

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÖPEKLERDE YUMUŞAK DOKU TÜMÖRLERİNİN
İMMUNOFENOTİPİK OLARAK SINIFLANDIRILMASI VE
HİSTOPATOLOJİK TEŞHİSLERİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

DAMLA HAKTANIR-YATKIN

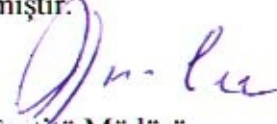
**DANIŞMAN
DOÇ.DR. S.SEÇKİN ARUN**

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2006

TEZ ONAYI

Bu çalışma 16/02/2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Patoloji Anabilim Dalı Doktora programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü

Prof.Dr.Emine KÖKOĞLU

Tez Danışmanı

Doç.Dr.S.Seçkin ARUN

İ.Ü. Vet.Fak. Patoloji AbDalı

Jüri Başkanı

Prof.Dr.Aydın GÜREL

İ.Ü. Vet.Fak. Patoloji AbDalı

Jüri Üyesi

Prof.Dr.Gürsel SÖNMEZ

U.Ü. Vet.Fak. Patoloji AbDalı

Jüri Üyesi

Doç.Dr.H.Hakan BOZKURT

İ.Ü. Vet.Fak.Histoloji-Embriyoloji AbDalı

Jüri Üyesi

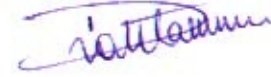
Doç.Dr.İbrahim FIRAT

İ.Ü. Vet.Fak. Patoloji AbDalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Damla HAKTANIR-YATKIN



İTHAF

Öğrenme arzusu ve büyüünü yaşadığı sürece asla yitirmeyen sevgili dedem Asb Pilot
Mehmet GEZGİN' in anısına...

TEŞEKKÜR

Tezimin deneysel ve yazım aşamaları boyunca tüm rutin işler için beni tolere eden, rahat bir çalışma ortamı sağlayan ve bilimsel ve manevi desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı öğretim üyeleri, değerli hocalarım, Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Aydın GÜREL ve Doç.Dr. İbrahim FIRAT’ a ve beni bu yolculuğun her şeyden öte ve önde kişisel gelişimimin bir parçası olduğuna inandıran ve negatif yükümü her daim pozitifleyen ve bana onkolojik patolojinin ilginç dünyasını öğreten doktora babam Doç.Dr.S.Seçkin ARUN’ a; bu sancılı süreçte tüm iş yükümü sırtlayan ve beni daima motive eden araştırma görevlisi büyüklerim Dr. Gülbin ŞENNAZLI, Dr. Ahmet GÜLÇUBUK ve arkadaşlarım Özge TÜRER, Kıvılcım SÖNMEZ, Gülay YÜZBAŞIOĞLU, Hande ÖZYOĞURTÇU’ ya; teknik destekleri ve kahve molaları için Patoloji Anabilim Dalı laborantları Sevgi EREN ve Akif ÖZTÜRK ’e; başta Dr. Gülben ERDEM HUQ olmak üzere her zaman güler yüzle karşılandığım “Doktora Bilimsel Destek Ünitem” Samatya Eğt. Hast. Patoloji Lab. doktorlarına ve Laborant Aslı TÜYSÜZ’ e; tezimin her aşamasında büyük bir özveriyle fahri danışmanlığımı yapan, engin bilgilerinden yararlandığım ve insanlığın uzun varoluş serüvenini mikroskobun okülerinde belki bazen tek bir “nüvede” keşfettiğine yürekten inandığım büyük bilim insanı Doç.Dr. Erol BOZKURT’ a; bana peşinden koşulan küçük hedeflerin, devinimin ve çoğu zaman yenilginin yaşamı anlamlı kıldığını öğreten, cesaretine hayranlık duyduğum kadim dostum ve eşim Araş.Gör.Dr. Emrah YATKIN’ a; sabır, direnç ve kararlılığın en gerçek kombinasyonu, bana hayatım boyunca tek ve benzersiz olma ayrıcalığını yaşatan ve beni koşulsuz seven biricik annem Dr. Tülay GEZGİN’e; evrenin, insan olmanın ve yaşamın sürekli gizini kovalayan saklı kalmış bilim emekçisi ve tanıdığım en büyük kitap kurdu ve filozof sevgili babam Dr. Ümit HAKTANIR’ a; yaratıcılığının kurtarıcılığını yaşamımın tüm “acil durumlarında” zekası ve yetenekleriyle birlikte yanı başımda paketlenmiş bulduğum, tezimin software kahramanı, çocukluk arkadaşım endüstriyel tasarımcı sevgili ağabeyim Bahadır HAKTANIR’ a; bilimsel önerileri, teknik yardımları ve tam teşekküllü sevgi destekleri için tanıdığım en özel ve yetenekli insanlardan sevgili dostlarım Dr. Funda YILDIZ ve eşi Atilla YILDIZ’ a; fazla mesaili uykusuz gecelerde birlikte sabahladığım küçük tüylü dostum Çıtır’ a,

Adlarını burada sayamadığım tüm dostlarıma yaşamımda ve kalbimde oldukları ve bireysel bütünlüğüme inandıkları için...

Hayattakileri ya da sonsuzluğa göçmüşleriyle tüm aileme, onlardan bir parça, onları yansıtan bir ayna ve “okyanusta küçük bir damla” olmamı sağladıkları için...

Ve bana burada Oscar kazanmışçasına çılgınca ve dilediğimce teşekkür etme fırsatı tanıyan herkese gerçekten ve yürekten teşekkür ediyorum!

Bu araştırma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından T-133/11112002 no’lu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Yumuşak Doku Tümörleri	3
2.1.1.Yumuşak Doku Tümörleri Hakkında Genel Bilgiler	3
2.1.2.Yumuşak Doku Tümörlerinin Sınıflandırılması.....	4
2.1.2.1.Fibröz Dokunun Tümörleri	7
2.1.2.2.Adipöz Dokunun Tümörleri.....	10
2.1.2.3.Kas Dokunun Tümörleri	11
2.1.2.4.Vasküler Mezenşimal Tümörler	15
2.1.2.5.Periferik Sinirlerin Tümörleri	17
2.1.2.6.Sinoviyal Sarkom.....	20
2.1.2.7.Hemanjiyoperisitom.....	21
2.1.2.8.Dermatofibrosarkom Protüberens	22
2.2.Diagnostik Yöntemler.....	23
2.2.1.İmmunohistokimya	25
2.2.1.1.Yumuşak Doku Tümörlerinin Tanısında İmmunohistokimyanın Kullanımı ve Önemi.....	25
2.2.1.2.İmmunohistokimyasal Tümör Belirteçleri.....	26
2.2.1.3.İmmunohistokimyada Kontrol Dokularının Kullanımı	32
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1.Gereç	33
3.2.Yöntem.....	33

3.2.1.Doku Takibi Ve Parafin Kesit Hazırlanışı	33
3.2.2.Histopatolojik Değerlendirme.....	34
3.2.3.İmmunohistokimyasal Yöntem.....	36
3.2.3.1.İmmunohistokimyasal İşaretleme Protokolü	37
3.2.3.2.Tampon Çözeltilerin Hazırlanışı.....	39
3.2.3.3.Kontrol Dokularının Boyanması.....	40
3.2.4.İmmunohistokimyasal Değerlendirme.....	41
3.2.5.Histopatolojinin İmmunohistokimyasal Sonuçlar İle Karşılaştırılması.....	41
4.BULGULAR.....	42
4.1.Histopatolojik Bulgular.....	47
4.2.İmmunohistokimyasal Bulgular.....	50
4.2.1.Kontrol Dokularda Boyanma.....	50
4.2.2.Tümör Dokularının Boyanması	51
4.3.İmmunohistokimyasal Bulguların Histopatolojik Bulgular İle Karşılaştırılması	53
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	75
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	96

KISALTMALAR LİSTESİ

YDT:	Yumuşak doku tümörü
YDS:	Yumuşak doku sarkomu
IHC:	İmmunohistokimya
HE:	Hematoksilen Eozin
FM:	Fibrom
FS:	Fibrosarkom
MFH:	Malign fibröz histiyositom
LM:	Leiomyom
LMS:	Leiomyosarkom
GIST:	Gastrointestinal stromal tümörler
RM:	Rabdomiyom
RMS:	Rabdomiyosarkom
LP:	Lipom
LPS:	Liposarkom
HM:	Hemanjiyom
HMS:	Hemanjiyosarkom
PSKT:	Periferik sinir kılıfı tümörleri
BPSKT:	Benign periferik sinir kılıfı tümörleri
MPSKT:	Malign periferik sinir kılıfı tümörleri
GHT:	Granüler hücreli tümör
SS:	Sinoviyal sarkom
KHP:	Köpeklerin hemanjiyoperisitomu
DFSP:	Dermatofibrosarkom protüberans
UDS:	Undiferensiye sarkom
UDMT:	Undiferensiye mezenşimal tümör
BMT:	Benign mezenşimal tümör
MSA:	Kas spesifik aktini
SMA:	Düz kas aktini
F-VIII:	Faktör VIII ilişkili antijen
NSE:	Nöron spesifik enolaz
GFAP:	Gliyal fibriler asidik protein
EMA:	Epitelyal membran antijeni
CEA:	Karsinoembriyogenik antijen

ÖZET

Haktanır-Yatkın, D (2006). Köpeklerde Yumuşak Doku Tümörlerinin İmmunofenotipik Olarak Sınıflandırılması ve Histopatolojik Teşhisleri ile Karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Patoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada farklı yaş ve ırklardaki köpeklerden alınmış yumuşak doku tümörlerinin immunfenotipik özelliklerinin tespiti, bunların histopatolojik teşhisleri ile karşılaştırılması ve diferensiyasyon yönü tanımlanamamış tümörlerde teşhise katkı sağlaması amaçlandı. Çalışmada toplam 50 köpeğe ait, farklı alanlarda lokalize olmuş benign veya malign karakterde yumuşak doku tümörü kullanıldı. HE ile boyanmış kesitlerde ilk histolojik değerlendirmeye göre hemanjiyoperisitom (n:1), dermatofibrosarkom (n:4), fibrom (n:2), fibrosarkom (n:4), hemanjiyom (n:2), hemanjiyosarkom (n:5), leiomyiom (n:8), leiomyiosarkom (n:3), malign fibröz histiyositom (n:4), nörofibrom (n:2) ve undiferensiye mezenşimal tümör (n:15) olgularını içeren formülle tespit edilmiş parafine gömülmüş örneklerde streptavidin-biotin immunperoksidaz yöntemiyle vimentin, keratin, desmin, kas aktini (HHF35), düz kas aktini (SMA), s-100 ve F-VIII gibi tümör belirteçlerini içeren bir antikor paneli kullanılarak immunohistokimyasal işaretleme yapıldı. 50 dokunun tümünde mezenşimal kökeni destekleyen vimentin pozitifliği ve keratin negatifliği gözlemlendi. s-100 sunulumu gösteren hemanjiyoperistom olgusu, bir dermatofibrosarkom protüberans, bir malign fibröz histiyositom ve üç undiferensiye mezenşimal tümör periferik sinir kılıfı tümörü; SMA pozitif üç undiferensiye tümör leiomyiosarkom; bir leiomyiosarkom ve bir undiferensiye sarkom malign fibröz histiyositom; bir nörofibrom, bir leiomyiom olgusu fibrom; iki undiferensiye sarkom fibrosarkom olarak yeniden adlandırıldı. İmmunohistokimyasal sonuçlar bir nörofibrom, dört undiferensiye mezenşimal tümörde sonuçsuz kaldı. HHF35'in desminden daha spesifik bir kas diferensiyasyonu belirteci olduğu, SMA'nın düz kas diferensiyasyonu, F-VIII'in endotelial diferensiyasyon için spesifik olduğu belirlendi ve bir undiferensiye sarkom hemanjiyosarkom olarak yeniden sınıflandırıldı. Fibröz ve fibrohistiyositik tümörlerde odakal düz kas diferensiyasyonu gösterildi. Sonuç olarak immunohistokimyanın histopatolojik tanıya eşlik etmesi gereken yardımcı bir tanı yöntemi olarak kullanılabileceği, ancak bazı dediferensiye mezenşimal tümörlerin sınıflandırılmasında ultrastrüktürel ve moleküler çalışmalara ihtiyaç duyabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Köpekler, Yumuşak Doku, İmmunohistokimya, Sarkom, Tümör Markırları

Bu araştırma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından T-133/11112002 no'lu proje ile desteklemiştir.

ABSTRACT

Haktanır-Yatkin, D (2006). Immunophenotypic Classification of Canine Soft Tissue Tumors and Comparison of the Findings with the Previous Histopathologic Diagnosis. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Pathology, Doctorate Thesis, Istanbul.

The objective of this study was to determine the immunophenotypic features of soft tissue tumors obtained from dogs of varying ages and breeds, to assess relevance between these findings and conventional diagnosis and contribute to the diagnosis particularly in undifferentiated tumors. The study was carried out on 50 benign and malignant soft tissue tumors, which were located in various anatomic sites. Previous conventional diagnosis consisted of hemangiopericytoma (n:1), dermatofibrosarcoma protuberance (n:4), fibromas (n:2), fibrosarcomas (n:4), hemangiomas (n:2), hemangiosarcomas (n:5), leiomyomas (n:8), leiomyosarcomas (n:3), malignant fibrous histiocytomas (n:4), neurofibromas (n:2), undifferentiated mesenchymal tumors (n:15). Formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were labeled with streptavidin-biotin immunoperoxidase method, using a panel of commercially available antibodies raised against vimentin, muscle specific actin (HHF35), desmin, smooth muscle actin (SMA), s-100, keratin and F-VIII. All specimens stained positively for vimentin, negatively for keratin, indicating the mesenchymal origin of the neoplastic tissues. s-100 positive hemangiopericytoma, one case of dermatofibrosarcoma protuberance and one malignant fibrous histiocytoma and three cases of undifferentiated tumors were referred as peripheral nerve sheath tumors; three cases of SMA positive undifferentiated tumors as leiomyosarcomas; one leiomyosarcoma and one undifferentiated sarcoma as malignant fibrous histiocytoma; one case of neurofibroma and leiomyomas as fibroma and two cases of undifferentiated sarcomas were categorized as fibrosarcomas on the basis of immunohistochemical findings. Immunohistochemistry was considered to be useless in one case of neurofibroma and four cases of undifferentiated tumors. The specificity of HHF35 as a myogenic marker was found to be superior to desmin antibody. SMA and F-VIII were determined to be specific for smooth muscle and endothelial differentiation, respectively. One case of undifferentiated sarcoma was re-classified as haemangiosarcoma. Focal smooth muscle differentiation was shown in fibrous and fibrohistiocytic tumors. In conclusion our findings revealed usefulness of immunohistochemistry as an auxiliary technique accompanying histopathologic diagnosis, but ultrastructural and molecular studies should be carried out in the classification of dedifferentiated mesenchymal tumors.

Key Words: Dogs, Soft Tissue, Immunohistochemistry, Sarcomas, Tumor Markers

This study was supported by The Research Fund of Istanbul University with project number T-133/11112002

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yumuşak doku ifadesi, retiküloendotelial sistem (monosit-makrofajlar sistemi), glia hücreleri ve çeşitli paranşimal organların destek dokuları ve iskelet sistemi dışında kalan epitelyal olmayan dokuları tanımlamak için kullanılmaktadır (1). Bu kavram geleneksel olarak kemik, kırık, beyin ve zarları, hematopoetik sistem hücreleri ve lenfoid doku dışında kalan mezenşimal dokuları kapsar (2). Yumuşak doku embriyolojik olarak mezodermden ve kısmen de nöroektodermden farklılaşır (1, 3).

Yumuşak doku tümörleri (YDT), heterojen, farklı yönlerde diferensiyasyon olabilen, histopatolojik yapıları birbirleriyle benzerlik gösterdiği için geleneksel tanı yöntemleriyle ayırt edilmesi güç neoplastik oluşumlardır (4–6). Aynı doku içerisinde mezenşimal kökenli farklı histogenetik komponentler içerdikleri literatürde gösterilmiştir (7–11).

Yumuşak dokunun kötü huylu tümörleri ya da sarkomları (YDS) metastazik potansiyeli düşük ya da orta düzeyde ancak bölgesel olarak agresiflik gösteren tümörlerdir (12,13). İlkel anaplastik formları, diferensiyasyon yönünün belirlenememesi sebebiyle undiferensiyasyon sarkom (farklılaşma yönü belirsiz olan) (14, 15) ya da undiferensiyasyon mekik (spindle) hücreli sarkomlar şeklinde sınıflandırılmıştır (16).

Neoplastik dokunun hücresel orijininin belirlenmesi ya da ışık mikroskopisiyle konulan tanının doğrulanması için ultrastrüktürel incelemelerin yanı sıra immunohistokimyasal (IHC) teknikler gibi yardımcı tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (7–10).

IHC doku kesitlerinde spesifik epitopların lokalizasyonunu göstermek amacıyla antikor içeren ayırıcıların kullanımı esasına dayalı yardımcı bir tanı yöntemidir (17–19).

Farklı doku antijenlerine karşı geliştirilen mono ve poliklonal antikorların varlığı ve IHC işaretleme metotlarının gelişimi sayesinde YDT'lerinin tanısında insanlarda olduğu kadar (20) veteriner patolojide (21–25) de olumlu gelişmeler kaydedilmiştir.

Bu çalışmada köpeklerde yumuşak dokuda lokalize olmuş benzer hücrel morfoloji ve histopatolojik paterne sahip mezenşimal tümörlerde immunohistokimyasal profilin araştırılması ve hematoxilen-eozin (HE) teşhisleriyle karşılaştırılması; undiferensiye ve anaplastik tümörlerde diferensiyasyon yönünün saptanması ve IHC'nin Anabilim Dalımızda rutin yardımcı tanı yöntemi olarak kullanımı amaçlandı. İnsanlar için geliştirilmiş bazı hazır ticari tümör belirteçlerinin (mono/poliklonal antikorlar) çapraz reaksiyon özelliğinden yararlanılarak formolle tespit edilmiş parafin ile bloklanmış normal ve neoplastik köpek dokularında streptavidin-biyotin immunperoksidaz tekniği ile hücrel antijenlerin işaretlenmesi planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Yumuşak Doku Tümörleri

2.1.1.Yumuşak Doku Tümörleri Hakkında Genel Bilgiler

İnsanlarda daha çok benign lezyonlar şeklinde görülen YDT'lerinin yıllık insidensi 100.000'de 300 olarak bildirilmiştir ve benign, malign tümör oranı 100:1'dir. YDS'lerinin prevalansı karsinomlar ve diğer neoplazilerle karşılaştırıldığında göreceli olarak düşüktür ve bildirilen tüm kanser vakalarının %1'ini oluştururlar. Bir çalışmada yıllık insidensin 100.000'de 1,4 olduğu bildirilmiştir (1).

Köpeklerde YDS'ları tüm deri ve subkutan neoplazilerin %15'ini oluşturan kanser grubudur. Yıllık insidensi 100.000 köpekte 35 vaka olarak bildirilmiştir (6, 16, 26).

YDS'ları insanlarda ve hayvanlarda genel olarak benzer patolojik görünüm, klinik gelişim ve biyolojik davranış sergilemektedir. Önemli bir ayırım noktası, hayvanların tersine, özellikle rabdomiyosarkom örneğinde olduğu gibi insanlarda genç yaşlarda insidensin yüksek oluşudur. Bazı özel tümör tipleri dışında insanlarda görülen pek çok sarkom tipine hayvanlarda da rastlanmaktadır (6).

Küçük hayvanlarda kedilerdeki aşı ilişkili sarkomların (27, 28) dışında bu tümörlerin etyolojisinde rol oynayan faktörler bilinmemekle birlikte köpeklerde radyasyon, travma, ve bazı parazitler ile ilişkilendirilmiştir (6). Öte yandan bazı onkojenik virusların YDS'lerinin gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (29). Literatürde köpeklerde muhtemel aşı bölgesi fibrosarkomları ile vücudun diğer bölgelerinde gelişen fibrosarkomlar karşılaştırılarak, yalnızca kedilerde (27, 28) değil köpeklerde (30) de aşı ilişkili sarkomların oluşabileceği bildirilmiştir. Cinsiyet ya da ırk predileksiyonu saptanmamış, ancak daha çok büyük ırk köpeklerde bildirilmiştir (31–38). YDS'larına idrar kesesinin botrioid rabdomiyosarkomları (39, 40) haricinde büyük

oranda orta yaşlı (ortalama 10,6) (41) ve yaşlı hayvanlarda (3, 12) rastlanmasına rağmen 6 (14) ve 2 (29) aylık yavru köpeklerde de bildirilmiştir.

Hayvanlarda YDT'lerinin en sık rastlandığı bölgeler, ekstremiteler, gövde, retroperiton, göğüs ve baş-boyun bölgesidir (6, 36, 42).

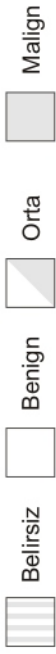
2.1.2.Yumuşak Doku Tümörlerinin Sınıflandırılması

İnsanlarda görülen belli başlı YDT'leri (2) Tablo 2.1'de gösterilmiştir. Evcil hayvanlarda kabul edilen en son sınıflandırma insanlardaki bu sınıflandırmadan adapte edilen ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1998 yılında yayımlanan mezenşimal tümörlerin histolojik sınıflandırmasıdır (43). Küçük hayvanlardaki (kedi ve köpek) YDT'leri bu sınıflandırma çerçevesinde malignite derecelerine göre Tablo 2.2'de gruplandırılmıştır. Mezotelyumun tümörleri, mast hücreli tümörler ve bazı benign neoplastik lezyonlara bu tabloda yer verilmemiştir.

YDT'leri, bağ doku, kas doku, yağ doku ve bunları besleyen damarlarla birlikte benzerlik gösterdikleri erişkin dokunun histogenik yapısı temel alınarak sınıflandırılırlar (1, 2, 5). Yumuşak doku kitleleri şeklinde proliferen olan periferik sinir sistemi tümörleri de gösterdikleri histopatolojik benzerlikler ve ayırıcı tanıda yarattıkları güçlükler sebebiyle bu grup altında değerlendirilir (1, 26).

Tablo 2.1- İnsanlarda Yumuşak Doku Tümörleri- Kumar ve ark (2) 'dan modifiye edilmiştir.

Fibröz	Adipöz	Düz Kas	Çizgili Kas	Vasküler	Periferik Sinir	Fibro-histiyositik	Histogenezi Belirsiz
Nodüler fasiitis	Lipom	Leiomyom	Rabdomiyom	Hemanjiyom	Benign Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri	Benign Fibröz Histiyositom	Granüler Hücreli Tümör
Fibromatozis	Fibrolipom	Leiomyosarkom	Rabdomiyosarkom	Kavernöz	Nörofibrom	Dermato-fibrosarkom Protuberans	Hemanjiyo-perisitom
Yüzeyel	Anjiyolipom	Malign Potansiyeli Belirsiz Tümörler	Embriyonel	Kapillar	Schwannom	Malign Fibröz Histiyositom	Sinoviyal Sarkom
Derin	Miyelolipom	Botrioid	Botrioid	Lenfanjiyom	Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri		Epiteloid Sarkom
Fibrosarkom	Anjiyo-miyolipom	Alveoler	Alveoler	Glomus Tümörü	Nörofibro-sarkom		Alveoler Yumuşak Doku Sarkomu
	Liposarkom	Pleomorfik	Pleomorfik	Hemanjiyo-endotelilyom	Malign Schwannom		
	İyi Diferansiye			Anjiyosarkom			
	Pleomorfik			Kaposi Sarkom			
	Miksoid			Lenfanjiyo-sarkom			
	Yuvarlak Hücreli						



Tablo 2.2- Kedi ve Köpeklerde Yumuşak Doku Tümörleri- Hendrick ve ark (43)'dan modifiye edilmiştir.

Fibröz	Adipöz	Düz Kas	Çizgili Kas	Vasküler	Periferik Sinir	Sinoviyum	Histiyositik	Histogenezi Belirsiz
Fibrom	Lipom	Leiomyom	Rabdomiyom	Hemanjiyom	Travmatik Nörom	Sinoviyal Hücreli Sarkom	Köpek Kutanöz Histiyoisitom	Köpek Hemanjiyo-perisitom
Kollojenöz Hamartom	İnfiltratif Lipom	Leiomyosarkom	Rabdomiyosarkom	Kavernöz	Granüler Hücreli Tümör		Ksantoma	Malign Mezenşiyom
Nodüler Dermatofibrozis	Anjiyolipom		Botrioid Rabdomiyosarkom	Kapillar	Benign Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri		Kutanöz Histiyoisitosis	
Nodüler Fasiitis	Liposarkom			Lenfanjiyom	Nörofibrom		Sistemik Histiyozis	
Miksom	İyi Diferansiye			Skrotal Vasküler Hamartom	Schwannom		Malign Histiyoisitosis	
Fibrosarkom	Pleomorfik			Kaposi Benzeri Sarkom	Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri			
Kedi Aşı-İlişkili Sarkomlar	Miksoid			Hemanjiyo-sarkom	Nörofibro-sarkom			
Köpek İyi Diferansiye Maksillar				Lenfanjiyo-sarkom	Malign Schwannom			
Miksosarkom				Kedi Abdominal Anjiyosarkom				
Malign Fibröz Histiyoisitom								
Storiform Pleomorfik								
Yangısal								
Dev Hücreli								

Benign Orta Malign

2.1.2.1.Fibröz Dokunun Tümörleri

Fibrom

Fibrom (FM), çok miktarda kollojen üreten olgun fibrositlerin iyi huylu tümörüdür (43). Deri ve subkutan dokular başta olmak üzere fibröz konnektif dokunun yer aldığı her anatomik bölgede görülebilir ve hemen her zaman soliter kitlelerdir (13, 44). Ancak köpeklerde en çok ekstremitelerde ve baş bölgesinde lokalize olduğu bildirilmiştir (12). Köpek deri ve derialtı tümörlerinin % 2-3'ünü fibromlar oluşturur (44). Düzgün sınırlı, ancak kapsülsüz, genellikle sert ve elastik yapıda yuvarlak oval veya kubbe şeklinde tümörlerdir.

