşürler (32).

PAP boyasının temel avantajı hücre çekirdeğinin şeffaf olarak boyanmasıdır (58, 69). Hücreler yaş fiksasyon işleminden dolayı küresel yapılarını korurlar ve preparat üç boyutlu olarak izlenir. Çekirdek membranı, çekirdekçik ve kromatin içeriği lacivert,

sitoplazma açık yeşil, eritrositler ise pembe boyanırlar (20). PAP boyası çekirdek morfolojisini vurgulamak üzere tasarlandığı için sitoplazma zayıf boyanır. Ancak iyi diferensiye yassı epitel hücreler keratin içermeleri nedeniyle yoğun turuncu boyanırlar (9). Özellikle hücrelerin üst üste yığıldığı alanlarda ve dokudan kopan parçacıklarda dahi boyanın şeffaf yapısından dolayı mikroskopik inceleme yapmak mümkündür. Neoplastik yapılarda maligniteyi gösteren önemli kriterlerin çekirdekte yoğunlaşması, neoplazi teşhisi konusunda PAP tipi boyaları diğerlerine oranla üstün kıldığı bildirilmiştir (2, 9, 58, 75).

Normal PAP boyasının uygulama süresi ortalama 25-30 dk arasında değişmektedir. Buna tespit süresi de eklenirse toplamda en az 1 saat zaman harcanmaktadır. Değişen koşullar ve gelişen tıbbın ihtiyaçları karşısında boyalar da sürekli modifiye edilmektedir.

Khodke ve ark. (34) modifiye ultra hızlı PAP boyasını geliştirerek tespit dahil boyama süresini 2 dk 45 sn'ye indirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada topladıkları serviko-vajinal örnekleri hem klasik hem de modifiye ultra hızlı PAP ile boyayıp elde edilen bulguları karşılaştırmışlardır. Sonuçlara göre her iki yöntemin de mükemmel sonuç verdiğini bulmuşlardır. Rutin uygulamalarda daha yaygın olarak modifiye ultra hızlı PAP boyasının kullanılmasını önermektedirler.

3. 2. 1. 2. May-Grünwald-Giemsa Boyası

Eosin ve Metilen mavisi boyalarını kombine olarak ilk kez 1891'de Romanowsky kullanmıştır. Romanowsky bu iki boyanın karışımının yüksek ayırıcı özelliklere sahip olduğunu, özellikle kan parazitlerinden malaria için spesifik olduğunu keşfetmiştir. Daha sonra Romanowsky boyalarının bir modifikasyonu olan May-Grünwald-Giemsa (MGG) boyası ticari solüsyon olarak geliştirilmiştir ve formülü gizli tutulmaktadır (16).

Romanowsky tip boyalarda (MGG, Wright's, Diff-Quick v.b.) PAP'ın tersine asit ve bazik yapıdaki boyalar aynı solüsyondadırlar ve solüsyon nötr durumdadır. Solüsyonların içeriği; bazik olan metilen mavisi, asit olan eosin Y ve çökelti ürünler azure

A, B ve C'dir. Polikrom Romanowsky boyalarının sonuçlarının iyi bilinmesine karşın boyama mekanizması tam olarak anlaşılamadığı bildirilmiştir (32).

Romanowsky tip boyalar kolay uygulanması nedeniyle veteriner sitolojide en yaygın kullanılan metot olduğu ifade edilmiştir (9, 69, 75). Havada kurutulmuş fikse edilen preparatlarda iki boyutlu görünüm oluşur. Çekirdekler mor, sitoplazma ve çekirdekcikler mavi, eritrositler ise pembe boyanırlar (32).

Rebar ve ark. (58), MGG boyasının en önemli avantajının çekirdek ve sitoplazma sınırlarını çok iyi sergilediği için morfolojik olarak hücrelerin kolayca tanınabilmesi olduğunu belirtmektedirler. Özellikle yangı hücreleri, mast hücrelerindeki gibi sitoplazmik granüller, parazitler ve bakteriler Romanowsky tip boyalarla belirgin biçimde boyandığı, bunun dışında ekstrasellüler matriks, kolloid, mukus, kondroid matriks, mikroid matriks ve diğer diagnostik önemi olan salgı ürünleri Romanowsky boyalarla oldukça iyi boyandığı, ancak yine de çekirdek iç yapısı için kalın bir boya olduğu, çeşitli literatürlerde (9, 20, 27, 32) bildirilmiştir.

Yoğun sıvı ve katı doku örneklerinde en çok karşılaşılan problemlerden biri hücrelerin yoğun kümeler halinde bulunmalarıdır. Romanowsky tip boyalar genellikle bu hücre yığınlarına nüfuz edemez ve bu alanlar mikroskopta incelenemez (69). Ancak bu tip boyaların uygulanması çok kolay ve prosedürü az basamaklıdır. Thrall (67), Veteriner Hekimlikte öncelikle Romanowsky tip boyaların kullanılmasını tavsiye etmektedir.

3. 2. 2. Sitolojik Malignite Kriterleri

Malign ve hiperplastik lezyonlar uniform ve yangısal olmayan hücre populasyonları içerirler ve bazen ayırt etmek güç olabilir. Bu süreçleri birbirinden ayırmak için rehber sitolojik malignite kriterleri belirlenmiştir (1). Malignitenin spesifik kriterleri tıpta ilk olarak, kendi adıyla anılan boyama metodunu geliştiren, George Papanicolaou tarafından tanımlanmıştır (74). Rozsel köpek dokuları için bu kriterleri Sano'nun trikromu ya da modifiye trikrom boyalarını kullanarak genişletmiştir (58). Son yıllarda, Papanicolaou tarafından ilk kez ana hatları belirtilen malignite kriterleri ile Romanowsky boyaları kullanılan sitolojik preparatlar da değerlendirilmektedir (58, 67).

Sitolojide malignite ile ilgili kriterler hücresel düzeydeki pleomorfizmden başlayıp, klinik bilgilere kadar uzanan bir eksenle ele alınarak incelenmektedir. Bu kriterler aşağıda ayrı ayrı değerlendirilecektir.

Pleomorfizm

Pleomorfizm, özel bir hücre tipi populasyonunda, bireysel hücreler ya da çok çekirdekli hücrelerde çekirdekler arasında büyüklük, şekil ve diğer özelliklerdeki varyasyonlar olarak tanımlanabilir. Hücresel pleomorfizm çoğunlukla anizositozis ve anizokaryozis olarak gözlenir. Normal, benign ve iyi diferensiyel malign neoplastik hücre populasyonları yalnızca hafiften orta şiddetliye doğru varyasyonlar sergiler. Aksine, indifferensiyel malign hücre populasyonlarında çekirdek ve hücre boyutlarında belirgin varyasyonlar mevcuttur. Hücresel pleomorfizm, malign neoplaziler için en yaygın gözlenen malignite kriteri olarak bildirilmiştir (13, 18, 58, 70).

Çekirdek İle İlgili Malignite Kriterleri

Hücresel üretim ve aktivitenin merkezi olan çekirdek, malignite kriterlerinin gözlemlendiği en önemli yapıdır (2, 49). Çekirdek, kromatin DNA kompleksi ve bileşik proteinler içerir. Bazı kromatin alanları, heterokromatin olarak bilinen mavi-siyah bir materyal olarak boyanır. Heterokromatin DNA'nın genetik olarak inaktif formudur. Daha açık boyanan kromatin (eukromatin) aktif olarak m-RNA'ya dönüşür ve protein sentezine katılır (1).

Malign neoplazilerde çekirdekte gözlenen önemli değişiklikler, büyük çekirdeklilik, anormal çekirdek şekli ve çok çekirdeklilik olarak bildirilmiştir (1, 13 70). Tek ya da çok çekirdekli hücrelerdeki, çekirdek boyut farkı (bazen 1-5 katı ya da daha büyük olabilir), yine önemli bir malignite kriteridir. Çok çekirdeklilik hem malign hem de normal hücrelerde gözlenebilir. Bu bazı hücrelerde normal bir bulgudur (osteoklastlar, epiteloid dev hücreler gibi), ancak diğer hücre tiplerinde (epiteliyal, mezoteliyal hücreler gibi) genellikle neoplastik bir değişiklik olarak gözlenir (1, 15, 19, 70). Çok çekirdekli bir hücrede anizokaryozis, malign hücrelerde görülen çok çekirdekliliğin sapkın bir formudur, fakat çok nadir olmak üzere normal hücrelerde de görüldüğü bildirilmiştir (13).

Şkirbinc ve ark. (63) meme tümörleriyle yaptıkları çalışmada çekirdeği, çekirdek büyüklüğü, çekirdek boyutundaki farklılıklar ve çekirdekçik/çekirdek oranı şeklinde üç temel özellikle değerlendirmektedirler ve sitolojik bir derecelendirme sistemi oluşturacak kadar güçlü indikatörler olarak ifade etmektedirler.

Kromatin

Genel olarak heterokromatin ve eukromatin benign hücrelerde homojen dağılmıştır. Kromatinik ağda, kromatin granülleri küçüktür ve hatta tüm çekirdeğe dağılmıştır. Bu görünüm çoğunlukla pürüzsüz veya yumuşak olarak ifade edilir. Benign hücreler transkripsiyonel olarak daha aktif oldukları için heterokromatin genellikle daha granülerdir, fakat düzenli dağılımlarını korurlar. Malign hücrelerde ise kromatin granülleri dağınık ve kabalaşmış olarak izlenir (1, 2, 15, 18, 58) . Buckner ve ark. (13), kromatinin, düzenli ve ince ya da düzensiz ve kabalaşmış yapısını, benign ve malign olguların teşhisinde anahtar bir özellik olarak bildirmişlerdir.

Bir hücrenin fazla DNA içermesi çekirdeğin daha fazla hiperkromatik boyanmasıyla sonuçlanır. Bu nedenle hiperkromazi (çekirdeğin normal bir hücreye göre daha yoğun boyanması) malignant hücrelerde daha fazla görülür. Çekirdekteki kromatinin anormal miktarda artması, boyanmadaki artışla sonuçlanır. Hiperkromazinin bir özelliği de kromatin

materyalinin yığınlar yapmasıdır. Hiperkromazi benign hücrelerin çekirdeklerinde de görülebilir (1, 2, 13, 58).

Allen ve ark. (2), köpek meme tümörlerinde yapmış oldukları çalışmada, kromatin granüllerindeki düzensizlik ve kabalaşmayı malign neoplazilerin sitolojik teşhisinde en önemli özelliklerden bir olarak bildirmiştir.

Çekirdekçikler

Çekirdekçikler, ince bir tabaka olan heterokromatin tarafından sarılmış yuvarlakta ovalere kadar değişen bir yapıya sahiptir. Normal hücreler 1-4 adet çekirdekçiğe sahip olabilirler. Bununla birlikte, genellikle 1-2 tanesi görülebilir ya da hiç biri gözlenmez. Çekirdekçikler r-RNA'nın sentez bölgesidir. Aktif olarak protein sentezleyen hücreler daha belirgin çekirdekçiklere sahiptir (1).

Benign hücrelerin çekirdekçikleri tipik olarak iyi sınırlanmış ve 5µm'den küçüktür (Kedi köpeklerin eritrositleri yaklaşık 6-8µm kadardır). 5µm'den daha büyük çekirdekçikler, malign neoplazilerde yaygın olarak gözlenen sitolojik bir özelliktir. Yassı köşeli yada çentikli kenarlı çekirdekçikler anormaldir ve bazen malign hücrelerde gözlenir. Preparasyon işlemi sırasında hasar gören hücrelerin çekirdekçiklerini değerlendirmeye katmamak için dikkatli inceleme yapılmalıdır (15, 45, 58, 75). Çok sayıda çekirdekçik ve özellikle her çekirdeğin çekirdekçik sayılarındaki farklılıklar yine malign neoplazilerde gözlenen özellikler olarak bildirilmiştir (1).

Mitotik Figürler

Bir çok malign neoplazmada mitotik figürler artan sayılarda gözlenir. Özellikle anormal mitotik figürler kanser hücrelerinde karakteristiktir. Mitozis boyunca kromozomlar normal olarak hücrenin iki zıt kutbuna çekilir. Bununla birlikte bazı kanser hücreleri, tripolar hatta multipolar mitozise kayabilir. Bu da hücrenin anormal bölünmesi ve kromozom kaybı ile sonuçlanır. Geriye kalan kromozomlar ise aslında komşu kromozomlarla aynı seviyede değildir ve hücrelerin malign olmalarının kanıtıdır (1, 2, 45).

Allen ve ark. (2) anormal mitotik figürlerin malignite için belirgin bir özellik olmakla birlikte, nadir rastlandığı için diğer kriterlere göre daha zayıf kabul edilebileceğini bildirmektedirler.

Çekirdek zarı

Çekirdek zarının dış hatları hücrelerin biyolojik aktivitesini de yansıtır. Benign hücrelerde dış membranın pürüzsüz ve yuvarlaktan ovale kadar değişen şekillerde; aktif ya da reaktif hücrelerde ise dış membranın dalgalı ya da bukleli görünümde, gözlendiği bildirilmiştir (1, 13).

Dönüşümlü hücre hasarında, sitolojik değişiklikler çoğunlukla iyoniktir ve sıvı dengesinin bozulmasına bağlıdır. Sıvı akışının bozulması hücre ve çekirdek açısından şişme ile sonuçlanır. Bundan dolayı, çekirdek zarı yuvarlak ve pürüzsüz olarak gözlenir. Dönüşümsüz hücre hasarında ise çekirdek morfolojisinde göze çarpan değişiklikler büzülmeden (piknozis), çekirdek çözülmesine (karyoreksis ve karyolizis) kadar değişir (13).

Malignant hücrelerde çekirdek zarının dış hatları değişkendir. Bazı hücre tiplerinde yuvarlak ve pürüzsüzden, açık renk noktalı ve köşeli klasik malign görünüme kadar sınıflandırılır. Çekirdek zarındaki bu açılar düzensiz ve keskindir. Ayrıca vakuol ya da diğer çekirdeklerin basıncı sonucu oluşmazlar (2, 13, 75).

Çekirdek / Sitoplazma Oranı

Çekirdek bölgesinin toplam sitoplazmaya oranı (Ç/S oranı) bir hücrenin matüritesi ve biyolojik aktivitesi hakkında bilgi verir niteliktedir. Genelde hücresel olgunluğun derecesi Ç/S oranı ile ters orantılıdır. Olgun hücrenin Ç/S oranı düşüktür, tersine, genç hücrelerin Ç/S oranı daha yüksektir. Ç/S oranı genellikle çekirdek büyümesi ile sonuçlanan atipi ve malignite süreçlerinde artabilir, hücresel olgunlukta ise azalır. Yangısal atipide hafifçe artışlar gözlenir (1, 67, 70).

Buckner ve ark. (13), sitolojistlerin normal ve reaktif hücre populasyonlarında, anormal Ç/S oranı ve malignite ihtimali varlığını doğru olarak değerlendirmek için derecelendirmenin varyasyonlarını öğrenmek zorunda olduklarını ifade etmişlerdir.

Hücre Sayısı

Sitolojik bir preparatta bulunan hücrelerin sayısı, mekanik eksfoliyasyonun kuvveti ile orantılı olarak ya da anaplazi ve displazinin derecesine bağlı olarak artar. Çünkü hücrel kohezyon biyolojik yüzeyleri örten epiteliyal fonksiyonlu hücrelerde önemlidir. Neoplazilerde kohezyon kaybı özelleşmiş hücrel fonksiyonda bir azalma olarak yorumlanabilir (2, 27, 58)

Sitoplazma İle İlgili Malignite Kriterleri

Bir hücrenin sitoplazması, hücrenin diferensiyasyon derecesini, köken aldığı dokuyu, bazı durumlarda da hücrenin fonksiyonunu gösterebilir. Hücrenin metabolik ürünleri, preparatlar Romanowsky tip boyalarla boyandığında, sitoplazmada vakuol ve granüller olarak gözlenebilir. Bazı hücrelerde sitoplazmik bazofilinin seviyesi protein üretiminin yoğunluğunu sergileyebilir (1).

Malign neoplazilerin teşhisinde, sitoplazmik malignite kriterlerinin çekirdekle ilgili kriterlere göre daha az önemli olduğu bildirilmiştir (2). Ancak, çekirdekle ilgili kriterlere ilave olarak teşhisi destekleyici nitelikte olabilir. Bununla birlikte Wellman (70), spesifik hücreler için sitoplazmik granüllerin ya da içeriklerin tümör tanısında yine de spesifik indikatörler olabileceğini bildirmiştir. Mast hücreleri granüllerinin ya da yağ hücrelerinin vakuolleri gibi.

Sitoplazmik kriterler artan sitoplazma boyanması, düzensiz hücre sınırları ve sitoplazmik vakuolleri içerir (13). Rebar ve ark. (58), sitoplazma boyanmasındaki artışın, sitoplazmanın RNA içeriğinin artışı ile ilgili olduğunu ve malign olgular kadar hiperplastik olgularda da görülebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, düzensiz hücre sınırlarının, genellikle

hücreler arası bağlantı özelliğini yitiren hücrelerde görüldüğünü de ifade etmişlerdir. Sitoplazmik vakuolizasyon spesifik bir bulgu değildir. Neoplastik hücrelerde dejenerasyonu ya da salgı yapan neoplastik hücrelerin varlığını gösterebilir (2, 70).

Hücresel Konfigürasyon

Hücresel konfigürasyon büyük ölçüde örnekleme metoduna bağlıdır. Fizyolojik ya da spontan eksfoliyasyon çoğunlukla tek hücre ve küçük hücre grupları görüntüsüyle sonuçlanır. Mekanik olarak eksfoliyasyonda benign hücreler tek, küme ya da doku parçaları şeklinde gözlenir. Benign doku parçaları genellikle oldukça belirgin hücresel sınırlara sahip hücre katmanlarından oluşur. Epitelial gruplarda çekirdekler komşu hücrelerin çekirdeğinin değmesi ya da baskısı ile biçimlenebilir. Bu olay **nüklear molding** olarak tanımlanır (1, 2, 13).

Malign hücreler, örnekleme metodu ne olursa olsun, tek hücre, hücre kümeleri ya da doku parçaları halinde bulunabilir. Malign doku parçaları genellikle hücre tabakalarından daha çok psödosinsityal gruplar (sitolojik preparasyonlarda, psödosinsityal gruplar belirgin hücre sınırları olmaksızın sinsityal olarak görünürler) olarak ortaya çıkarlar. Psödosinsityal gruplarda malign hücrelerin çekirdeklerinin uyumsuzluk, kabalık ve polarite (polarite, aynı doku parçasındaki çekirdeklerin normal uyumu olarak tanımlanır) kaybı sergilediği bildirilmiştir (1, 45, 70).

Üç boyutlu doku parçalarını bazen başı boş serbest halde gezen hücre kümelerinden ayırmak zor olabilir. Normal bir doku parçası, in vivo olarak da ilişkilerini koruyan bir hücreler grubu, genellikle iyi belirlenmiş dış hatlara sahiptir. Bu dış hat bitişik durumdaki hücrelerin sitoplazmalarından oluşur. Tersine, malign bir hücre kümesinde genellikle bir dış sınıra sahiptir. Bu sınır, bireysel hücrelerin rastgele toplanması sonucu geliştiği güzel bir görünümde değildir. Ayrıca, normal doku parçaları solid hücrelerden oluşur, oysa ki malign hücre kümelerindeki bireysel hücreler arasında aralıklar ya da pencerelerin bulunabileceği bildirilmiştir (1, 67). Buckner ve ark. (13), nüklear molding'in normal doku parçalarında bulunmasına karşın, hücre kümelerinde bulunmadığını ifade etmektedir.

Preparat Zemini

Preparat zemini konusunda sitologlar bir yangı ya da malign bir durum olasılığına karşı uyanık olmalıdır. Yangı, genellikle bakteri, virus, parazit gibi etkenler, yabancı maddeler ya da otoantijenlere karşı bir konak yanıtına işaret eder. Dokuda yangısal bir durum olmasına karşın, örneklerde bazen yangısal belirtiler bulunmayabilir (13).

Wellman (70), nekrotik hücre artıkları ve hemolize kan gibi tümör diyatezlerinin invaziv karsinomlarla ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Preparat zeminindeki yabancı yapıların, lezyonun niteliği hakkında bilgi verebileceğini ve önemli bir ayrıntı olarak dikkat edilmesi gerektiği ifade edilmektedir (13).

Klinik Bilgiler

Doğru ve baştan sona tam bir klinik geğmiş sitolojik bir örneğin değerlendirilmesinde zorunludur. Eğer klinik geğmişe ulaşılamıyorsa bilgi elde edilene kadar örnek değerlendirilmemelidir. Çok sık olarak klinik geğmişe ilgili küçük bir bilgi, zor bir vakada doğru teşhisi yapmakta yeterli olabilir. Hikayesini sağlamakda her ne kadar klinisyen sorumlu olarak görölse de, olgu hakkında bilgi verilmediği zaman, bu bilgiyi araştırmanın sitolojistin görevlerinden birisi olduğu bildirilmiştir (13).

Yukarıda sıralanan sitolojik özellikler günlük laboratuvar pratiğinde en çok gözlenen parametrelerdir. Ne yazık ki klasik kriterler tüm vakalarda her zaman bulunmaz. Sitolog baştan sona var olan tüm değişiklikleri gözlemek, bunları beklenen bulgularla karşılaştırmak ve mümkün olan en doğru teşhisi yapmak zorundadır. Doğru sitolojik teşhisin yalnızca doğru teşhis kriter bilgisine değil, aynı zamanda, sitoloğun pratikle kazandığı deneyime bağlı olduğu unutulmamalıdır.

Nitekim, Tanaka ve ark. (64)'nın, meme kanserinin sitolojik teşhisinde yapılan istatistiksel hatalara ilişkin yaptıkları çalışmada, diğer referans çalışmalara göre doğru teşhis oranının düşük olduğunu ve bunun da büyük ölçüde kendi ülkelerindeki (Japonya)

meme kanseri insidensinin düşük olması nedeniyle, yetersiz deneyime sahip olmalarından kaynaklandığını bildirmektedirler.