Neoplastik hücreler iri, solgun, oval veya uzun normokromatik çekirdeğe sahip ve çok çekirdekçikli, belirsiz sitoplazmalı (kollojen stromaya karışan) genellikle iğsi bazen yıldızsı şekilde hücrelerdir (13, 45). Az sayıda mitotik figür izlenir. İç içe geçmiş fibrosit demetleri ve geniş kollojen liflerinden meydana gelen küçük girdap benzeri kıvrılmalar karakteristik histolojik yapısıdır (12, 13, 43, 44). Kollojen lifleri parlak, eozinofilik ve hiyalinize görünümündedir. Solid olabildiği gibi ödem ve müsinöz materyalle ayrılmış gevşek bir yapıda izlenebilir. Farklı derecelerde vaskülarizasyon gösterir ve kitleyi çevreleyen epidermis hiperplazik olabilir. (13).

Schwannomlardan farklı olarak hücresel yoğunluğu düşüktür ve gerçek girdap ya da palizat oluşturmazlar (44).

Fibrosarkom

Fibrosarkom (FS) fibroblastların malign tümörüdür. Köpek deri ve derialtı tümörlerinin yaklaşık %6'sını fibrosarkomlar oluşturur (44). Farklı miktarda kollojen lifleri içeren ve değişen açılarla birbirini kesen farklı genişlikteki immatür fibroblast demetleri bu neoplazilerin asıl histolojik paternidir (43). Nadiren herringbone (dik açıyla birbirini kesen demetlerin balıksırtı şeklinde görünüm alması) yapı ve girdaplar izlenir (28). Hücresel yoğunluğu fibromlara göre çok daha yüksektir. Tümör hücreleri az miktarda sitoplazmaya sahip genellikle mekik-iğsi (fusiform-spindle), oval ya da yıldızsı yapıda hücrelerdir ve genellikle çok çekirdekçiklidir. Anaplastik formları

belirgin hücresel pleomorfizm gösterir. Kötü diferensiye tümörlerde büyük yuvarlak-oval çekirdekli, belirgin çekirdekçikli neoplastik hücreler ile oval ve poligonal yapıda çok çekirdekçikli dev hücreler görülebilir. Şekilsiz hücre grupları ve lenfosit infiltrasyonları da izlenir Kollojen miktarı özellikle anaplastik tiplerinde minimal düzeydedir. (28, 43). Bazı FS'lar değişik miktarlarda müsinöz madde içerir ve yüksek oranda vaskülarizasyon gösterirler. Nekroz, yangı ve ödem görülebilir (30). Sınırlı ya da infiltratif, iyi diferensiye ya da belirgin ölçüde anaplastik olabilen genellikle hızlı büyüyen tümörlerdir. İnfiltrasyon, anaplazi, mitotik figürlerin sayısı maligniteyi belirleyen kriterlerdir (44). Bostock ve Dye (46), mitotik aktivitenin, köpek fibröz konnektif doku sarkomlarının prognozunun belirlenmesinde en önemli kriter olduğunu bildirmişlerdir. Mitotik figür sayısı diferensiyasyon derecesine göre farklılık gösterir. Metastaz çok görülen bir durum değildir, ancak sıklıkla nüks eder (28).

Deride, göğüs boşluğu ve ekstremitelerin subkutan dokusunda, oral ve nazal kavitede gelişebilir (13). Köpeklerde oral kavite tutulumlu YDS'lerinin büyük bir kısmının anaplastik fibrosarkomlar olduğu bildirilmiştir (36).

Özellikle periferik sinir kılıfı tümörlerinden (PSKT) ve leiomyosarkomlardan (LMS) ayrımı güç olabilir. Literatürde köpeklerin kötü huylu periferik sinir kılıfı tümörlerinde (MPSKT) FS'un histolojisine benzer alanlar izlenmiştir (47).

PSKT'lerinde palizatlar (çekirdeklerin paralel dizilimi), demet ve girdap yapıları daha kısa ve kollojen stroması (48) daha belirgindir. LMS'larda ise çekirdekçiklerin oldukça belirgin, çekirdeklerin çok daha yuvarlak yapıda, sitoplazmalarının daha bol, eozinofilik ve vakuoler görünümlü olduğu bildirilmiştir (49, 50).

LMS'lardan ayrımında desmin (intermediate filaman) antijeni belirleyici olabilir, çünkü LMS'ların yaklaşık %80'inin desmin antikoru ile işaretlendiği, ancak FS'larda bu hücresel antijenin sunulmadığı bildirilmiştir (12).

FS'ların genel olarak anti-vimentin hariç diğer yumuşak doku tümör belirteçleri ile negatif immunreaksiyon verdiği veteriner literatürde ve insanlarda bildirilmiştir (17, 51–54).

Malign Fibröz Histiyositom

Malign fibröz histiyositom (MFH) histolojik olarak fibroblastik veya miyofibroblastik diferensiyasyon gösteren ya da her ikisinin arasında bir fenotipe sahip ilkel mezenşimal hücrelerden meydana gelen pleomorfik malign bir tümördür (13, 43, 55). Tipik olarak yarık benzeri damarların etrafında “storiform”(hasır örgüsü) ya da “chartwheel” (jant teli) patern olarak adlandırılan, farklı açılarda kesişen kısa demetler halinde yerleşmiş tombul mekik hücrelerden meydana gelir (55). Pleomorfik alanlar, daha tombul fibroblastik hücreler ve histiyositler içerir, mitotik aktivite daha belirgindir ve bu alanlarda düzensiz, hiperkromatik çekirdekli tuhaf şekilli neoplastik dev hücreler bulunur (56). Ultrastrüktürel düzeyde FS’lar ile büyük benzerlik gösterirler (57).

Yetişkinlerde en yaygın görülen YDS’udur (2). İnsanlarda en çok baş-boyun bölgesi ve ekstremitelerde rastlanır (57). Evcil hayvanlar içerisinde ise en çok köpeklerde görüldüğü bildirilmiştir (12, 43). Ekstremiteler ve gövdede soliter ya da multisentrik subkutan kitleler (10, 55, 58) şeklinde görüldüğü gibi viseral organların tutulumunun görüldüğü metastazik formları da literatürde bildirilmiştir (10, 12, 15). Lokal olarak agresiflik gösteren ve sıklıkla nüks eden bir tümör grubudur. Golden Retriever ve Rottweiler en çok predileksiyon gösteren köpek ırklarıdır (10, 58, 59).

İnsanlarda MFH’lar histolojik patern ve baskın hücre tiplerine göre 5 alt grupta değerlendirilir: pleomorfik-storiform, yangısal, dev hücreli, miksoid ve anjimatoid (57, 60).

Köpeklerde yangısal, (15), dev hücreli (15, 58) ve pleomorfik-storiform (10, 12, 15, 52) tipleri bildirilmiştir, ancak en sık rastlanılan pleomorfik-storiform varyantıdır. Bu alt tipi vakaya göre varyasyon göstermekte birlikte belirgin çekirdekçiğe sahip şekilsiz çekirdekli oldukça büyük yuvarlak-poligonal histiyositik hücreler ile storiform ya da fingerprint (parmakizi) yapıları oluşturan iğsi-fibroblastik hücrelerden meydana gelir (10,12). Lenfosit, plazma hücreleri ve eozinofiller gibi yangısal hücreler ve tuhaf şekilli dev hücreler de izlenir (12, 15, 52).

Osteosarkomlar (10) ve pleomorfik rabdomiyosarkomlar (10, 57) MFH ile benzer histolojik özellikler göstermeleri nedeniyle ayırıcı tanıda dikkate alınması gereken mezenşimal tümörlerdir. Tanıyı desteklemek amacıyla geleneksel ışık mikroskopisinin yanı sıra IHC’den (10, 52, 57) ve elektron mikroskopisinden (57) yararlanılmıştır.

MFH'larda genel olarak s-100 negatifliği (10, 15, 52, 57) ya da zayıf immunreaktivitesi (61), myoglobin (10) ve F-VIII (15) negatifliği, güçlü (60) veya farklı düzeylerde (10, 15) desmin ve kas spesifik aktini (MSA) boyanması ve vimentin pozitifliği (15, 57, 61) bildirilmiştir. Özellikle s-100 pozitifliği daha çok sinir kılıfı tümörü olasılığını düşündürmüştür (57). Literatürde kas aktini, vimentin ve desmin immunoreaktivitesinin fibroblastik/miyofibroblastik fenotiple uyumlu olduğu bildirilmiştir (62).

İnsanlarda (57) olduğu gibi köpeklerde de MFH'un vimentin pozitif olduğu, düz kas aktini (SMA) ve desmin markırları ile değişken pozitiflik gösterdiği literatürde bildirilmiştir (15). Aynı çalışmada doku içi kontrol yapıları hariç tümöral dokunun neoplastik hücrelerinde sitokeratin, s-100 ve F-VIII immunreaktivitesi gösterilmemiştir.

2.1.2.2.Adipöz Dokunun Tümörleri

Lipom

Olgun lipositlerin normal yağ dokusundaki benzerleri gibi solid dizilimler yapan iyi huylu nodüler proliferasyonlarıdır. Köpek deri ve subkutan tümörlerin %9'unu lipomların (LP) oluşturduğu bildirilmiştir (55). Düzgün sınırlı ancak kapsülsüz tümörlerdir. İnfiltratif tipi, göğüs, gluteal kaslar ve arka bacakların proksimalinde derin dokularda lokalize olur (12, 43). Tümöral hücreler küçük hilal şeklinde çekirdeğe sahip geniş vakuoler sitoplazmalı hücrelerdir. Doku içerisinde çok sayıda köpüksü epiteloïd makrofaj görülebilir. Histopatolojik olarak teşhisi güçlük yaratmamaktadır (12).

Liposarkom

Liposarkomlar (LPS) lipositlerin malign proliferasyonlarıdır. Lezyonun insidansının köpeklerde %1'den az olduğu bildirilmiştir (55). İyi diferensiyasyon, anaplastik/pleomorfik ve miksoïd alt grupları bulunur Solid alanlar oluşturan ekzantrik çekirdekli tek belirgin bir sitoplazmik vakuole sahip yuvarlak, poligonal hücrelerin yanı sıra, çekirdek boyutunun değiştiği çok sayıda sitoplazmik vakuole sahip pleomorfik

hücreler de içerebilir (12, 55). Anaplastik/pleomorfik formu MFH'un pleomorfik tipiyle benzerlik gösterir (43). Lipit vakuollerinin gösterilmesi için özel histokimyasal boyalara ve ultrastrüktürel çalışmalara gerek duyulur (12).

2.1.2.3.Kas Dokunun Tümörleri

Vücudun pek çok sisteminde kas dokusu mevcuttur, hem çizgili hem de düz kas komponenti içerir. İskelet kası postural, lokomotor, abdominal ve respiratör (diyafram, interkostal, larinks) kasların yanı sıra dil ve farinks ile kedi ve köpeklerde özefagusun bir kısmını oluşturur. Ayrıca kalp kası da çizgili kas grubundadır. Düz kas dokusu yaygın dağılım gösterir; Gastrointestinal kanal ve genital yolların tunikasında, trakeobronşiyoler dallanmada, vasküler sistemde, deride (erraktör pili kasları) bulunur, dolayısıyla pek çok yerde miyojenik diferensiyasyon gösteren tümöral oluşumlar izlenir (63).

Bazı hücrel antijenler için geliştirilmiş tümör belirteçleri ile farklı histogenetik soya sahip oluşumların farklı dokulara dönüşebilen (puliripotent) hücrelerinin miyojenik diferensiyasyon gösterebilecekleri literatürde belirtilmiştir (64–67).

Düz kas ve çizgili kas tümörleri anatomik yerleşimleri açısından benzerlik gösterirler ve ortak embriyonik orijine sahiptirler (68).

Düz Kasın Tümörleri

Düz kas tümörleri, gastrointestinal kanalda mide ve bağırsakta muskularis mukoza katı (32,49); ağız boşluğunda vasküler düz kas katmanı (69); viseral organların kapsüllerindeki düz kas liflerinden ve trabeküladan (70, 71) gelişebilir. Nadiren vasküler perisitlerden (puliripotent mezenşimal hücreler olarak kabul edilmekte), glandular yapıların miyoepitel hücrelerinden ya da miyofibroblastlardan geliştikleri bildirilmiştir (63).

Dermiste erraktör pililerden ya da vasküler düz kaslardan köken aldığı düşünülen kutanöz düz kas tümörleri de veteriner literatürde bildirilmiştir (72).

Pek çok mekik hücreli tümör ya da tümör benzeri lezyon (Fibrom, fibrosarkom, kollojenöz nevus, dermatofibrom), düz kas diferensiyasyonuna benzer histolojik özelliklere sahip schwannomlar, MPSKT'leri, aşı ilişkili kedi sarkomları, hemanjiyosarkom (HMS), hemanjiyoperisitom (HP), rabdomiyosarkom (RMS) ve undiferensiye sarkomlar (UDS) leiomyom (LM) ya da leiomyosarkom (LMS) olarak yanlış değerlendirilebilirler (63). IHC ile SMA reaktivitesinin saptanması düz kas kökenli tümörlerin ayrımında önemli bir kriterdir (69).

Leiomyom

Düz kasın iyi huylu, kapsülsüz ve invaziv olmayan tümörüdür. Karakteristik olarak normal düz kas dokusunu taklit eden iç içe geçmiş geniş demetler oluşturan sınırları belirsiz, koyu eozinofilik sitoplazmalı iki ucu küt (puro şeklinde) çekik çekirdeğe sahip homojen mekik hücre popülasyonundan meydana gelir. Bu hücreler “herringbone”(balıksırtı) patern şeklinde adlandırılan 90°'lik açıyla kesişen demetler oluşturur ve enine kesitlerde kısa demetler izlenir. Mitotik figür nadiren bulunur. Yüzeyde ülserasyon görülmesine rağmen nekroz izlenmez (63). Kutanoz LM'larda hücrelerin daha heterojen olduğu ve iki ya da çok çekirdekçikli hücrelerin izlenebileceği ve hafif düzeyde anizokaryozis bulanabileceği bildirilmiştir (72).

Köpeklerde dişi genital sisteminin en sık rastlanan tümörleri LM'lardır (73). Dişi genital sisteminin multisentrik LM'larında belirgin fibröz konnektif doku ve miyofibroblastik diferensiyasyonun varlığı nedeniyle daha önceleri fibroleiomyom terimi kullanılmıştır (63).

Ayrıca düz kas dokusu ve vasküler yapının bir arada görüldüğü bir başka neoplastik oluşumun varlığı veteriner literatürde anjiyoleiomyom gibi terimlerin kullanılmasına yol açmıştır (74).

Leiomyosarkom

Köpek gastrointestinal kanalının en yaygın (%20–30) malign mezenşimal tümörleridir (70,75). LM'lardan farklı olarak invaziv tümörlerdir. Sıkıca paketlenmiş, homojen iğsi hücrelerden oluşabileceği gibi farklı histolojik yapıya sahip pleomorfik,

oval-yuvarlak veya uzun çekirdekli mekik hücrelerden meydana gelebilir (49, 50). Çok sayıda mitoz görülebilir. İyi diferensiyasyonlu LMS'lar kesişen geniş demetler meydana getiren bol eozinofilik sitoplazmalı granüler kromatine sahip iki ucu küt puro şeklinde çekirdeğe sahip belirgin çekirdekçikli mekik hücrelerden meydana gelir (76). Diferensiyasyonu daha kötü olanlar sitoplazmanın belirsizleşmesiyle daha hücrel bir görünüm alır. Granüler ya da dağınık kromatinli, yuvarlak ya da çekik çekirdekli yan yana dizilmiş çekirdeklerden oluşan demetler oluştururlar. Kötü diferensiyasyonlu LMS'larda iki ve çok çekirdekli hücreler, anaplastik hücreler ve çok çekirdekli dev hücreler yaygındır. Tümör nekrozu ve yangı ile birlikte belirgin ödem ve kanama izlenebilir (31, 77). Bazı durumlarda iyi diferensiyasyonlu LMS ile LM'ları ayırt etmek güç olabilir. En önemli malignite kriteri mitotik indeks (Genel olarak kabul edilen değer 10 farklı 40x'lık büyütme sahasında 10'dan büyük tipik ya da atipik mitotik figür bulunmasıdır), invazyon ve nekrozdur (49, 63, 69,78).

Işık mikroskopisiyle benzer hücrel morfoloji ve yapısal paterne sahip olmaları sebebiyle FS'lar ile sıklıkla karıştırılan LMS'lar için diffuz anti-SMA ve fokal anti-desmin immunreaktivitesi görülmesi ayırıcı bir bulgudur (69).

Çizgili Kasın Tümörleri

Rabdomiyom

Çizgili kasın iyi huylu tümörüdür. Köpeklerde daha çok subkutan tutulumun (63) bildirildiği rabdomiyomlar (RM) daha az sıklıkla larinks (79, 80) ve dilde (81) izlenir. Tümör oldukça eozinofilik, granüler sitoplazmalı, belirgin çekirdekçikli yuvarlak-oval iri pleomorfik hücrelerden meydana gelmektedir. Mitotik figür az sayıdadır ve sitoplazmik çizgili yapı izlenebilir (79). Neoplastik doku içerisinde çok çekirdekli dev hücreler ve küçük köşeli neoplastik hücrelerin varlığı da bildirilmiştir (81). Vakuoller sitoplazmalı köpük hücreleri izlenebilir, çok fazla vakuol içeren hücreler ışınal tarzda görülen sitoplazmik kalıntıları nedeniyle "spiderweb cell" (örümcek ağı hücresi) şeklinde isimlendirilirler (63).

Rabdomiyosarkom

Gevşek bir stroma içerisinde yapılanmış disorganize, rabdomiyoblastlar için karakteristik koyu eozinofilik sitoplazmalı, hiperkromatik çekirdekli farklı boyutlardaki (pleomorfik) hücrelerden meydana gelir (35). Raket hücreler şeklinde isimlendirilen bu hücrelerin varlığı önemli bir histopatolojik kriterdir (63). Tuhaf şekilli çekirdeklere sahip anaplastik sarkomların çoğu RMS'lara benzer (33, 35). Desmin ve miyogloblin antikorları ile immunreaktivite izlenmesi ayırıcı tanıda önemli bir kriterdir (39, 79, 80, 82). Literatürde köpeklerde idrar kesesinde (çocuklardaki botrioid RMS'a benzerlik gösteren) (39), kalpte (33), iskelet kasında (35), perianal bölgede (34) bildirilmiştir.

Miyogloblin ve alfa sarkomerik aktin, çizgili kas diferensiyasyonu için spesifik tümör belirteçleridir (17). Vimentin, desmin ve kas aktini (HHF35) pozitifliği de kedi ve köpeklerin RM ve RMS'larında bildirilmiştir (63).

Gastrointestinal Stromal Tümörler

İnsanlardaki çalışmalara (65, 83) benzer olarak evcil hayvanlarda da gastrointestinal kanalın daha önceden düz kas kökenli olduğu düşünülen, genellikle mekik nadiren epitelioid ve pleomorfik neoplastik hücrelerden oluşan non-lenfoid mezenşimal tümörlerinin gerçekte heterojen bir grup tümör olduğu IHC yöntemleriyle ortaya konmuştur (24, 25, 84). Gastrointestinal kanalın ultrastrüktürel ve immunohistokimyasal olarak düz kas diferensiyasyonu göstermeyen bu benign ya da malign tümörleri için LM ya da LMS adlandırması yerine "gastrointestinal stromal tümörler" (GIST) terimi kullanılmaya başlamıştır (85). Ancak düz kas kökenli tümörler halen GIST'lerin en geniş grubunu oluşturmaktadır (25, 64). LaRock ve Ginn (64)'in çalışmasında GIST'lerin %49'unda görülen s-100 pozitiflik bu tümörlerin alt gruplarının daha kompleks bir histogenez ve diferensiyasyona sahip olduğunu işaret etmektedir. Genel olarak GIST'lerin miyojenik, nörojenik, miyojenik+nörojenik ve undiferensiyel mezenşimal hücrelerden meydana geldiği düşünülmektedir (24). Öte yandan insan ve hayvanlarda bu tümörlerin barsak duvarının otonom sinir iletimini sağlayan hücrelerin öncülleri olan Cajal hücrelerinden köken aldığı immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir (25, 65, 83, 84). CD117, Cajal hücrelerinde

sunulan bir c-kit proteinidir ve GIST'lerin tanısında kullanılan bir antikor olduğu literatürde bildirilmiştir (17).

2.1.2.4.Vasküler Mezenşimal Tümörler

Hemanjiyom

Hemanjiyomlar (HM) tek kat ve tek tip endotelial hücrelerin çevrelediği eritrositler ile dolu vasküler boşluklardan meydana gelen, dermal ya da subkutan tümörlerdir. Neoplastik hücreler, vasküler kanallar oluşturan iyi diferensiye endotel hücreleridir. Vasküler boşlukların büyüklüğüne göre kavernöz ve kapillar olarak iki varyantı görülmektedir. Kapillar tip HM, daha büyük bazen de pleomorfik çekirdekli hücreler ile daha hücreli bir yapı oluşturur. Az sayıda mitotik figür izlenir (43). Evcil hayvanlar içerisinde en sık köpeklerde rastlanır. Irk ya da seks predispozisyonu pek bilinmemekle birlikte kısa tüylü ve açık renk derili köpeklerde uzun süre güneş ışığına maruz kaldıkları için gelişmiş olabileceği bildirilmiştir. Deride genellikle soliter bazen multiple kitleler şeklinde görülebilir (12). Vasküler endotelden köken aldığı için vücutta pek çok dokuda görülebilir. Köpeklerde en çok dalak ve dermis ile subkutanöz dokularda bildirilmiştir (86).

Hemanjiyosarkom

Endotel hücrelerinin metastaz oranı yüksek, agresif, kötü huylu tümördür (87–90). HMS'lar evcil hayvanlar içerisinde diğer türlere göre en sık köpeklerde görülür (91). İnsanlardaki anjiyosarkomlara benzerlik gösterirler (16). HM'lara göre daha nadir görülür ve 9–10 yaşlı hayvanlar en çok etkilenen yaş grubudur. Alman çoban köpekleri (German shepherdlar) ve Golden retrieverlar ve özellikle kastre edilmiş erkek hayvanlar daha duyarlıdır (16, 86, 91, 92). HMS'lar genellikle daha önceden varolan bir HM'un malign transformasyonu yerine “de novo” gelişim gösterirler. Çok az bir kısmının bu şekilde geliştiği bildirilmiştir (12). Vasküler endotelden köken aldığı için vücutta pek çok dokuda görülebilir (87, 89, 93). Dalak en çok tutulumun olduğu organdır (86, 90–

92, 94) ve makroskobik olarak nodüler hiperplazi ya da hematoma benzer (71, 92, 94, 95). Literatürde köpeklerdeki retroperitoneal sarkomların büyük bir kısmını HMS'ların oluşturduğu bildirilmektedir (96). Genellikle multisentrik bir neoplastik lezyondur ve deri tutulumu bu multisentrik sendromun bir parçasıdır. Bazı köpek dermal HMS'larının kronik solar iridasyona bağlı olarak geliştiği bildirilmiştir. Kısa tüylü, açık renkli ırklar (greyhound, whippet ve pit bull gibi) risk grubudur (12). 104 köpekte yapılan bir araştırmada HMS olgularının 65 (%62)'inin dalakta, 18 (%17)'inin göğüs ve ekstremitelerin yumuşak dokusunda, 6'sının karaciğerde (%6), 4'ünün (%4) baş bölgesinde, 3 (%3)'ünün kalpte, yine 3 (%3)'ünün uzun kemiklerde, 2 (%2)'sinin akciğerde ve birer (ayrı ayrı %1) vakanın da idrar kesesi, aorta ve prostatta geliştiği bildirilmiştir (91). Day ve ark (97)'in çalışmasında 38 vakasının (%44'ünü) neoplastik lezyonların oluşturduğu toplam 87 adet splenik biyopsinin 17'sini HMS'lar oluşturmaktadır.