3. 2. 3. Sitolojik Teşhisin Avantaj ve Dezavantajları

Sitolojik teşhisin temel avantajları hızlı, güvenilirliği yüksek ve ekonomik olmasıdır (2, 15, 42, 43, 66). Bunun yanı sıra örnekleme metotları hasta tarafından kolay tolere edebilir ve anestezi gerektirmeyen yöntemler olmasıdır (69).

Sitolojik preparatlarda lezyonu yangı, hiperplazi ya da neoplazi olarak sınıflandırmak mümkündür (75). Sitoloji, histopatolojiye yardımcı yararlı bir metot olmakla birlikte, bazı neoplazilerin teşhisinde doğrudan sonuç verebilir. Deneyimli sitolojistler bazı spesifik tümörleri sitolojik olarak kolaylıkla teşhis edebildikleri gibi, çoğu neoplazi türlerinde kesin olmayan bir ön teşhis de yapabilirler. Bu bilgi ise prognoz tahmini ve uygulanacak tedavi yönteminin belirlenmesinde oldukça yararlıdır. Ayrıca hastanın başka sağlık problemleri varsa, tedavideki öncelikleri belirlemeye yardımcı olur (2, 70). Wellman (70), sitolojinin aynı zamanda metastazik ve nüks tümörlerin belirlenmesinde de kullanılabildiğini ifade etmiştir.

Tıpta özellikle İİAB yöntemi ile çok fazla çalışma yapılmıştır. Farklı tümörlerle yapılan bu çalışmalarda “pozitif tanımlama oranları”nın ortalama % 95-100 civarlarında olduğu gözlenmektedir. “Diagnostik geçerlilik” ise yine % 85-99 arasında değişmektedir (3, 8, 38, 42, 63, 64).

Sitoloji bazen kesin teşhis için yeterli bilgi vermez . Hatalı negatif ve şüpheli teşhis olasılığı her zaman mevcuttur. Tartışmalı sitolojik preparatlar genellikle örnekleme metodundan ya da lezyonun doğasından kaynaklanır. Diğer bir problem ise preparatlarda örnekleme, fikzasyon ya da boyama prosedürleri sırasında oluşabilecek artifaktlar ya da yetersiz örnek alınmasıdır. Hücrelerin kan hücreleri ile örtülmesi, koyu boyanması ya da

üst üste gelmeleri sitolojik ayrıntıları gizleyebilir ve teşhis yapmayı güçleştirebilir. Bazı durumlarda ise yeniden örnekleme yapılması mümkün olmayabilir (35).

Sitolojik yöntemlerle bu problemleri aşmak için konsantrasyon (sitosantrifüj) ve hücre bloklama gibi bazı teknikler de geliştirilmiştir. Kulkarni ve ark. (35), hücre bloklama tekniğinde histolojik kesit kalitesinin oldukça yüksek ve özellikle de örneklemenin tekrarlanamadığı durumlarda hücre bloklama tekniğinin son derece yararlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bazı prognostik parametreleri sitolojik olarak immunositokimya ya da flow sitometri gibi metotlarla araştırmak mümkündür (31, 63).

Veteriner Hekimlikte henüz fazla popüler olmamasına rağmen, bu yöntem tıpta benign ya da malign olmasının da ötesinde, tümörlerin tanımlanması ve alt sınıflandırmasının yapılmasında da kullanılabilir (14).

Bonzanini ve ark. (8), memenin in situ duktal karsinoma ve invaziv duktal karsinoma tümörleri arasında sitolojik olarak ayırım yapmışlar ve sitomorfolojik özelliklerin bu iki tümörü ayıracak kadar yeterli olduğunu göstermişlerdir.

Maygarden ve ark. (42), benign karakterli meme kitleleri ile yaptıkları çalışmada, yeterli miktarda örneklenen kitlelerin alt sınıflandırma yapmaya yetecek kadar sitolojik özellik gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Şkirbinc ve ark. (63), histolojik derecelendirmeye alternatif olarak, Giemsa boyanmış meme İİAB materyallerini üç temel çekirdek özelliği açısından inceleyip, sitolojik bir derecelendirme yapmışlardır. Bu özellikler çekirdek büyüklüğü, çekirdek boyutundaki farklılıklar ve çekirdekçik/çekirdek oranı olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda çalışmada flow sitometri yöntemi ile DNA-ploidi ve S-faz fraksiyonu da değerlendirilmiştir. Bu çalışma sitolojik derecelendirmenin histolojik derecelendirme kadar önemli olduğunu, hatta histolojik derecelendirmeye bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

Sitolojik teŖhis, tıpta yüksek güvenilirliğe sahip olmasına rağmen çoğunlukla diğer teŖhis yöntemleri ile kullanılmaktadır. McCluggage ve ark. (43), İİAB tekniği ile memenin granüler hücreli tümörü ile yaptıkları çalışmada, klinik, radyolojik ve sitolojik yöntemlerin tümör teŖhisinde, l yaklaşım olarak çok önemli olduğunu bildirmişlerdir.



4. GEREÇ VE YÖNTEM

4. 1. GEREÇ

Çalışmada 1999-2003 yılları arasında, Fakültemiz Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda, meme tümörü şüphesiyle nodülektomi, lobektomi, unilateral mastektomi ve total mastektomi yöntemleri uygulanan, çeşitli yaşlardaki ve değişik ırklara ait 100 adet dişi köpeğin meme dokusu kullanıldı.

4. 2. YÖNTEM

4. 2. 1. Laboratuvar Yöntemi

Laboratuvarımıza gelen tümör şüpheli meme dokularına merkez düşey ve yatay eksenleri boyunca kesitler uygulandı. Mineralizasyon ve kemikleşme şekillenmiş bazı tümör şüpheli kitlelerin mümkün olan bölgelerine kesit uygulandı.

Sitolojik yöntem:

Sitolojik örnekleri hazırlamak için kazıma tekniği kullanıldı (15, 54, 69, 70). Kesit yapılan yüzeylerinde ülserasyon veya kanama olan dokular önce kurutma kağıdı ile kurulandı. Bistüri dokunun kesit yüzeyine 90° açı yapacak şekilde yerleştirildi ve nazikçe birkaç kez kazındı. Bistüriye toplanan materyal temiz bir lam üzerine yayıldı. PAP boyası uygulanacak lamlar, tespit etmek üzere yayma hazırlanır hazırlanmaz %96'lık etanole konuldu. Modifiye Romanowsky boyası olan MGG uygulanacak yaymalar ise havada kurumaya bırakıldı.

% 96'lık etanolde en az 1 saat tespit edilen sitolojik örneklere Tablo 1' de gösterildiği gibi klasik PAP boya prosedürü uygulandı (39).

Tablo 1. Papanicolaou Boyama Prosedürü

PAPANICOLAOU BOYAMA PROSEDÜRÜ		
Amaç	Madde	Süre
Rehidrasyon	Distile su	3-5 kez daldırma
Çekirdek boyama	Hematoksilen (Sigma HHS-16)	2-3 dk
Yıkama	Çeşme suyu	5 dk
Dehidrasyon	% 96'lık etanol	2 dk
Dehidrasyon	% 96'lık etanol	2 dk
Sitoplazma boyama	Orange G 6 (Sigma HT40-1-16)	2-3 dk
Yıkama	% 96'lık etanol	2 dk
Yıkama	% 96'lık etanol	2 dk
Sitoplazma boyama	Eosin Azure 50 (Sigma HT40-3-16)	3 dk
Yıkama	% 96'lık etanol	2 dk
Yıkama	% 96'lık etanol	2 dk
Parlatma	Xylol	15 dk

Havada kurutulan yaymalar ise Tablo 2'deki Modifiye Romanovsky boyası olan MGG Prosedürüne göre boyandı (39).

Tablo 2. May-Grünwald-Giemsa Boyama Prosedürü

MAY-GRUNWALD-GIEMSA BOYAMA PROSEDÜRÜ		
Amaç	Madde	Süre
Boyama	May-Grünwald (Sigma MG500)	3 dk
Yıkama	Distile su	1 dk
Boyama	Giemsa (Sigma GS500) (1 damla stok / 1 cc distile su)	15 dk
Yıkama	Distile su	Boya giderilene kadar
Havada kurutma	--	
Parlatma	Xylol	3 dk

Tablo 1 ve Tablo 2 de anlatılan prosedürlere göre boyanmış preparatlar Xylol aşamasından sonra Kanada Balsamı ve lamel ile kapatıldı. Hazırlanan sitolojik preparatlar Olympus marka CX 31 model ışık mikroskopunda incelendi.

Histolojik yöntem:

Sitolojik preparasyon tamamlandıktan sonra dokular, % 10'luk formalin solüsyonu ile tespit edildi ve daha sonra rutin işlemlerden geçirildi. Parafin bloklara gömülen doku örneklerinden 4-5 µ kalınlığında kesitler alındı. Bütün kesitler Hematoksilen&Eozin (H&E) boyası ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi (39).

4. 2. 2. Mikroskopik Değerlendirme Yöntemi

Sitolojik ve histolojik preparatlar birbirlerinden bağımsız olarak değerlendirildi. Histolojik preparatlar WHO tarafından yayınlanan sınıflandırmaya göre isimlendirildi (50).

Sitolojik preparatların değerlendirilmesi için daha önce yapılan çalışmalara göre pleomorfizm, büyük çekirdeklilik, anormal çekirdeklilik, çekirdek zarı alterasyonları, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, mitotik figürlerin varlığı, çekirdekçik şeklinde ve sayısında varyasyonlar, kromatin granüllerinde kabalaşma, dev hücre varlığı, psödosinsityal hücre gruplarının varlığı, molding (çekirdeğin başka bir çekirdek ya da hücre tarafından oluşturulan basıncın etkisiyle biçimlenmesi), çekirdek ve sitoplazma vakuolizasyonları, hücresel yoğunluk, hücreler arası bağlantının zayıflığı, spindle hücre varlığı, yangısal hücre varlığı, nekrotik döküntüler, makrofaj varlığı ve skuamoz epitellerin varlığı şeklinde toplam 21 adet sitolojik malignite kriteri belirlendi (2, 13, 15, 70). Her iki boyamayı da yan yana değerlendiren bir form hazırlandı. Bu form üzerinde kriterlerin preparatta bulunma yoğunluğuna göre puanlama yapıldı.

Puanlama için 40x'lik ve 100x'lik objektiflerde 10'ar mikroskop alanı değerlendirildi. 40'lık objektifte dev hücre varlığı, psödosinsityal hücre gruplarının varlığı, hücreler arası zayıf bağlantı, hücresel yoğunluk, spindle hücre varlığı, yangısal hücre varlığı, nekrotik döküntüler, makrofaj varlığı ve skuamoz epitellerin varlığı kriterleri; 100'lük objektifte pleomorfizm, büyük çekirdeklilik, anormal çekirdeklilik, çekirdek zarı alterasyonları, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, mitotik figürlerin varlığı, çekirdekçik şeklinde ve sayısında varyasyonlar, kromatin granüllerinde kabalaşma, molding, çekirdek

ve sitoplazma vakuolizasyonları kriterleri değerlendirildi. Her bir kriter için Tablo 3'teki gibi (0) - (+3) arasında puan verildi (38). Mitotik figürler için 10 alanda 1 adet mitotik figür +1, 2-5 figür +2, daha fazla miktardaki mitotik figürler +3 olarak kaydedildi.

Tablo 3. Puanlama

Yoğunluk (%)	0-10	11-30	31-50	51-100
Puan	0	+1	+2	+3

Mikroskopik değerlendirme tamamlandıktan sonra bütün olguların puanları toplandı. Hücre ve çekirdekle ilgili Tablo 8'deki ilk 10 kriterden en az 5 tanesi +2 ve üzeri puan almışsa malign, 3-4 kriter +2 ve üzeri puan almışsa şüpheli, 2 ve daha az kriter +2 ve üzeri puan almışsa benign olarak değerlendirildi.

4. 2. 3. İstatistik Yöntemi

Veriler Pearson Chi-Square testi ile değerlendirildi. Her bir sitolojik kriter ve her iki boyama yöntemi için ayrı ayrı gerçek pozitif (histopatolojik ve sitolojik olarak malign), gerçek negatif (histopatolojik ve sitolojik olarak benign), hatalı pozitif (histopatolojik olarak benign, sitolojik olarak malign) ve hatalı negatifleri (histopatolojik olarak malign, sitolojik olarak benign) saptayabilmek için 0 ve 1 puanları "hastalık negatif", 2 ve 3 puanları ise "hastalık pozitif" olarak değerlendirildi. Ayrıca sitolojik teşhislerde de şüpheli olgular malign olgulara dahil edildi (3). Her iki boyama yöntemine göre bütün kriterlerin ve sitolojik teşhislerin ayrı ayrı duyarlılık, özgüllük, pozitif tanımlama oranı, negatif tanımlama oranı ve tanı değeri hesaplandı (2, 3, 41). Ayrıca benign ve malign tümörler arasında doğum yapma, kısırlaştırılma ve yaş açısından varyasyonları ölçmek için yine Chi Square testi uygulandı. İstatistiksel analizler bilgisayarda SPSS (Statistical Package for Social Sciences Ver.10.0) programında yapıldı.

5. BULGULAR

5. 1. Histopatolojik Bulgular

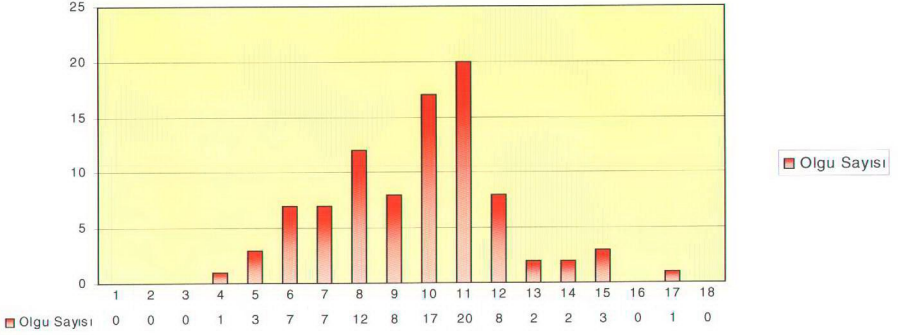
100 meme tümörü şüpheli köpekten alınan materyaller histopatolojik olarak incelendi. Tümörlerin histomorfolojik dağılım ve yüzde oranları Tablo 4' de verildi.

Tablo 4. Meme tümörlerinin sayı ve yüzde dağılımı

MALİGN TÜMÖRLER	SAYI ve (%)	BENİGN TÜMÖRLER	SAYI ve (%)
İn Situ Karsinoma	3	Simple Adenoma	3
Tubulopapiller Adenokarsinoma	20	Kompleks Adenoma	2
Solid Adenokarsinoma	11	Basaloid Adenoma	1
Kompleks Adenokarsinoma	16	Fibroadenoma	4
Osteosarkoma	7	Benign Miks Tümör	6
Karsinosarkoma	14	Lipoma	2
Spindle Hücreli Karsinoma	3	Nörofibroma	1
Skuamoz Hücreli Karsinoma	1	TOPLAM	21
Liposarkoma	1		
TOPLAM	76	DİSPLAZİ	5

Çalışmanın materyalini oluşturan köpeklerin yaş dağılımı Tablo 5'de verildi. 100 köpekten yaşı en küçük olan 4, en büyük olan ise 17 olarak belirlendi. 9 köpeğin yaş bilgisine ulaşılamadı. Yaş tablosu değerlendirildiğinde 10-11 yaşları arasında meme tümörü insidensinin yükseldiği gözlemlendi.

Tablo 5. Köpek meme tümörlerinin yaşlara göre dağılımı.



Malıgn ve benıgn tümörler arasında, yaş gruplarının Chi Square testi ile karşılaştırılmasında anlamlı bir fark ($p>0.05$) gözlenmedi.

Çalışmada, memelerinde tümör saptanan köpeklerin ırkları oldukça çeşitlilik gösteriyordu. Bununla birlikte en fazla tümör saptanan ırk %41 ile Terrier ve ikinci olarak %7 ile melez ırklar oldu. Geri kalan yüzde dilimi diğer ırklar arasında paylaşıldı.

Köpeklerin doğum yapma ve kısırlaştırılma durumları, malıgn ve benıgn tümörler arasında Chi Square testi ile karşılaştırıldı. Hem doğum yapma hem de kısırlaştırılma durumları açısından malıgn ve benıgn tümörler arasında anlamlı bir fark ($p>0.05$) gözlenmedi. Bununla birlikte, kısırlaştırılma ve doğum yapma bilgilerine ulaşılabilen, malıgn meme tümörüne sahip 63 köpekten 24'ünün doğum yaptığı, 7'sinin kısırlaştırıldığı, aynı şekilde benıgn-meme tümörüne sahip 16 köpekten 7'sinin doğum yaptığı, yalnızca 1 tanesinin kısırlaştırıldığı tespit edildi.

5. 2. Sitolojik Bulgular

Materiyali oluşturan her bir meme tümöründen önce sitolojik preparatlar hazırlanarak PAP ve MGG boyaları ile boyandı. Hastaların klinik bilgilerini ve 21 sitolojik malignite kriterini içeren formlar tüm vakalar için ayrı ayrı dolduruldu. Tüm sitolojik değerlendirmeler tamamlandıktan sonra, aynı tümörden hazırlanan doku kesitleri histopatolojik olarak incelendi ve son olarak sitolojik sonuçlarla karşılaştırıldı.

Histopatolojik olarak displazi teşhis edilen beş olgunun sitolojik incelemesinde, +1 düzeyinde normal ya da dejeneratif durumda meme epiteli, +3 düzeyinde köpüklü makrofajlar, hem PAP hem de MGG preparatları için ortak görüntüyü oluşturdu (**Resim 1**). Ayrıca bazı olgularda +2 düzeyinde yangısal hücreler de izlendi. Hem çekirdek hem de sitoplazma vakuolizasyonları MGG preparatında yoğun izlenirken, PAP preparatında gözlenmedi. Diğer tüm kriterler ise 0 olarak kaydedildi. Bu beş olgunun PAP ve MGG sitolojik teşhisleri benign olarak değerlendirildi.

Histopatolojik olarak fibroadenoma teşhis edilen dört olgunun sitolojik incelemesinde, iki olgu hem PAP hem de MGG preparatında malign, kalan ikisi aynı şekilde benign olarak teşhis edildi. Fibroadenomaların sitolojik incelemesinde, mikroskopik olarak uniform tubuler epiteller, fibrositik hücreler ve köpüklü makrofajlar gözlemlendi. Malign teşhis edilen iki fibroadenoma olgusunda da çekirdekçik şekil ve sayısındaki varyasyonlar, pleomorfizm, hücresel yoğunluk, zayıf hücreler arası bağlantı gibi kriterler +2 olarak kaydedildi. Ayrıca bu olgularda yangısal hücre yoğunluğu, yassı hücre metaplazileri de dikkat çekici idi. Benign olgularda makrofaj, hücresel yoğunluk ve yangısal hücre varlığı kriterlerinin dışındaki kriterler 0 ve +1 puanları ile değerlendirildi.

Histopatolojik olarak simple adenoma teşhis edilen üç olgudan, birincisi her iki boyama sonucunda benign, ikincisi her iki boyamada şüpheli, üçüncüsü ise PAP boyaması benign, MGG boyaması ise şüpheli olarak teşhis edildi. Simple adenomaların sitolojik incelemesinde, iki olguda çekirdek sitoplazma sınırları belirgin monomorfik yapıda tubuler

epiteller izlendi (R-2). Üçüncü olguda tubuler epitellerde +2 düzeyinde pleomorfizm gözlemlendi. Bu olguda aynı zamanda çekirdekçik sayısı ve şeklindeki varyasyon kriteri de +2 olarak değerlendirildi. Makrofajlar iki olguda +2 ve +3 düzeylerinde izlenirken, bir olguda hiç gözlenmedi. Şüpheli olguda ayrıca çekirdek/sitoplazma oranlarında +2 düzeyinde artış tespit edildi. Hücresel yoğunluk her üç olgu için +1 ve +2, zayıf hücreler arası bağlantı +1, yangı hücresi varlığı ise +2 ve +3 düzeylerinde tespit edildi. Şüpheli olguda +2, diğerlerinde +1 değerinde olmak üzere preparatlarda skuamöz epiteller de gözlemlendi.

Histopatolojik olarak basaloid adenoma teşhis edilen bir olgunun sitolojik teşhisleri, PAP boyasında şüpheli, MGG boyasında ise malign olarak değerlendirildi. MGG boyanmış preparatta pleomorfizm, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, büyük çekirdeklilik, çekirdek zarı tahrifatları ve kromatin granüllerinin yoğunlaşması +2 kaydedildi (R-3). Ayrıca MGG boyasında molding +2 değerinde gözlemlendi (R-4). PAP boyamasında ise pleomorfizm, çekirdek zarı tahrifatları, kromatin granüllerinin yoğunlaşması +2 değerinde, diğer kriterler çoğunlukla +1 olarak değerlendirildi. Hücresel yoğunluk ve zayıf hücreler arası bağlantı +1 düzeyindeydi.

Histopatolojik teşhisi kompleks adenoma olan iki olgudan bir tanesi sitolojik teşhiste yetersiz materyal, diğeri ise her iki boyama yöntemine göre de malign olarak değerlendirildi. MGG boyanmış preparatta pleomorfizm, çekirdek zarı alterasyonları, kromatin granüllerinin kabalaşması ve spindle hücre varlığı kriterleri +3 olarak değerlendirildi. Büyük çekirdeklilik, anormal çekirdek şekli, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdekçik sayısı ve şekli, hücresel yoğunluk ve makrofaj sayısı kriterleri ise her iki boyama prosedüründe +2 olarak kaydedildi. Ayrıca yine PAP boyamasında spindle hücre varlığı +3, makrofaj yoğunluğu ise +2 olarak değerlendirildi. Hücresel yoğunluk iki yöntemde de +2 olarak değerlendirildi.

Histopatolojik incelemede benign miks tümör teşhis edilen altı olgunun sitolojik incelemesinde, her iki boyamada üç olgu benign, iki olgu malign ve bir olgu da PAP benign MGG şüpheli olarak değerlendirildi. Her iki yöntemde göre teşhisleri benign olan olgularda

pleomorfizm, büyük çekirdeklilik, makrofaj ve spindle hücre varlığı +2 düzeyinde, diğer özellikler ise +1 ya da 0 olarak kaydedildi. Her iki boyamada malign teşhis edilen olgularda ise pleomorfizm, büyük ve anormal çekirdek, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdekçik şekil ve sayısı varyasyonları, hücresel yoğunluk, spindle hücre ve yangısal hücre varlıkları kriterleri +2 ve +3 olarak değerlendirildi. Diğer özellikler 0 ve +1 kaydedildi. PAP boyamasında benign, MGG boyamasında şüpheli teşhis edilen bir olguda ise pleomorfizm ve büyük çekirdek özellikleri +2, ek olarak MGG boyamasında çekirdek/sitoplazma artışı ve kromatin granüllerinde yoğunlaşma +2, diğer özellikler ise 0 ve +1 olarak değerlendirildi. Malign teşhis edilen olgularda çok yoğun olmak üzere bu olguların tümünde diğer benign olgulardan farklı olarak büyük ve tuhaf çekirdekli osteoblastik hücreler gözlendi (**R-5**). Pleomorfizm daha çok bu hücrelere arasında belirgindi. Bu hücrelerin yanı sıra monomorfik yapıda tubuler epiteller de gözlendi (**R-6**). Hem PAP hem de MGG boyamalarında osteoblastik tipteki hücrelerin çekirdeklerinin diğer tubuler epitellere göre daha açık boyandığı gözlendi.

Histopatolojik olarak lipom teşhis edilen iki olgunun sitolojik incelemesinde, PAP ve MGG boyamalarında benign olarak teşhis edildi. Her iki olguda da kriterlerin çoğu 0 puan olarak değerlendirilirken, hücresel yoğunluk ve kromatin granüllerinin yoğunlaşması +1 olarak kaydedildi. Preparatlarda, çekirdekleri periferde yerleşmiş, sitoplazmaları geniş yağ vakuolleri ile dolu lipositik hücreler gözlendi. Ayrıca her iki olguda zeminin yağ vakuolleri ve eritrositlerden zengin olduğu gözlendi. PAP boyanmış preparatlarda alkol fikzasyonu ile hücre yoğunluğunun olumsuz yönde etkilendiği gözlendi.

Histopatolojik olarak nörofibroma teşhis edilen bir olgunun sitolojik incelemesinde ise PAP benign, MGG şüpheli teşhis edildi. Bu preparatlarda yoğun biçimde fibrositik ve fibroblastik tipte mezenşimal hücreler, uzun fibriler yapılar gözlendi. MGG boyamasında pleomorfizm, büyük ve anormal çekirdek ve çekirdek/sitoplazma oranı artışı +2 olarak değerlendirildi. Diğer kriterler ise 0 ve +1 olarak izlendi.

Displazi ve benign tümörlerde malignite kriterlerinde ilk 10 kriter genellikle 0 - +1 arasında gözlendi. Diğer kriterler ise olgulara göre 0 - +3 arasında izlendi.

Histopatolojik olarak in situ karsinoma teşhis edilen üç olgunun sitolojik teşhisleri de her iki boyama metoduna göre malign olarak değerlendirildi. Ortak olarak üç olguda da yoğun biçimde pleomorfik tubuler epiteller gözlendi. Hücre çekirdekleri ise kromatinleri yoğunlaşmış, kaba granüllü ve koyu olarak izlendi (R-7). Ayrıca anormal ve büyük çekirdeklilik, çekirdekçik şekli ve sayısındaki farklılıklar +3 olarak değerlendirildi. Bu hücrelerde aynı zamanda çekirdek ve sitoplazma vakuollerinin de yoğun olduğu gözlendi. İki olguda sitolojik preparatlarda papilla ve tubul yapıları gözlendi.

Histopatolojik değerlendirmede yirmi olgu tubulopapiller adenokarsinoma olarak teşhis edildi. Bu olguların sitolojik incelemesinde, ikisi hem PAP hem de MGG boyamasında benign; bir olgu PAP şüpheli, MGG malign; iki olguda ise PAP benign, MGG malign; on beş olgu ise hem PAP hem de MGG boyamasında malign olarak değerlendirildi. Tubulopapiller tümörlerin sitolojisinde her iki boyamada ortak özellikleri spindle hücre varlığının +1 olmasıydı. Bazı olgularda makrofajların yoğunluğu, bazılarında skuamoz metaplazilerin varlığı ve preparat zeminlerinde yağ vakuollerinin yoğunluğu dikkat çekiciydi. Ayrıca bu tip tümörlerde preparat zeminlerinde nekrotik dejeneratif tümör hücreleri ve yangısal hücreler de +2 ve +3 düzeylerinde gözlendi (R-8). Çoğunlukla pleomorfik, çekirdek/sitoplazma oranları artmış, tuhaf çekirdekli, çekirdekçik sayısı ve şekilleri farklı, kromatin içerikleri yoğunlaşmış tubuler epiteller gözlendi. Az sayıda olmak üzere bazı olgularda mitotik figürlere rastlandı. Çekirdek vakuolizasyonları genellikle +2 düzeyindeydi. Bu tip tümörlerde preparatlarda yine papilla ve tubul formlarının (R-9,10,11) yanı sıra, psödosinsityal gruplara (R-12) rastlandı. Benign teşhis edilen olgularda çekirdek yapıları tıpkı adenomalardaki gibi uniforme gösteriyordu. Ayrıca kromatin içerik homojen ve açık renkli olarak gözlendi. Benign ve şüpheli teşhis edilen olgularda hücresel yoğunluk +1, malign olgularda genellikle +3 düzeyinde gözlendi.

Histopatolojik olarak solid adenokarsinoma olarak teşhis edilen on bir olgudan bir tanesi PAP malign, MGG şüpheli, diğer on olgu ise her iki boyama yöntemine göre malign olarak değerlendirildi. Solid adenokarsinomlarda en belirgin özellikler hücresel yoğunluk ve hücreler arası bağlantı zayıflığının +3 düzeyinde olmasıydı. Preparatlarda sitoplazmaları az, birbirinden bağımsız çok sayıda tubuler epiteller dikkat çekici nitelikteydi. Bunun yanında pleomorfizm, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, kromatin granüllerinin belirginleşmesi, çekirdekçiik sayı ve şekillerinde farklılıklar, çekirdek vakuolizasyonları gibi kriterler genellikle +3 olarak kaydedildi. Solid tümörlerin sitolojisinde bol dejeneratif hücre, nekrotik artıklar, yangısal hücreler ve bakteri kümeleri izlendi. Spindle hücre varlığı 0 ve +1 olarak kaydedildi.

Histopatolojik olarak kompleks adenokarsinoma olarak teşhis edilen on altı tümörden bir tanesi sitolojide aşırı derecede yangısal hücre infiltrasyonu nedeniyle değerlendirme dışı bırakıldı. Bir olgu her iki boyama yöntemine göre de benign, başka bir olgu PAP şüpheli, MGG malign, kalan diğer on üç olgu her iki boyama yöntemine göre malign olarak değerlendirildi. On beş olgudaki ortak özellik spindle hücre varlığının her iki boyama yönteminde de +2 ve +3 düzeylerinde olmasıydı. Malign teşhis edilen olgularda pleomorfizm, büyük ve anormal çekirdeklilik, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek zarı alterasyonları, çekirdekçiik değişiklikleri, kromatin yoğunlaşmaları, makrofaj, yangı hücreleri, hücresel yoğunluk gibi kriterler +2 ve +3 düzeylerindeydi (**R-13,14,15**). Bazı olgularda dev hücre ve mitotik figür varlığı +1 düzeyinde gözlemlendi. Bu tümör tipinde tubuler ve myoepitel hücrelerinin yanı sıra, bazı olgularda az sayıda osteoblastik tipte hücrelere de rastlandı.

Histopatolojik olarak karsinosarkoma olarak teşhis edilen on dört olgu sitolojik olarak her iki boyama yöntemine göre de malign olarak değerlendirildi. Ortak olarak bütün olgularda pleomorfizm (**R-16a**), büyük ve anormal çekirdek, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek zarı alterasyonları (**R-17**), çekirdekçiik şekil ve sayısı varyasyonları, kromatin içeriğinin yoğunlaşması (**R-18,19,20,21**) gibi kriterlerin +2 ve +3 düzeyinde değerlendirildiği mezenseşimal hücreler ve tubuler epiteller izlendi. Bu tümörlerde özellikle,

mezenşimal kökenli olan, poligonal yapıda, iri, tuhaf çekirdekli ve az sitoplazmalı hücreler oldukça tipikti (R-16b,22a,22b). Bazı olgularda mitotik figürlerin yanı sıra, osteoklastik tipte dev hücreler dikkat çekiciydi. Ayrıca bazı olgularda da yangısal hücre ve makrofaj varlığı gibi kriterler +2 olarak değerlendirildi (R-23). Bir olguda diğerlerinde daha fazla oranda tubuler epiteller gözlenmekle birlikte tubul ve kordon yapılarının varlığı da dikkat çekiciydi.

Histopatolojik olarak osteosarkoma teşhis edilen yedi olgu sitolojik olarak da her iki boyama yöntemine göre malign olarak değerlendirildi. Bu tümörlerde açık renk çekirdekli, poligonal ve bol sitoplazmalı, çok sayıda çekirdeğe sahip osteoblastik hücreler gözlemlendi (R-24,25). Pleomorfizm, büyük ve anormal çekirdek, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek zarı alterasyonları, çekirdekçik şekil ve sayısı varyasyonları (R-26,27b), kromatin içeriğinin yoğunlaşması (R-27a), dev hücre varlığı (R-28,29) ve mitotik figürler (R-30,31,32,33) gibi kriterler genellikle +3 düzeyinde gözlemlendi. Hücresel yoğunluk ve hücreler arası bağlantı zayıflığı da yine +3 düzeyindeydi. Bu olguların hiçbirinde tubuler ya da myoepitel hücresi gözlenmezken, bazı olgularda nekrotik ve yangısal hücreler +1 ve +2 düzeylerinde izlendi.

Histopatolojik olarak spindle hücreli karsinoma olarak teşhis edilen üç olgu ise sitolojik olarak iki boyama yönteminde de malign olarak değerlendirildi. Bu tümörlerin sitolojisinde hücresel yoğunluk, hücreler arası bağlantı zayıflığı, spindle hücre varlığı kriterleri +3 olarak kaydedildi. Pleomorfizm, çekirdek zarı alterasyonları ve çekirdekçik sayısı ve şeklindeki varyasyonlar ile kromatin içeriğinin yoğunlaşması kriterleri de +3 olarak gözlemlenirken, büyük ve anormal çekirdek, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, psödosinsiyal gruplar ve yangısal hücre varlığı kriterleri +2 düzeyindeydi (R-34,35).

Histopatolojik olarak skuamoz hücreli karsinoma teşhis edilen bir olgu sitolojide de malign olarak değerlendirilirken, pleomorfizm, büyük ve anormal çekirdek, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek zarı alterasyonları, çekirdekçik şekil ve sayısı varyasyonları, kromatin içeriğinin yoğunlaşması, yangısal hücre varlığı ve hücreler arası

zayıf bağlantı +2 ve +3 olarak değerlendirildi. Hücresel yoğunluk +1 düzeyinde izlendi. Bu tümörde poligonal yapıda küçük çekirdekli ve bol sitoplazmalı skuamoz hücrelerin (R-36) yanı sıra pleomorfik tubuler epiteller de gözlemlendi. İyi diferensiyasyonlu skuamoz hücrelerin yanında, az diferensiyasyonlu hücrelerin sitoplazmaları da PAP preparatında turuncu boyanmış olarak gözlemlendi (R-37,38).

Histopatolojik olarak liposarkoma teşhis edilen son olgu ise yine her iki boyama yöntemine göre sitolojik olarak malign değerlendirildi. Pleomorfizm, büyük ve anormal çekirdek, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek zarı alterasyonları, çekirdekçik şekil ve sayısı varyasyonları, kromatin içeriğinin yoğunlaşması, hücresel yoğunluk, hücreler arası zayıf bağlantı, çekirdek ve sitoplazma vakuolizasyonları +2 ve +3 olarak değerlendirildi. Bu tümörde preparat zemininin MGG boyası ile yağ vakuollerinden de zengin olduğu tespit edildi (R-39).

Histopatolojik olarak malign teşhis konulan tümörlerde ortak olarak molding özelliği çok az gözlemlendi. Ayrıca tüm olgular da pleomorfizm, büyük ve anormal çekirdek, çekirdek/sitoplazma oranı artışı kriterleri genellikle PAP'da +2 değer alırken MGG boyasında +3 olarak izlendi.

Çalışmada meme tümörü şüpheli kitlelerden kazıma yöntemi ile örneklemeye yapıldı. Preparatların çoğunda bol miktarda tümör hücresi, eritrosit, bazılarında yoğun makrofaj ve yangısal hücre gözlemlendi. Bazı preparatlarda tubul ve gerçek papilla yapılarına rastlandı.

MGG boyanmış preparatlarda, hücreler yassılaşıp çapları büyümüş olarak gözlemlendi. Hücrelerin üst üste yığıldığı yoğun alanlarda, koyu boyanma nedeniyle inceleme yapılamadı. Bazı preparatlarda kurumalara bağlı boyama artefaktlarının (R-40) yanı sıra, boya çökeltileri nedeniyle oluşan koyu mor-siyah granüllerin preparattaki hücrelerin üzerini örttüğü gözlemlendi (R-41). Çekirdek ve sitoplazma vakuolizasyonları, hücrelerin sitoplazmik sınırları ve preparat zemini MGG boyasında rahatlıkla izlendi.

PAP boyanmış preparatlarda hücrelerin çapları küçüldüğü gözlemlendi. Genel olarak yoğun hücreli alanlarda mikroskopik inceleme rahatlıkla yapıldı ve hücreler üç boyutlu olarak izlendi. PAP boyası sitoplazma ve zemin boyama özelliği açısından zayıf olarak gözlemlendi. Buna karşılık çekirdeğin iç yapısı ve çekirdekle ilgili malignite kriterleri son derece net olarak gözlemlendi. Ayrıca skuamöz epitellerin sitoplazmaları turuncu boyanmış olarak tespit edildi. Bazı preparatlarda kurumaya bağlı artifakt olarak, hücrelerin iki boyutlu görünümde oldukları gözlemlendi (R-42). PAP boyanmış preparatlarda hücreli yoğunluk daha az, MGG preparatlarında daha fazla olarak belirlendi.

5. 3. İstatistiksel Bulgular

Tüm olguların hem PAP hem de MGG boyama yöntemine göre sitolojik teşhisleri yapılmış ve sonuçlar histopatolojik teşhisle karşılaştırılmıştır (Tablo 6) .

Tablo 6. Histopatolojik sonuçların sitolojik teşhislerle karşılaştırılması.

	Sitolojik Teşhisler			Histopatolojik Teşhisler
	Benign	Şüpheli	Malign	
PAP	16	3	4	Benign
	3	2	70	Malign
MGG	13	5	5	Benign
	3	1	71	Malign

21?

20 adet kriter ve sitolojik teşhislerin hem PAP hem de MGG boyama sonuçları ayrı ayrı histopatolojik teşhisle karşılaştırılıp tüm olguların gerçek pozitif, hatalı negatif, hatalı pozitif ve gerçek negatif durumları belirlenmiştir. Tablo 7’de PAP ve MGG’ ya göre sitolojik teşhislerin gerçek durumla karşılaştırılmaları sonuçları verilmiştir.

Tablo 7. Sitolojik preparatların teşhislerinde gerçek ve hatalı pozitif ve negatif değerleri.

	PAP	MGG
Gerçek Pozitif	73	72
Hatalı Negatif	2	3
Hatalı Pozitif	7	10
Gerçek Negatif	16	13

Tüm kriterler ve sitolojik teşhislerin her iki boyama yöntemine göre ayrı ayrı duyarlılık, özgüllük, pozitif tanımlama oranı, negatif tanımlama oranı ve diagnostik değerleri hesaplanmış (Tablo 8) ve her iki boyama yönteminin sonuçları Pearson Chi-Square analiz yöntemine göre bilgisayar ortamında SPSS (Ver 10.0) programında karşılaştırılmıştır:

- Pozitif ve negatif tanımlama oranları açısından PAP ve MGG arasında, hiçbir kriter anlamlı fark göstermemiştir. ($p>0,05$).
- Duyarlılık açısından PAP ve MGG'nin karşılaştırılmasında, büyük çekirdeklilik, anormal çekirdeklilik, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek ve sitoplazma vakuolizasyonları ($p<0,001$) ve kromatin içeriğinin yoğunlaşması ($p<0,05$) kriterleri anlamlı farklılıklar göstermiştir.
- Özgüllük açısından PAP ve MGG'nin karşılaştırılmasında anormal çekirdeklilik, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek vakuolizasyonları kriterleri anlamlı farklılıklar ($p<0,05$) göstermiştir.
- Diagnostik değer açısından ise büyük çekirdeklilik, anormal çekirdeklilik, çekirdekçik şeklindeki varyasyonlar, sitoplazma vakuolizasyonları kriterleri ($p<0,05$) ve çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek vakuolizasyonları ($p<0,001$) kriterleri yine anlamlı farklılıklar göstermişlerdir.

Tablo 8. Malignite kriterlerinin ve sitolojik teşhisin duyarlılık, özgüllük, pozitif tanımlama oranı, negatif tanımlama oranı ve tanı değerleri.

Malignite Kriterleri	PAP / MGG Duyarlılık (%)	PAP / MGG Özgüllük (%)	PAP / MGG Pozitif Tanımlama Oranı (%)	PAP / MGG Negatif Tanımlama Oranı (%)	PAP / MGG Diagnostik Değer (%)
Pleomorfizm	96 / 96	70 / 48	91 / 86	16 / 21	90 / 85
Büyük Çekirdeklik	60 / 85	83 / 65	92 / 89	61 / 42	65 / 81
Anormal Çekirdeklik	45 / 76	87 / 61	92 / 86	67 / 56	55 / 72
Çekirdek Zarı Alterasyonları	69 / 80	91 / 65	96 / 88	52 / 50	74 / 77
Çekirdek/Sitoplazma Oranı Artışı	23 / 65	100 / 74	100 / 89	72 / 60	41 / 67
Mitotik Figürlerin Varlığı	11 / 11	100 / 100	100 / 100	74 / 74	32 / 32
Çekirdekçik Şeklinde Varyasyonlar	89 / 83	78 / 70	93 / 89	31 / 41	87 / 80
Çekirdekçik Sayısında Varyasyonlar	81 / 79	74 / 74	91 / 91	45 / 48	80 / 78
Kromatin Granüllerinde Kabalaşma	80 / 65	52 / 65	85 / 86	56 / 63	73 / 65
Dev Hücre Varlığı	12 / 23	100 / 100	100 / 100	74 / 72	35 / 41
Psodönsinyal Hücreler	31 / 35	91 / 96	92 / 96	71 / 69	41 / 45
Molding	00 / 04	100 / 91	00 / 60	77 / 77	23 / 24
Çekirdek Vakuolizasyonları	03 / 43	100 / 78	100 / 86	76 / 70	26 / 51
Sitoplazma Vakuolizasyonları	01 / 21	96 / 91	50 / 89	77 / 74	23 / 38
Hücrel Yoğunluk	84 / 84	61 / 61	88 / 88	46 / 46	79 / 79
Hücrelerarası Bağlantı Zayıflığı	65 / 69	74 / 57	89 / 84	60 / 64	67 / 66
Spindle Hücre Varlığı	45 / 44	70 / 48	83 / 73	72 / 79	50 / 45
Yangı Hücre Varlığı	44 / 33	48 / 57	73 / 71	79 / 79	45 / 39
Nekrotik Döküntüler	24 / 25	83 / 87	86 / 83	74 / 75	39 / 39
Makrofaj Varlığı	37 / 37	57 / 52	74 / 72	78 / 80	42 / 41
Skuamöz Epitel Hücre Varlığı	04 / 03	87 / 78	50 / 29	78 / 80	23 / 20
Sitolojik Teşhis	97 / 96	70 / 57	91 / 88	11 / 19	91 / 87

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tıp dünyasında başlangıcı 1930' lu yıllara dayanan sitolojik muayene, aradan geçen 70 yıla karşın ülkemiz Veteriner Patoloji'de henüz hak ettiği yeri bulamamıştır. Son yıllarda özellikle neoplazilerin teşhisi konusunda gerek sitolojik muayene yöntemlerini karşılaştıran, gerekse lezyonların sitolojik özelliklerini tanımlayan, tartışan ve sitolojik muayenenin önemini vurgulayan pek çok araştırma makalesi yayınlanmıştır (1, 3, 15, 27, 31, 32, 41, 42, 44, 58, 66, 72). Bu yayınlara dayanarak Veteriner Patoloji' de sık karşılaşılan bir klinik problem olarak köpek meme tümörlerinin sitolojik muayenesinde gerekli olacak malignite kriterlerinin belirlenmesinin teşhis, prognoz ve izlenecek tedavi protokolü açısından büyük önem gösterdiğini düşünmekteyiz.

Çalışmada toplam 100 adet köpektan alınan, meme tümörü şüpheli kitlelerin histopatolojik olarak 76 (% 76) adeti malign, 19 (% 19) adeti benign meme bezi tümörü ve 5 (% 5) adeti displazi olarak belirlendi. Allen ve ark. (2) yapmış oldukları çalışmada 75 kitleden 36' sı malign, 33' ü benign ve 6'sı displazi olarak kaydedilmiştir. İki yüz iki köpek üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise kitlelerin % 68' nin malign, % 30' nun benign meme tümörü, % 2' sinin ise displazi olduğu tespit edilmiştir. Yapılan araştırmaların çoğunda (22, 25) ve bu çalışmada meme tümörlerinin % 50' sinden fazlasının malign olduğu görülmektedir. Bununla ilgili olarak, kitlelerin hayvan sahipleri tarafından özellikle uzun tüylü ırklarda geç fark edilmeleri, geç operatif müdahalede bulunulması, dolayısıyla zamana bağlı olarak malign transformasyon şekillenmesi olasılığı düşünülmektedir.