Histolojik olarak çoğunlukla küçük yarıklar, bazen de kavernöz kanallar şeklinde vasküler boşluklar oluşturan immatür endotel hücrelerinden meydana gelir. Neoplastik hücreler çok değişkendir; mekik, poligonal veya oval şekilli olabilir. Yarıkları döşeyen pleomorfik neoplastik hücrelerin belirgin hiperkromatik yuvarlak çekirdekleri ve geniş sitoplazmaları vardır. Bu vasküler boşluklar farklı miktarda kan içerir ve tromboz görülebilir, ayrıca hemoraji ve nekroza rastlanır. (88, 90). Sıklıkla mitotik figür görülür ve neoplastik oluşum içerisinde hemosiderin yüklü makrofajlar ve polimorfnükleer hücre infiltrasyonları izlenir (87).

Geleneksel olarak faktör VIII (F-VIII) immunpozitifliğinin HMS'lar için diagnostik olduğu düşünülmektedir. Literatürde köpeklerdeki HMS vakalarında güçlü anti-F-VIII (87, 88, 98) ve anti-vimentin (87) pozitifliği bildirilmiştir.

2.1.2.5.Periferik Sinirlerin Tümörleri

Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri

Periferik sinir kılıfı tümörleri (PSKT) schwann hücreleri, modifiye schwann hücreleri, fibroblastlar ya da perinöral hücreler veya hem schwann hücreleri hem de perinöral hücrelerden köken aldığı düşünülen heterojen bir grup tümörü içerir (22, 43, 99). Neoplastik kitle sadece schwann hücrelerinden oluşuyorsa schwannom/malign schwannom; hem schwann hücreleri hem de perinöral hücrelerden oluşuyorsa nörofibrom/nörofibrosarkom terimleri kullanılır. Bu tümöral yapıların hepsi birden PSKT'leri başlığı altında toplanmıştır (12).

Periferik sinir tümörleri periaksonal Schwann hücrelerinin çoğunlukla benign olan neoplastik transformasyonu sonucu gelişir ve bu tip tümörler schwannomlar olarak adlandırılır. Bir sinir ya da sinir kılıfı içinde geliştikleri için nörinom terimi de kullanılmıştır. Nörofibrom (NFM) ve nörofibrosarkom (NFS) sinir kılıfı içerisinde endonöral veya epinöral yerleşimli fibroblastlardan köken aldığı düşünülen tümörleri ifade etmek için kullanılan kavramlardır. Perinöral fibroblastomlar olarak da tanımlanırlar. Schwann hücre tümörü daha az kullanılan bir terimdir. Bu tümörlerin miyelin üreten Schwann hücrelerinden mi yoksa endo-, peri- ve epinörium üreten fibroblastlardan mı geliştiği hala tartışmalı bir konudur (100).

PSKT'lerinin diğer pek çok YDT'ü ile benzer morfolojik özellikler göstermeleri sebebiyle ışık mikroskopuyla doğru olarak teşhis edilemedikleri ve tümörün gerçek prevalansının çok daha yüksek olduğu düşünülmektedir (7). En güvenilir sınıflandırma tümörün ultrastrüktürel ve immunohistokimyasal özelliklerinin ortaya konması ile mümkündür.

PSKT'lerinin mekik şekilli neoplastik hücrelerinin vimentin, (22, 47, 99, 101) ve s-100 için immun pozitif (7, 22, 47, 99, 101); sitokeratin (99, 101), SMA ve F-VIII (22, 99) için negatif olduğu gösterilmiştir.

Literatürde genç köpeklerde (2 yaşlı) spinal kanalı tutan malign melanotik schwannom (102) ve 1 yaşında bir köpekte diyafram tutulumlu osseöz diferensiyasyon gösteren PSKT (7) bildirilmiştir. PSKT'lerin genel olarak soliter kitleler şeklinde geliştiği gösterilmiştir (102).

Benign Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri

Schwannom

Tümöral kitle histolojik olarak iç içe geçmiş demetler, anaforlar ve storiform patern oluşturan iri belirgin çekirdekçikli, veziküler mekik çekirdekli iğsi şekilli yoğun hücresel tabakalardan meydana gelir. İnsanlarda bu görüntü Antoni Tip A paterni şeklinde tanımlanır (103). Veteriner literatürde köpeklerin PSKT'lerinde de bildirilmiştir (22). İnsanlardaki schwannomlarda birbirine paralel olarak yerleşmiş, merkezde kalan sitoplazmik yığının her iki kenarında çit şeklinde dizilim gösteren (palizat) çekirdeklerin oluşturduğu Verocay cisimciklerinin köpeklerde çok nadir görüldüğü bildirilmiştir. Gevşek fibröz ve miksomatöz stroma içerisine yerleşmiş küçük yuvarlak hiperkromatik çekirdekli hücrelerin oluşturduğu hücresel yoğunluğu düşük alanlar da mevcuttur ve insanlarda Antoni B tip patern olarak tanımlanır (48, 104). Veteriner literatürde köpeklerin PSKT'lerinde de bu patern bildirilmiştir (22, 99).

Nörofibrom

Veteriner literatürde daha önceki yıllarda schwannom ile eş anlamlı olarak kullanılan (55) nörofibrom terimi yerine her iki neoplastik oluşumun BPSKT başlığı altında toplandığı WHO tarafından yayımlanmış güncel sınıflandırma kabul görmektedir (43). İnsanlarda nörofibromların da schwann hücrelerinden köken aldığı, ancak fibroblastlar ve perinöral hücreler gibi diğer komponentlerin de yer aldığı karışık bir neoplastik hücre popülasyonundan meydana geldiği bildirilmiştir (48). İnsanlarda NFM'lar histolojik olarak ince ve dalgalı çekirdeğe sahip birbirine çapraz demetler oluşturan iğsi hücre popülasyonundan meydana gelir ve gerçek kapsüllü tümörlerdir. Multiple kitleler yapan ve mitotik aktivite ve hücresellüğün yoğun olduğu, malign transformasyon alanlarının varlığı insanlarda von Recklinghausen hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (103).

Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri

Köpeklerdeki PSKT'lerinin çoğu kötü huyludur ve rutin kesitlerde hücre kökeninin (schwann, perinörial ya da fibroblastik) belirlenmesi oldukça güçtür, bu nedenle bu tümörler için periferik sinirlerin malign tümörleri (MPSKT) şeklinde bir sınıflandırma yapılmıştır (48). Tutulum yeri, makroskopisi, biyolojik davranışı ve histolojik özelliklerindeki benzerlik nedeniyle köpek hemanjiyoperisitomları (KHP) ayırıcı tanıda değerlendirilmesi gereken tümör grubudur. Bu tümörlerin değişik histolojik kökene sahip ya da aynı tümörün farklı varyantları olup olmadığı tartışmalıdır. PSKT'lerinde girdap yapıları daha az belirgin, hücreler arası fibril ve müsinoz matriks daha fazla, işçi hücreler daha incedir (43).

S-100, nöron spesifik enolaz (NSE) ve gliyal fibriler asidik protein (GFAP) immunreaktivitesi, MPSKT'lerinin KHP'lardan ayrımında nörojenik diferensiyasyonun gösterilmesi bakımından oldukça önemlidir (99). SMA antikoru da ayırıcı IHC analizinde kullanılması gereken bir tümör belirteçidir, çünkü KHP'ların büyük oranda anti-SMA pozitifliği gösterdiği bildirilmiştir (22).

MPSKT'lerin multipotent özelliği, tümör hücrelerinin farklı mezenşimal ya da epitelyal diferensiyasyon göstermesine yol açar. Melanositik (102), kondro-osseöz (7), glandüler (47) diferensiyasyon gösteren tipleri köpeklerde bildirilmiştir ve kötü prognozla seyreder (47).

Granüler Hücreli Tümör

Histogenezi tam olarak aydınlatılamamış olsa da schwann hücrelerinden köken aldığı düşünülen eozinofilik sitoplazmik granüllere sahip belirgin çekirdekçikli iri epitelooid hücreli benign tümörlerdir (105). Köpeklerde genellikle oral kavite (106) ve sıklıkla da dilde lokalize olduğu bildirilmiştir (107).

İmmunohistokimyasal çalışmalar değişik türler ve değişik lokalizasyon bölgelerinde gelişen ve ışık mikroskopisiyle ortak morfolojik özellikler sergileyen granüler hücreli tümörlerin (GHT) ortak bir histogeneze sahip olmadığını ve farklı kökenden gelen birçok değişik hücreden diferansiye olabileceğini göstermiştir (106–107).

2.1.2.6.Sinoviyal Sarkom

Eklemleri döşeyen sinoviyal epitel ile olan morfolojik benzerliği sebebiyle bu isimle adlandırılan sinoviyal sarkomlar (SS), insanlarda hem mezenşimal hem de epitelyal komponenti birlikte içeren karakteristik bifazik paterne sahip ya da sadece monofazik mekik hücrelerden oluşan YDT'leri olarak tanımlanır (108). Histolojik olarak FS benzeri alanlar oluşturan neoplastik mezenşimal hücrelerin çevrelediği düzensiz yarık benzeri boşluklar ve yalancı glandüler yapılar yapan neoplastik epitelyal hücrelerden meydana gelir (56, 108). Bu neoplastik hücrelerin morfolojik benzerlik göstermesine rağmen sinoviyum hücrelerinden köken almadığı ultrastrüktürel ve immunohistokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir (108). SS'lar keratin, epitelyal membran antijeni (EMA) ve karsinoembriyonik antijen (CEA) gibi epitelyal belirteçler ile immunreaktivite göstermektedir. Oysa sinoviyal hücreler vimentin için pozitif ve epitelyal belirteçler ile negatiftir (108, 109). İnsanlarda SS'ların özelleşmiş artrojenik mezenşim hücrelerinin tümöründen çok hem nöroektodermal hem de sinir kılıfı diferensiyasyonu gösteren mezenşimal bir tümör olduğu hipotezi de önerilmiştir (109).

Veteriner literatürde hemen yalnızca köpeklerde bildirilen SS'ların insanlardaki gibi bifazik karakterli gerçek SS'ların epitelyal komponentini oluşturan hücrelerle aynı histogeneze sahip olup olmadığı tartışmalıdır (56). WHO'nun evcil hayvanlardaki mezenşimal tümörler sınıflandırmasında sinoviyoblastik mezenşimden köken alan epiteloid ve mekik hücreli bir tümör olduğu kabul edilmiştir (43). Son yıllarda yapılan yayınlarda köpeklerde hem bifazik hem monofazik hem de kötü diferensiye SS vakaları bildirilmiştir (37, 110). Ayrıca insanlardaki SS vakaların çoğunun kalça, göğüs duvarı, kol, akciğer-plöra gibi eklemlerden uzak bölgelerde ve derin dokuda lokalize olduğu bildirilirken (109), köpeklerde tam tersi eklem bölgelerinin tutulumu (diz, dirsek ve kalça eklemi) gösterilmiştir (37, 54, 110).

2.1.2.7.Hemanjiyoperisitom

Vasküler perisitlerden köken aldığı düşünülen bu tümörün histogenezi tam olarak bilinmemektedir (13, 55). İnsanlarda yapılan ultrastrüktürel çalışmalara rağmen bu neoplastik oluşumun gerçekte perisitik kökenli olup olmadığı, hatta böyle bir neoplastik oluşumun varlığı dahi tartışmalıdır (111). Evcil hayvanlar içerisinde sadece köpeklerde görülen bu tümör kollojenöz ve musinöz bir stroma içerisine yerleşmiş ve genellikle eritrositlerden yoksun kapillar damarlar çevresinde konsantrik dizilimler oluşturan mekik hücrelerden meydana gelir (43, 55, 112). Veziküler çekirdekli iri epitelooid hücresel komponente sahip formları da köpeklerde bildirilmiştir (21). Perivasküler girdaplar oluşturan bu hücresel dizilim “fingerprint” (parmak izi ya da “onion skin” (soğanın enine kesitindeki halka yapısı) paterni olarak adlandırılır ve köpek hemanjiyoperisitomlarının (KHP) değerlendirilmesinde kullanılan histolojik kriterlerden biridir (42, 66, 21). Bu fingerprint paternin merkezinde her zaman vasküler bir yapı görülmeyebilir (66). Köpek hemanjiyoperisitomlarında (KHP) tipik parmak izi paterninin yanı sıra kısa demet oluşumları, palizat yapıları (66) ve storiform patern (21) bildirilmiştir. Schwannomlarla olan benzerliği nedeniyle neoplastik hücrelerin perisitik yerine nöral kökene sahip olduğu düşünülmektedir (13, 55). İnsanlardaki HP’lar ile KHP’lerinin farklı antijenik karakter göstermeleri sebebiyle farklı histogeneze sahip olduğu literatürde bildirilmiştir (66). Buna paralel olarak insanların HP’lerinde perisitik bir belirteç olan kas aktini (HHF35) ile immun reaktivite izlenmeyişi bu tümörlerin perisitik kökeni hakkında tartışma yaratmaktadır (62). Literatürde KHP’lerinde HHF35 (kas aktini), desmin ve s-100 pozitifliği bildirilmiştir (66). Bir başka çalışmada tümü s-100 negatif olan KHP’nin immunohistokimyasal profilinin vasküler kökeni işaret ettiği gösterilmiştir (21). Öte yandan endotelial hücre belirteci olan anti-F-VIII ile neoplastik hücrelerde boyanma izlenmemiştir (21, 113).

2.1.2.8.Dermatofibrosarkom Protüberens

Dermatofibrosarkom protüberens (DFSP) tipik storiform patern oluşturan iri bir örnek fibroblastik hücrelerden meydana gelen kapsülsüz subkutanöz yerleşimli bir tümördür (55, 114). İnsanlarda genellikle yetişkinlerde görülen bu tümör dermis ve subkutanöz dokuları tutan, yavaş büyüyen nodüler kitleler meydana getirir (2). Belirgin storiform patern gösteren fibrosarkomatöz alanlara sahip olduğu da literatürde gösterilmiştir (114). Veteriner dermatopatolojide (55) malign fibröz histiyositomların alt grubu olarak kabul edilmekte birlikte WHO'nun 1998 yılında yayımladığı (43) evcil hayvanların mezenşimal tümörleri sınıflandırmasına dahil edilmemiştir. İnsanlarda orta düzeyde malignite gösteren fibrohistiyositik neoplaziler arasında yer alan (2, 115) bu tümör, tanım olarak veteriner literatürde kullanılmamaktadır.

2.2.Diagnostik Yöntemler

İnsanlardaki onkolojik vakaların %90'ının tanısı HE ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskopisiyle yapılmaktadır (116). Veteriner patolojide de bu geleneksel tanı metodunun geçerliliği benzer oranlarla ifade edilmektedir. Vakaların %10'unda ise özel histolojik boyama yöntemleri, immunohistokimya gibi özel teknikler ve ultrastrüktürel incelemeler gerekmektedir (6, 117).

Farklı tümör gruplarının radyosensitivite, lokal biyolojik davranış, bölgesel ve sistemik metastaz eğilimlerindeki çeşitlilik sebebiyle tümörlerin immunfenotipinin ya da kökeninin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bazı tümörlerin biyolojik davranışları ise tümörün histolojik kriterlerle saptanan malignite derecesi (grade) ile ilişkilidir. (117). YDT'leri çok heterojen bir grubu temsil ettikleri için tümüne birden uyarlanabilecek tek bir prognostik faktör bulmak oldukça güçtür. Tümörlerin malignitelerinin derecelendirilmesi tümörün diferensiyasyon yönü ve hücre tipi ile ilişkili olduğu kadar bir dizi histolojik parametrenin birlikte değerlendirmesini de gerektirir (1). Hücresel diferensiyasyon, mitotik indeks ve nekroz en önemli histolojik kriterlerdir (3, 117–119). Ancak hücresellik oranı, hücresel pleomorfizm/anaplazi, ekspansif ya da infiltratif ve invaziv büyüme, matriks miktarı, kanama, yangı derecesi ve tümörün derinliği gibi faktörler de değerlendirmeye alınır (1).

Neoplastik lezyonların diferensiyasyon yönünün saptanması ve histogenezinin belirlenmesi için mikroskopik incelemelerde dikkate alınması gereken üç önemli parametre bulunmaktadır (120):

- ✓ Hücrelerin morfolojisi,
- ✓ Hücrelerin yapılanması (patern ve matriks)
- ✓ Hücrelerin iç kimyası (immunohistokimyasal profili)

Neoplastik lezyonların histolojik yapısı, morfolojisi ve stromal özelliklerine göre bir dizi ayırıcı diagnostik kategori oluşturulmuştur. Buna göre YDT'leri 6 grupta değerlendirilir (120):

1. Demetler yapan mekik hücreli tümörler: Hücresel schwannomlar, leiyomiyosarkomlar, mekik hücreli rabdomiyosarkomlar, sinoviyal sarkomlar, fibrosarkomlar ve malign periferik sinir kılıfı tümörleri bu grupta yer alır

2. Miksoid lezyonlar: Kondromlar, nörofibromlar, malign fibröz histiyositomlar, dermatofibrosarkom protüberens ve leiyomiyosarkomlar dahil pek çok YDT'ü miksoid patern gösterebilir.

3. Epiteloid tümörler: Bu tümörlerin ayırıcı tanısında IHC'nin önemi büyüktür. Metastazik karsinomlar, melanomlar ve büyük hücreli lenfomalardan mutlaka ayrılmalıdır. Periferik sinir kılıfı tümörleri, leiyomiyomlar, leiyomiyosarkomlar, hemanjiyosarkomlar ve bifazik sinoviyal sarkomlar epiteloid formda gözükebilir.

4. Yuvarlak hücreli tümörler: Epiteloid tümörlerde olduğu gibi lenfomalar ve karsinomlardan immunohistokimyasal olarak ayrılmalıdır.

5. Pleomorfik tümörler: Malign fibröz histiyositom, liposarkom, rabdomiyosarkom, malign periferik sinir kılıfı tümörleri ve leiyomiyosarkomların pleomorfik varyantları görülebilir.

6. Hemorajik ve vasküler lezyonlar: Sarkomlar genel olarak vaskülarizasyonu yüksek tümörler olsalar da pek çok vasküler tümör, hemorajik bir kitle görünümünde değildir. Vasküler lezyonları değerlendirirken damar içi ya da damar dışı lezyonlar olup olmadığına dikkat edilmelidir.

YDT'lerini oluşturan neoplastik hücreler fibroblastik, miyofibroblastik ve fibrohistiyositik tümörlerde genel olarak demetler, balıksırtı ya da storiform yapı; nöral tümörlerde palizatlar oluştururlar (120).

2.2.1.İmmunohistokimya

Doku kesitlerinde spesifik epitopların lokalizasyonunu göstermek amacıyla antikor içeren ayıraçların kullanımı esasına dayalı yardımcı tanı yöntemidir (17–19) Formol çözeltisinde tespit edilmiş parafine gömülmüş doku örnekleri, normal ve neoplastik dokularda hücrel antijenlerin immunohistokimyasal olarak tespitinde en sık kullanılan materyallerdir. Pratik oluşları, iyi morfolojik korunma sağlayışları ve geriye dönük (retrospektif) çalışmalara olanak tanımaları açısından tercih edilirler. Ancak fiksasyon ve doku takip işlemi sırasında bazı antijenik bölgelerin hasar görebildiği bildirilmiştir (37, 57).

2.2.1.1.Yumuşak Doku Tümörlerinin Tanısında İmmunohistokimyanın Kullanımı ve Önemi

YDT'lerinin morfolojik olarak heterojenite göstermeleri ve farklı hücrel kökene sahip tümör gruplarının ortak histolojik özellikler sergilemeleri, bu tümörlerin geleneksel morfolojik teşhisinde güçlükler yaratmaktadır. (7–10, 112).

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan pek çok çalışmada IHC'nin özellikle anaplastik ve pleomorfik tümör tiplerinde tanıya katkısı değerlendirilmiş ve bazı tanımlanamamış olgular IHC özelliklerine göre yeniden sınıflandırılmıştır (20, 23, 113, 121, 122).

Gatter ve ark (123)'ün bir retrospektif çalışmasında histolojik orijini tanımlanamamış 120 neoplastik materyal monoklonal ve poliklonal antikorları içeren bir antikor panel ile işaretlenerek 8 vaka dışındaki tüm tümöral dokular köken aldıkları hücre tipine göre yeniden adlandırılmıştır.

Düz tüylü retriever ırkı köpeklerde yapılan bir çalışmada daha önceden undiferensiye sarkom olarak adlandırılan hücrel pleomorfizm gösteren tümör olguları (n:14) IHC ile WHO sınıflandırması göre MFH olarak yeniden adlandırılmışlardır (15). Aynı çalışmada ayırıcı tanıda FS, RMS, SS, LMS, KHP, NFS'ların immunohistokimyasal profili de değerlendirilmiş ve YDS'lerinin ortak histopatolojik

özellikler sergilemeleri nedeniyle geleneksel ışık mikroskopisiyle teşhislerinin güç olduğu ve yardımcı teşhis yöntemleri gerektirdiği belirtilmiştir.

2.2.1.2. İmmunohistokimyasal Tümör Belirteçleri:

İnsanlarda normal hücrelerde ve neoplastik dokularda sunulan antijenik yapılar ile bu antijenlere karşı geliştirilmiş antikorlar (17) Tablo 3’de gösterilmiştir. Evcil hayvanlarda yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda bu antikorların çapraz reaksiyon özelliklerinden yararlanılır (112, 121)

Tablo 2.3- İnsanlarda Yaygın Olarak Kullanılan Tümör Belirteçleri – Folpe ve Gown (17)’dan.

Antikorlar	Sunulduğu Normal ve Neoplastik Dokular
Sitokeratinler	Karsinomlar, epiteloid sarkomlar, sinoviyal sarkomlar, bazı anjiyosarkomlar ve leiomyosarkomlar, mezoteliomlar, ekstrarenal rabdoid tümörler
Vimentin	Sarkomlar, melanom, bazı karsinom ve lenfomalar
Desmin	Benign ve malign düz kas ve iskelet kası tümörleri
Glial Fibriler Asidik Protein	Gliomlar, bazı schwanomlar
Nörofilaman	Nöroblastik tümörler
Pan-Kas Aktini	Benign ve malign düz kas ve iskelet kası tümörleri, miyofibroblastik tümörler, psödotümörler
Düz Kas Aktini	Benign ve malign düz kas tümörleri, miyofibroblastik tümörler, psödotümörler
Miyojenik Regülatör Proteinleri	Miyogenin Miyod1
Sarkomerik Aktin	Rabdomiyosarkom
s-100 proteini	Rabdomiyosarkom
Epitelial Membran Antijeni	Melanom, benign ve malign periferik sinir kılıfı tümörleri, kartilaginöz tümörler, normal adipöz doku, langerhans hücreleri
CD31	Karsinomlar, epiteloid sarkomlar, sinoviyal sarkomlar, bazı sinir kılıfı tümörleri (perinörinom), meningiyom, büyük hücreli anaplastik lenfomalar
Faktör-VIII	Benign ve malign vasküler tümörler
CD34	Benign ve malign vasküler tümörler, soliter fibröz tümörler, hemanjiyoperisitom, epiteloid sarkom, dermatofibrosarkom protuberans
CD99	Ewing sarkomu/ ilkel nöroektodermal tümör, bazı rabdomiyosarkomlar, bazı sinoviyal sarkomlar, lenfoblastik lenfom, mezenşimal kondrosarkom, küçük hücreli osteosarkom
CD45	Lenfoma
CD30	Büyük hücreli anaplastik lenfomalar
CD68	Makrofajlar, fibrohistiyositik tümörler, granüler hücreli tümörler, bazı sarkomlar, melanomlar, karsinomlar
Melanozom-Spesifik Antijenleri	Melanomlar, anjiyolipomlar, berrak hücreli sarkomlar, melanositik schwanomlar
CD117a	Gastrointestinal stromal tümörler, Cajal hücreleri
Uleks Lektin	Kaposi sarkomlar, anjiyosarkomlar, endotel hücreleri

Çalışmada Kullanılan Bazı Tümör Belirteçlerinin Genel Özellikleri

İntermediate Filamanlar

Tüm ökaryotik canlılarda bulunan hücre iskeletinin temel komponentlerini oluşturan bir grup proteindir ve beş temel alt grubu (vimentin, sitokeratinler, desmin, neurofilamanlar, glial fibrilar asidik protein) bulunur (17). Bu proteinlerin fonksiyonu tamamıyla bilinmemesine rağmen hücresel bütünlüğünün, şeklinin ve organel yerleşiminin sağlanması ve hücre ve hücre içi hareketlerin düzenlenmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir (113). Bunlara karşı geliştirilen antikorlar, hem insan hem de hayvan patolojisinde yaygın olarak kullanılan tümör belirteçleridir (112, 122).

Vimentin

Tüm mezenşimal hücreler tarafından sunulan bir proteindir. Erken embriyogenez süresince tüm hücreler tarafından sunulur ve aşamalı olarak bazı hücrelerde tip-spesifik intermediate filamanlar ile yer değiştirir (17). Bazı mezenşimal dokularda ise bu proteinlerle birlikte sunulur (kas hücrelerinde desmin, bazı schwann hücrelerinde GFAP ile) (113). Vimentinin köpeklerde fibroblastlar, endotel hücreleri ve bazı düz kas hücrelerini kapsayan çeşitli mezenşimal hücrelerde sunulduğu literatürde (113, 121) gösterilmiştir.

Vimentin hem insanlarda hem de köpeklerde pek çok tümörde mezenşimal orijini göstermek amacıyla yaygın olarak kullanılmıştır (17, 21, 22, 37, 66, 112, 124). Nöroblastomlar dışında tüm YDT'lerinde vimentin sunulduğu bir başka çalışmada da bildirilmiştir (53).