Köpek meme tümörleri 2 yaşın altında nadiren gözlenmekle birlikte, "kanser yaşı" olarak adlandırılan 5-6 yaşlarda insidens hızla artar ve en yoğun olarak 10-11 yaşlarda gözlenir. 2-4 yaş arası köpeklerde genellikle displazi izlenirken, 5 yaşın altındaki köpeklerde nadiren malign tümör gözlendiği bildirilmiştir (22, 30, 40, 65). Çalışmada meme tümörü saptanan köpeklerin yaş aralığı literatürlerle uyum göstermektedir. Köpek meme tümörlerinde yaş, aslında klinik açıdan değerli prognostik bir indikatördür (30).

Ancak çalışmada yaş grupları açısından benign ve malign meme tümörleri arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı bir farklılık ($p>0.05$) gözlenmemiştir.

Safkan köpek ırklarının belli bir grubunun, meme tümörü riski altında bulunduğu literatürlerde (7, 50, 73) bildirilmiştir. Özellikle pointer, setter ve spaniel gibi ırklar daha duyarlı; chihuahua, beagle gibi saf ırkların yanı sıra melez köpek ırkları ise daha az duyarlı olarak kaydedilmiştir (50, 65). Çalışmada meme bezlerinde tümör saptanan köpeklerin % 41'i terrier ve % 7' si melez ırklar olarak belirlendi. Geri kalan yüzde dilimi diğer ırklar arasında paylaşıldı. Yamagami ve ark. (73) yaptıkları çalışmada, meme tümörü saptadıkları ırklar arasında en fazla maltese, mongrel ve yorkshire terrier gözlemişlerdir. Buna sebep olarak Tokyo'daki köpek popülasyonunu göstermişlerdir. Aynı şekilde bizim çalışmamızda % 41 oranında terrier gözlenmesinin ırk duyarlılığının yanında İstanbul'daki köpek popülasyonu ile ilgili olduğunu düşünmekteyiz.

Köpeklerde meme tümörlerinin etyolojisinde hormonal faktörleri öne süren pek çok araştırma mevcuttur (6, 17, 23, 24, 26, 59, 61). Yapılan bir çalışmada (10), I. östrus siklusundan önce kısırlaştırılan dişilerde meme kanseri riski yaklaşık % 0.5, bir östrus siklusu geçirenlerde % 8, iki ya da daha fazla östrus siklusu geçirdikten sonra kısırlaştırılanlarda ise % 26 olarak bildirilmiştir. Çalışmada, kısırlaştırılma ve doğum yapma bilgilerine ulaşılabilen, malign meme tümörüne sahip 63 köpekten 24'ünün doğum yaptığı, 7'sinin kısırlaştırıldığı, aynı şekilde benign meme tümörüne sahip 16 köpekten 7'sinin doğum yaptığı, yalnızca 1 tanesinin kısırlaştırıldığı tespit edildi. Benign ve malign meme tümörüne sahip köpeklerin kısırlaştırılma ve doğum yapma durumları arasında Chi-Square analizine göre anlamlı bir farklılık ($p>0.05$) gözlenmedi. Bu sonucun kısırlaştırılan hayvan sayısının çok az olmasının yanında, kısırlaştırılmış köpeklerin çoğunlukla ikiden fazla östrus siklusu geçirmiş hatta bir kez doğum yapmış olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz.

Biopsi materyallerinin histopatolojik muayenesi en güvenilir diagnostik yöntemdir. Histopatolojik yöntemler lezyonun tanımlanmasının yanında, çevresindeki deri, yumuşak

doku, kan ve lenf damarlarına infiltrasyon varlığı; tümörde pleomorfizm ve nekroz varlığı veya yokluğu, diferensiyasyon derecesi ve mitotik indeksi gibi histomorfolojik ayrıntıları ve eksizyonun tam yapıp yapılmadığı gibi önemli bir çok detay hakkında bilgi verir. Bütün bu veriler neoplastik yapının biyolojik davranışı ve prognozu hakkında büyük önem taşırlar (47). Ayrıca parafinize doku kesitlerine, ışık mikroskopta incelenebilen standart H&E boyası dışında ayırıcı boyalar uygulanabilir. Elektron mikroskopi ve immnuhistokimya gibi diğer özel yöntemlerin uygulanması için biopsi materyali büyük avantajlar sağlar (49). Ancak bütün bu yöntemler, zaman, maliyet ve ulaşılabilirlik açısından sitolojik yöntemleri ilk tercih olarak öne çıkarmaktadır.

Allen ve ark. (2) köpek meme tümörlerinde en yaygın tedavi cerrahi eksizyon olduğu için, kesin tedavinin çoğunlukla hastalığın teşhisinden önce uygulandığını bildirmişlerdir. Ancak sitolojik muayene cerrahi tedavi öncesinde klinisyene büyük avantajlar sağlayabilecek bir metottur. Sitolojik muayenenin en önemli avantajları; güvenli ve ucuz olması, hızlı ve kolay uygulanması, prosedürü hasta tarafından rahat tolere edilebilmesi ve genellikle anestezi gerektirmemesidir (15, 37, 66). Sitolojik muayene yangısal, benign ve malign lezyonların birbirinden ayrılmasında yardımcı olur. Acil durumlarda tedavi edilmesi gereken hastalıkları sıraya koyar. Sitolojik muayene minimum düzeyde ekipman ve bir uzman sayesinde kolayca bir çok klinikte uygulanabilir (3, 15, 56, 58, 66). Sitolojik yöntemler klinik muayeneye iyi bir yardımcı olarak kurgulanmıştır (14, 66). Sitolojik yöntemlerin güvenilirliği yüksek olmakla birlikte, bazen hatalı negatif oranının da yüksek olabileceği bildirilmiştir (3). Sitolojik yöntemlerle elde edilen materyaller aynı zamanda, hücre bloklama, immunositokimya ve flow sitometri gibi daha kesin sonuca ulaşılabilen yöntemlerle değerlendirilebilir (31, 35, 48, 63).

Çalışmada, toplam 100 adet meme tümörü şüpheli kitlenin sitolojik muayenesinde 2 olgu yetersiz materyal nedeniyle değerlendirme dışı bırakıldı. PAP boyanmış preparatların değerlendirilmesinde hatalı pozitif oranı %7, hatalı negatif oranı %2; MGG boyanmış preparatlarda ise hatalı pozitif oranı %10, hatalı negatif oranı ise %3 olarak belirlendi. Ariga ve ark. (3)'nın insan meme tümörlerinde yapmış oldukları çalışmada sitolojik

teşhislerdeki ortalama hatalı pozitif oranı %1, hatalı negatif oranı ise %9 olarak bildirilmiştir. Allen ve ark. (2)'nin köpek meme tümörleri ile yaptıkları çalışmada iki ayrı sitolojistin sonuçlarına göre, hatalı pozitif oranları sıra ile %3 ve %0, hatalı negatif oranları %22 ve %36 olarak bildirilmiştir. Çalışmadaki sonuçlar insan ve köpeklerin meme tümörleri ile yapılan çalışmaların sonuçlarının tersine, hatalı negatif oranı düşük, hatalı pozitif oranları ise yüksektir. Bu çalışmadaki hatalı pozitiflerin büyük kısmı benign miks tümör ve fibroadenom gibi mezenşimal hücrelerin de katıldığı köpek meme tümörlerinden kaynaklanmaktadır. Maitra ve ark.(41)'nin mezenşimal lezyonlarda yapmış oldukları çalışmada hatalı pozitif oranı %7, hatalı negatif oranı %6 olarak bildirilmiştir. Thomas ve ark. (66)'nin yaptıkları çalışmada ise meme tümörlerinde hatalı pozitif oranı % 0 iken, diğer tümörlerde %0-%6 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bu sonucun insan meme tümörlerinde sitolojik muayene metotları ve değerlendirme kriterlerinin iyi oturtulmuş olması ile ilgisi çok büyüktür. Ancak, bizim hatalı pozitif oranımızın yüksek olmasında en büyük payın özellikle miks meme tümörü yapısına katılan mezenşimal kökenli hücrelere ait olduğunu düşünüyoruz.

Bu çalışmada her iki boyayı duyarlılıkları açısından ele alacak olursak malignite için önemli 6 kriter öne çıkmaktadır. Bunlar, pleomorfizm, büyük çekirdeklilik, çekirdek zarındaki alterasyonlar, çekirdekçik sayısı ve şeklindeki varyasyonlar, son olarak da kromatin granüllerindeki kabalaşma ve düzensizliktir. Bu kriterlerin PAP ya da MGG' ya göre duyarlılıkları %80' in üzerinde hesaplanmıştır.

Pleomorfizm, büyük ve anormal çekirdeklilik ve çekirdek/sitoplazma oranı artışı aynı kategorideki neoplastik değişikliklerdir. Anormal çekirdek şekli ve çekirdek sitoplazma oranı artışının pozitif tanımlama oranları, PAP-MGG sırasıyla, %92-%86 ve %100-%89 yüksek olmasına karşın diğer kriterlere göre daha az rastlanıldığı için duyarlılıkları, PAP-MGG sırasıyla, %45-%76 ve %23-%65 düşüktür. Tersine pleomorfizm ve büyük çekirdeklilik ise hem pozitif tanımlama oranı %91-%86 ve %92-%89 hem de duyarlılıkları %96-%96 ve %60-%80 yüksektir. Allen ve ark. (2)'nin yaptıkları çalışmada iki ayrı sitolojistin sonuçlarına göre pleomorfizmin duyarlılığı %94-%97,

çekirdek/sitoplazma oranı artışında ise %42-%64 olarak bildirilmiştir. Pleomorfizm ve çekirdek büyüklüğü, maligniteyi göstermesi açısından önemli iki kriter olmakla birlikte, Škrbinc ve ark. (63) çalışmalarında aynı kriterleri sitolojik derecelendirme yapmak amacıyla kullanmışlardır.

Değişik literatürlerde (37, 58, 70) bildirildiği gibi, çekirdek zarı alterasyonları sık gözlenen bir malignite kriteridir. Buckner ve ark. (13) malignant hücrelerde çekirdek zarının dış hatlarının değişken olduğunu, bazı hücre tiplerinde ise yuvarlak ve pürüzsüzden, açık noktalı ve anguler klasik malign patterne kadar sınıflandırıldığını belirtmiştir. Allen ve ark. (2) yaptıkları çalışmada, bu kriterin malignite için önemsiz olmasının yanı sıra, iki ayrı sitolojist sırasıyla, pozitif tanımlama oranını %79-%25, duyarlılığını da %31-%6 olarak bildirmişlerdir. Çalışmada çekirdek zarı alterasyonlarının pozitif tanımlama oranı, PAP ve MGG sırasıyla, %96-%88, duyarlılık ise %69-%80 olarak hesaplanmıştır. Bu kriter çalışmada önemli malignite kriterlerinden biri olarak değerlendirildi.

Çekirdekcik şekli ve sayısındaki varyasyonlar, düzensiz kromatin şekli, benzer çalışmalarda bildirildiği gibi malignite için önemli bir kriterdir (1,2, 13, 15, 63, 70, 75). Çalışmada çekirdekcik şekli, sayısı ve kromatin ganüllerindeki kabalaşma kriterlerinin pozitif tanımlama oranları, PAP ve MGG sırasıyla, %93-%89, %91-%91, %85-%86 , aynı şekilde duyarlılıkları ise %89-%83, %81-%79, %80-%65 olarak belirlenmiştir. Bu çok önemli üç kriter malign neoplaziler için hem ayırıcı özelliكتedir hem de yaygın olarak gözlenmektedir. Ancak Allen ve ark. (2)' nin yaptıkları çalışmada pozitif tanımlama ve duyarlılık oranları, çalışmamızdaki kadar yüksek olmamakla birlikte benign ve malign neoplazi ayırımı için önemli olarak bildirilmiştir.

Anormal mitotik figürler, insan meme karsinomlarında önemli bir indikatör olarak bahsedilir (63, 75). Allen ve ark. (2) yaptıkları çalışmada, mitotik figürlerin yalnızca malign tümörlerde ve nadiren gözlenmelerinin önemli bir kriter olarak değerlendirilmesini engellediğini bildirmişlerdir. Çalışmada mitotik figür varlığı kriterinin duyarlılığı her iki boya için de %11; özgüllük ve pozitif tanımlama oranları ise %100 olarak saptanmıştır.

Aynı şekilde çalışmada, mitotik figür varlığı yalnızca malign tümörlerde ve çok nadir gözlemlenmeleri için pozitif tanımlama oranı %100 olsa da, önemsiz bir kriter olarak değerlendirildi.

Çok çekirdekli dev hücreler hem malign hem de normal dokularda gözlenebilir. Bu bazı dokular için normal bir bulgudur (osteoklastlar, epiteloid dev hücreler gibi). Ancak bazı hücre tiplerinin çok çekirdekli dev hücre formları (hepatositler, mezotelial hücreler gibi) genellikle neoplastik bir değişiklik olarak gözlenir (15). Wellman (70), çok çekirdekli hücrelerin eğer diğer malignite kriterleri beraberinde bulunmuyorsa, malignite işareti olarak değerlendirilmemesi gerektiğini bildirmiştir. Çalışmada çok çekirdekli dev hücrelere yalnızca osteosarkoma ve nadiren karsinosarkomalarda rastlanmıştır. Bu nedenle pozitif tanımlama oranı her iki boya için %100 olmakla birlikte, duyarlılık, PAP-MGG sırasıyla, %12 ve %23 olarak belirlenmiştir. Ancak duyarlılığın bu kadar düşük olması çok çekirdekli dev hücre formlarını, sitolojik malignite kriteri için önemsiz olarak değerlendirmemize neden olmuştur. Psödosinsityal hücreler de yine çok çekirdekli dev hücreler gibi görülme sıklığının az olması nedeniyle, çalışmada önemsiz olarak değerlendirilmiştir.

Molding gerçek hücre kümelerinde gözlenen bir özelliktir (13). Çalışmamızda bu kriter çok fazla gözlenmemiştir. Duyarlılık oranı, PAP – MGG sırasıyla, %100-%4, pozitif tanımlama oranı ise %0-%60 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre molding özelliği benign ve malign neoplazilerin sitolojik ayırımında önemli bulunmamıştır. Allen ve ark. (2)'nin yaptıkları çalışmada da aynı şekilde molding özelliği önemli bulunmamıştır.

Çekirdek ve sitoplazma vakuolizasyon kriterleri, çalışmamızda her iki boya açısından da önemsiz kriterler olarak belirlendi. Rebar ve ark.(58) sitoplazmik vakuolizasyonun spesifik bir bulgu olmadığını, ya neoplastik hücrelerde dejenerasyonu ya da salgı yapan neoplastik hücrelerin varlığını gösterdiğini bildirmiştir. Wellman (70), ise sitoplazmik indikatörlerin benign malign neoplazi ayırımı yapacak kadar güçlü olmadığını bildirmiştir.

Allen ve ark. (2) hücresel yoğunluğun benign malign lezyon ayırımında iyi bir kriter olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca sebep olarak, sitolojik preparasyonlarda karsinomalarda olduğu kadar atipik hiperplastik lezyonların da bol hücre vermesi olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise tam tersi hücresel yoğunluk önemli bir malignite kriteri olarak karşımıza çıkmaktadır. Her iki boya için de pozitif tanımlama oranı %88, duyarlılık %84 olarak hesaplanmıştır.

Hücreler arası zayıf bağlantı, spindle hücre varlığı, yangı hücresi varlığı, nekrotik döküntüler, makrofaj varlığı, skuamoz epitellerin varlığı gibi kriterler malignite bildirmesi açısından istatistiki açıdan bir önem göstermedi. Ancak bu kriterler, asıl malignite bildirenlerin yanında, yardımcı kriterler olarak değerlendirilebilir.

Her ne kadar çalışmanın kapsamında olmasa da, bu çalışma ile köpek meme tümörlerini, sitolojik preparatta histomorfolojiye yönelik sınıflandırma adına az da olsa deneyim kazanılmıştır. Maygarden ve ark. (42) benign insan meme tümörlerinin sitolojik preparatlarında alt sınıflandırma çalışması yapmışlar ve sonuçların histopatlojik teşhisle karşılaştırılmasında olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Chhieng ve Cohen (14) ise sitolojik muayene ile artık malign-benign tümör ayırımı ötesinde, tümörlerde sınıflandırma yapılabileceğini bildirmişlerdir. Bonzanini ve ark. (8) duktal karsinoma in situ ve invaziv duktal karsinoma arasında sitomorfolojik özelliklerden faydalanarak sınıflandırma yapmışlardır. Yapılan çalışmada hücre yapısı yanında, hücresel yoğunluk, hücreler arası ilişkiler, zemin özellikleri, nekrotik döküntüler, mikrokalsifikasyon, makrofajlar v.b. kriterler incelenmiştir.

Yukarıda bahsedilen hücreler arası zayıf bağlantı, spindle hücre varlığı, yangı hücresi varlığı, nekrotik döküntüler, makrofaj varlığı, skuamoz epitellerin varlığı kriterleri malignite derecesini belirlemekten çok, belki de, bu morfolojik sınıflandırmaya katkıda bulunabilecek kriterlerdir. Subjektif değerlendirmeler olmakla birlikte çalışmada, zayıf hücreler arası bağlantı en fazla solid ve tubulopapiller adenokarsinomalarda gözlenmiştir. Yine yangı hücresi ve nekrotik döküntüler, en çok tubulopapiller, solid ve kompleks

adenokarsinomlarda gözlenmiştir. Spindle hücre varlığı ayırıcı bir kriter olmamakla birlikte, çok yoğun gözlenmesi kompleks tipte tümörlere yönlendirmektedir. Ancak Allen ve ark. (2) yaptıkları çalışmada, spindle hücrelerin, basit tümörleri komplekslerden ayırmakta yetersiz kaldığını bildirmişlerdir. Makrofajlar ise en fazla displazik ve kistik olgularda gözlenmiştir.

Materyalin yüzeyini kazıma ya da lama değdirme gibi yöntemler özellikle yüzeysel kitleler, cerrahi ya da nekropsi materyalleri için uygulanabilir niteliktedir (54, 69). Çalışmada meme tümörü şüpheli kitlelerden kazıma yöntemi ile örnekleme yapılmıştır. Ancak sitolojik örnekleme teknikleri içinde en az artefakt oluşturan metot İİAB' sidir (69). Bu konudaki çalışmaların büyük çoğunluğu da İİAB tekniği ile gerçekleştirilmiştir (2, 3, 41, 44, 56, 66). Çalışmada örnekleme için kazıma tekniğinin seçilmesinin birinci nedeni, tümör şüpheli dokuların laboratuvarımıza mastektomi materyali olarak gelmesidir. Ayrıca klinik bölümlerinde, İİAB' si gibi sitolojik materyal toplama işlemlerinin henüz rutin olarak uygulanmaması ve daha sonra histolojik karşılaştırma için hasta takibinin düzenli yapılamaması diğer bir nedendir. İnce iğne aspirasyonundan özellikle yetersiz materyal alınma durumlarında iyi sonuç elde edilmeyebilir (31). Sitolojik materyalleri değerlendirme konusundaki deneyimsizliğimiz de başka bir neden olarak daha fazla örnek toplayabileceğimiz ve daha fazla hücre inceleyebileceğimiz kazıma yöntemine yönelmemize neden olmuştur. Bu deneyimden sonra konuyla ilgili daha sonraki çalışmaları özellikle İİAB tekniği ile planlamayı düşünmekteyiz.

Çalışmada sitolojik preparatlar PAP ve Romanowsky boyaalarının bir modifikasyonu olan MGG boyaaları ile ayrı ayrı boyandı ve her iki boyama yöntemi ayrı ayrı değerlendirildi. PAP ve MGG gibi Romanowsky tip boyaaların kıyaslandığı araştırmalar yapılmıştır. Jörundsson ve ark. (32) PAP tipi boyaaların şeffaf, çekirdek ayrıntılarını iyi gösteren, neoplazilerde iyi sonuç veren boyaalar olması yanında, özellikle hafif sitoplazmik boyaaları nedeniyle hücre gruplarında çok iyi sonuç verdiğini; ancak, sitoplazmik özellikler için zayıf, çok basamaklı, zahmetli boyaalar olduklarını belirtmişlerdir. Romanowsky tip boyaalar içinse, hücre morfolojisini, sitoplazma boyasından

dolayı iyi ortaya koyduğunu, ancak özellikle hücrelerin üst üste yığıldıkları gruplarda çekirdek özelliklerinin incelenmesinde yetersiz kaldığını belirtmişlerdir. Rebar ve ark. (58) ise Romanowsky tip boyaların septik, yangısal lezyonlar için diagnostik üstünlüklerinin yanında, fikzasyon yöntemi ve uygulanmasının çok pratik olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca Romanowsky tip boyaların, her ne kadar çekirdek değişimleri ile ilgili ayrıntıları iyi göstermese de, bir çok malign neoplazinin teşhisinde malignite kriterlerinin çoğunluğunu sergilemekte yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

PAP ve MGG boyaları için literatürlerde belirtilen farklılıkları çalışmamızda da aynı şekilde izlendi. Ayrıca her bir malignite kriterinin her iki boya için de hesaplanan duyarlılık, özgüllük, pozitif tanımlama oranı, negatif tanımlama oranı ve diagnostik değerleri karşılaştırıldı. Pozitif ve negatif tanımlama değerleri açısından iki boya arasında da fark ($p>0.05$) gözlenmemesine rağmen, duyarlılık açısından PAP ve MGG'nin karşılaştırılmasında; büyük çekirdeklilik, anormal çekirdeklilik, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek ve sitoplazma vakuolizasyonları ($p<0,001$) ve kromatin içeriğin yoğunlaşması ($p<0,05$) kriterleri anlamlı farklılıklar göstermiştir. Diagnostik değer açısından ise büyük çekirdeklilik, anormal çekirdeklilik, çekirdekçik şeklindeki varyasyonlar, sitoplazma vakuolizasyonları kriterleri ($p<0,05$) ve çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek vakuolizasyonları ($p<0,001$) kriterleri yine anlamlı farklılıklar göstermiştir. Bu kriterlerden büyük çekirdeklilik, anormal çekirdeklilik, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek vakuolizasyonları, sitoplazma vakuolizasyonlarındaki farklılık MGG boyasının, literatürlerde (1, 32) belirtildiği gibi, iyi kontras yaratmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca vakuolizasyon gibi dejeneratif değişiklikler PAP boyasında izlenmezler (2, 58). Çekirdekçik şeklindeki varyasyonlar ve kromatin granüllerinin kabalaşması kriterlerindeki farklılıklar ise PAP boyasının MGG' ye karşı üstünlüğünü ortaya koymaktadır. Çalışmamızda istatistiksel olarak da PAP boyasının MGG' ya göre daha üstün olduğu belirlenmiştir. Ancak bu oluşan farklılıklar malign neoplazi teşhisini değiştirecek kadar anlamlı değildir. Her ne kadar PAP boyası daha üstün görüntüleme özelliğine sahip olsa da, MGG da neoplazi teşhisi konusunda, çalışmamıza göre, yeterli olarak izlenmiştir. Burada tercih aslında Larkin (37)'in da belirttiği gibi sitolojistin aşına olduğu boyadan yana

yapılmalıdır. Jörundsson ve ark. (32) ise öncelikle prosedürü kolay olan MGG'nin uygulanıp, özellikle neoplazi vakalarında gerek duyulduğu zaman PAP uygulanmasını önermişlerdir.