Tüm epitelyal hücrelerin sitokeratin, tüm mezenşimal hücrelerin de vimentin içerdiği bilinmekle birlikte (17, 125) vimentinin aynı zamanda bazı sarkomatoid ve anaplastik karsinomlarda (113) bir pulmoner karsinom ve bir hemanjiyosarkom vakasında (121) ve bifazik ve monofazik SS'larda (108) keratin ile birlikte sunulduğu literatürde gösterilmiştir.

Sitokeratinler

Genel bir eğilimle moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılan sitokeratinler bir dizi (20'nin üzerinde) intermediate filaman proteini içerir. Karsinom vakalarında yüksek sensitivite gösteren ve epitelyal tümörlerin non-epitelyal tümörlerden ayırımında yaygın olarak uygulanan tümör belirteçleridir. Gerçek epitelyal diferensiyasyon gösteren sinoviyal sarkom ve epitelioid sarkom gibi mezenşimal tümörlerde normal keratin sunulumunun yanı sıra, gerçek epitelyal diferensiyasyon göstermeyen bazı tümörlerde (düz kas tümörleri, melanomlar, endotelyal hücre tümörleri) farklı bir dizi hedef hücre popülasyonunda perinükleer yerleşimli ya da sitoplazma içerisinde noktalar tarzında kural dışı sitokeratin (özellikle anti-sitokeratin 8 ve 18 ile) sunulumu izlenmiştir. LMS'ların da en azından %30'unun keratin içerdiği literatürde belirtilmiştir (17).

Düşük moleküler ağırlıklı sitokeratinlerin bazal epidermal katmanlarda ve glandüler epitelyumda (113) büyük sitokeratin moleküllerinin ise str. korneum'da (121) lokalize olduğu bildirilmiştir. Tüm epitelyal hücrelerde bulunmakla birlikte hücrenin diferensiyasyon derecesine göre hacimce ya da kantitatif olarak farklılaşırlar (37).

Kas Diferensiyasyonu Belirteçleri

Üç tip kas diferensiyasyonu görülür. İlki RM ve RMS'larda olduğu gibi iskelet kası diferensiyasyonudur. İkincisi LM ve LMS'larda izlenen "gerçek" düz kas diferensiyasyonu ve sonuncusu tümörlerin stromal reaksiyon sahasında ve iyileşen yara dokusunda hücre popülasyonunun oldukça büyük bir kısmını oluşturan miyofibroblastlarda izlenen "kısmi" düz kas diferensiyasyonudur. Kas diferensiyasyonunu gösteren belli başlı tümör belirteçleri desmin, aktinin çeşitli izoformları ve miyojenik regülatör proteinlere karşı geliştirilmiş antikorlardır (17).

Desmin

Hem düz kas hem de iskelet kası hücrelerinde sunulan intermediate filaman proteinlerinden biridir. Nadiren miyofibroblastlarda izlenir. Bu nedenle miyofibroblastların gerçek düz kas hücrelerinden ayırımında aktin ile birlikte kullanılır (17).

Aktin

Farklı izoformları bulunur. Sırasıyla tüm kas aktinleri için spesifikite gösteren HHF35 ve düz kas aktini izoformlarını tanıyan 1A4 klonu (α -SMA) en yaygın kullanımı olan antikorlardır (17).

Düz kas aktini (SMA) düz kas diferensiyasyonu için spesifiktir (108). Düz kas ve tümörlerinin, iskelet kası ve tümörlerinden ayrımında kullanılır. SMA izoformları miyofibroblastlar tarafından da sunulur, ancak genel olarak bu hücrelerdeki sunulum paterni, düz kas hücrelerindeki bir örnek sitoplazmik boyanmadan farklı olarak sitoplazmanın periferinde sınırlı kalmış ışık huzmesi (wispy) ya da ray benzeri (tram-track) reaksiyon tarzındadır. Bir monoklonal antikor (Mab) olan asr-1 klonu ise sarkomerik aktinleri yani iskelet ve kalp kası aktinlerini tanır (17).

Literatürde köpek düz kas tümörleri (25, 29, 31, 49, 50, 64, 69, 72, 76, 78, 84, 126), GIST'ler (25, 84) ve MFH'larda (54) α -SMA için pozitif immunreaktivite bildirilmiştir. SMA antikoruna benzer morfolojiye sahip köpek PSKT'leri ile KHP'ların immunfenotipik ayrımında kullanılmıştır (22).

Kas aktini (HHF35) ve desmine karşı geliştirilen antikorların insanlarda non-neoplastik normal dokularda, miyokardta çizgili kas lifleri, iskelet kası, arterlerin muskular katı, tüm gastrointestinal kanalın düz kas katmanı, miyometriyumun ve prostatın düz kas katmanı ile reaksiyon verdiği gösterilmiştir (62). Desminden farklı olarak HHF35 klonunun köpek dokularında kas hücrelerinin yanı sıra miyoepitelyal hücreler (66) ile arteriyol, venül ve kapillar damarların dış hücre katmanı yani perisitler ile de reaksiyon verdiği gösterilmiştir (21). Literatürde anti-desmin immunreaktivitesi göstermeyen bir LMS alanına bitişik normal köpek böbrek dokusunda pek çok tubuler epitelin bazal kısımlarında ve bir splenik hemanjiyosarkom vakasında mekik hücreler ile organ kapsülünde desmin lokalizasyonu izlenmiştir (108).

Desmin immunreaktivitesi veteriner literatürde LMS (25, 31, 32, 49, 66, 69, 76, 78, 126), RMS (33–35, 39, 40), MFH (10, 52, 61) ve KHP (21, 66) gibi köpek YDS olgularında bildirilmiştir.

HHF35 immunreaktivitesi köpeklerde LMS (29, 66, 78), RMS (35), MFH (61) ve KHP (66) olgularında bildirilmiştir.

Öte yandan kas spesifik aktini, HHF35'in desmine göre daha spesifik ve güçlü reaksiyon verdiği köpeklerdeki çeşitli YDT'lerinde gösterilmiştir (29, 61, 66, 78, 81).

MFH, KHP ve bazı FS vakalarında saptanan yüksek oranda aktin ve desmin reaktivitesinin miyofibroblastik diferensiyasyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (10, 15, 21, 51, 52, 57, 61, 66, 124).

Nöral Diferensiyasyon Belirteci

S-100

20-kDa ağırlığında Ca bağlayıcı asidik bir proteindir. Amonyum sülfat içerisinde %100'lük çözünürlük gösterdiği için bu şekilde isimlendirilmiştir. Üç izotipi vardır: α -, α - β ve β - β . İlki miyokartda, ikincisi melanositler, glialar, kondrositler ve deri eklentilerinde bulunur. Üçüncü izotipi de Langerhans hücreleri ile schwann hücrelerinde görülür (17). Neoplastik dokularda α ve β izotipleri malign melanomlar ve kondrosarkomlarda sunulurken, sadece β izotipi malign schwannomlarda mevcuttur. Ancak pek çok ticari antikor bu ikisinin ayrımı yapılmadan hazırlanmıştır (53).

Spesifik olmamakla birlikte PSKT'lerinin ayrımında kullanılan önemli bir sinir kılıfı diferensiyasyonu belirtecidir (17).

İnsanlarda MPSKT'lerinin ayırıcı tanısına dahil edilen SS, RMS, LMS, adipoitik ve kondrositik tümörler gibi bir dizi non-nöral tümörlerde de sunulur. Malign melanomlar hem insanlarda (17), hem köpeklerde (23, 127) hemen daima s-100 pozitifdir.

İnsan literatüründe nörojenik diferensiyasyonun gösterilmesi amacıyla undiferensiy SS'larda (108, 109) ve triton tümörlerde (hem rabdomiyoblastik hem de nörojenik diferensiyasyon gösteren malign periferik sinir kılıfı tümörü) (67) kullanılmıştır.

Veteriner literatürde köpeklerde PSKT'lerinde (7, 22, 47, 99, 101), GHT'lerde (107), KHP'larında (66), MFH'larda (38), LMS'larda (23) s-100 antijeni sunulduğu literatürde bildirilmiştir.

Endotelial Diferensiyasyon Belirteci

F-VIII ra (F-VIII ilişkili protein, vWF)

Diyagnostik IHC çalışmalarında kullanılan ilk endotel spesifik tümör belirteçidir. İnsanlarda vasküler tümörlerin %50-70'inde pozitif reaksiyon verdiği bildirilmiştir (17). Her ne kadar vasküler tümörler için spesifik olsa da endojen H₂O₂'nin yeterince giderilememesi (128) gibi IHC prosedüründe karşılaşılan bazı teknik yetersizlikler kullanımın sınırlandırılmasına yol açar. Bu proteinin sadece endotel hücrelerince sunulmayıp kan dolaşımında serum içerisinde serbest halde bulunuşu geniş nekroz ve kanama alanlarında da pozitif reaksiyona neden olur (17). Öte yandan veteriner literatürde köpeklerdeki endotelial kökenli tümörlerin işaretlenmesinde başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir (87, 88, 98).

2.2.1.3.İmmunohistokimyada Kontrol Dokularının Kullanımı

IHC sonuçlarının geçerli kılınması için ayıraç ya da prosedür kontrolleri oluşturulması gerekmektedir. İki şekilde kontrol oluşturulur: Önceden pozitif ya da negatif reaksiyon verdiği bilinen kontrol dokuları ilgili antikorlarla işaretlenir. İkinci bir seçenek olarak, aranan doku antijeni için geliştirilen primer antikor yerine başka bir antikor, non-immun serum veya çözeltilinin uygulanması ile kontrol prosedürleri oluşturulur (129).

Pozitif Kontrol Dokularının Oluşturulması

Çalışılan materyal ile aynı işlemlerden (fiksasyon, doku takibi vb) geçirilen bu dokuların hedef antijeni içermesi gerekmektedir. Bu dokulardaki boyanma yoğunluğu veya boyanma özgüllüğündeki farklılıklar uygulanan prosedürün doğruluğunun kontrolünü sağlar (129).

Negatif Kontrol Dokularının Oluşturulması

Çalışılan materyal ile aynı işlemlerden geçirilen ilgili dokulara, pozitif kontrollerden farklı olarak hedef antijene karşı geliştirilen primer antikor uygulanmaz ve bu aşama dışında prosedür aynı şekilde uygulanır. Bu dokularda pozitif reaksiyon gözlenmesi prosedürün hatalı olduğunu gösterir (129).

Doku İçi Kontrol Dokuları

En ideal doku kontrolleridir, ayrı pozitif kontrol dokularına ihtiyaç duyulmaz. Aranan hedef antijen çalışılan tümöral materyal içerisinde normal doku komponenti olarak mevcuttur. Böylece fiksasyon, doku takibi ve boyama prosedüründeki hatalar doğrudan elenmiş olur (129).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereç

Çalışmada 2000- 2004 yılları arasında Anabilim Dalımızda patolojik incelemesi yapılan formolle tespit edilmiş-parafinle bloklanmış toplam 50 adet köpek tümör dokusu kullanıldı. Bu örnekler farklı anatomik bölgelerde lokalize olmuş, histopatolojik inceleme sonucu tümü mezenşimal kökenli benign ya da malign karakterde tümör teşhisi konmuş köpek tümörlerinden seçildi.

3.2.Yöntem

3.2.1.Doku Takibi ve Parafin Kesit Hazırlanışı

Çalışma süresince gelen materyaller makroskobik incelemeleri yapıldıktan sonra %10'luk tamponlu formol çözeltisinde 24 saat tespit edilip rutin doku takip işlemlerinden geçirildi ve tüm dokulardan Rotary Mikrotomla 2–3 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Çalışmanın deneysel aşamasından önce histopatolojik incelemesi yapılmış Anabilim Dalı arşivine ait diğer parafin bloklardan IHC için aynı şekilde seri kesitler alındı. Her olguya ait kesitlerden bir örnek, ışık mikroskobunda değerlendirilmek üzere HE ile boyanırken, diğerleri immunohistokimyasal işaretleme için Poly-L-Lysine (PLL, Innovex, Kat. No.CUS801) kaplı lamlara alınarak + 4–8 °C' de saklandı.

İlgili antikorlar ile işaretlenecek tüm kesitler bir gece önceden 65 °C'lik etüvde bekletilerek kuru olarak parafin giderme işlemi yapıldı.

3.2.2.Histopatolojik Değerlendirme

Çalışmada kullanılan toplam 50 olguya ait HE ile boyanmış preparatlar Olympus BX50F4 ışık mikroskopuyla incelenerek hücre morfolojileri ve paterni değerlendirildi. Tümör tipleri, kitlelerin boyutları ve lokalizasyonu, hayvanların yaş, ırk ve cinsiyet gibi klinik bilgileri Tablo 3.1’de gösterildi.

Tablo 3.1- Olgulara Ait Klinik Bilgiler

No	HE Teşhis*	İrk	Yaş	Cinsiyet**	Lokalizasyon	Boyut (cm) ***
1	KHP	Collie	6	E	Ekstremit, karpal eklem,	4.5x2x0.4
2	DFSP	Melez	5	D	Ekstremit, subkutan	2x1.5x1, 1x0.5x0.5
3	DFSP	Rottweiler	8	D	Ekstremit, subkutan	6x5x4
4	DFSP	Belgium Shepherd	10	D	Ekstremit (ayak)	5x3x2
5	DFSP	Melez	8	D	Ekstremit, dirsek eklemi	7x4x2
6	FM	Cocker	13	D	Vagina	3x4x5
7	FM	Terrier	14	D	Vagina	2.2x2.3x16
8	FS	Cocker	14	D	Sternum, subkutan	5x4x2, 1x0.5x0.5
9	FS	Terrier	14	E	Oral kavite	4x2.5x2, 2x2x1
10	FS	Kangal	2	E	Ekstremit, kuyruk ucu	8x3x6.5
11	FS	Collie	11	D	Ekstremit, gluteal kaslar	8x4x2
12	HM	Terrier	7	D	Ekstremit, dirsek eklemi	2x2.5x0.5, MN
13	HM	Danua	8	E	Testis	1x1x1, MN
14	HMS	Boxer	8	D	Dalak	6x5x5
15	HMS	Boxer	8	E	Dalak	4x3x1, 1.5x1x1
16	HMS	Bulldog	10	E	Ekstremit	9x5x2, 5x4x2
17	HMS	Danua	6	E	Testis	6x5x3
18	HMS	Bull Mastiff	11	E	Servikal bölge, subkutan	9x7x6, MN
19	LM	Melez	9	D	Uterus	8x4x2
20	LM	Terrier	8	D	Yanak, kutanöz	2.5x2x1.5
21	LM	Poodle	9	E	Bağırsak	9x6x4
22	LM	Kangal	8	E	Maksilla	5x6x3
23	LM	Terrier	11	D	Vagina	5x3x4
24	LM	German Shepherd	8	D	Uterus	9x10x12
25	LM	Seter	11	D	Vagina	4.5x4x3.5
26	LM	Terrier	8	D	Vagina	8x6x4
27	LMS	Terrier	10	E	Dalak	---
28	LMS	German Shepherd	10	E	Mide	3x2x1.5
29	LMS	Terrier	9	D	İdrar Kesesi	0.5x0.5x0.3
30	MFH	Cocker	10	D	Ekstremit, popliteal kaslar	6x5x3
31	MFH	Golden retriever	9	D	Kulak, subkutan	3x2x5.2
32	MFH	German Shepherd	10	E	Servikal, subkutan	7x4.5x6
33	MFH	Kangal	9	E	Ekstremit	7x7x5
34	NFM	Terrier	11	D	Sternum, subkutan	10x6x4
35	NFM	Cocker	11	E	Fossa paralumbalis	5x4x6
36	UDMT	Rottweiler	10	E	Göz kapağı	0.5x1x0.5
37	UDMT	German Shepherd	7	E	Ekstremit (ayak)	0.8x0.4x0.5
38	UDMT	Terrier	9	D	Ekstremit, kalça eklemi	1x1x1, MN
39	UDMT	Kangal	8	D	Ekstremit, subkutan	3x2x2
40	UDMT	Cocker	15	E	Ekstremit, subkutan	4x2x2, 1x0.5x0.5
41	UDMT	Boxer	10	E	Ekstremit (ayak), dermis	7x4.5x1, 5.3x2x1
42	UDMT	Collie	10	E	Aksillar bölge	5.5x4x6.5
43	UDMT	Boxer	10	E	Sternum, subkutan	6x5x2
44	UDMT	Terrier	16	D	Ekstremit, gluteal kaslar	6x5x2.5, 5x4x1.5
45	UDMT	Pitbull	10	E	Sternum, subkutan	3.5x7x4.5
46	UDMT	Terrier	10	E	Oral kavite	3x4x2
47	UDMT	Melez	10	D	Sternum, subkutan	10x15x5
48	UDMT	Kangal	1	D	Sternum, subkutan	6x5x3.4
49	UDMT	German Shepherd	2	E	Sert damak-maksilla	2x2x0.5
50	UDMT	Melez	11	D	Ekstremit	9.5x9.5x4.5

*KHP: Köpek Hemanjiyoperisitom; DFSP: Dermatofibrosarkom protuberans; FM: Fibrom; FS: Fibrosarkom; HM: Hemanjiyom; HMS: Hemanjiyosarkom; LM: Leiomyom; LMS: Leiomyosarkom; MFH: Malign Fibröz Histiyositom; NFM: Nörofibrom; UDMT: Undiferansiye Mezenşimal Tümör

**D: Dişi; E: Erkek

--- : Bilinmiyor

***MN: Multinodüler

3.2.3.İmmunohistokimyasal Yöntem

PLL kaplı lamlara alınan parafin kesitler, insanlar için geliştirilmiş bir grup monoklonol ve poliklonal antikorlardan seçilmiş mezenşimal tümör belirteçleri ile streptavidin-biyotin peroksidaz tekniği kullanılarak immunohistokimyasal olarak işaretlendi. Kullanılan primer antikorlar, ticari katalog numaraları, klonları, dilüsyon oranları, inkübasyon süreleri ve antijenlerin açığa çıkarılması için yapılan ön işlemler Tablo 3.2’de özetlendi.

Konsantre olarak temin edilen primer antikorların sulandırılması amacıyla hazır antikor dilüsyon çözeltisi (Lab Vision, USA, Kat No.TA–125-UD) kullanıldı.

Tablo 3.2- Antikor Paneli

Katalog Kodu (NeoMarkers) 1 ml	Tümör Belirteçleri		Klon	Dilüsyon Oranı	Antijen Retrieval		İnkübasyon Süresi		Lokalizasyon
	Antikor*	Hayvan Türü**			HIER***	Enzim			
MS-129-P	Vimentin	Mouse (Mab)	V9	1:400	Mikrodalga 15 Dk. Sitrabuffer		Oda Sıcaklığı	1 Saat	Sitoplazmik
MS-742-S	MSA	Mouse (Mab)	HHF35	1:100	x	x	Oda Sıcaklığı	1 Saat	Sitoplazmik
MS-376-S	Desmin	Mouse (Mab)	D33	1:100	x	x	Oda Sıcaklığı	1 Saat	Sitoplazmik
MS-21-P	SMA	Mouse (Mab)	1A4	1:200	x	x	Oda Sıcaklığı	1 Saat	Sitoplazmik
RB-044-A	S100	Rabbit (Pab)	-	1:200	x	x	+4°C	Gece	Sitoplazmik
MS-356-P	Keratin	Mouse (Mab)	PAN-CK Ab-2	1:100		Pepsin +37°C 10 Dk	Oda Sıcaklığı	1 Saat	Sitoplazmik
RB-281-A	F-VIII ra	Rabbit (Pab)	-	1:100		Trypsin +37°C 10 Dk	+4°C	Gece	Sitoplazmik

*MSA: Kas Spesifik Aktin; SMA: Düz Kas Aktini

**Mab: Monoklonal Antikor; Pab: Poliklonal Antikor

***HIER: Isı ile epitoplara açığa çıkarılması

x: Antijen retrieval yapılmadı

Görüntüleme sistemi olarak sekonder antikor (biotinylated goat anti-mouse/rabbit IgG), streptavidin-peroksidaz ve protein blocking çözeltisi (Ultra V Block) içeren hazır ticari bir kit (LabVision, USA, Kat. No.TP-125-HL) ve reaksiyonun renklendirilmesi amacıyla kromojen olarak 3-amino-9-ethylcarbozole (AEC), (LabVision, USA, Kat No. TA-125-HA) kullanıldı.

Isı ile antijenlerin açığa çıkarılması işlemi sadece vimentin antikoru için uygulandı. Preparatlar mikrodalgada sitratlı tampon çözeltisi ile kaynatıldıktan sonra soğuması için oda sıcaklığında 20' bekletildi. Enzim önışlemi aşamasında anti- F-VIII ra için boyanacak preparatlar Pepsin (LabVision, USA. Kat. No. TA-125-PE); keratin antikoru ile işaretlenecek preparatlar Tripsin (LabVision, USA. Kat No. TA-125-TR) çözeltisi ile inkübe edildi. Aktin, SMA, Desmin ve s-100 belirteçleri için antijen açığa çıkarma işlemi uygulanmadı.

Preparatlar boya prosedürü boyunca (protein bloking-primer antikorun uygulaması dışında) tüm aşamalar arasında fosfatlı tampon çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Zemin boyaması için Mayer Hematoksilen (BDH, England. Kat No. 350604T) kullanıldı. Son olarak preparatlar çeşme suyu ile yıkandıktan sonra kromojenle uyumlu su bazlı bir yapıştırıcı (ScyTek, USA) ile kapatıldı.

3.2.3.1.İmmunohistokimyasal İşaretleme Protokolü

Streptavidin-Biyotin İmmunperoksidaz Metodu

1. Parafin Giderme ve Suya İndirgeme		
Ksilol		3 x 30'
% 100 Alkol		2 x 3'
% 96 Alkol		2 x 3'
% 80 Alkol		3'
% 70 Alkol		3'
Distile su		2 x 3'
2. Antijenlerin Açığa Çıkarılması (Antigen retrieval)		
Antijenlerin Isı İle Açığa Çıkarılması		
Vimentin - Mikrodalga (750 Watt) sitratlı tampon çözeltisinde		4 x 3'
Enzim Sindirimi		
Keratin - Tripsin	37 °C'de	10'
F-VIII - Pepsin	37 °C'de	10'

3. PBS ile yıkama	3 x 3'
4. Endojen Peroksidaz Aktivitesinin Bloke Edilmesi %0.3' lük H ₂ O ₂ (mutlak metanolde)	25'
5. PBS ile yıkama	3 x 3'
6. Proteinlerin Bloke Edilmesi UV Block	7'
7. Primer Antikor ile İnkübasyon Vimentin/Aktin/SMA/Desmin/Keratin F-VIII / S100	60' Gece
8. PBS ile yıkama	3 x 3'
9. Sekonder Antikor (Link)	25'
10. PBS ile yıkama	3 x 3'
11. Streptavidin Biotin Kompleks (Label)	25'
12. PBS ile yıkama	3 x 3'
13. Reaksiyonun Görünür Hale Getirilmesi Kromojen (AEC ile inkübasyon)	15'
14. Distile su	2 x 3'
15. Mayer Hematoksilen	2'
16. Akar suda yıkama	10'
17. Kesitlerin Kapatılması	

3.2.3.2. Tampon Çözeltilerinin Hazırlanışı

PBS (pH:7.6)

NaCl	:8.00 gr
Na ₂ HPO ₄	:1.15 gr
KCl	:0.20 gr
KH ₂ PO ₄	:0.20 gr

1000 ml distile suya tamamlandı.

Sitrathı Tampon Çözeltisi (pH:6)

Stok A Çözeltisi

Sitrik asit (0.1M)	: 0.96 gr
Distile su	: 50 ml

Stok B Çözeltisi

Sulu sodyum sitrat (0.1M)	: 1.786 gr
Distile su	: 50 ml

Çalışma Çözeltisi

A çözeltisi	: 9.0 ml
B çözeltisi	: 41 ml

500 ml distile suya tamamlandı.

3.2.3.3.Kontrol Dokuların Boyanması

Pozitif Kontrol Dokuları

Her antikor için seçilen normal ve neoplastik köpek dokuları işaretlenen hücre komponenti ile birlikte Tablo 3.3’de verildi.