Ariga ve ark. (3), insan meme tümörlerinde yaptıkları çalışmada duyarlılık %98, özgüllük %98, pozitif tanımlama oranı %99, negatif tanımlama oranı %91, diagnostik değeri ise %98 olarak bildirilmiştir.

López-Ferrer ve ark. (38)'nin meme bezinin fibroadenomları ile yaptıkları başka bir çalışmada, duyarlılık %86,9, özgüllük %93,8, pozitif tahmin değeri %79,3, negatif tahmin değeri %96,3 olarak kaydedilmiştir.

Tanaka ve ark. (64), meme tümörlerinde İİAB'sinin teşhis hatalarının istatistiksel analizini yapmışlardır. İİAB'sinin meme tümörlerinde duyarlılık oranı %81 olarak saptanmıştır. Bu oranın istenilen sonuç olmamakla birlikte, düşük de olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca meme kanseri oranının diğer ülkelere oranla Japonya'da insidensinin daha düşük olması ve buna bağlı olarak konuyla ilgili deneyimlerinin daha az olmasının da sonucu etkileyebileceği ifade edilmiştir.

Allen ve ark. (2)'nin köpek meme tümörlerinde yapmış oldukları benzer bir çalışmada, iki farklı sitolojiste göre, duyarlılık %25-%17, özgüllük %62-%49, pozitif tanımlama oranı %90-%100, negatif tanımlama oranı %75-%59 ve diagnostik değeri %79-%66'dir.

Çalışmamızda sitolojik teşhisin duyarlılık, özgüllük, pozitif tanımlama oranı, negatif tanımlama oranı ve diagnostik değeri PAP ve MGG sırasıyla; duyarlılık %97-%96, özgüllük %70-%57, pozitif tanımlama oranı %91-%88, negatif tanımlama oranı %11-%19 ve diagnostik değeri %91-%87 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar diğer çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında köpek meme tümörleri için oldukça yüksektir. Bunun, çalışmadaki malign olguların sayılarının fazlalığından ve seçtiğimiz örnekleme tekniğine

bağlı olarak, her olgu için fazla sayıda hücre inceleme fırsatı bulmamızdan kaynaklandığını düşünüyoruz.

Griffiths ve ark. (27)'nin köpek tümörleriyle yaptıkları çalışmada genel olarak tümörlerin %74'ünün sitolojik ve histopatolojik teşhislerinin uyumlu olduğunu belirlemişlerdir. Ancak meme karsinomalarını diğer tümörlerden ayırdıklarında %42'sinin histopatolojik sonuçla uyumlu olduğunu, meme tümörlerinin malignite kriterlerini belirlemenin de oldukça güç olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde Meyer (45) köpek meme tümörlerinin teşhisinde ise sitolojinin kullanımının sınırlı olduğunu ifade etmiştir. Misdorp ve ark. (47) köpeklerde benign ve malign meme lezyonlarının ayırımında sitolojinin yetersiz kaldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise köpek meme tümörlerinin, PAP boyasında %89'nun, MGG boyasında ise %85'nin sitolojik ve histopatolojik teşhislerinin uyumlu olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızdaki olguların 3/4' ü malignitesi yüksek ve sitolojik kriterleri çok iyi sergileyen tümörlerdi. Bunun sitolojide kolayca tanınmalarına ve doğru teşhis edilmelerine neden olduğunu düşünüyoruz. Ancak benign miks ve kompleks tümörlerdeki hatalı pozitif oranının yüksek olması da köpek meme tümörlerinin sitolojik teşhisi için bir handikap oluşturmaktadır. Bunun yanında şüpheli olguları hücre bloklama, immunositokimya, flow sitometri v. b. ileri sitolojik tekniklerle kesin teşhise ulaştırmak mümkündür.

Sitolojik muayene yöntemi bir çok gelişmiş ülkede çok iyi oturtulmuş ve önemli bir teşhis yöntemi olsa da Anabilim Dalımız açısından henüz çok yeni bir yöntemdir ve bu çalışma ile önemli bir deneyim kazanılmıştır.

Sonuç olarak;

1. Çalışmamızda köpek meme tümörlerinde en önemli sitolojik malignite kriterleri olarak pleomorfizm, büyük çekirdeklilik, çekirdek zarı alterasyonları, çekirdekçik şekli ve sayısındaki varyasyonlar, kromatin granüllerinin kabalaşması ve son olarak hücresel yoğunluk belirlenmiştir. Diğer kriterlerin, malignitenin teşhisi ya da histomorfolojiye yönelik sınıflandırma için, daha çok, yardımcı kriterler olabileceğini düşünmekteyiz.

2. Çalışmamızda köpek meme tümörlerinin PAP boyasında %89'nun, MGG boyasında ise %85'nin sitolojik ve histopatolojik teşhislerinin uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca istatistiksel olarak sitolojik teşhisin diagnostik duyarlılığı PAP boyamasında %91, MGG boyamasında ise %87 olarak saptanmıştır.

3. PAP ve MGG boyalarının karşılaştırılmalarında, PAP her ne kadar istatistiksel olarak görüntülemeadaki üstünlüğü kanıtlanmış olsa da MGG'nında deneyimli bir sitolog için neoplazi teşhisinde yeterli olduğu belirlenmiştir.

4. Çalışmamızda sitolojik muayenenin köpek meme tümörleri teşhisindeki yüksek istatistiksel sonuçları, bu pratik, ekonomik, hızlı ve güvenli teşhis yönteminin önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın sitolojik teşhis yöntemleri ile çalışmak isteyen meslektaşlarımıza ışık tutacağını umuyoruz.

7.ÖZET

Çalışmamızda, iki farklı sitolojik boyama yöntemi olan Papanicolaou (PAP) ve May-Grünwald-Giemsa (MGG) kullanarak, köpek meme tümörlerinin sitolojik malignite kriterleri ve sitolojik teşhisin histopatolojik teşhis ile korelasyonu incelenmiştir.

Meme tümörü şüphesiyle laboratuvarımıza gönderilen, çeşitli yaşlardaki ve değişik ırklara ait 100 adet dişi köpeğin meme dokularından sitolojik preparatlar hazırlanmış, PAP ve MGG boya ile boyanmıştır. Doku örnekleri ise %10'luk formalin ile tespit edildikten sonra rutin laboratuvar işlemlerinden geçirilmiş ve H&E ile boyanmıştır. Her iki yöntem ile hazırlanan preparatlar birbirlerinden bağımsız olarak ışık mikroskopta incelenmiştir. Doku kesitleri WHO (World Health Organization-1999)' nun bildirdiği, köpek meme tümörlerinin histopatolojik sınıflandırmasına göre değerlendirilmiştir. Sitolojik preparatlar ise 21 sitolojik malignite kriterine göre incelenip benign ya da malign olarak sınıflandırılmıştır. Ayrıca PAP ve MGG boya avantajları ve dezavantajlarının yanı sıra, her bir sitolojik malignite kriteri açısından karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda köpek meme tümörlerinde en önemli sitolojik malignite kriterleri olarak pleomorfizm, büyük çekirdeklilik, çekirdek zarı alterasyonları, çekirdekcik şekli ve sayısındaki varyasyonlar, kromatin granüllerinin kabalaşması ve hücresel yoğunluk belirlenmiştir. Köpek meme tümörlerinde, olguların benign ya da malign olması bakımından, PAP boyasında %89, MGG boyasında ise %85 düzeyinde sitolojik ve histopatolojik teşhislerinin uyumlu olduğu belirlenmiştir. PAP ve MGG sırasıyla, duyarlılık %97- %96, özgüllük %70-%57, pozitif tanımlama oranı %91-%88, negatif tanımlama oranı %11-%19 ve diagnostik değeri %91-%87 olarak saptanmıştır.

Her iki sitolojik boyanın karşılaştırılmasında pozitif ve negatif tanımlama değerleri açısından fark ($p>0.05$) gözlenmemesine rağmen; duyarlılık açısından; büyük çekirdeklilik, anormal çekirdeklilik, çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek ve sitoplazma vakuolizasyonları ($p<0,001$) ve kromatin içeriğin yoğunlaşması ($p<0,05$) kriterleri anlamlı

farklılıklar göstermiştir. Diagnostik değer açısından ise büyük çekirdeklilik, anormal çekirdeklilik, ekirdeik Şeklindeki varyasyonlar, sitoplazma vakuolizasyonları kriterleri ($p<0,05$) ve çekirdek/sitoplazma oranı artışı, çekirdek vakuolizasyonları ($p<0,001$) kriterleri yine anlamlı farklılıklar göstermişlerdir. PAP ve MGG boyalarının karşılaştırılmalarında, PAP her ne kadar istatistiksel olarak da görüntülemedeki üstünlüğü kanıtlanmış olsa da MGG'nın da deneyimli bir sitolog için neoplazi teşhisinde yeterli olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda sitolojik muayenenin köpek meme tümörleri teşhisindeki anlamlı istatistiksel sonuçları, bu pratik, ekonomik, hızlı ve güvenli teşhis yönteminin önemini bir kez daha ortaya koymuŐtur.

Anahtar Kelimeler : Köpek, meme tümörü, papanicolaou, may-grünwald-giemsma, sitolojik teşhis.

8. SUMMARY

The Cytological Diagnosis of Canine Mammary Tumours Using Different Staining Techniques (Papanicolaou and May-Grünwald-Giemsa) and Correlation Between the Cytological and Histopathological Diagnosis

In this study, the cytological aspect of criteria of malignancy in canine mammary tumours were evaluated and a correlation was established between cytological and histopathological diagnosis by application of two different cytological staining methods: Papanicolaou (PAP) and May-Grünwald-Giemsa (MGG).

The study was conducted on surgical mammary biopsy specimens, suspected of mammary tumour of 100 dogs of various breeds and ages, which were submitted to our laboratory. Cytological smears of the masses were prepared and stained with PAP and MGG. Tissue samples were fixed in 10% formaline, routinely processed and then stained with Hematoxylin&Eosin for histopathologic interpretation. Both were evaluated under light microscopy individually. Tissue specimens were evaluated according to the WHO (World Health Organisation 1999) histopathological classification of canine mammary tumours. Cytological specimens were evaluated on the basis of 21 cytological criteria of malignancy and defined as benign or malignant tumours. The staining methods, PAP and MGG were compared in terms of the advantages and the disadvantages of their usage, as well as each cytological criterion.

In our study, the major cytological criteria of malignancy in canine mammary tumours were listed as pleomorphism, large nuclei, nuclear membrane alterations, variable nucleolar size, shape and quantity, coarse chromatin and high cellularity. Cytological diagnosis was consistent with that of histopathology in 89% of all cases with PAP and in 85% with MGG, due to the malignant or benign features of the masses. The sensitivity, specificity and positive predictive value, negative predictive value and diagnostic accuracy

of PAP and MGG were determined to be 97%, 96%; 70%, 57%; 91%, 88%; 11%, 19% and 91%, 87%, respectively.

Although no statistically significant difference ($p < 0,05$) was detected in terms of positive and negative predictive values, when both cytological staining methods were compared, statistically significant differences were obtained with regard to some criteria such as large nuclei, abnormal nuclear size, increase in nucleus to cytoplasm ratio and nuclear and cytoplasmic vacuolar patterns ($p < 0.001$) and coarse chromatin ($p < 0.05$). In terms of diagnostic accuracy, the criteria such as large nuclei, abnormal nuclei, variable nucleolar size and cytoplasmic vacuolisation were shown to be statistically significant ($p < 0.05$) as well as the increase in nucleus to cytoplasm ratio, nuclear vacuolar patterns ($p < 0.001$). When PAP and MGG were compared, although the visual superiority of PAP was statistically proven, MGG was determined to be an efficient method for an experienced cytologist in the diagnosis of neoplasms.

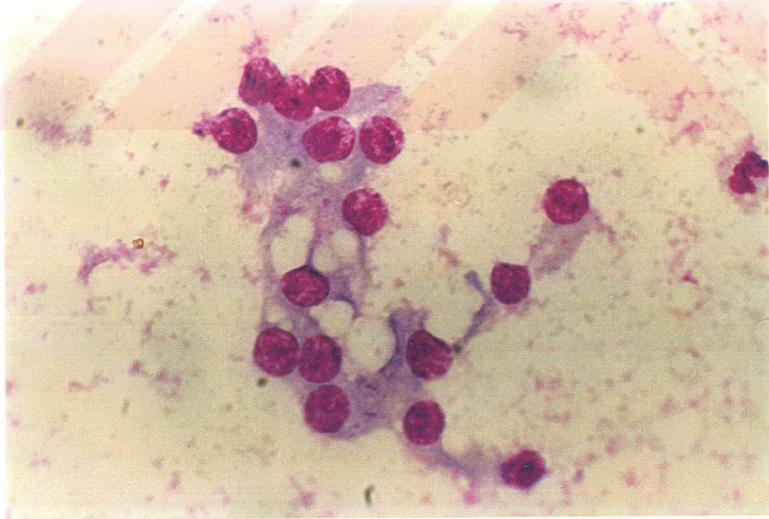
In our study, significant statistical results of cytological examination in the diagnosis of canine mammary tumours have once again proved the importance of this quick, inexpensive and reliable diagnostic method.

Key Words : Dog, mammary tumor, papanicolaou, may-grünwald-giems, cytologic diagnosis.

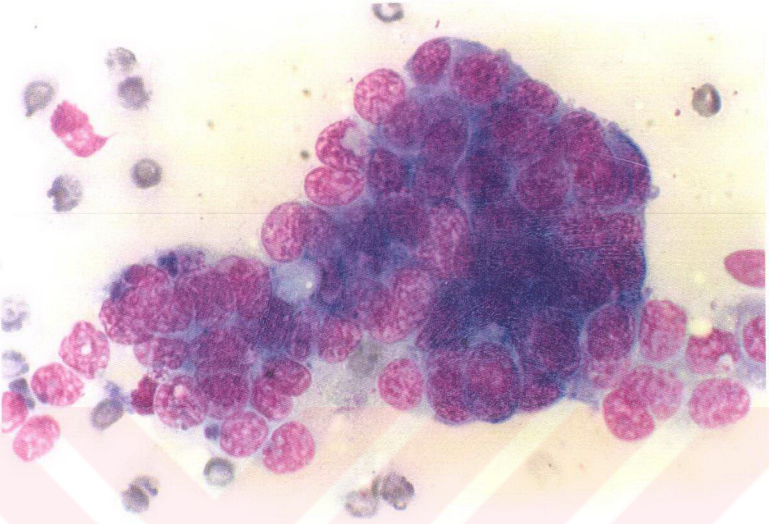
9. RESİMLER



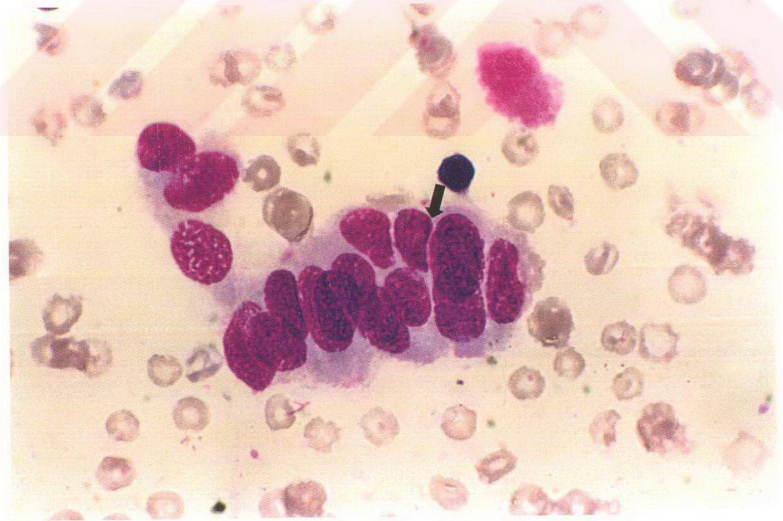
Resim 1: Displazi teşhis edilen meme dokusunun sitolojik görüntüsü; makrofaj (okla gösterilen), az sayıda lökosit ve eritrositler. PAP, 1000x



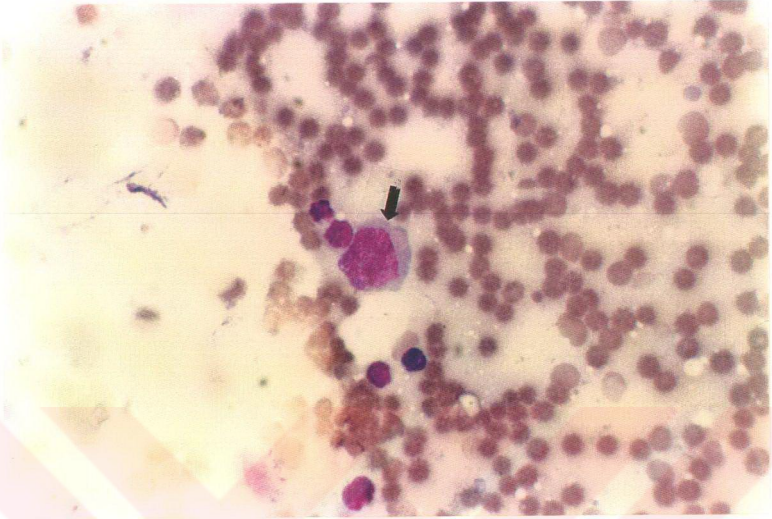
Resim 2: Simple adenoma teşhis edilen meme dokusu; dejeneratif monomorfik tubuler epitel hücreleri. MGG, 1000x



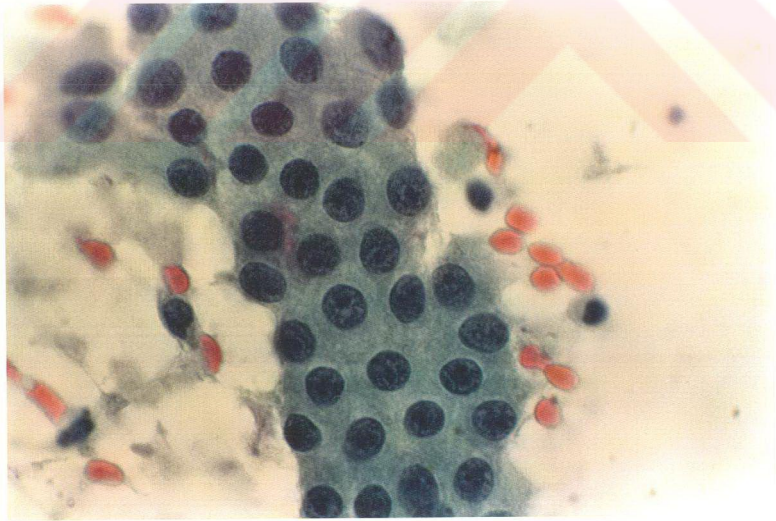
Resim 3: Basaloid adenoma teşhis edilen meme dokusu; çekirdekte kromatin yoğunlaşmaları ile karakterize monomorfik epitel hücreleri. MGG, 1000x



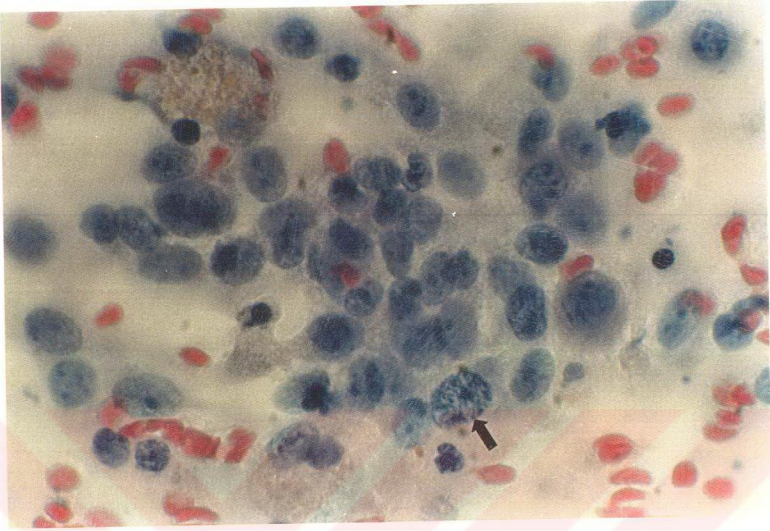
Resim 4: Basaloid adenoma teşhis edilen meme dokusu; kromatin granülleri belirgin, nükleer molding (okla gösterilen) özelliği gösteren epitel hücreleri. MGG, 1000x