Tablo 3.3- Pozitif Kontrol Dokuları

Antikor*	Doku Örneği	İşaretlenen Komponent
Vimentin	Fibrosarkom Granülasyon Dokusu Leiomyom Malign Melanom Meme Adenokarsinomu	Fibroblastlar Tüm Mezenşimal Hücreler Neoplastik Kas Hücreleri Melanom Hücreleri Miyoeitel Hücreleri
MSA	İskelet Kası İnce Bağırsak Kesiti Leiomyosarkom Vasküler Yapılar	Sarkoplazma Tunika Muskularis, İnterglandular Kas Tabakası Neoplastik Tombul-Füsiform Hücreler Damar Düz Kas Hücreleri, Perisitler
Desmin	İskelet Kası İnce Bağırsak Kesiti Leiomyosarkom	Sarkoplazma Tunika Muskularis Neoplastik Tombul-Füsiform Hücreler
SMA	İnce Bağırsak Kesiti Leiomyom	Tunika Muskularis, İnterglandular Kas Tabakası Füsiform Neoplastik Hücreler
s-100	Periferik Sinir Kesiti	Schwann Hücreleri
Keratin	Köpek Deri Biyopsisi Tükürük Bezi Adenokarsinomu Fibrosarkom	Normal Keratinize Epitel Tabakası Neoplastik Epitelyal Hücreler Neoplastik Mekik Hücreler
F-VIII	Tüm Vasküler Yapılar	Endotel Hücreleri

*MSA: Kas spesifik aktini; SMA: Düz kas aktini

Negatif Kontrol Dokuları

Primer antikorun uygulandığı aşamada kontrol dokuları PBS ile inkube edilerek negatif kontroller oluşturuldu (66, 88, 98, 110, 121, 126). Boya protokolü bu aşama dışında aynı şekilde uygulandı. Negatif kontrollerin hiçbirinde uygulanan monoklonal ve poliklonal antikorlar için immunreaksiyon izlenmedi.

3.2.4.İmmunohistokimyasal Değerlendirme

IHC ile işaretlenen örnekler, 40x'lık büyütmede farklı alanları taranarak immunreaktivite yoğunluğu ve paternine göre dört grupta değerlendirildi. Doku içi kontrollerin ya da aynı seride işaretlenen kontrol dokuların bulunduğu preparatlarda pozitif reaksiyon izlenmesi önkoşuluyla immunoreaktivite göstermeyen neoplastik dokular (-), fokal boyanma (+), diffuz ancak zayıf boyanma (++), diffuz ve yoğun boyanma (+++) şeklinde skorlandı.

3.2.5.Histopatolojinin İmmunohistokimyasal Sonuçlar ile Karşılaştırılması

Vakaların tümünde tümöral dokuların histopatolojik özellikleri (hücresel komponent, mitotik indeks, patern, yangı/ödem, tümör nekrozu vb) ile belirlenen morfolojik tipi, immunohistokimyasal profili karşılaştırılarak tümöral dokunun diferensiyasyon yönü belirlendi. Mitotik indeks 40x'lık büyütmede 10 farklı sahadaki toplam mitoz sayısı belirlenerek belli sayı aralıklarındaki değerler olarak verildi. Tümör nekrozu ve atipik mitozun varlığı malignite kriterleri olarak değerlendirildi (3, 38, 41).

Bazı olguların ilk histopatolojik teşhisleri, tümöral dokuların IHC özelliklerine göre değiştirilerek yeniden belirlendi. Undiferensiye mezenşimal tümörlerin (UDMT) büyük bir kısmı aynı şekilde değerlendirilip yeniden adlandırıldı.

4. BULGULAR

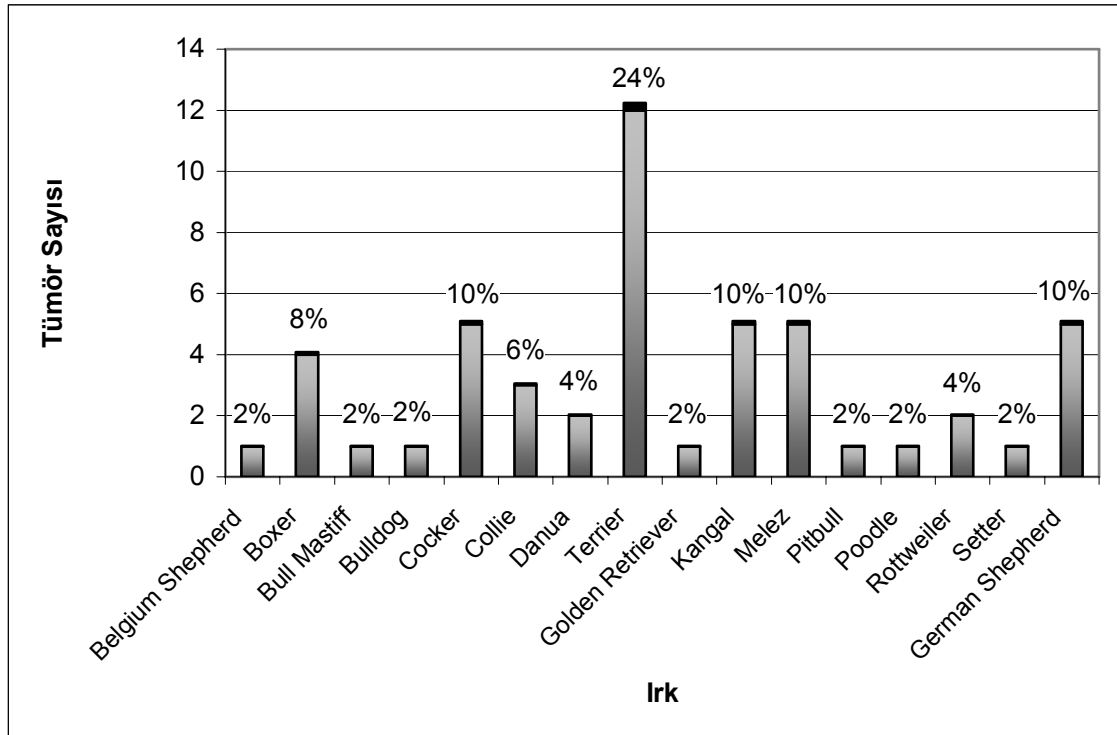
Çalışma materyalini oluşturan toplam 50 köpek tümörünün ilk histopatolojik teşhislerine göre KHP (n:1), DFSP (n:4), FM (n:2), FS (n:4), HM (n:2), HMS (n:5), LM (n:8), LMS (n:3), MFH (n:4), NFM (n:2) ve UDMT (n:15) olgularını içerdiği belirlendi.

En küçüğü 1, en büyüğü 16 yaşında olan köpeklerin yaş ortalaması 9,26 olarak hesaplandı.

Cinsiyet açısından bir predileksiyon saptanmadı. Dişi hayvanların oranı %52; erkek hayvanları %48 olarak belirlendi.

Köpek ırkları çeşitlilik göstermekle birlikte daha çok büyük ırk köpeklerin etkilendiği, ancak en fazla tümör saptanan köpek ırkının %24 (n:12)'lük oranla Terrier olduğu belirlendi. YDT'lerinin ırklara göre dağılımı Tablo 4.1 'de verildi.

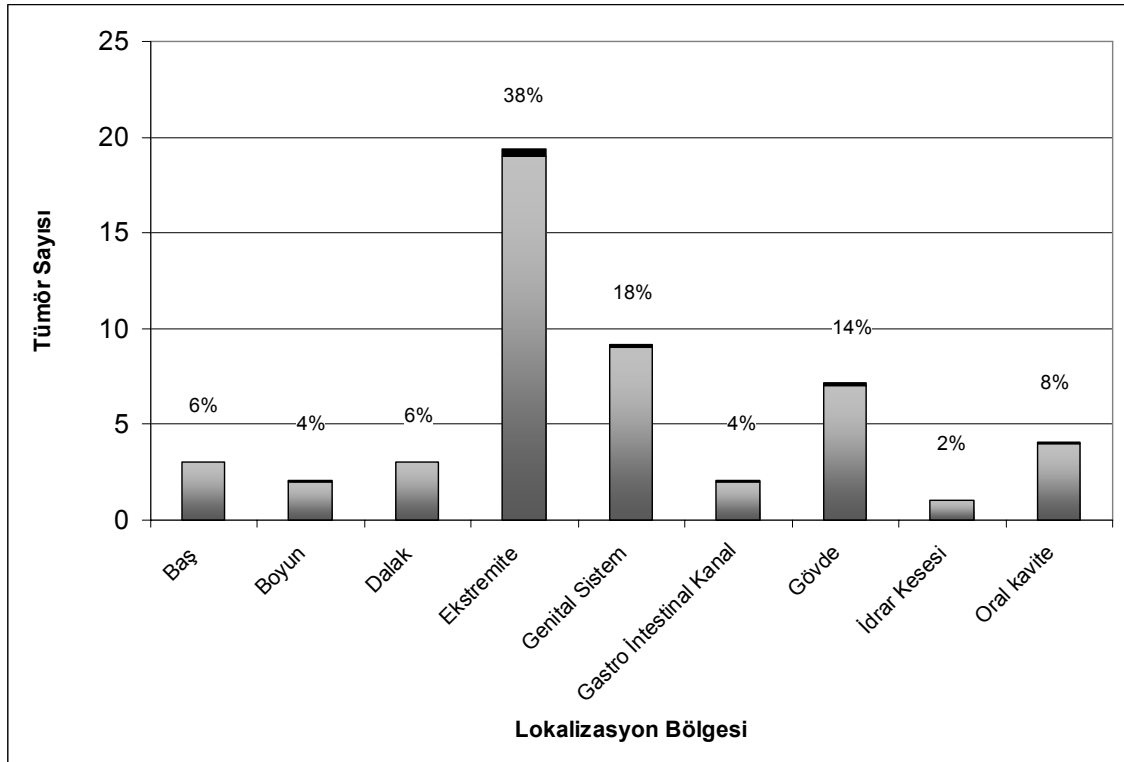
Tablo 4.1- Yumuşak Doku Tümörlerinin Irklara Göre Dağılımı



En fazla tümör tespit edilen lokalizasyon bölgesi %38 (n:19)'lik oranla ekstremiteler olarak belirlendi. Bunu sırasıyla genital sistem (%18), gövde (%14), oral kavite (%8), baş bölgesi (%6) ve dalak (%6) izledi. Tümörlerin lokalizasyon bölgelerine göre dağılımı Tablo 4.2'de verildi.

Çalışma materyalini oluşturan 50 olguya ait IHC sonuçları, hücresel morfoloji, yangı, ödem, tümör nekrozu, mitotik indeks ve diğer histopatolojik özellikleri ile birlikte Tablo 4.3'de gösterildi.

Tablo 4.2- Yumuşak Doku Tümörlerinin Lokalizasyon Bölgelerine Göre Dağılımı



Tablo 4.3- Yumuşak Doku Tümörlerine Ait İmmünohistokimyasal ve Histopatolojik Bulgular

Tümör Belirteçleri **										Histopatolojik Özellikler ***				
No	HE Teşhis *	Vimentin	MSA	Desmin	SMA	S100	Keratin	F.VIII ra	Hücresel Komponent	Mitotik İndeks	Nekroz	Ödem Yangı	Diğer Özellikler	Patern
1	KHP	+++	-	-	-	++	-	-	Pleomorfizm: Belirgin eozinofilik nükleoluslu veziküler nükleuslu, sitoplazmik sınırları belirsiz mekik + epiteloid	---	---	---	Miksoid alanlar, Multinükleer dev hücreler	Perivasküler Girdaplar
2	DFSP	+++	-	-	-	-	-	---	Üniform: Multi-nükleolar, iri veziküler tombul-ovoid nükleuslu, ince çekik sitoplazmalı	---	---	Y	---	Storiform
3	DFSP	+++	-	-	+	-	-	---	Üniform: Hiperkromatik nükleuslu iğsi + tek eozinofilik nükleoluslu veziküler ovoid nükleuslu iri-tombul	---	---	---	---	Storiform
4	DFSP	+++	-	-	-	+	-	---	Yüksek selülitte: Mono-nükleolar veziküler nükleuslu dalgalı iğsi + Periferde uzun eozinofilik rhabdomyoblastik (raketi hücreleri)	---	---	---	Neo-vaskülarizasyon, hyalinize kolojen birikimleri	Kesişen Demetler
5	DFSP	+++	-	-	-	-	-	---	Üniform: Eozinofilik sitoplazmalı iğsi	---	---	---	Yoğun kolojenöz matris	Gerçek Storiform
6	FM	+++	-	-	-	-	-	---	Yüksek selülitte, pleomorfizm: Multi-nükleolar bol çekik eozinofilik sitoplazmalı fibroblastik-blastik	---	---	---	---	Belirsiz Storiform
7	FM	+++	-	-	-	-	-	---	Üniform: Fibroblastik bazı alanlarda fibrostitik	---	---	---	Yoğun kolojenöz matris	Belirsiz Storiform
8	FS	+++	-	-	-	-	-	---	Yüksek selülitte, pleomorfizm: Belirgin nükleoluslu, ovoid nükleuslu, dar eozinofilik sitoplazmalı	< 5 AMF	N	Y	---	Storiform, Girdaplar
9	FS	+++	-	-	-	-	-	---	Multi-nükleolar veziküler yuvarlak-ovoid nükleuslu, dar eozinofilik sitoplazmalı	10-15	N	Y	---	Demetler
10	FS	+++	-	-	-	-	-	---	Yüksek selülitte: Mono-nükleolar, veziküler ovoid nükleuslu, dar çekik sitoplazmalı	10-15	N	Y	---	Dağınık Demetler, Belirgin Patern Yok
11	FS	+++	-	-	-	-	-	---	Hafif pleomorfizm: Hiperkromatik nükleuslu iğsi	5-10 AMF	N	---	---	Dağınık Demetler, Belirgin Patern Yok
12	HM	+++	---	---	---	---	-	+++	Üniform endotel hücreleri	---	---	---	---	Ektazik Vasküler Boşluklar
13	HM	+++	---	---	---	---	-	+++	Üniform endotel hücreleri	---	---	---	---	Kapiller Damarlar
14	HMS	+++	+++	---	---	+++	-	+++	Pleomorfizm: Multinükleolar, veziküler nükleuslu iri + yassı endotel benzeri	20-25 AMF	---	---	---	Düzensiz Ektazik Vasküler Boşluklar + Rudimenter Lumen Formasyonu
15	HMS	+++	+++	---	---	+++	-	++	Pleomorfizm: Tek iri nükleuslu atipik + veziküler nükleuslu granüler sitoplazmalı	20-25 AMF	---	---	---	Düzensiz Ektazik Vasküler Boşluklar + Rudimenter Lumen Formasyonu
16	HMS	+++	+	---	---	+++	-	++	Pleomorfizm: Veziküler nükleuslu, eozinofilik sitoplazmalı iri hücreler	20-25	N	---	---	Yarıklanmalar, Düzensiz Papiller Yapılar
17	HMS	+++	---	---	---	+++	-	+++	Pleomorfizm: Yassı endotel benzeri iri hücreler	25-35 AMF	N	---	Ülserasyon	Yarıklanmalar, Düzensiz Kapiller Damarlar
18	HMS	+++	---	---	---	++	-	+++	Atipik: Hiperkromatik çekirdekli mekik	10-15 AMF	---	Y	---	Yarıklanmalar, Düzensiz Ektatik Vasküler Boşluklar

Tablo 4.3- Yumuşak Doku Tümörlerine Ait İmmünohistokimyasal ve Histopatolojik Bulgular

No		HE Teşhis *		Tümör Belirteçleri **					Histopatolojik Özellikler ***					
				Vimentin	MSA	Desmin	SMA	S100	Keratin	F-VIII ra	Hücresel Komponent	Mitotik İndeks	Nekroz	Ödem Yangı
19	LM	++	+++	++	+++	---	-	---	Düşük selüliterte: Mononükleoler tombul nükleuslu, çekik sitoplazmalı	---	---	Y	---	Kısa Demetler, Yalancı Storiform
20	LM	+++	+++	++	+++	---	-	---	Üniform: Eozinofilik sitoplazmalı, iki ucu küt mekik (puro hücreleri)	---	---	---	---	Kesişen Uzun Demet Yapıları
21	LM	+++	++	+	+++	-	-	---	Üniform: Eozinofilik sitoplazmalı, iki ucu küt mekik (puro hücreleri)	---	---	Y	---	Kesişen Uzun Demet Yapıları
22	LM	+++	-	-	+++	-	-	---	Pleomorfizm: İki ucu küt mekik + yuvarlak-ovoid	---	---	---	---	Kesişen Uzun Demet Yapıları
23	LM	+++	+++	++	+++	---	-	---	Üniform: Puro benzeri nükleuslu, çekik eozinofilik sitoplazmalı mekik	---	---	---	---	Kesişen Uzun Demet Yapıları
24	LM	+++	+++	+++	+++	---	-	---	Üniform: Puro benzeri nükleuslu, çekik eozinofilik sitoplazmalı mekik	---	---	---	---	Kesişen Uzun Demet Yapıları
25	LM	+++	+	-	-	-	-	---	Yüksek selüliterte: Fibrostitik-blastik	---	---	---	---	Kısa Demetler, Yalancı Storiform
26	LM	+++	+++	---	+++	---	-	---	Üniform: İki ucu küt ovoid nükleuslu	---	---	---	---	Kısa Demetler, Yalancı Storiform
27	LMS	+++	-	-	+++	+	-	---	Pleomorfizm: Multi-nükleoler yuvarlak-ovoid veziküler nükleuslu, çekik eozinofilik sitoplazmalı + iğsi	10-15 AMF	---	---	---	Kesişen Demetler
28	LMS	+++	+++	++	+++	-	-	---	Hafif pleomorfizm: Multi-nükleoler iki ucu küt veziküler mekik	5-10 AMF	N	---	---	Kesişen Demetler
29	LMS	+	-	+	+	-	-	---	Pleomorfizm: Mono-multi nükleoler ovoid nükleuslu dar eozinofilik sitoplazmalı fibroblastik histiyositik,	< 5 AMF	---	---	---	Pleomorfik- Storiform
30	MFH	+++	-	-	+	-	-	---	Pleomorfizm: Hiperkromatik nükleuslu ince uzun sitoplazmalı eozinofilik hücreler + multinükleoler veziküler histiyositik hücreler	45-50 AMF	---	Y	Tuhaf şekilli iri anaplastik hücreler+multinüklear dev hücreler	Storiform
31	MFH	+++	-	-	+	+	-	---	Yüksek selüliterte, pleomorfizm: Multinükleoler, veziküler çekirdekli iri tombul	20-25 AMF	---	Y	---	Pleomorfik-Storiform
32	MFH	+++	-	-	-	+++	-	---	Selüliterte yüksek, üniform: Belirgin çok çekirdekçikli veziküler blastik	10-15 AMF	---	Y	---	Storiform, Küçük Girdaplar, Verocay Cısmıkları
33	MFH	+++	-	-	-	-	-	---	Selüliterte yüksek, hafif pleomorfizm: Belirgin nükleoluslu veziküler blastik + fibriller eozinofilik sitoplazmalı	< 5 AMF	---	Y	---	Belirgin Storiform
34	NFM	+++	-	-	-	-	-	-	Üniform: Mono-nükleoler hiperkromatik nükleuslu dalgalı iğsi	---	---	Ö	Müsinöz dejenerasyon, Kanama, Miksoid matris	Belirsiz Palizatlar, Belirsiz Storiform
35	NFM	+++	-	-	-	-	-	---	Hafif pleomorfizm: Çekik eozinofilik sitoplazmalı, dalgalı, iğsi	---	---	---	Kollojenden zengin miksamatoöz stroma	Kesişen Demetler

Tablo 4.3- Yumuşak Doku Tümörlerine Ait İmmunohistokimyasal ve Histopatolojik Bulgular

No	HE Teşhis *	Tümör Belirteçleri **					Histopatolojik Özellikler ***							
		Vimentin	MSA	Desmin	SMA	S100	Keratin	F-VIII ra	Hücresel Komponent	Mitotik İndeks	Nekroz	Ödem Yangı	Diğer Özellikler	Patern
36	UDMT	+++	-	---	-	-	-	++	Atipi, pleomorfizm: İçinde eritrosit izlenen geniş, vakuoler sitoplazmalı ekzantrik nükleuslu endotel benzeri	5-10 AMF	---	Y	Hemoraji	Yarıklanmalar, Küçük Vasküler Boşluklar
37	UDMT	++	-	---	-	-	-	-	Üniform: Sitoplazmik sınırları belirsiz fibroblastik	---	---	Y	Ülserasyon	Storiform
38	UDMT	+++	-	---	-	+	-	-	Yüksek selülide: Belirgin mono-multi nükleoluslu iri epiteloïd + konsantrik dizilişli dalgalı içsi hücreler	---	---	Ö	Kollojenöz matris	Dağınık Demetler, Belirgin Patern Yok
39	UDMT	+++	-	---	-	-	-	-	Mono-multi eozinofilik nükleoluslu iri histiyositik	---	---	---	Reaktif yangısal dev hücreler, dilate trombozlu vasküler yapılar	Perivasküler Girdaplar, Storiform
40	UDMT	+++	-	---	+	-	-	-	Yüksek selülide: Epiteloïd-blastik hücreler	15-20 AMF	N	Y	Miksomatöz	Solid, Belirgin Patern Yok
41	UDMT	+++	-	---	-	-	-	-	Yoğun selülide: İri veziküler nükleuslu	< 5 AMF	---	---	İnfiltratif	Belirgin Patern Yok
42	UDMT	+++	-	---	-	+	-	-	Mono-multi-nükleoluslu tombul nükleuslu çekik eozinofilik sitoplazmalı hücreler	< 5 AMF	---	---	Kollojenöz matris	Storiform
43	UDMT	+++	-	---	-	+	-	-	Selülarite yüksek, pleomorfizm: hiperkromatik içsi hücreler + bol sitoplazmalı köşeli hücreler	---	---	Y	---	Üniform Fibriler Yapı, İlkel Palizadlar
44	UDMT	+++	-	---	-	+	-	-	Selülarite yüksek, pleomorfizm: Mono nükleoler oval veziküler nükleuslu tombul + mekik hücreler	---	---	Y	---	Küçük Üniform Girdaplar
45	UDMT	+++	-	---	-	-	-	-	Pleomorfizm, atipi: yuvarlak-oval veziküler nükleuslu blastik hücreler	---	---	Y	Miksoid matris	Storiform
46	UDMT	+++	-	---	+++	-	-	-	Pleomorfizm: Mekik ve az sayıda epiteloïd	35-40 AMF	N	---	---	Düzensiz Demetler
47	UDMT	+++	-	---	+	-	-	-	Eozinofilik sitoplazmalı, hiperkromatik çekirdekli mekik hücreler + yer yer epiteloïd	15-20	N	---	Miksoid matris	Belirsiz Storiform
48	UDMT	+++	++	---	+++	-	-	-	Çekik sitoplazmalı tombul yuvarlak nükleuslu	5-10	N	---	---	Demetler
49	UDMT	+++	-	---	-	-	-	-	Pleomorfizm: Hiperkromatik nükleuslu, içsi + epiteloïd hücreler	> 50 AMF	N	---	Hemoraji	Storiform , Demetler
50	UDMT	++	+	---	-	-	-	-	Pleomorfizm: Hiperkromatik nükleuslu içsi + histiyositik hücreler	5-10 AMF	N	Ö	Perivasküler kollojen birikimleri (hyalinizasyon), multinüklear dev hücreler	Belirsiz Storiform

* KHP: Köpek Hemanjiyoperistom; DFSP: Dermatofibrosarkom protuberans; FM: Fibrom; FS: Fibrosarkom; HM: Hemanjiyom; HMS: Hemanjiyosarkom; LM: Leiomyom; LMS: Leiomyosarkom; MFH: Malign Fibröz Histiyositom; NFM: Nörofibrom; UDMT: Undiferansiye Mezenşimal Tümör

** MSA: Kas aktini; SMA: Düz kas aktini

*** Mitotik İndeks: 40x'lık büyütmede on farklı mikroskobik sahadaki mitotik figür sayısı; AMF: Atipik mitotik figür; N: Nekroz; Y: Yangı; Ö: Ödem

--- Test edilmedi / Mevcut değil

4.1.Histopatolojik Bulgular

İlk histopatolojik teşhise göre KHP şeklinde adlandırılan olguda neoplastik hücrelerin pleomorfik olduğu ve belirgin eozinofilik çekirdekçikli veziküler çekirdeklere sahip, sitoplazmik sınırları belirsiz mekik formunda ya da tombul epitelooid hücrelerden meydana geldiği izlendi. Sırasıyla Antoni A ve Antoni B paternini andıran geniş miksomatöz alanlar ve bu alanlardan belirgin olarak ayrılmış işsi hücrelerden meydana gelen, hücreliliğin yüksek olduğu farklı alanlar izlendi (Şekil 1a). Kapillar damarların etrafında konsantrik dizilimler meydana getiren perivasküler girdap yapılarının (fingerprint patern) belirgin histopatolojik yapıyı oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 1b). Tümöral dokunun periferinde az sayıda multinükleer dev hücrelerin yer aldığı izlendi.

Histolojik olarak DFSP olarak adlandırılan tümörlerin üçünde hiperkromatik ya da eozinofilik çekirdekçikli mekik hücrelerden meydana gelmiş storiform patern oluşturan kısa demet yapıları izlendi. İki tümörde işsi hücrelerin yanı sıra, yuvarlak-ovoid veziküler çekirdekli üniform hücreler ve bir olguda plazma ağırlıklı mononükleer yangısal infiltrasyon gözlemlendi. Olgu 3’de ince eozinofilik sitoplazmalı neoplastik hücrelerin oluşturduğu gerçek storiform paternin tüm alanlarda bir örnek yapı oluşturduğu izlendi (Şekil 2). Olgu 4’de diğerlerinden farklı olarak hücresel yoğunluğun yüksek, hücrelerin pleomorfik olduğu gözlemlendi. Storiform benzeri kısa demet yapıları oluşturan neoplastik hücrelerin tek çekirdekçikli, veziküler çekirdekli dalgalı ve işsi hücrelerden meydana geldiği izlendi (Şekil 3a). Tümöral dokunun içerisinde yeni damarlaşma alanları ve hiyalinize kollojen birikimleri gözlemlendi. Kitlenin periferinde yer alan uzun eozinofilik, rabdomiyoplastik hücreler (raket hücreleri) dikkat çekti (Şekil 3b).