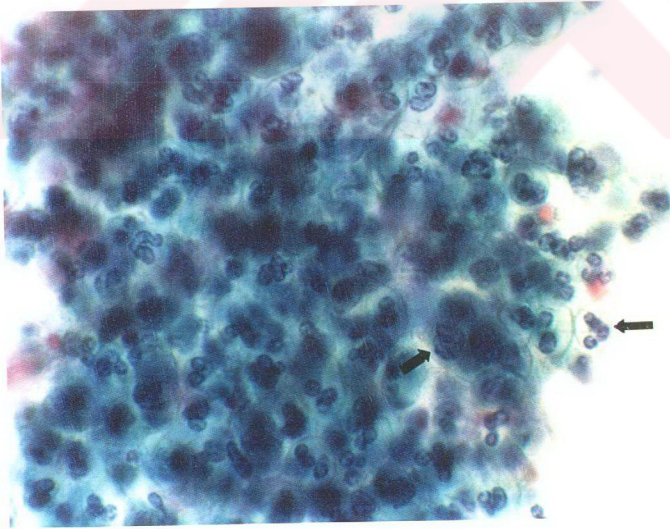
Resim 5: Benign miks tümör teşhis edilen meme dokusu; köşeli yapıda anormal hücre (okla gösterilen). MGG, 400x



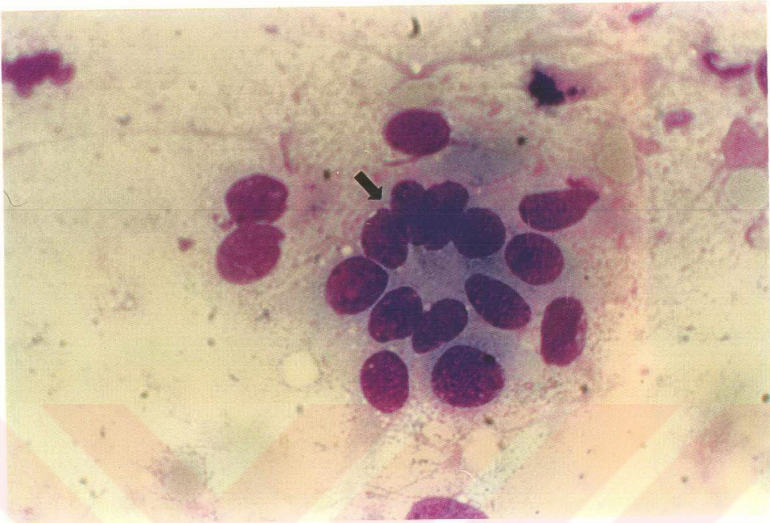
Resim 6: Benign miks tümör teşhis edilen meme dokusu; benign epitel hücreleri. PAP, 1000x



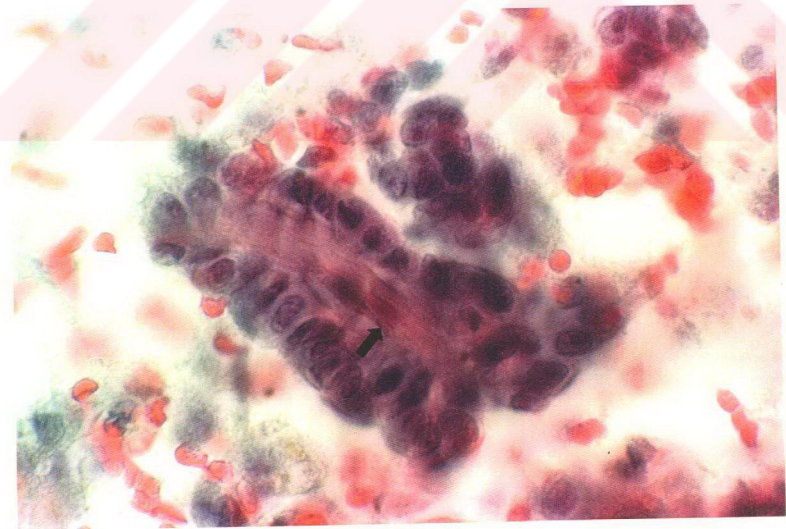
Resim 7: İn situ karsinoma teşhis edilen meme dokusunun sitolojik görüntüsü; pleomorfik, kromatin granülleri belirgin (okla gösterilen) epitel hücreleri. PAP, 1000x



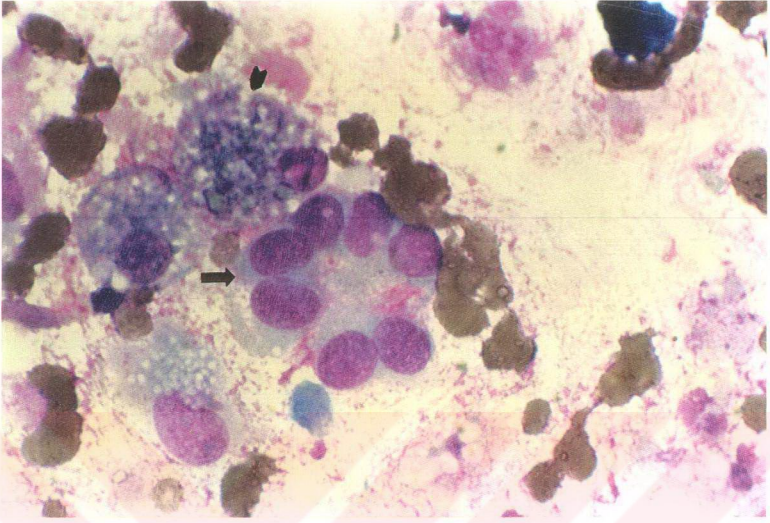
Resim 8: Tubulopapiller adenokarsinoma teşhis edilen meme dokusu; yoğun lokösit kümesi (ince ok), altında epitel hücreleri (kalın ok). PAP, 1000x



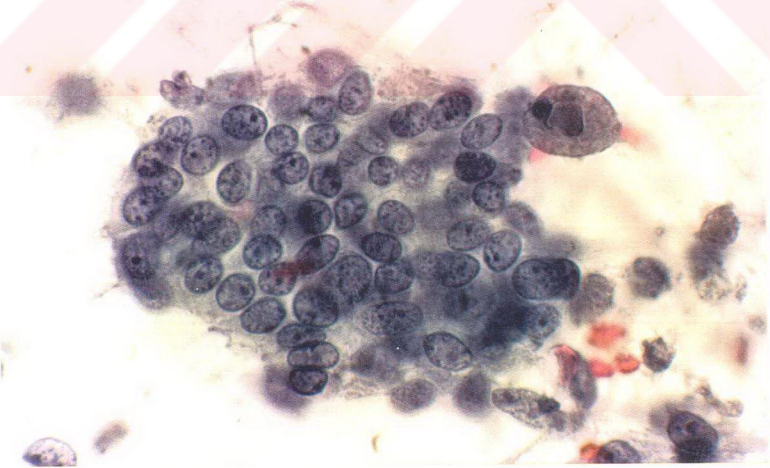
Resim 9: Tubulopapiller adenokarsinoma teşhis edilen meme dokusu; tubul yapısında pleomorfik epitel hücreleri. MGG, 1000x



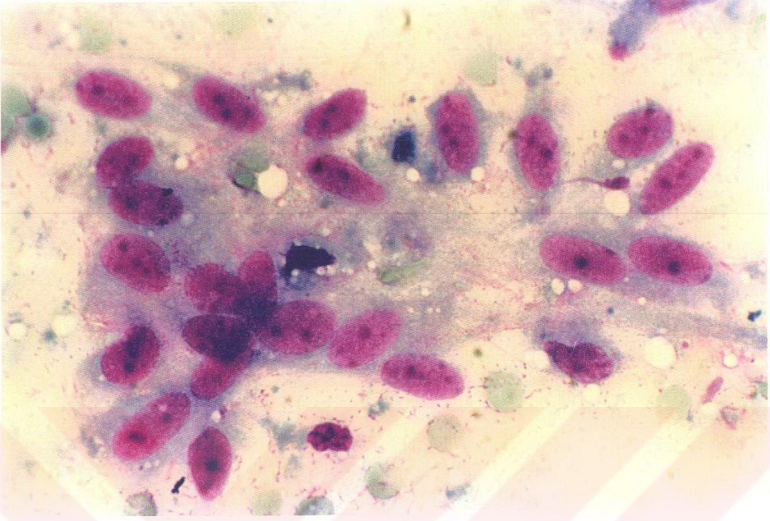
Resim 10: Tubulopapiller adenokarsinoma teşhis edilen meme dokusu; Ortadaki stromal dokusu (okla gösterilen) belirgin papilla yapısı. PAP, 1000x



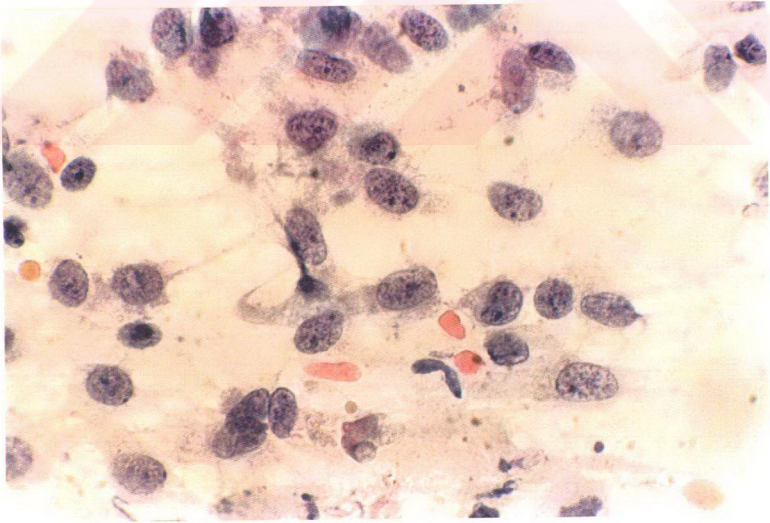
Resim 11: Tubulopapiller adenokarsinoma teşhis edilen meme dokusu; tubul formunda epitel hücreleri (okla gösterilen), makrofajlar (ok başı ile gösterilen). MGG, 1000x



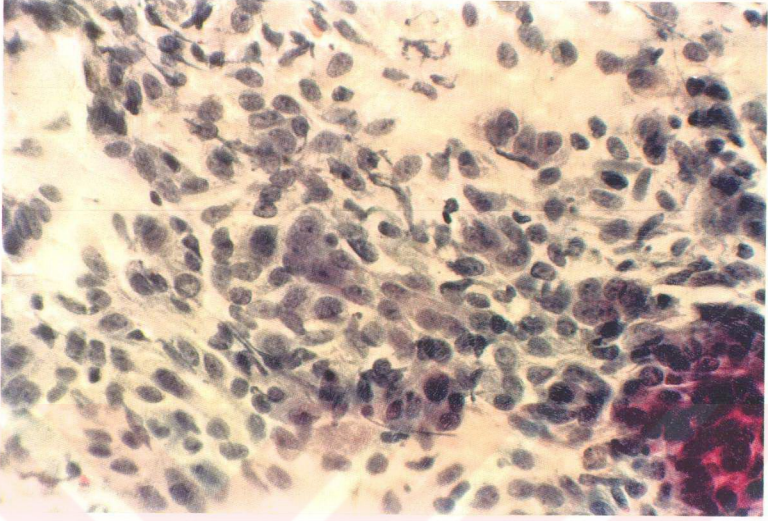
Resim 12: Tubulopapiller adenokarsinoma teşhis edilen meme dokusu; kromatin granülleri belirgin, psödosinsityal grup halinde epitel hücreleri. PAP, 1000x



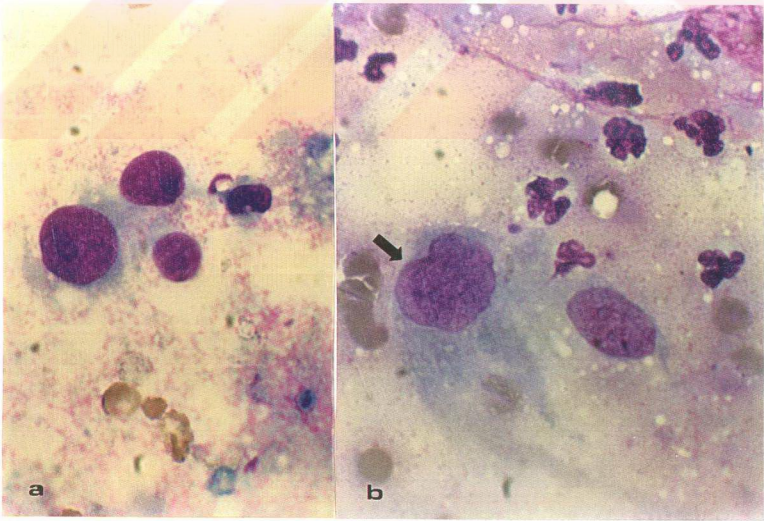
Resim 13: Kompleks adenokarsinoma teşhis edilen meme dokusunun sitolojik görüntüsü; çekirdekçik sayıları farklı myoepitel hücreleri. MGG, 1000x



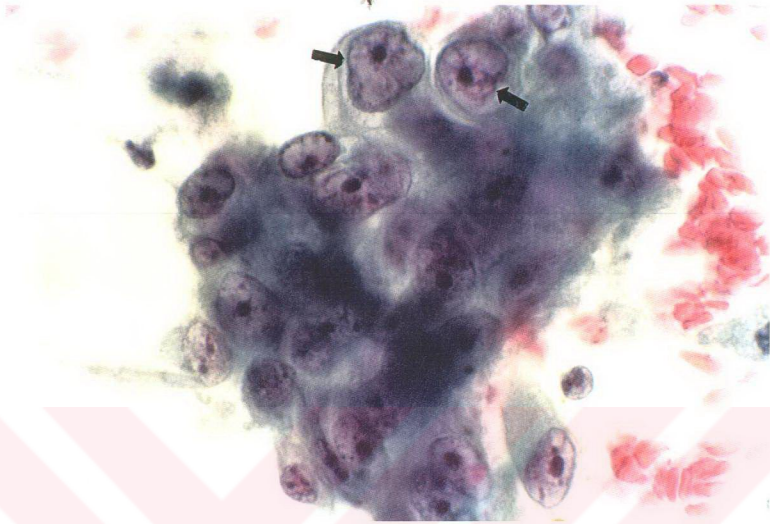
Resim 14: Kompleks adenokarsinoma teşhis edilen meme dokusu; kromatin granülleri belirgin myoepitel hücreleri. PAP, 1000x



Resim 15: Kompleks adenokarsinoma teşhis edilen meme dokusu; çok sayıda tubuler ve myoepitelyal hücreler. PAP, 400x



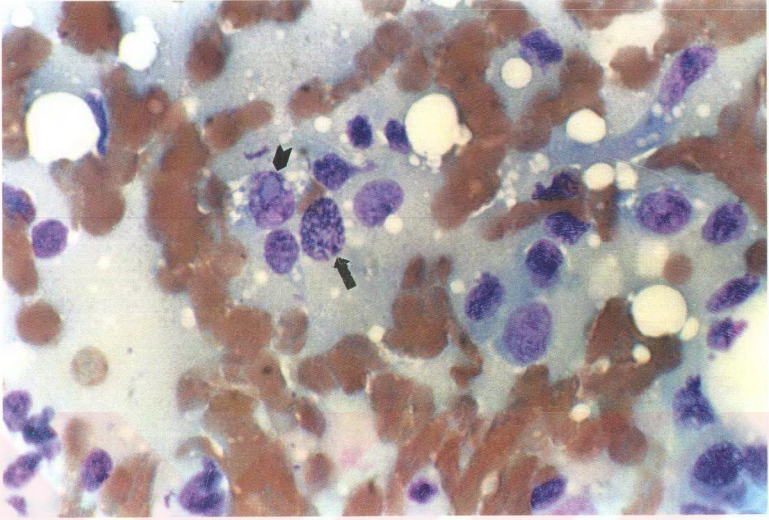
Resim 16: Karsinosarkoma teşhis edilen meme dokusu; a-pleomorfik malign epitel hücreleri, b-iri çekirdekli, çekirdek zarı girintili çıkıntılı malign hücre (okla gösterilen). MGG, 1000x



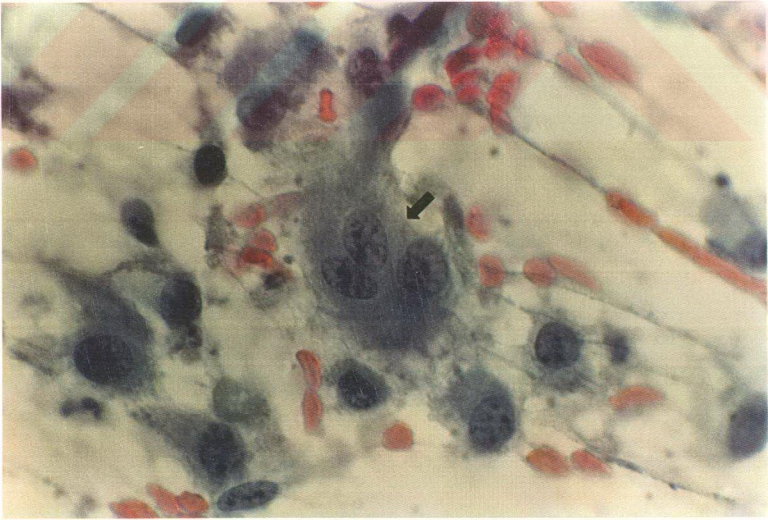
Resim 17: Karsinosarkoma teşhis edilen meme dokusu; çekirdekçikleri belirgin, pleomorfik, çekirdek zarları dalgalı (okla gösterilen) malign hücreler. PAP, 1000x



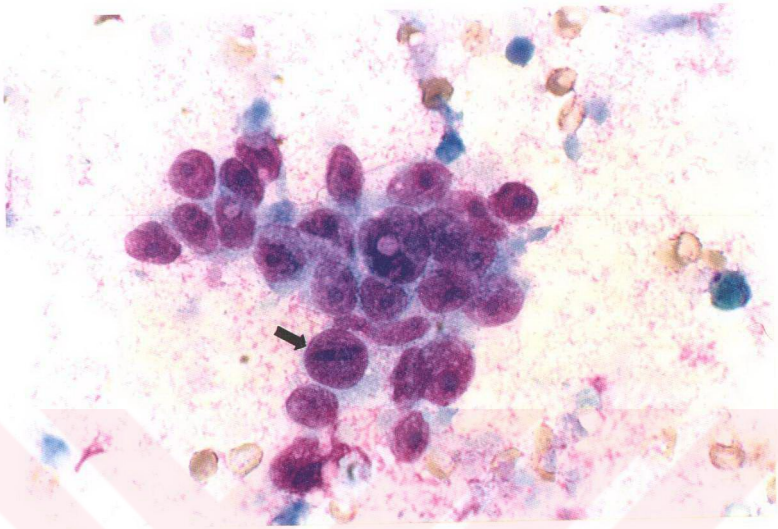
Resim 18: Karsinosarkoma teşhis edilen meme dokusu; çekirdekçik sayıları ve şekilleri farklı, kromatin granülleri belirgin çok sayıda hücre. PAP, 1000x



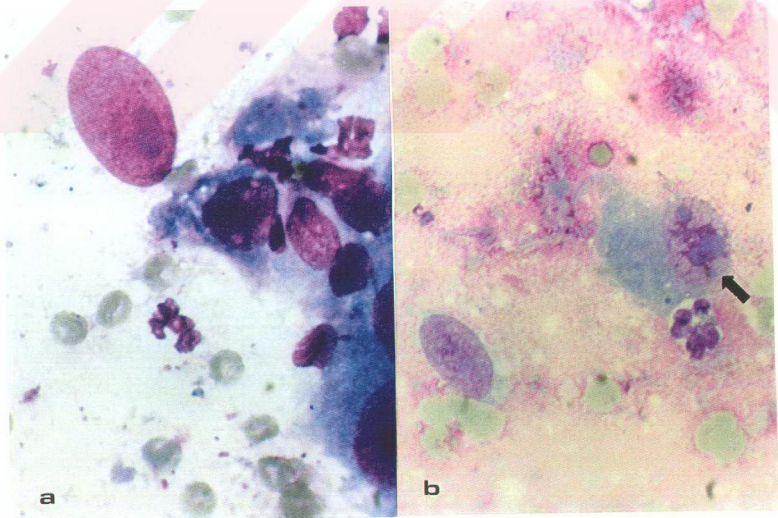
Resim 19: Karsinosarkoma teşhis edilen meme dokusu; kromatin granülleri belirgin hücre (okla gösterilen), iri tuhaf çekirdekçik (ok başı ile gösterilen). MGG, 1000x



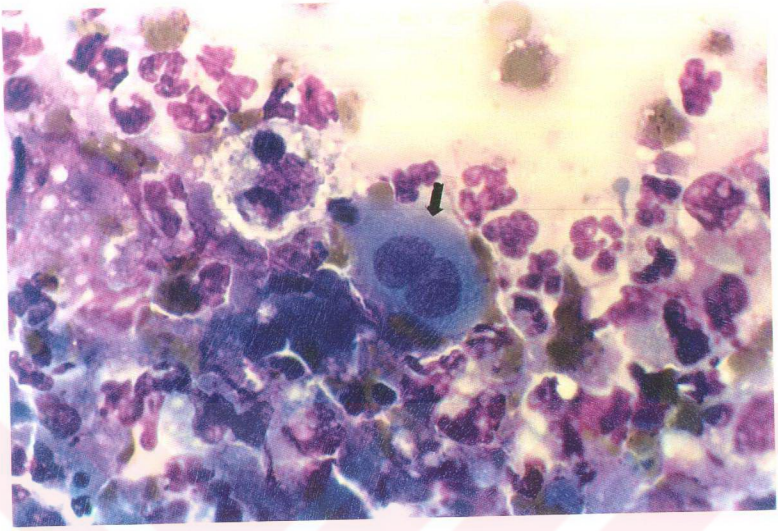
Resim 20: Karsinosarkoma teşhis edilen meme dokusu; çekirdekçik sayıları farklı çift çekirdekli hücre (okla gösterilen). PAP, 1000x



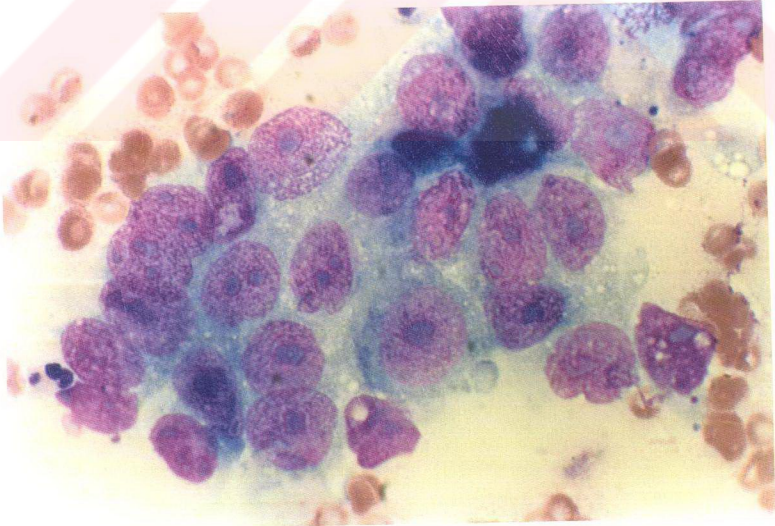
Resim 21: Karsinosarkoma teşhis edilen meme dokusu; çekirdekçik şekilleri farklı (okla gösterilen), vakuollü hücreler. MGG, 1000x



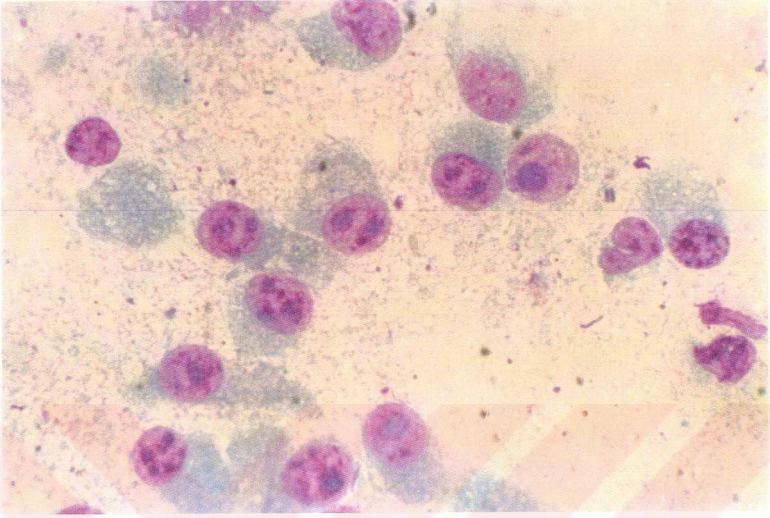
Resim 22: Karsinosarkoma teşhis edilen meme dokusu; a-iri çekirdek ve çekirdekçik, b-çekirdekçik büyüklükleri farklı tuhaf hücre (okla gösterilen). MGG, 1000x



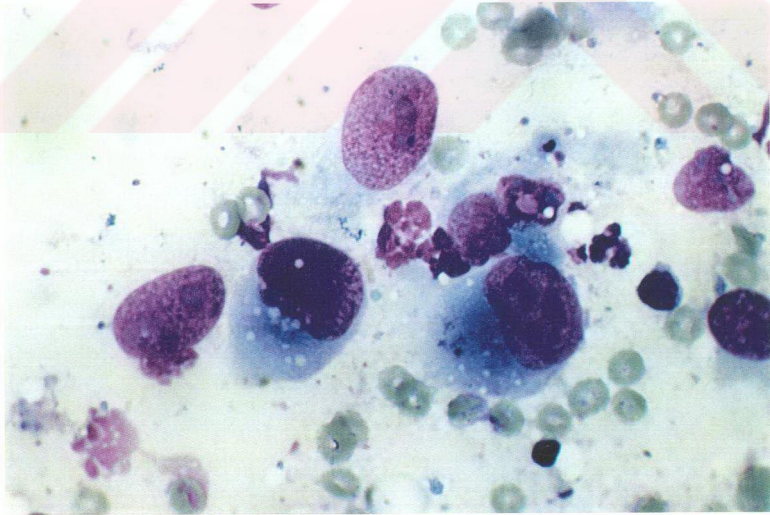
Resim 23: Karsinosarkoma teşhis edilen meme dokusu; çift çekirdekli hücre (okla gösterilen) ve lökosit kümesi. MGG, 1000x



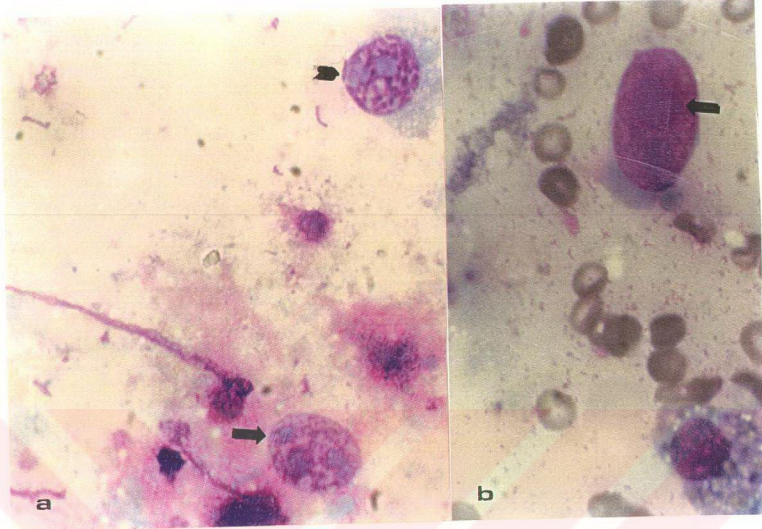
Resim 24: Osteosarkoma teşhis edilen meme dokusunun sitolojik görüntüsü; kromatin granülleri belirgin, pleomorfik, iri çekirdekçikli osteoblastik hücreler. MGG, 1000x



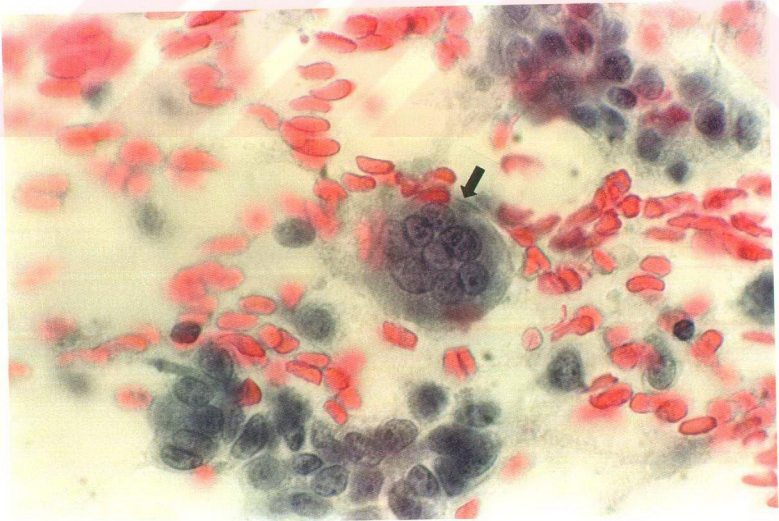
Resim 25: Osteosarkoma teşhis edilen meme dokusu; çekirdekçik şekil ve sayıları farklı osteoblastik hücreler. MGG, 1000x



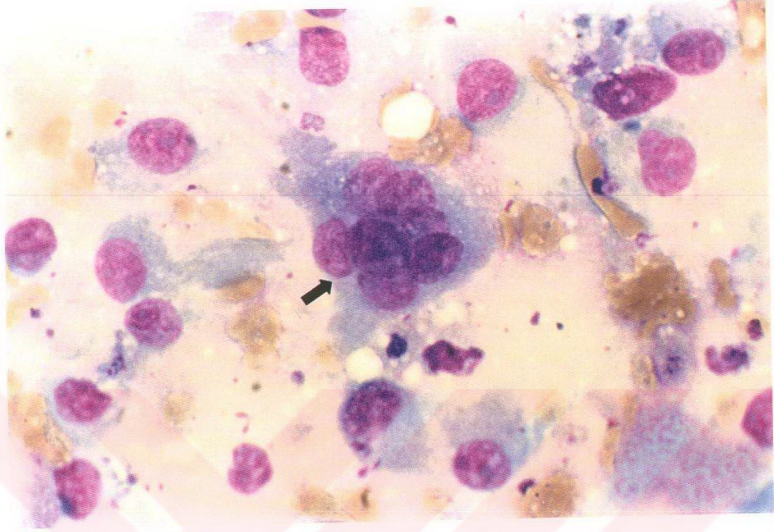
Resim 26: Osteosarkoma teşhis edilen meme dokusu; iri çekirdekli, çekirdekçik şekil ve sayıları farklı pleomorfik osteoblastik hücreler. MGG, 1000x



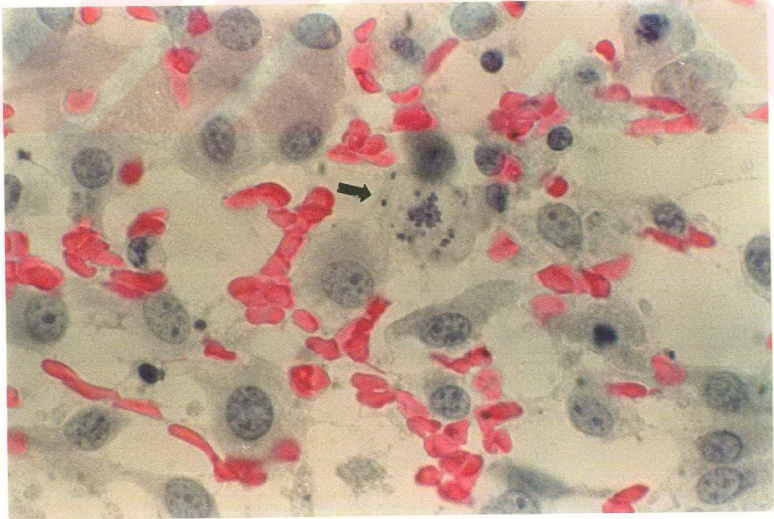
Resim 27: Osteosarkoma teşhis edilen meme dokusu; a-çekirdekçik şekilleri farklı hücre (ok), hücre mitoz evresine girmiş (ok başı), b-anormal çekirdekçik (okla gösterilen). MGG, 1000x



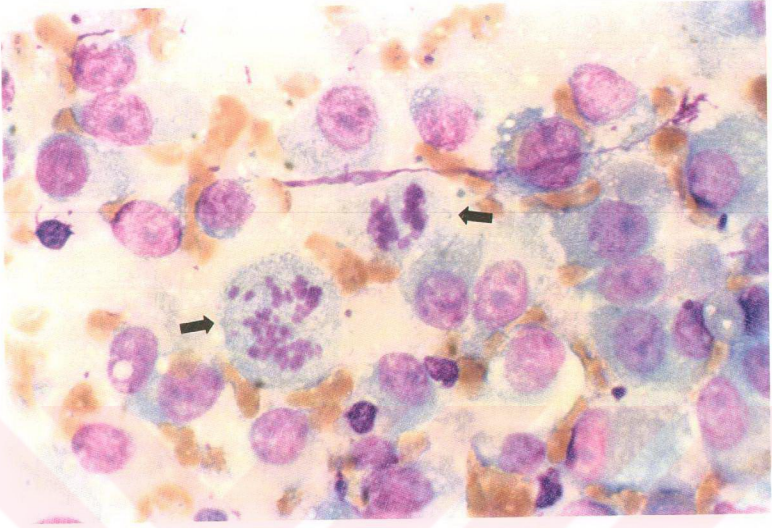
Resim 28: Osteosarkoma teşhis edilen meme dokusu; osteoklastik dev hücre (okla gösterilen). PAP, 1000x



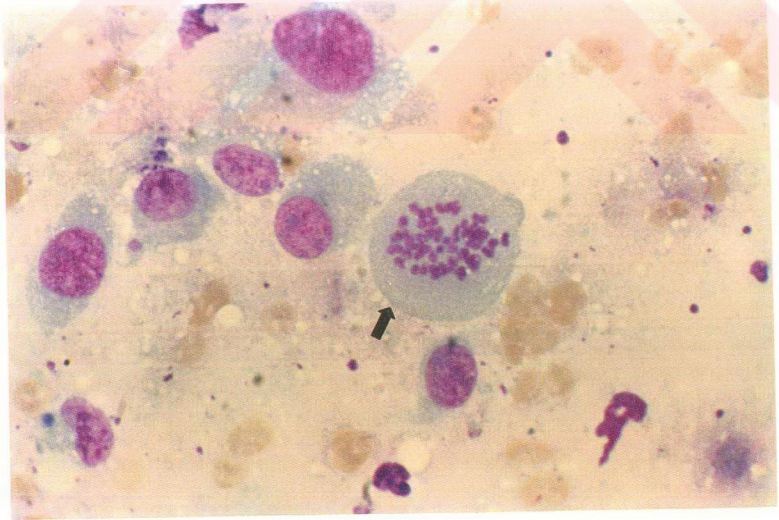
Resim 29: Osteosarkoma teşhis edilen meme dokusu; osteoklastik dev hücre (okla gösterilen). MGG, 1000x



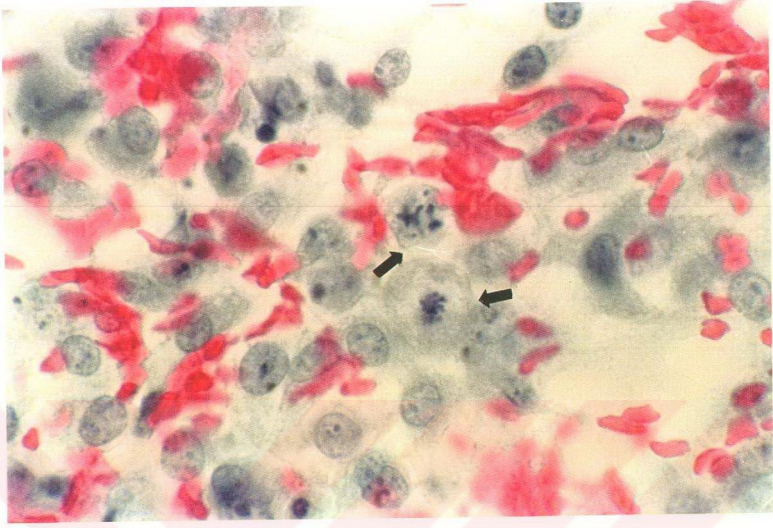
Resim 30: Osteosarkoma teşhis edilen meme dokusu; anormal mitotik figür (okla gösterilen). PAP, 1000x



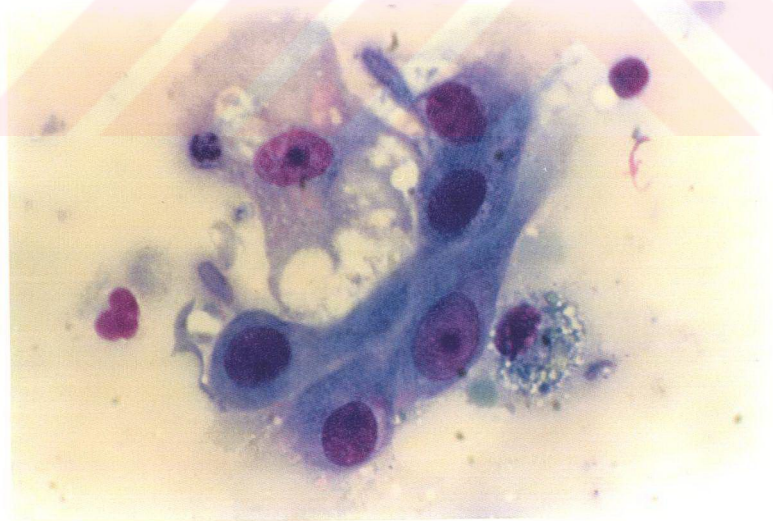
Resim 31: Osteosarkoma teşhis edilen meme dokusu; anormal mitotik figür (okla gösterilen), pleomorfik osteoblastik hücreler. MGG, 1000x



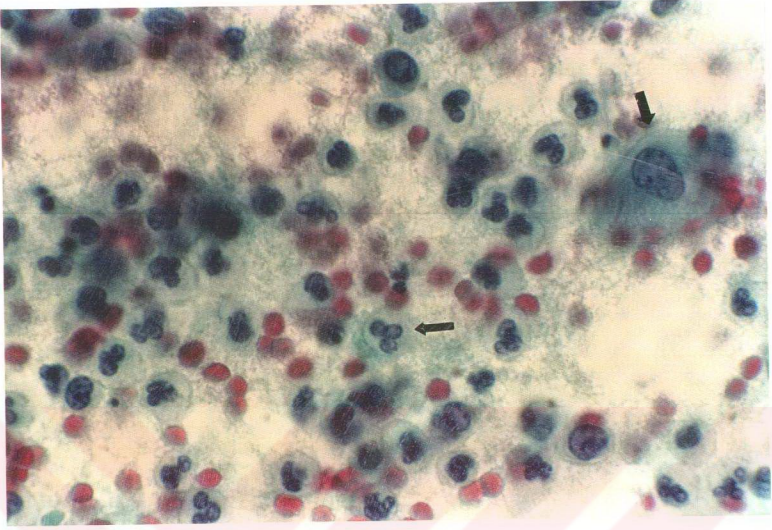
Resim 32: Osteosarkoma teşhis edilen meme dokusu; anormal mitotik figür (okla gösterilen). MGG, 1000x



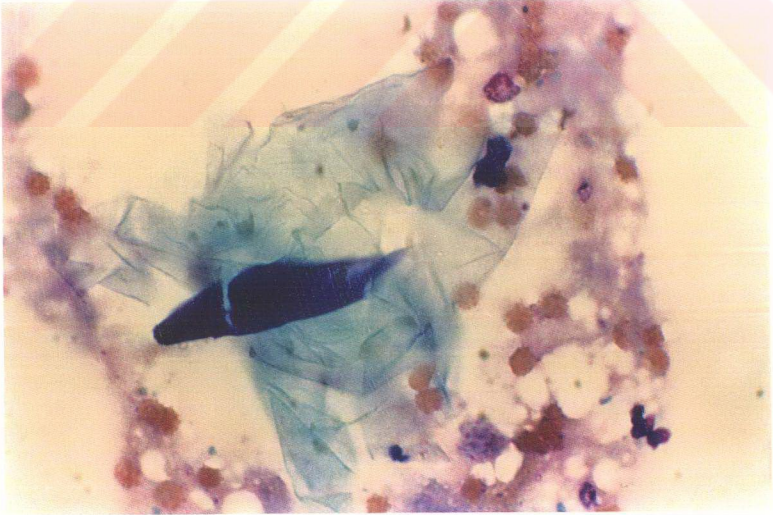
Resim 33: Osteosarkoma teşhis edilen meme dokusu; anormal mitotik figür (oklarla gösterilen). PAP, 1000x



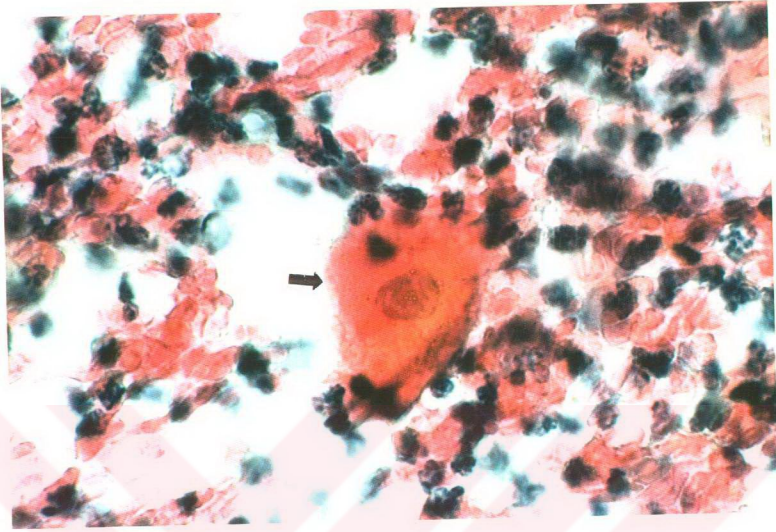
Resim 34: Spindle hücreli karsinoma teşhis edilen meme dokusu; monomorfik myoepiteliyal hücreler. MGG, 1000x



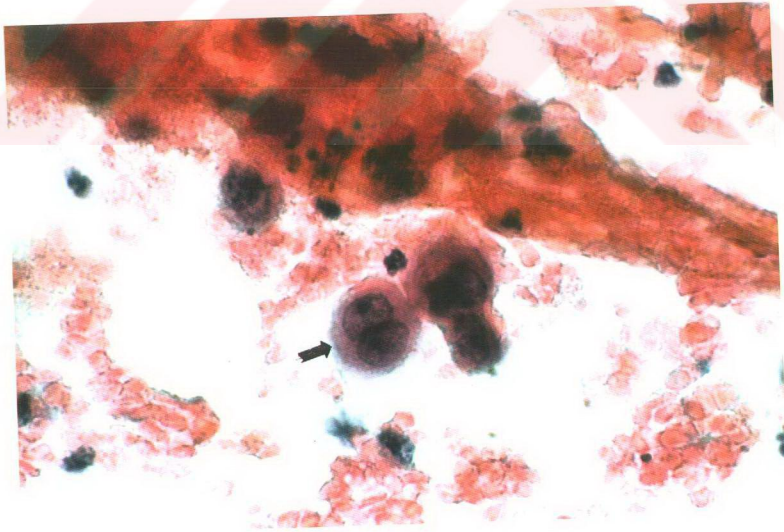
Resim 35: Spindle hücreli karsinoma teşhis edilen meme dokusu; yoğun lökosit (ince ok), iri çekirdekli myoepitelyal hücre (kalm ok). PAP, 1000x



Resim 36: Skuamoz hücreli karsinoma teşhis edilen meme dokusu; iyi diferansiye polygonal yapıda skuamoz hücreler. MGG, 1000x