FM olgularında belirsiz storiform patern yapan ve çekik eozinofilik sitoplazmalı fibroblastik ve fibrositik hücreler izlendi. Bir olguda hücreliliğin yüksek olduğu, diğerinde yoğun kollojenöz matriksin varlığı dikkat çekti.

Histolojik olarak FS olarak teşhis edilen olguların ikisinde belirgin patern bulunmamakla birlikte dağınık demet yapıları izlendi. Diğer olgulardan birisinde demet yapısı belirginken, diğerinde storiform yapı ve perivasküler girdaplar gözlemlendi. Genellikle tüm olgularda hücreliliğin yüksek olduğu ve neoplastik kitlenin, belirgin çekirdekçikli yuvarlak-ovoid çekirdekli çekik ve eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluştuğu izlendi. Olguların tümünde tümör nekrozu ve mitotik figür izlendi. Bir olguda mitotik indeks 5'den küçük, diğerinde 5–10, diğer ikisinde 10–15 arasındaydı. İlk ikisinde atipik mitotik hücreler mevcuttu. İki olguda mononükleer, birinde polimorfnükleer yangısal infiltrasyon izlendi.

HM olgularının birinde tek tip endotel hücrelerinin çevrelediği damar yapılarının küçük kapıllar formda, diğerinde daha geniş ektazik boşluklar şeklinde yapılandığı izlendi. Mitotik figür, tümör nekrozu ya da yangı izlenmedi.

Histolojik olarak HMS olarak teşhis edilen olguların üçünde yarıklanmalar ve düzensiz kapıllar ve daha büyük ektazik vasküler boşluklar izlendi (Şekil 4a). Solid yapıdaki diğer ikisinde düzensiz ektazik damarların yanı sıra rudimenter lumen formasyonları gözlemlendi. Pleomorfik ve atipik tek ya da çok çekirdekçikli, veziküler çekirdekli, eozinofilik sitoplazmalı yassı endotel benzeri iri hücrelerin belirgin hücresel komponenti meydana getirdiği izlendi. Olguların ikisinde birkaç alanda nekroz, nekroz görülen bir vaka hariç tümünde çok sayıda tipik ve atipik mitotik figür izlendi. Nekroz görülen diğer olguda ülserasyon da mevcuttu.

Histolojik olarak LM olarak teşhis edilen 8 olgunun tümünde kesişen farklı uzunluktaki yatay ve dikey demet yapıları belirgin paterni oluşturmaktaydı (Şekil 5). En yaygın olarak görülen neoplastik hücre tipi tek belirgin çekirdekçikli, iki ucu küt ovoid-tombul çekirdekli, çekik eozinofilik sitoplazmalı puro hücreleri idi. İki olguda polimorfnükleer ağırlıklı yangısal infiltrasyon izlendi. Kesişen kısa demetlerin bazı olgularda yalancı storiform patern oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 6a).

Histolojik olarak LMS teşhis edilen üç olgudan ikisinde kesişen farklı uzunluklarda demet yapıları, bir olguda pleomorfik hücrelerin oluşturduğu storiform patern gözlemlendi. İlk iki vakada tek ya da çok çekirdekçikli yuvarlak-ovoid çekirdekli,

çekik eozinofilik sitoplazmalı pleomorfik mekik hücreler ile daha az sayıda hiperkromatik çekirdekli iğsi hücreler izlenirken, Olgu 29'un (Pleomorfik-storiform patern izlenen) neoplastik hücrelerinin fibroblastik ya da fibrositik formda ve histiyositik tipte hücreler olduğu gözlemlendi. Bir olguda nekroz, diğerlerinde değişen düzeylerde tipik /atipik mitotik figür izlendi.

Histolojik olarak MFH olarak değerlendirilen olguların tümünde storiform patern izlenirken sadece birisinde tipik pleomorfik-storiform patern (Şekil 7a) gözlemlendi. Olgu 30'da hiperkromatik çekirdekli ince uzun sitoplazmalı eozinofilik hücreler ve çok çekirdekçikli veziküler fibroblastik-histiyositik hücrelerin yanı sıra tuhaf şekilli anaplastik hücreler ve dev hücreler ve hafif düzeyde mononükleer yangı hücreleri ve çok sayıda (Mitotik indeks: 45–50) tipik ve atipik mitotik figür gözlemlendi (Şekil 8). Olguların hepsinde değişen düzeylerde tipik ve atipik mitotik figür izlenirken tümör nekrozu gözlenmedi. Olguların tümünde yangı mevcuttu. Olgu 32'de diğerlerinden farklı olarak ve ilkel palizatlar-verocay cisimcikleri (Şekil 9a) ve girdap yapıları (Şekil 9b) izlendi.

NFM olarak teşhis edilen olguların ilkinde (Olgu 34) miksoid ve ödematöz bir matriks içerisine yerleşmiş bir örnek tek çekirdekçikli, dalgalı ve iğsi yapıda hiperkromatik hücrelerden meydana gelen belirsiz storiform patern ve palizat oluşumları ile hemorajik alanlar ve müsinöz dejenerasyon alanları gözlemlendi. Diğer olguda kollojenden zengin miksoid bir stroma içerisinde yapılanmış hafif pleomorfizm gösteren eozinofilik sitoplazmalı dalgalı ve iğsi neoplastik hücrelerin demet yapıları oluşturduğu gözlemlendi.

Histopatolojik teşhislerde diferensiyasyon yönü saptanamamış olgularda (Olgu 36–50) damar benzeri yarıklanmalar (Olgu 36), storiform yapı (Olgu 37, 39, 42, 45, 47, 49, 50), dağınık (Olgu 38, 46) ve kesişen (Olgu 48 ve 49) demetler, Olgu 39 ve 44'de perivasküler girdaplar (Şekil 10a) ve son olarak palizatlar (Olgu 43) gibi farklı tümör gruplarında gözlenen histolojik yapılar izlenirken, neoplastik hücrelerin genel olarak iki tip hücreden meydana geldiği gözlemlendi: Tek ya da çok sayıda belirgin çekirdekçikli yuvarlak-ovoid veziküler çekirdekli eozinofilik sitoplazmalı hücreler ve hiperkromatik çekirdekli uzun ince sitoplazmalı iğsi hücreler. Birkaç alanda tümör nekrozu (Şekil 11a)

saptanan 6 olguda neoplastik hücrelerde pleomorfizm ile birlikte değişen sayılarda tipik ve atipik mitotik figür izlendi (Şekil 12a,12b). Bazı olgularda yangı, ödem, ülserasyon ve iki tümöral dokuda sırasıyla reaktif yangısal (Olgu 39) ve tümör dev hücreleri (Olgu 50) gözlemlendi.

4.2.İmmunohistokimyasal Bulgular

4.2.1.Kontrol Dokularda Boyanma

Vimentin tüm normal dokularda doku içi pozitif kontrolü olarak kullanılan konnektif doku, endotel hücreleri ve kas hücrelerinde pozitif reaksiyon verdi. Ayrıca kontrol olarak kullanılan bir köpek FS olgusunda güçlü ve yaygın pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 13). Normal epitelyal dokuda immunreaktivite gözlenmedi.

Keratin köpek deri kesitinde epidermisin kornifiye katmanı (Şekil 14a) ve köpek tükürük bezi adenokarsinomunda neoplastik epitel hücreleri (Şekil 14b) ile pozitif reaksiyon verdi. Neoplastik mezenşimal komponent ile immunreaktivite göstermedi.

s-100 köpek periferik sinir kılıfı kesitinde schwann hücreleri (Şekil 15) ile pozitif reaksiyon verdi. Köpek liposarkomunda, normal lipositik hücrelerde malign melanomlarda immunreaksiyon izlenmedi.

F-VIII normal ve neoplastik köpek dokularında damar endotelleri ile pozitif reaksiyon verdi.

Tüm neoplastik ve normal dokularda damar duvarı (perisitler ve düz kas hücreleri) sinir sonlanmaları sırasıyla miyojenik ve nörojenik diferensiyasyon belirteçleri için doku içi kontroller olarak pozitif reaksiyon verdi.

4.2.2. Tümör Dokularının Boyanması

İlgili antikorlar ile immunohistokimyasal olarak işaretlenen tümör dokularında saptanan pozitif olgu sayıları farklı tümör gruplarına göre Tablo 4.4’de özetlendi.

Tablo 4.4- İşaretlenen Tümör Dokularında Pozitif Olgu Sayıları

Tümör Tipi*		İmmunohistokimyasal Bulgular**						
		Vimentin	MSA (HHF35)	Desmin	SMA	s-100	Keratin	F-VIII
KHP	n:1	1/1	o	o	o	1/1	o	o
DFSP	n:4	4/4	o	o	1/4 ^a	1/4 ^a	o	---
FM	n:2	2/2	o	o	o	o	o	---
FS	n:4	4/4	o	o	o	o	o	---
HM	n:2	2/2	---	---	---	---	o	2/2
HMS	n:5	5/5	3/5	---	5/5	---	o	5/5
LM	n:8	8/8	7/8 ^b	5/7	7/8 ^b	0/3	o	---
LMS	n:3	3/3	1/3 ^c	2/3	3/3	1/3 ^c	o	---
MFH	n:4	4/4	o	o	2/4 ^d	2/4 ^d	o	---
NFM	n:2	2/2	o	o	o	o	o	---
UDMT	n:15	15/15	2/5	---	4/15 ^a	4/15 ^a	o	1/15

*KHP: Köpek Hemanjiyoperisitom; DFSP: Dermatofibrosarkom protüberens; FM: Fibrom; FS: Fibrosarkom; HM: Hemanjiyom; HMS: Hemanjiyosarkom; LM: Leiomyom; LMS: Leiomyosarkom; MFH: Malign Fibröz Histiysitom; NFM: Nörofibrom; UDMT: Undiferensiye Mezenşimal Tümör

n: Olgu sayısı

**MSA: Kas Aktini; SMA: Düz Kas Aktini

n/n: Pozitif Tümör Sayısı / İşaretlenen Tümör Sayısı

a: SMA ve s-100 pozitif reaksiyonu farklı olgularda ; b: MSA ve SMA pozitif reaksiyonu 2 olgu hariç aynı olgularda; c: MSA ve s-100 pozitif reaksiyonu farklı olgularda; d: SMA ve s-100 pozitif reaksiyonu 1 olgu hariç farklı dokularda saptandı.

o: Tümü negatif

--- : Test Edilmedi

Çalışmanın materyalini oluşturan toplam 50 köpek tümör dokusunun vimentin için pozitif reaksiyon verdiği izlenirken hiçbir dokuda keratin sunulmadığı saptandı.

İlk histopatolojik değerlendirmede FM ve FS olarak teşhis edilen olgularda vimentin dışındaki antikorlar ile pozitif reaksiyon saptanmadı. Ayrıca NFM olarak teşhis edilen dokularda vimentin hariç diğer antikorlar ile immunreaksiyon saptanmadı.

KHP olgusunda sadece s-100 için farklı alanlarda fokal pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 1c).

Dört DFSP olgusunun ikisinde vimentin dışındaki antikorlar ile immun reaksiyon izlenmedi: Bir olguda SMA, diğerinde s-100 için fokal pozitiflik saptandı.

HM ve HMS olgularının tümü F-VIII ile boyandı (Şekil 4b, 16a, 16b). Ayrıca SMA ve MSA, HHF35 klonu ile boyanan HMS olgularının beşi SMA, üçü HHF35 ile pozitif reaksiyon verdi.

LM olgularında HHF35 (Şekil 6b, 6c) ve Desmin (Şekil 17) ile işaretlenen tümöral dokulardan sırasıyla bir ve iki doku dışında tümü pozitif reaksiyon verdi. Desmin ve HHF35 negatifliği yalnızca bir dokuda birlikte gözlemlendi. Öte yandan bir tümör dokusu hariç tümünde SMA pozitifliği saptandı (Şekil 6d). Düz kas diferensiyasyonu gösterilemeyen bu doku desmin için negatif, HHF35 için ise fokal pozitif reaksiyon verdi. LMS olarak teşhis edilen tümör dokularının yalnızca birinde HHF35, ikisinde desmin ve üçünde SMA pozitifliği izlendi. Desmin ve HHF35 için immunreaksiyon göstermeyip SMA için güçlü pozitif reaksiyon veren olguda bir alanda fokal s-100 pozitifliği izlendi (Şekil 18a, 18b). HHF35 sunulumu gözlenmeyen buna karşılık desmin ve SMA pozitifliği saptanan olguda (Olgu 29) bu iki antikor için sadece bir alanda ve az sayıda hücrede pozitif reaksiyon gösterildi. Ayrıca vimentin pozitifliği tüm tümöral dokulardan farklı olarak farklı birkaç alanda odaksal reaksiyonlar şeklinde gözlemlendi.

MFH olarak teşhis edilen olgularda desmin ve HHF35 için immunreaksiyon saptanmadı. İki vakada fokal SMA pozitifliği (Şekil 7b) ve iki vakada biri fokal diğeri

yoğun ve diffuz olmak üzere s-100 pozitifliği gösterildi. Yoğun ve diffuz s-100 pozitifliği gösteren doku (Şekil 9c) SMA ile negatif reaksiyon verdi. Bir olguda ise vimentin hariç hiçbir antikor ile immunreaksiyon izlenmedi.

UDMT olarak tanımlanan tümöral dokuların ikisinde HHF35, dördünde SMA, yine farklı dört dokuda fokal s-100 (Şekil 19) ve bir olguda yaygın, ancak zayıf F-VIII pozitifliği gösterildi. SMA pozitifliği gösteren dokuların sadece birisinde immun reaksiyonun yaygın ve güçlü olduğu tespit edildi (Şekil 20). Öte yandan neoplastik hücrelerin bir örnek yuvarlak epiteloid hücrelerden meydana geldiği tümöral dokuda (Olgu 40) güçlü ve yaygın vimentin pozitifliğinin (Şekil 11b) yanı sıra farklı birkaç alanda aynı tip hücrelerde odaksal, ancak güçlü SMA pozitifliği (Şekil 11c) dikkat çekti. Nörojenik diferensiyasyon gösteren perivasküler küçük girdap yapılarının izlendiği olguda (Olgu 44) yine birkaç alanda fokal s-100 pozitifliği (Şekil 10b) ve yaygın vimentin boyanması (Şekil 10c) saptandı.

4.3.İmmunohistokimyasal Bulguların Histopatolojik Bulgular ile Karşılaştırılması

Çalışmanın materyali oluşturan toplam elli tümör dokusunun HE ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskopisiyle yapılan ilk histolojik teşhisleri, immunohistokimyasal bulguları ile karşılaştırıldı.

Farklı tümör grupları içerisinde yer alan bazı olgular immunohistokimyasal profillerine göre yeniden adlandırıldı. Bu olgulara ait son teşhisler Tablo 4.5’de verildi.

İlk histopatolojik değerlendirmede UDMT’ler olarak adlandırılan 15 tümöral doku immunohistokimyasal özelliklerine göre yeniden sınıflandırıldı (Tablo 4.6).

Tablo 4.5- Farklı Tümör Tiplerinde Son Teşhis

Olgu No	İlk HE Teşhis*	Pozitif İmmun Reaksiyon Antikorlar (skor)**	Son Adlandırma***
1	KHP	Vim(+++, s-100(++))	BPSKT
2	DFSP	Vim(+++)	DFSP
3	DFSP	Vim(+++), SMA(+)	DFSP
4	DFSP	Vim(+++, s-100(+))	BPSKT
5	DFSP	Vim(+++)	DFSP
6	FM	Vim(+++)	FM
7	FM	Vim(+++)	FM
8	FS	Vim(+++)	FS
9	FS	Vim(+++)	FS
10	FS	Vim(+++)	FS
11	FS	Vim(+++)	FS
12	HM	Vim(+++), F-VIII(+++)	HM
13	HM	Vim(+++), F-VIII(+++)	HM
14	HMS	Vim(+++), HHF35(+++), SMA(+++), F-VIII(+++)	HMS
15	HMS	Vim(+++), HHF35(+++), SMA(+++), F-VIII(++)	HMS
16	HMS	Vim(+++), HHF35(+), SMA(+++), F-VIII(++)	HMS
17	HMS	Vim(+++), SMA(+++), F-VIII(++)	HMS
18	HMS	Vim(+++), SMA(++), F-VIII(++)	HMS
19	LM	Vim(++), HHF35(+++), Desmin(++), SMA(+++)	LM
20	LM	Vim(+++), HHF35(+++), Desmin(++), SMA(+++)	LM
21	LM	Vim(+++), HHF35(++), Desmin(+), SMA(+++)	LM
22	LM	Vim(+++), SMA(+++)	LM
23	LM	Vim(+++), HHF35(+++), Desmin(++), SMA(+++)	LM
24	LM	Vim(+++), HHF35(+++), Desmin(++), SMA(+++)	LM
25	LM	Vim(+++, MSA(+))	FM
26	LM	Vim(+++), HHF35(+++), SMA(+++)	LM
27	LMS	Vim(+++), SMA(+++), s-100(+)	LMS
28	LMS	Vim(+++), HHF35(+++), Desmin(++), SMA(+++)	LMS
29	LMS	Vim(+), Desmin(+), SMA(+)	MFH
30	MFH	Vim(+++), SMA(+)	MFH
31	MFH	Vim(+++), SMA(+), s-100(+)	MFH
32	MFH	Vim(+++, s-100(+++))	MPSKT
33	MFH	Vim(+++)	MFH
34	NFM	Vim(+++)	BMT
35	NFM	Vim(+++)	FM

*KHP: Köpek Hemanjiyoperisitom; DFSP: Dermatofibrosarkom protüberens; LM: Leiomyom; LMS: Leiomyosarkom; MFH: Malign Fibröz Histiositom; NFM: Nörofibrom

**Vim: Vimentin; MSA: Kas Aktini; SMA: Düz Kas Aktini

+: Birkaç alanda fokal pozitif reaksiyon; ++: Yaygın zayıf pozitif reaksiyon; +++: Yaygın güçlü pozitif reaksiyon

***BPSKT: Benign periferik sinir kılıfı tümörü; FM: Fibrom; MFH: Malign Fibröz Histiositom; MPSKT: Malign periferik sinir kılıfı tümörü; BMT: Benign mezenşimal tümör

Tablo 4.6- Diferensiyasyon Yönü Tanımlanamamış Tümörlerde Son Teşhis

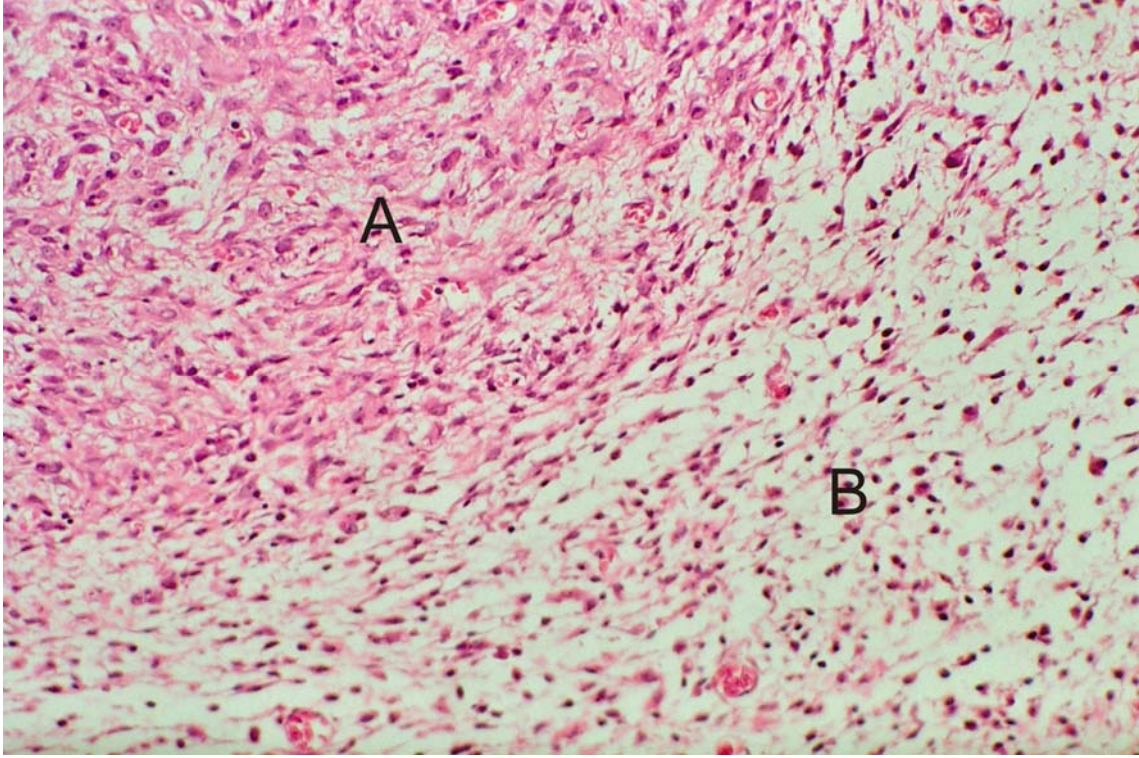
Olgu No	Pozitif İmmun Reaksiyon	Son Adlandırma**
	Antikorlar (skor)*	
36	Vim(+++), F-VIII(++)	HMS
37	Vim(++)	BMT
38	Vim(+++), s-100(+)	BPSKT
39	Vim(+++)	BFHT
40	Vim(+++), SMA(+)	LMS (epiteloid)
41	Vim(+++)	UDS
42	Vim(+++), s-100(+)	UDS
43	Vim(+++), s-100(+)	BPSKT(Schwannom)
44	Vim(+++), s-100(+)	BPSKT
45	Vim(+++)	BMT
46	Vim(+++), SMA(+++)	LMS
47	Vim(+++), SMA(+)	FS
48	Vim(+++), MSA(++), SMA(+++)	LMS
49	Vim(+++)	FS
50	Vim(++), MSA(+)	MFH

*Vim: Vimentin; MSA: Kas Aktini; SMA: Düz Kas Aktini

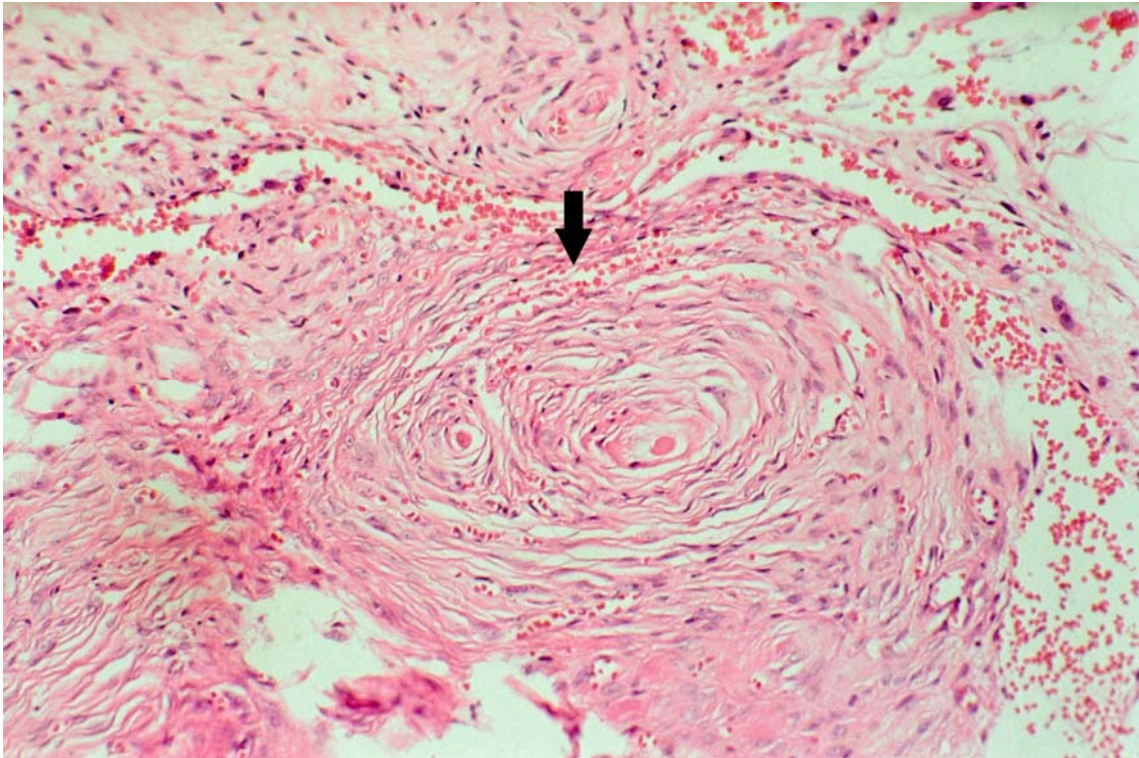
+: Birkaç alanda fokal pozitif reaksiyon; ++: Yaygın zayıf pozitif reaksiyon; +++: Yaygın güçlü pozitif reaksiyon

** HMS: Hemanjiyosarkom; BMT: Benign mezenşimal tümör; BPSKT: Benign periferik sinir kılıfı tümörü; BFHT: Benign fibrohistiyositik tümör; LMS: Leiomyosarkom; UDS: Undiferensiye sarkom; FS: Fibrosarkom; MFH: Malign Fibröz Histiyositom

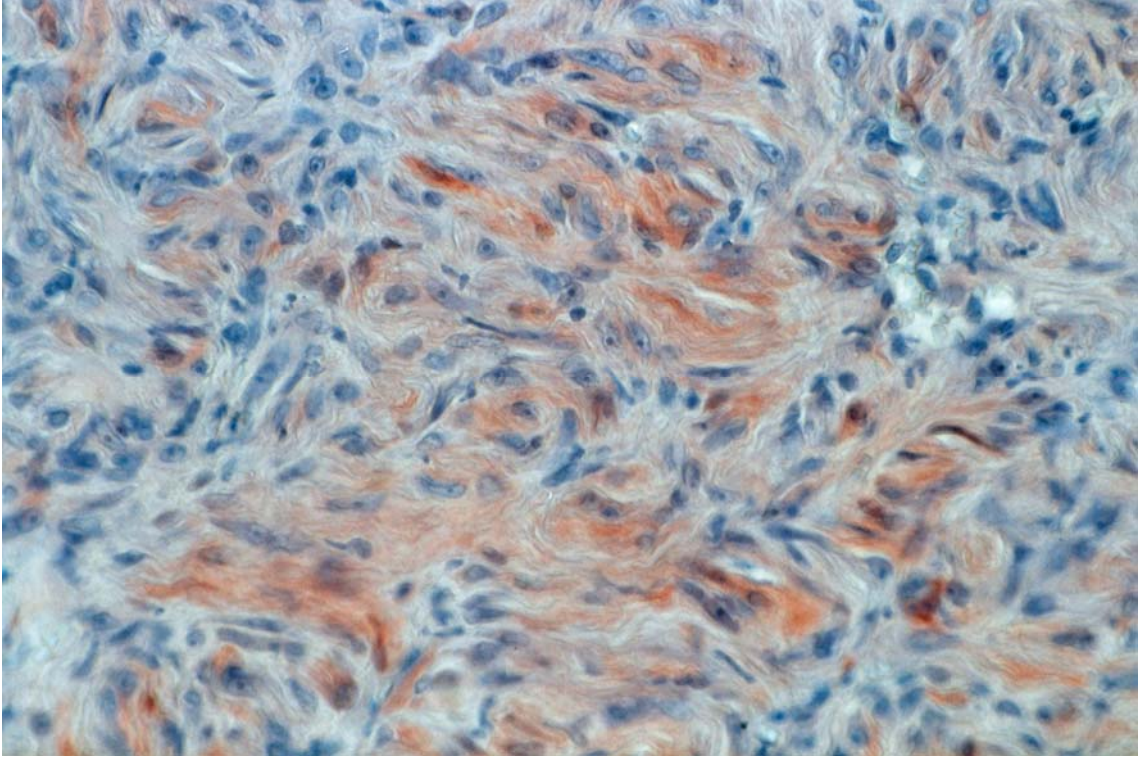
ŞEKİLLER



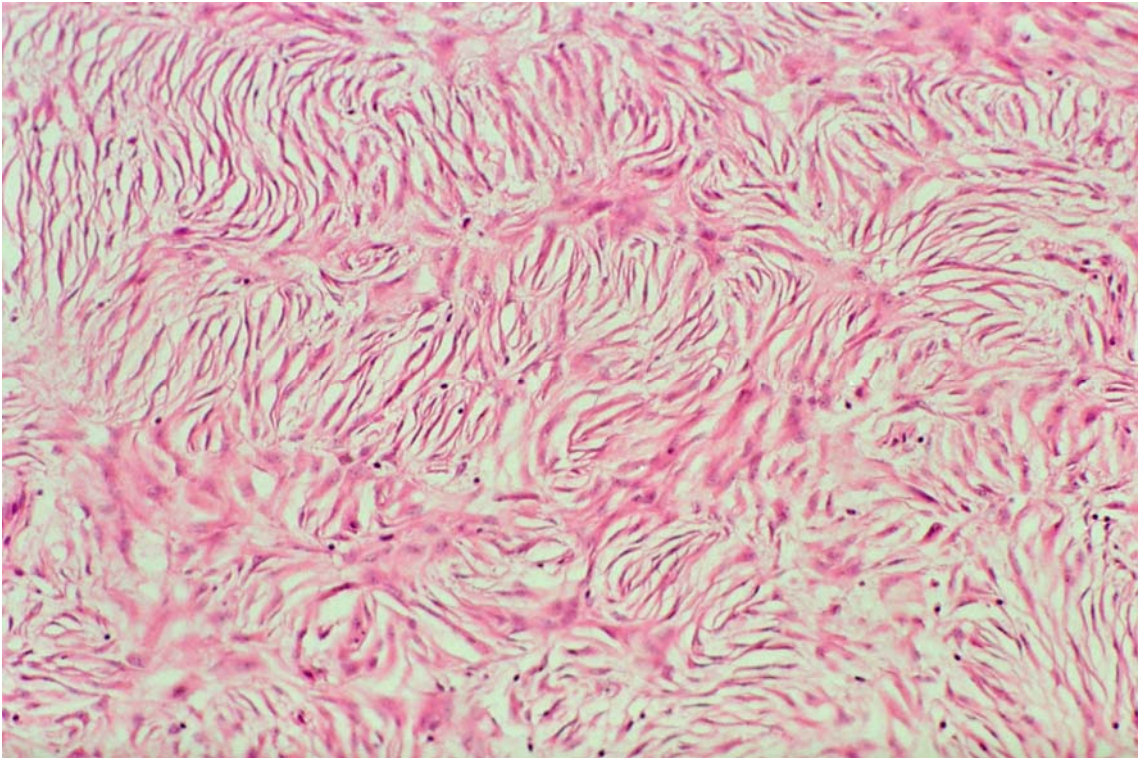
Şekil 1a. Olgu 1. Histolojik olarak hemanjiyoperisitom şeklinde adlandırılan tümöral doku. Antoni A (A) ve Antoni B (B) benzeri alanlar. HE, 200x



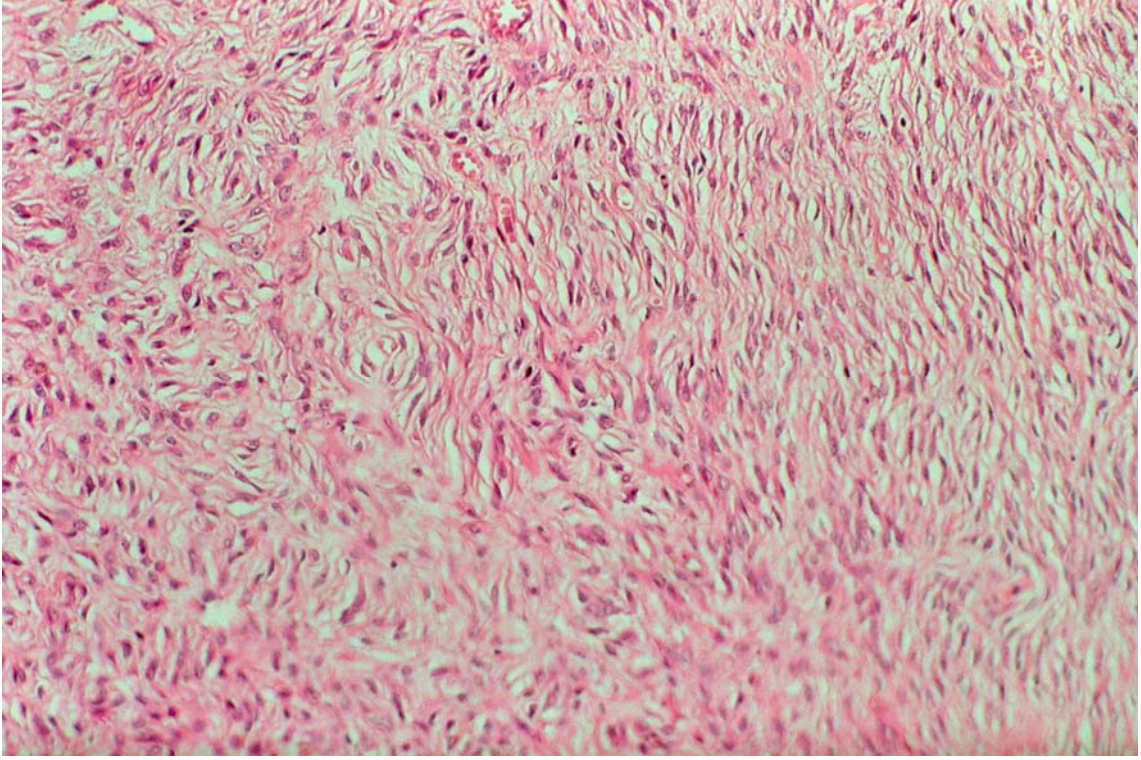
Şekil 1b. Olgu 1. Hemanjiyoperisitom şeklinde adlandırılan tümöral doku. İğsi hücrelerin oluşturduğu perivasküler girdaplar, parmak izi paterni (ok işareti). HE, 200x



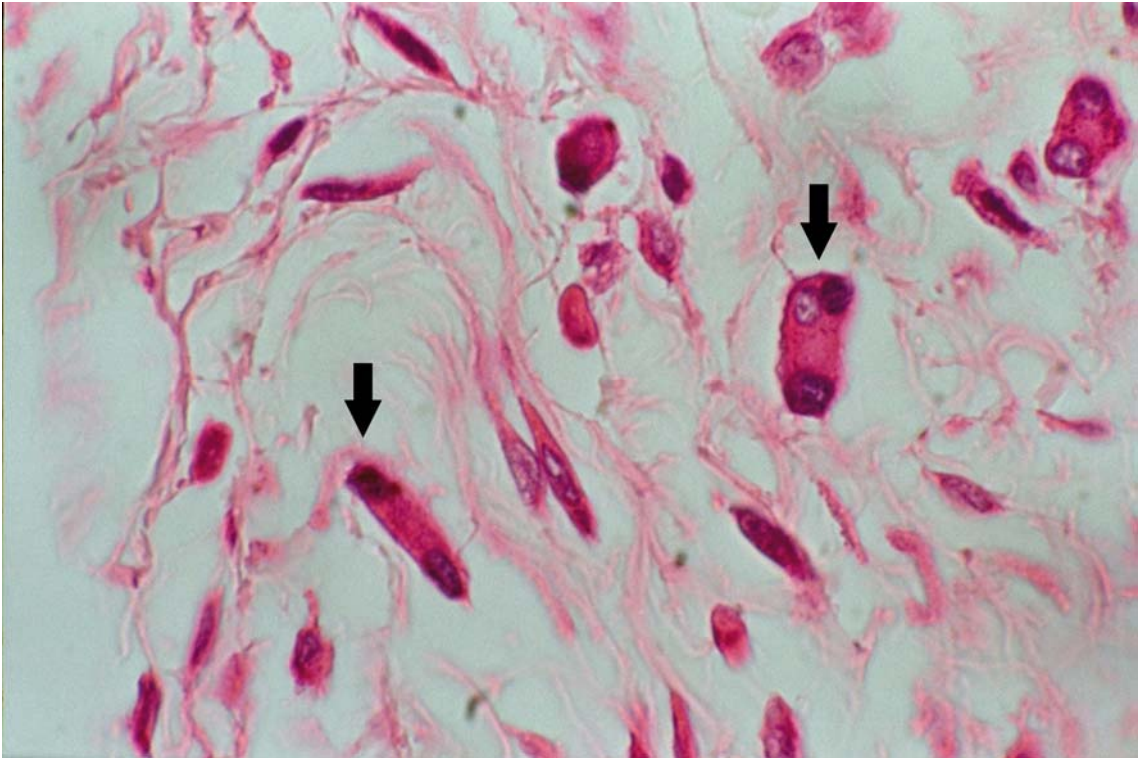
Şekil 1c. Hemanjiyoperisitom şeklinde adlandırılan olguda s-100 boyanması. Son teşhis: Periferik sinir kılıfı tümörü. İmmunperoksidaz, 400x



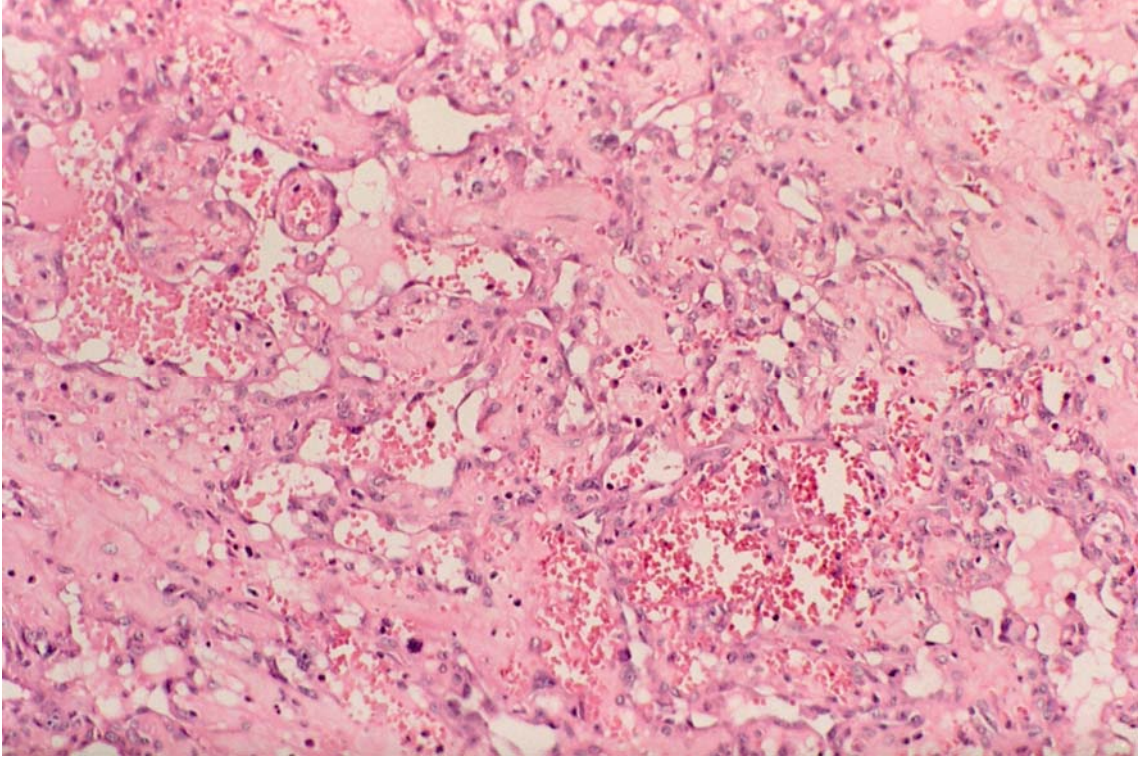
Şekil 2. Olgu 3. Dermatofibrosarkom protüberens. Gerçek storiform patern. HE, 200x



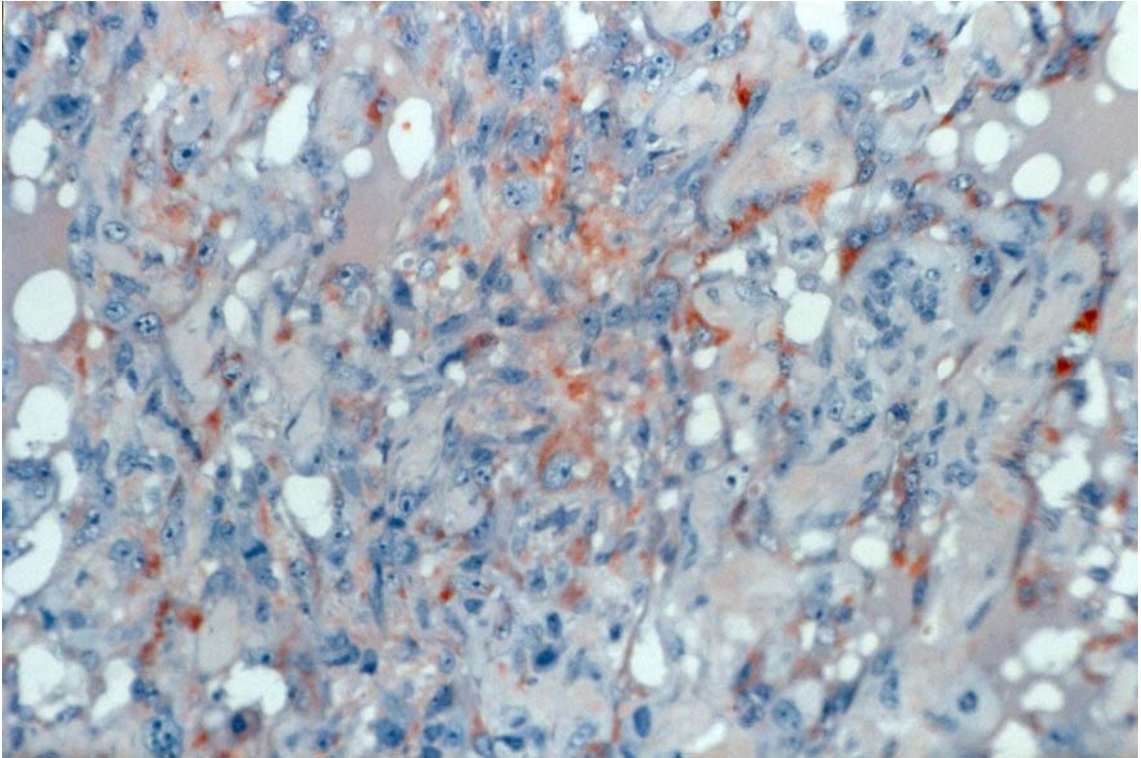
Şekil 3a. Olgu 4. Dermatofibrosarkom protüberens şeklinde adlandırılan dokuda storiform ve fibriler yapı. HE, 200x.



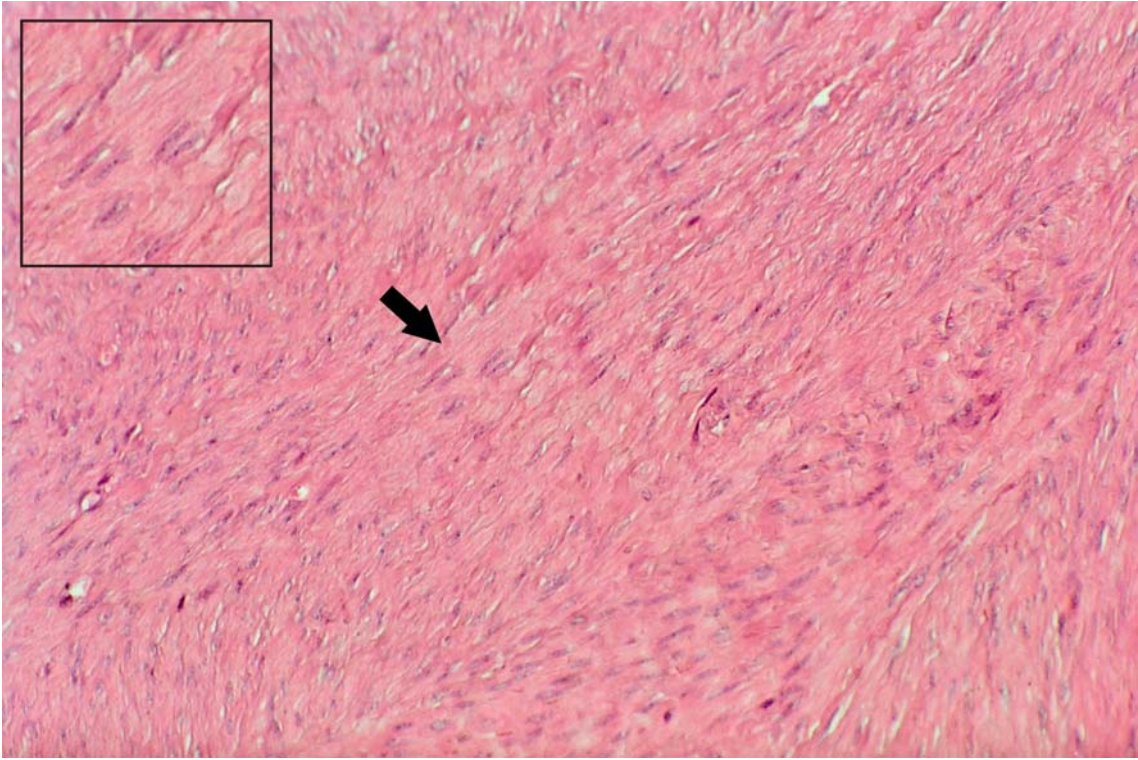
Şekil 3b. Olgu 4. Eozinofilik rabdomiyoplastik hücreler (ok işareti). Son teşhis: Periferik sinir kılıfı tümörü. HE, 1000x



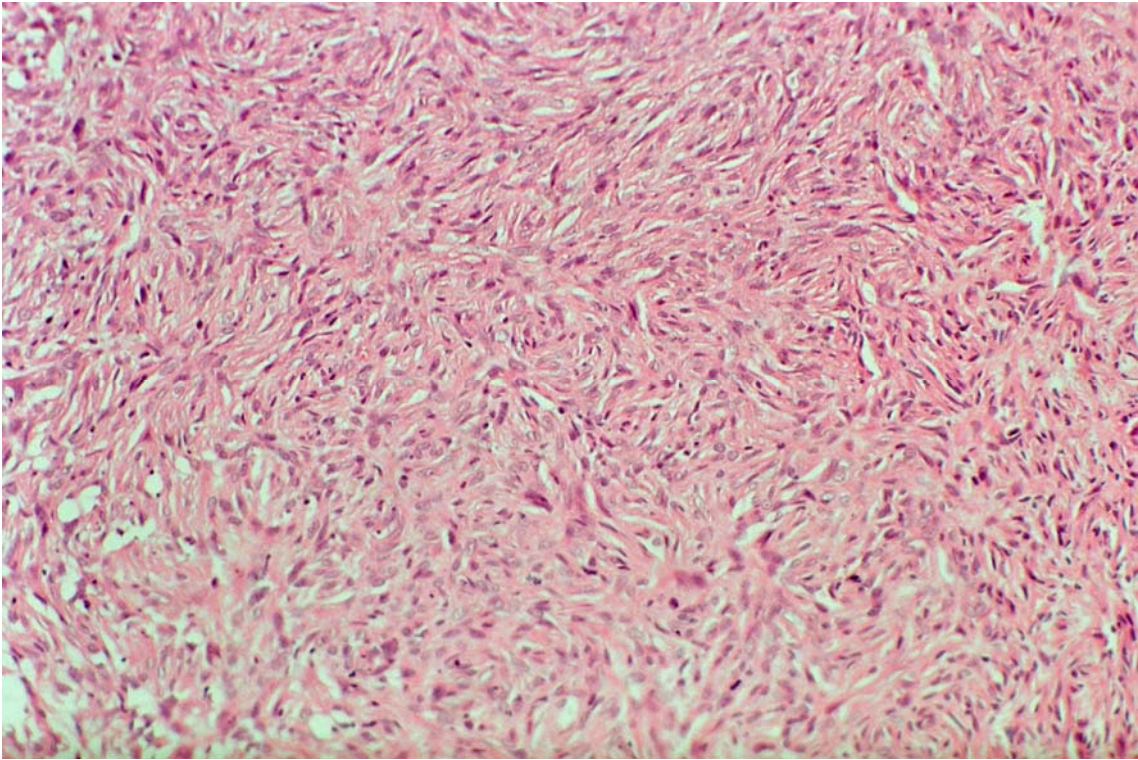
Şekil 4a. Olgu 14. Hemanjiyosarkom olarak teşhis edilen dokuda yarıklanmalar ve ektazik vasküler boşluklar. HE, 200x