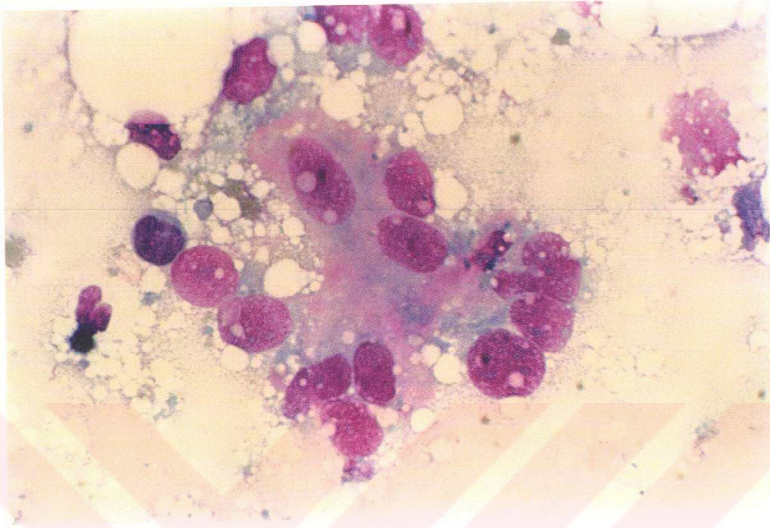


Resim 37: Skuamoz hücreli karsinoma teşhis edilen meme dokusu; az diferensiyel poligonel yapıda, sitoplazması turuncu boyanan skuamoz hücre (okla gösterilen). PAP, 1000x

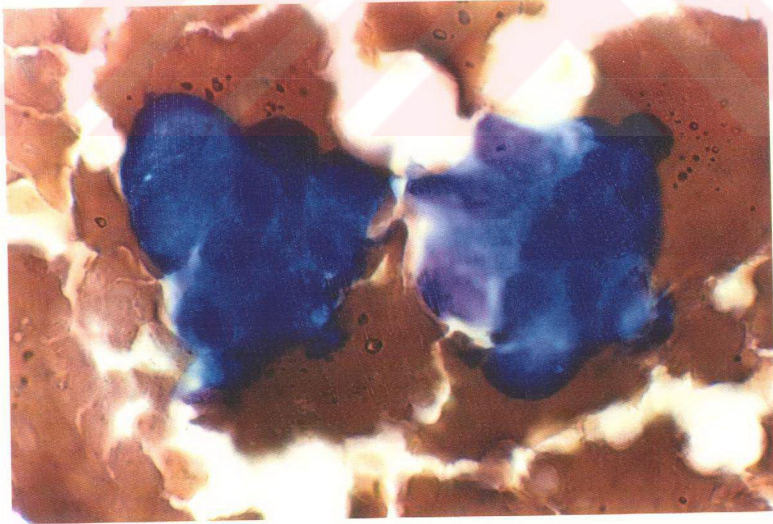


Resim 38: Skuamoz hücreli karsinoma teşhis edilen meme dokusu; kötü diferensiyel, sitoplazması turuncu boyanan skuamoz hücre (okla gösterilen). PAP, 1000x

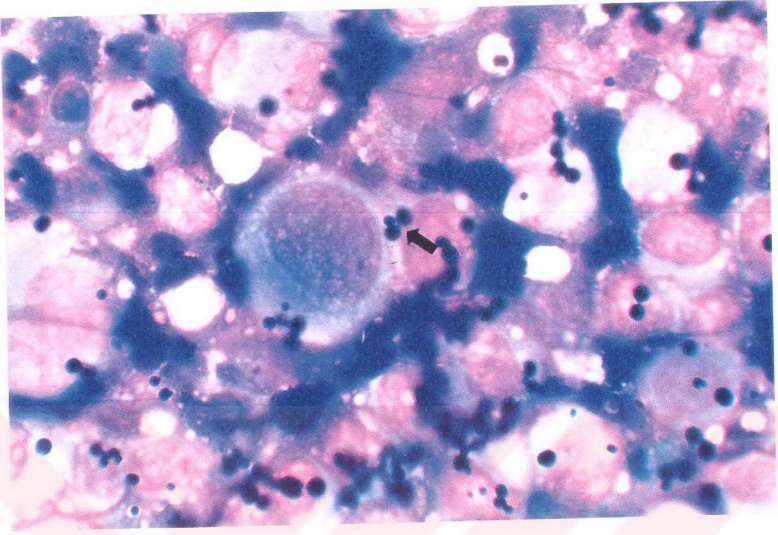
ayt
Adıyıldız



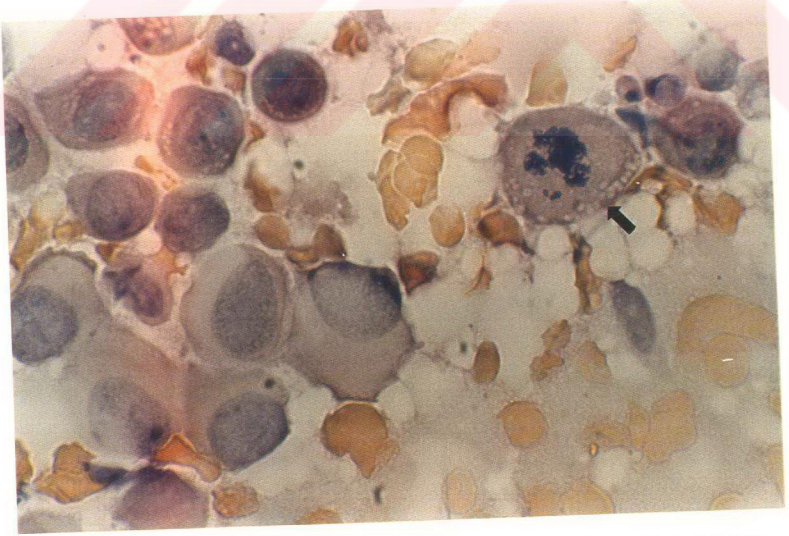
Resim 39: Liposarkoma teşhis edilen meme dokusu; zemin, hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında yoğun vakuoller, pleomorfik hücreler. MGG, 1000x



Resim 40: MGG boyasında kurumaya bağlı artefakt görüntüsü. 1000x



Resim 41: MGG boyasında, boya çöktetisinden (okla gösterilen) kaynaklanan boyanma hatası. 1000x



Resim 42: PAP boyasında fiksasyon hatasına bağlı kuruma sonucu oluşan artefakt görüntüsü, anormal mitotik figür (okla gösterilen). PAP, 1000x

10.KAYNAKLAR

1. Alleman A. R, Bain P.J. Diagnosing Neoplasia: The Cytologic Criteria for Malignancy. *Veterinary Medicine* 2000; 95 (3) : 204-223
2. Allen S. W, Prasse K. W, Mahaffey E. A. Cytologic Differentiation of Benign from Malignant Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* 1986; 23: 649-655
3. Ariga R, Bloom K, Reddy V. B, Kluskens L, Francescatti D, Dowlat K, Siziopikou P, Gattuso P. Fine-Needle Aspiration of Clinically Suspicious Palpable Breast Masses with Histopathologic Correlation. *The American Journal of Surgery* 2002; 184:410-413
4. Aughey E, Frye F. L. *Comparative Veterinary Histology with Clinical Correlates*. Manson Publishing / The Veterinary Press, London, 2001; 194-196
5. Baloch Z. W, Gupta P. K, Yu G. H, Sack M. J, LiVolsi V. A. Follicular Variant of Papillary Carcinoma: Cytologic and Histologic Correlation. *American Journal of Clinical Pathology* 1999; 111: 216-222
6. Barnes D. M, Hanby A. M. Oestrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer: Past, Present and Future. *Histopathology* 2001; 38: 271-274
7. Benjamin S. A, Lee C. A, Saunders W. J. Classification and Behavior of Canine Mammary Epithelial Neoplasms Based on Life-span Observations in Beagles. *Veterinary Pathology* 1999; 36: 423-436
8. Bonzanini M, Gilioli E, Brancato B, Cristofori A, Bricolo D, Natale N, Valentini A, Palma P. D. The Cytopathology of Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. A

Detailed Analysis of Fine Needle Aspiration Cytology of 58 Cases Compared with 101 Invasive Ductal Carcinomas. *Cytopathology* 2001; 12 (2) : 107-119

9. Boon G. D, Rebar A. H, De Nicola D. B. A Cytologic Comparison of Romanowsky Stains and Papanicolaou – type Stains. I. Introduction, Methodology and Cytology of Normal Tissues. *Veterinary Clinic Pathology* 1982; 11 (1): 22
10. Bostock D. E. Canine and Feline Mammary Neoplasms. *British Veterinary Journal* 1986; 142: 506-515
11. Bratulić M, Grabarević Ž, Artuković B, Capak D. Number of Nucleoli and Nucleolar Organizer Regions per Nucleus and Nucleolus-Prognostic Value in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology* 1996; 33 (5) : 527-532
12. Brodey R. S, Goldschmidt M. H, Rozsel J. R. Canine Mammary Gland Neoplasms. *Journal of American Animal Hospital Association* 1983; 19: 61-90
13. Buckner F, England J. M, Batheja N. General Cytologic Principles. In: Atkinson B. S. (eds) .*Diagnostic Cytopathology* W&B Saunders Comp. Philadelphia, 1992; 1-8
14. Chhieng D. C, Cohen J. M. Fine Needle Aspiration Cytology of Mammary Fibromatosis: A case Report and Review of Literature. *Cytopathology* 1999; 10: 354-359
15. Clinkenbeard K. D, Cowell R. L. Cytological Features of Malignant Neoplasia. *Waltham Focus* 1994; 4 (3) : 1-8
16. Conn H. J. *Biological Stains* 7th Ed. Williams&Wilkins Company 1961; 69

17. Donnay I, Rauš J, Devleeschouwer N, Wouters-Ballman P, Leclercq G, Verstegen J. Comparison of Estrogen and Progesterone Receptor Expression in Normal and Tumor Mammary Tissues from Dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1995; 56 (9) : 1188-1194
18. Ducatman B. S. Fine Needle Aspiration of the Breast. In: Atkinson B. S. (eds) *.Diagnostic Cytopathology W&B Saunders Comp. Philadelphia, 1992; 433-465*
19. Dunn J, Villiers E. General Principals of Cytological Interpretation. In *Practice* 1998; 20 (8) : 429-437
20. Eroğlu S. Sitolojik Tanı Yöntemleri. Non Jinekolojik Sitoloji Kurs Notları, Türk Patoloji Derneği 1996; 3-11
21. Funakoshi Y, Nakayama H, Uetsuka K, Nishimura R, Sasaki N, Doi K. Cellular Proliferative and Telomerase Activity in Canine Mammary Gland Tumors. *Veterinary Pathology* 2000; 37 (2) : 177-183
22. Fidler I. J, Brodey R. S. A Necropsy Study of Canine Malignant Mammary Neoplasms. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1967; 151 (6) : 710-715
23. Gärtner F, Geraldés M, Gassali G, Rema A, Schmitt F. DNA Measurement and Immunohistochemical Characterization of Epithelial and Mesenchymal Cells in Canine Mixed Mammary Tumours: Putative Evidence for a Common Histogenesis. *The Veterinary Journal* 1999; 158: 39-47
24. Geraldés M, Gärtner F, Schmitt F. Immunohistochemical Study of Hormonal Receptors and Cell Proliferation in Normal in Canine Mammary Glands and Spontaneous Mammary Tumours. *Veterinary Record* 2000; 146: 403-406

25. Gilbertson S. R, Kurzman I. D, Zachrau R. E, Hurvitz A. I, Black M. M. Canine Mammary Epithelial Neoplasms: Biologic Implications of Morphologic Characteristics Assessed in 232 Dogs. *Veterinary Pathology* 1983; 20: 127-142
26. Graham J. C, O'Keefe D. A, Gelberg H. B. Immunohistochemical Assay for Detecting Estrogen Receptors in Canine Mammary Tumors. *American Journal of Veterinary Research* 1999; 60 (5) : 627-630
27. Griffiths G. L, Lumsden J. H, Valli V. E. O. Fine Needle Aspiration Cytologic and Histologic Correlation in Canine Tumors. *Veterinary Clinical Pathology* 1984; 13 (1) : 13
28. Hampe J. F, Misdrop W. Tumours and Dysplasias of the Mammary Gland. *Bulletin World Health Organization* 1974; 50: 111-113
29. Hellmén E. The Pathogenesis of Canine Mammary Tumors. *The Cancer Journal* 1996; 9 (6) : 1-9
30. Hellmén E, Bergström R, Holmberg L, Spångberg I –B, Hansson K, Lindgren A. Prognostic Factors in Canine Mammary Tumors: A Multivariate Study of 202 Consecutive Cases. *Veterinary Pathology* 1993; 30: 20-27
31. Howat A. J, Briggs W. A. Technical Method. Fine Needle Aspiration Cytology of the Breast Using the Cytospin Method. *Cytopathology* 1999; 10 (1) : 50-53
32. Jörundsson E, Lumsden J. H, Jacobs R. M. Rapid Staining Tehcniques in Cytopathology: A Review and Comparision of Modified Protocols for Hematoxylin and Eosin, Papanicolaou and Romanowsky Stains. *Veterinary Clinical Pathology* 1999; 28 (3) : 100-108

33. Juntas P, Pogačnik M. Morphometric Analysis of AgNORs in Tubular and Papillary Parts of Canine Mammary Gland Tumors. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 2000; 22 (3) : 185-192
34. Khodke K. K, Ambadekar N. N, Tote V. D. Modified Ultra Fast Papanicolaou Staining. *Cytopathology* 1999; 10 (1): 66-67
35. Kulkarni M. B, Prabhudesai N. M, Desai S. B, Borges A. M. Scrape Cell-Block Technique for Fine Needle Aspiration Cytology Smears. *Cytopathology* 2000; 11: 179-184
36. Kumar V, Cotran R. S, Robbins S. L. *Temel Patoloji*. Çeviri Editörü: Çevikbaş U. 6.Ed Nobel & Yüce yayınları, İstanbul, 2000; 132-175
37. Larkin H. A. *Veterinary Cytology: Cytological Diagnosis of Diseases of the Respiratory Tract in Animals*. *Irish Veterinary Journal* 1994; 47: 304-312
38. López-Ferrer P, Jiménez-Heffernan J.A, Vicandi B, Ortega L, Viquer J. M. Fine Needle Aspiration Cytology of Breast Fibroadenoma. A Cytohistologic Correlation Study of 405 Cases. *Acta Cytologica* 1999; 43 (4) : 579-586
39. Luna L. G. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology* 3rd Ed. Mc Graw-Hill Book Company, 1968
40. MacEwen E. G, Withrow S. Tumors of the Mammary Gland. In : (eds). *Small Animal Clinical Oncology*. 2nd ed. W&B Saunders Comp. Philadelphia, 1989; 356-372

41. Maitra A, Ashfaq R, Saboorian M. H, Lindberg G, Gokaslan S. T. The Role of Fine Needle Aspiration Biopsy in the Primary Diagnosis of Mesenchymal Lesions a Community Hospital-Based Experience. *Cancer* 2000; 90 (3) : 178-185
42. Maygarden S. J, Novotny D. B, Jhonson D. E, Frable W. J. Subclassification of Benign Breast Disease by Fine Needle Aspiration Cytology: Comparison of Cytologic and Histologic Findings in 265 Palpable Breast Masses. *Acta Cytologica* 1994; 38 (2) : 115-129
43. Mccluggage W. C, Sloan S, Kenny B. D, Alderdice J. M, Kirk S. J, Anderson N. H. Fine Needle Aspiration Cytology of Mammary Granular Cell Tumour: A Report of Three Cases. *Cytopathology* 1999; 10: 383-389
44. McKee G. T, Tildsley G, Hammond S. Cytologic Diagnosis and Grading of Ductal Carcinoma In Situ. *Cancer* 1999; 87 (4) :203-209
45. Meyer D. J. Cytology for the Diagnosis of Neoplastic and Non-Neoplastic Disease. *The Veterinary Quarterly* 1996; 18 (suppl. 1) : 48-49
46. Milli Ü. H, Hazıroğlu R, Aydın Y, Gülbahar M. Y. Köpek Meme Tümörlerinde Sitokeratin, Vimentin ve Alfa-Düz Kas Aktin İntermedier ve Mikro Filamentlerinin İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu. *Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Degisi* 2000; 24: 81-92
47. Misdorp W, Else R. W, Hellmén E, Lipscomb T. P. Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat. AFIP 2nd series. Washington D. C. 1999; Vol 7
48. Mitnick J. S, Gianutsos R, Pollack A. H, Susman M, Baskin B. L, Ko W. D, Pressman P. I, Feiner H. D, Roses D. F. Tubular Carcinoma of the Breast:

Sensitivity of Diagnostic Techniques and Correlation with Histopathology. American Journal of Roentgenology 1999; 172 (2) : 319-323

49. Morrison W. B, DeNicola D. B. Advantages and Disadvantages of Cytology and Histopathology for the Diagnosis of Cancer. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal) 1993; 8 (4) : 222-227
50. Moulton J. E. Tumors of Domestic Animals. 3rd ed. Berkeley California University of California Press, California, 1990; 518-553
51. Nieto A, Pena L, Perez-Alenza M. D, Sanchez M. A, Flores J. M, Castano M. Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in Canine Mammary Tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance. Veterinary Pathology 2000; 37 (3) : 239-247
52. Noden D. M, De Lahunta A. The Embryology of Domestic Animals. Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1985; 335-336
53. Peña L, Castaño M, Sanchez M. A, Rodriguez A, Flores J. M. Immunocytochemical Study of Type IV Collagen and Laminin in Canine Mammary Tumours. Journal of Veterinary Medicine A 1995; 42: 50-61
54. Perman V. New Approaches to Preparing for Cytologic Examination. The Bovine Practitioner 1987; 22: 182-183
55. Preziosi R, Sarli G, Benazzi C, Marcato P. S. Detection of Proliferating Cell Nuclear Antigen in Canine and Feline Mammary Tumours. Journal of Comparative Pathology 1995; 113: 301-313

56. Rammou-Kinia R, Anagnostopoulou I, Tassiopoulos F, Lykourinas M. Fine Needle Aspiration of the Testis. Correlation Between Cytology and Histology. *Acta Cytologica* 1999; 43 (6) : 991-998
57. Raskin R. E. Liver Cytology: Interpreting Needle Biopsy Samples. *Veterinary Medicine* 2000; 95 (3) : 244-249
58. Rebar A. H, Boon G. D, DeNicola D. B. A Cytologic Comparison of Romanovsky Stains and Papanicolaou-type Stains II. Inflammatory and Neoplastic Lesions. *Veterinary Clinical Pathology* 1982; 11 (11) : 16-25
59. Rutteman G. R, Misdrop W, Blankenstein M. A, van den Brom W. E. Oestrogen and Progestin Receptors in Mammary Tissue of the Female Dog: Different Receptor Profile in Non-malignant and Malignant States. *British Journal of Cancer* 1988; 58: 594-599
60. Salda L. D, Sarli G, Benazzi C, Marcato P. S. Giant Cells in Anaplastic Mammary Carcinoma of the Dog and Cat. *Journal of Comparative Pathology* 1993; 109: 345-360
61. Sartin E. A, Barnes S, Kwapien R. P, Wolfe L. G. Estrogen and Progesterone Receptor Status of Mammary Carcinomas and Correlation with Clinical Outcome in Dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1992; 53 (11) : 2196-2200
62. Schafer K.A, Kelly G, Shcrader R, Griffith W. C, Muggenburg B. A, Tierney L. A, Lechner J. F, Janovitz E. B, Hahn F. F. A Canine Model of Familial Mammary Gland Neoplasia. *Veterinary Pathology* 1998; 35: 168-177

63. Škrbinc B, Bábic A, Cúfer T, Us-Krašovec M. Cytological Grading of Breast Cancer in Giemsa-stained Fine Needle Aspiration Smears. *Cytopathology* 2001; 12(1) : 15-25
64. Tanaka K, Shoji T, Tominaga Y, Nakagawa H, Yamamoto D, Kawanishi H, Sakaida N, Okamura A, Hioki K. Statistical Analysis of Diagnostic Failure of Fine Needle Aspiration Cytology in Breast Cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2001; 76: 100-105
65. Theilen G. H, Madewell B.R. *Veterinary Cancer Medicine*. 2nd ed. Lea&Febiger, Philadelphia, 1987; 328-329
66. Thomas J. O, Amanguno A. U, Adeyi O. A, Adesina A. O. Fine Needle Aspiration in the Management of Palpable Masses in Ibadan: Impact on the Cost of Care. *Cytopathology* 1999; 10: 206-210
67. Thrall M. A. Cytologic Examinations of Cutaneous and Subcutaneous Lumps and Lesions. *Veterinary Medicine* 2000; 95 (3) : 224-241
68. Tuzlalı S. Meme Lezyonlarında İnce İğne Aspirasyon Biopsisi. Non Jinekolojik Sitoloji Kurs Notları, Türk Patoloji Derneği 1996; 65-72
69. Villiers E, Dunn J. Collection and Preparation of Smears for Cytological Examination. *In Practice* 1998; 20 (7): 370-377
70. Wellman M. L. The Cytologic Diagnosis of Neoplasia. *Veterinary Clinics of North America (Small Animal Practice)* 1990; 20 (4) : 919-938

71. Wilson G. P. Mammary Glands : Their Developments and Diseases; In : Bojrab M. J. (eds). Pathobiology in Small Animal Surgery. Lea&Febiger, Philadelphia, 1981; 394-404
72. Wright P.J, Parry B. W. Cytology of the Canine Reproductive System. Veterinary Clinics of North America (Small Animal Practice) 1989; 19 (5): 851-874
73. Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M. Prognosis for Canine Malignant Mammary Tumors Based on TNM and Histologic Classification. Journal of Veterinary Medicine Sciences 1996;58 (11) : 1079-1083
74. Zachariadou-Veneti S. A tribute. George Papanicolaou (1883-1962). Cytopathology 2000; 11: 152-157
75. Zinkl J. G. Cytodiagnosis. In : Theilen G. H, Madewell B.R. (eds). Veterinary Cancer Medicine. 2nd ed. Lea&Febiger, Philadelphia, 1987; 71-84

11. ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Antalya’da doğdum. İlk, orta öğrenimimi Antalya’da tamamladım. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 1996 yılında mezun oldum. 1997-1998 yılları arasında 1 yıl süre ile Migros T. A. Ş. ‘de “gıda hijyeni” konusunda çalıştım. 1997 yılında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı’nda Doktora eğitimime başladım. 1999 yılında yine Patoloji Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandım ve halen görevime devam etmekteyim.