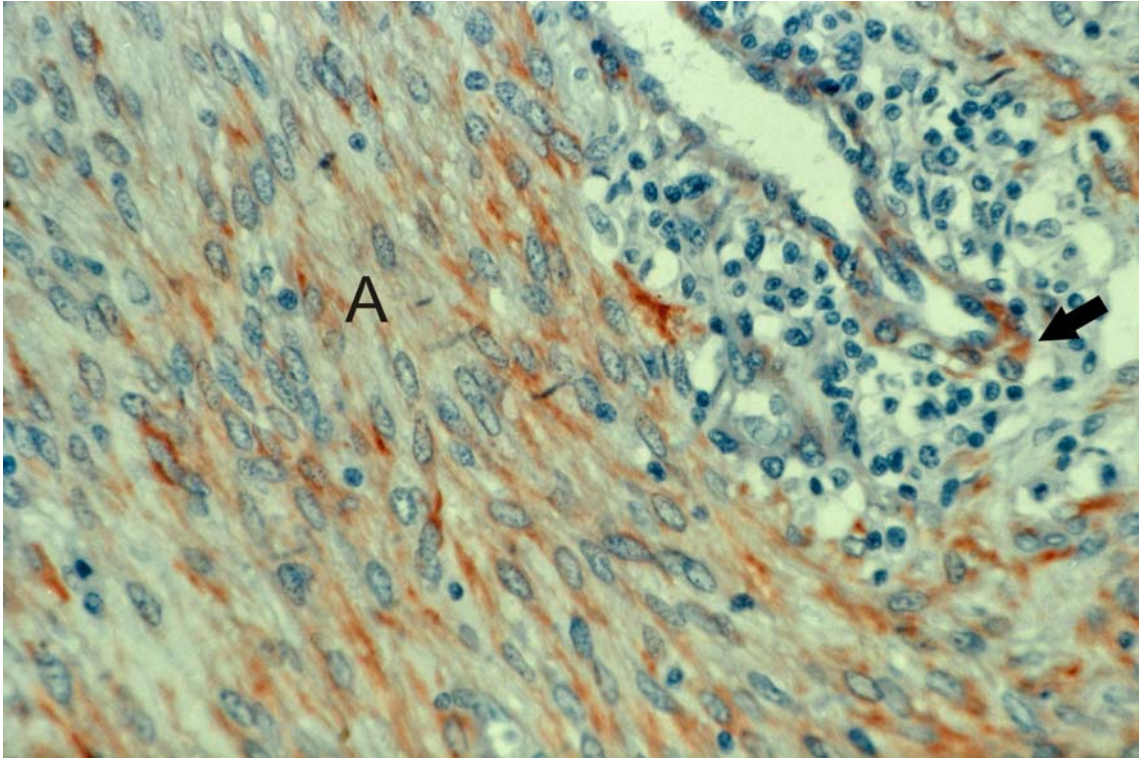
Şekil 4b. Olgu 14. Hemanjiyosarkom. F-VIII boyanması. İmmunperoksidaz, 400x



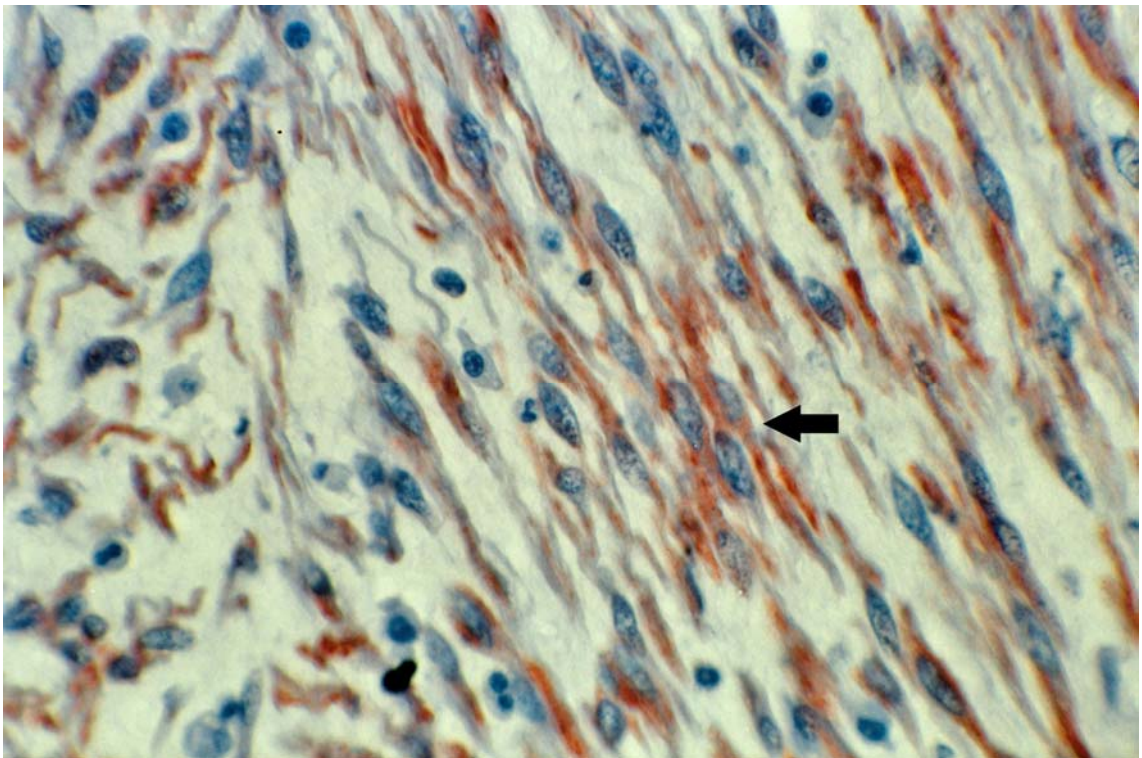
Şekil 5. Olgu 23. Leiomyom. Kesişen demet yapıları. Detay (ok işareti): Belirgin çekirdekçikli uzun küt uçlu çekirdeğe sahip mekik hücreler. HE, 200x



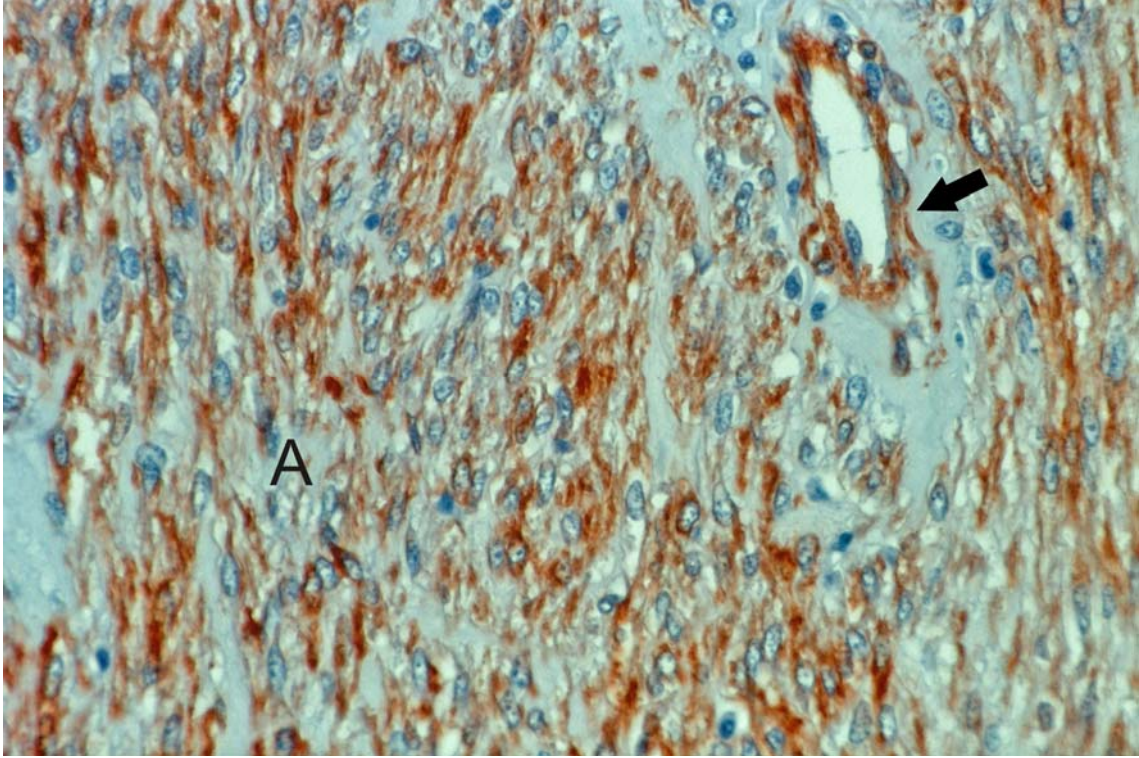
Şekil 6a. Olgu 19. Leiomyom. Kısa demetler (Yalancı storiform yapı). HE, 200x



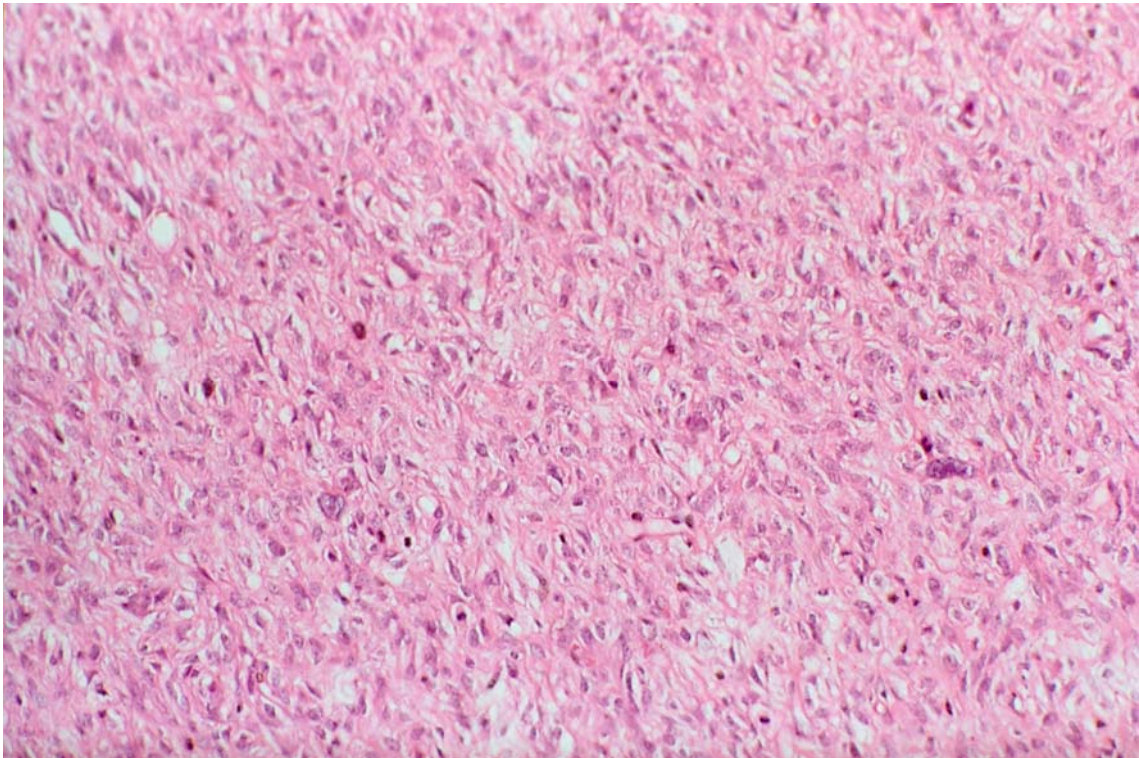
Şekil 6b. Olgu 19. Leiomyom. Mekik hücrelerde (A) ve vasküler düz kas hücrelerinde (ok işareti) HHF35 boyanması. İmmunperoksidaz, 400x



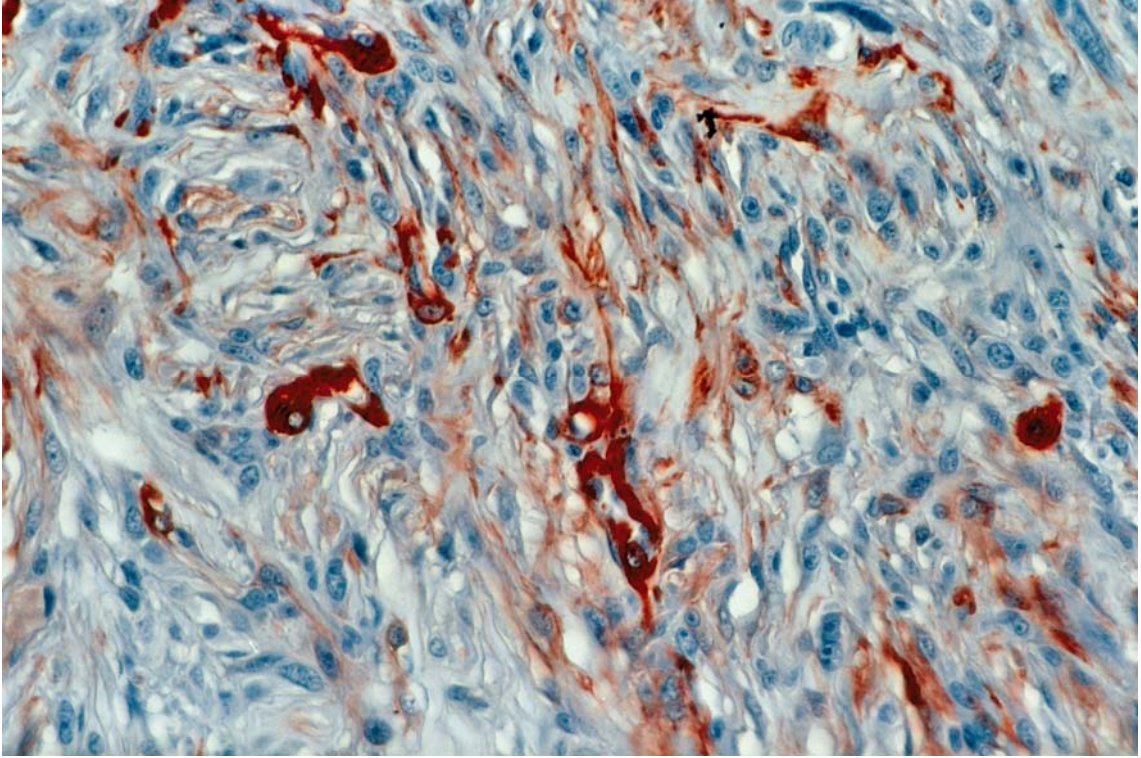
Şekil 6c. Olgu 19. Leiomyom. Neoplastik hücrelerde sitoplazmik HHF35 boyanması (ok işareti). İmmunperoksidaz, 600x



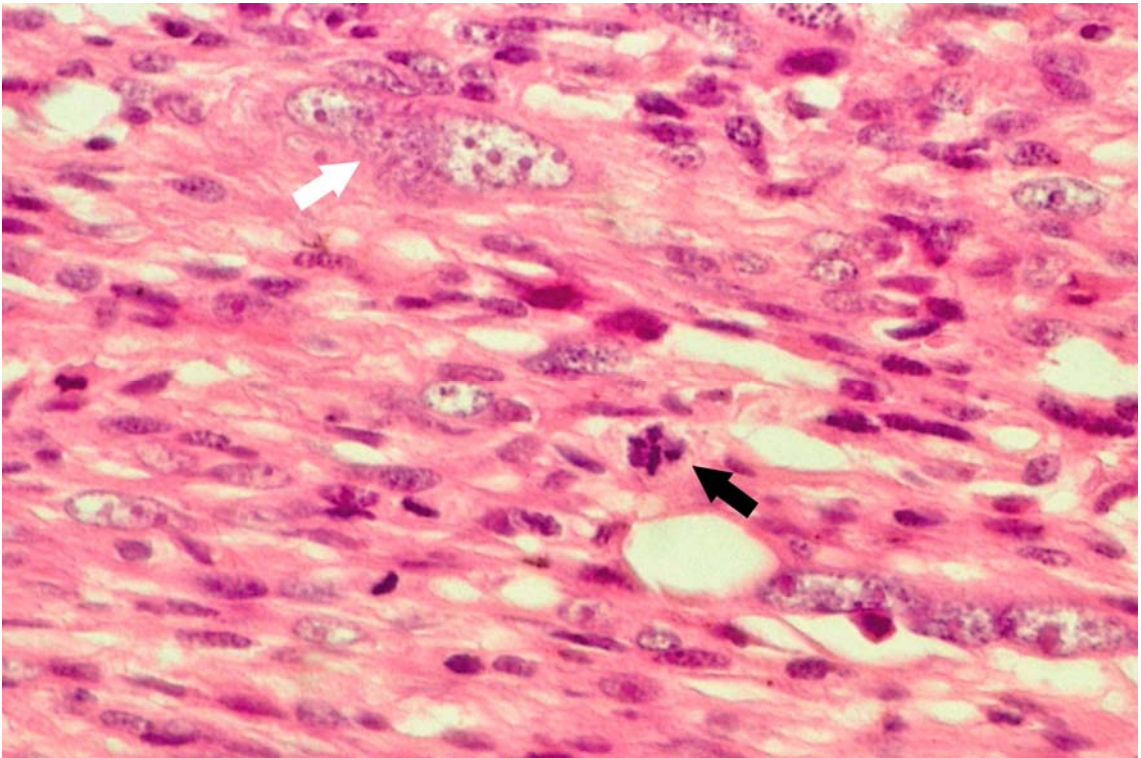
Şekil 6d. Olgu 19. Leiomyom. Neoplastik mekik hücrelerde (A) ve peristlerde (ok işareti) SMA boyanması. İmmunperoksidaz, 400x



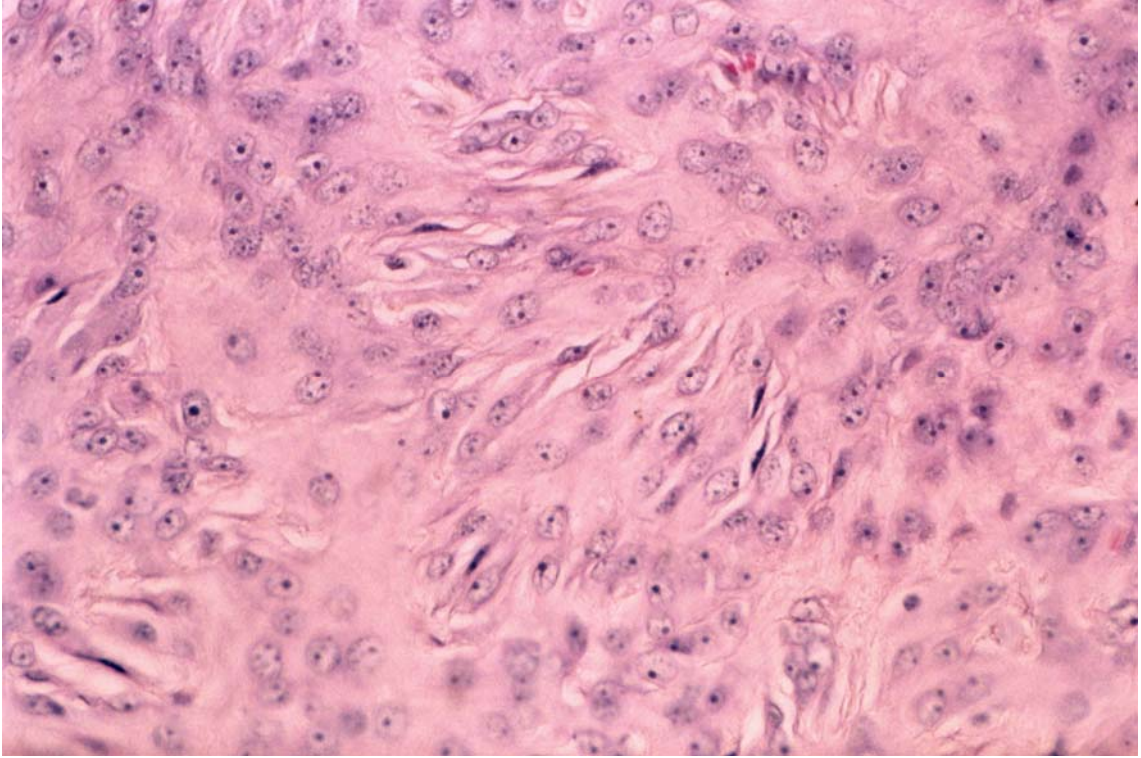
Şekil 7a. Olgu 31. Malign fibröz histiyositom. Pleomorfik-storiform patern. HE, 200x



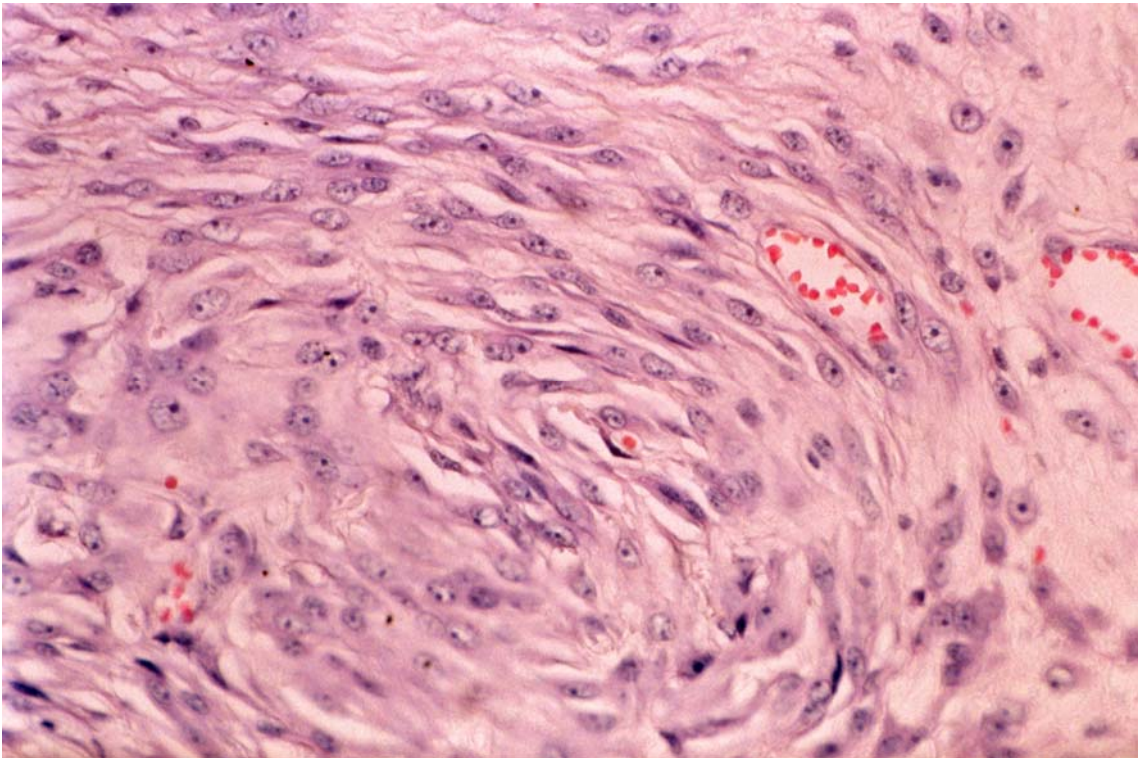
Şekil 7b. Olgu 31. Malign fibröz histiyositom. Odaksal SMA boyanması. İmmunperoksidaz, 400x



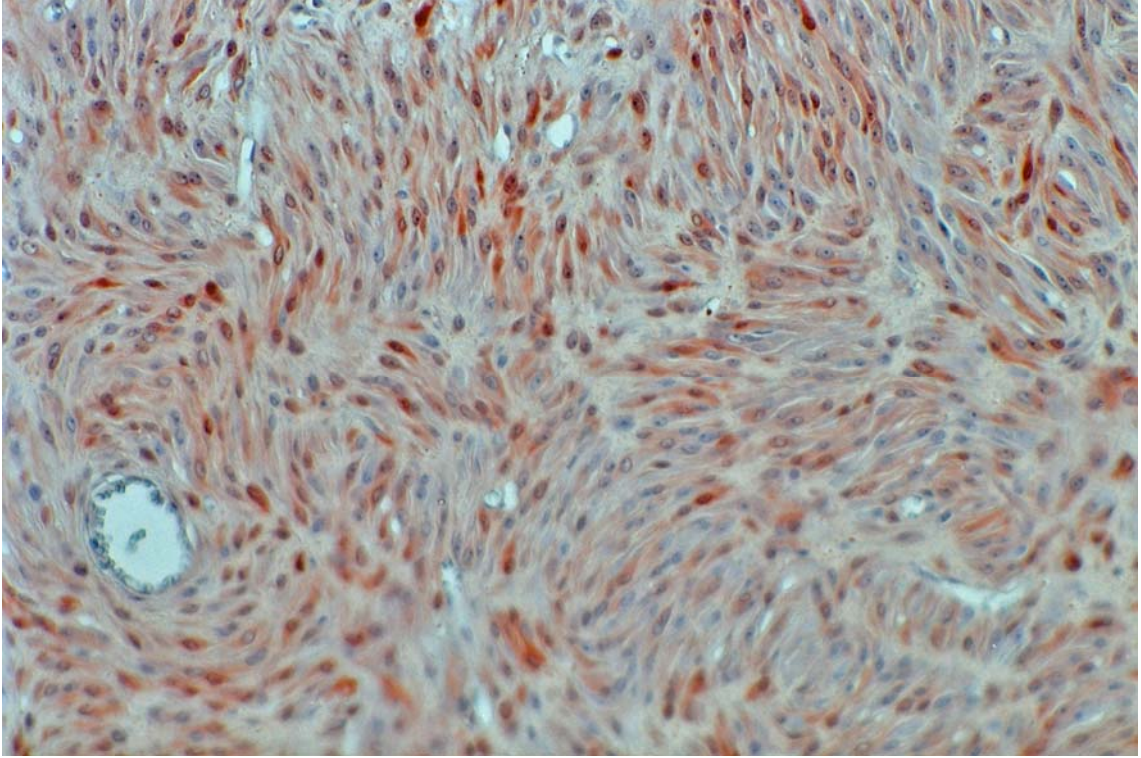
Şekil 8. Olgu 30. Malign fibröz histiyositom. İri anaplastik hücreler (beyaz ok) ve atipik mitotik figür (siyah ok). HE, 600x



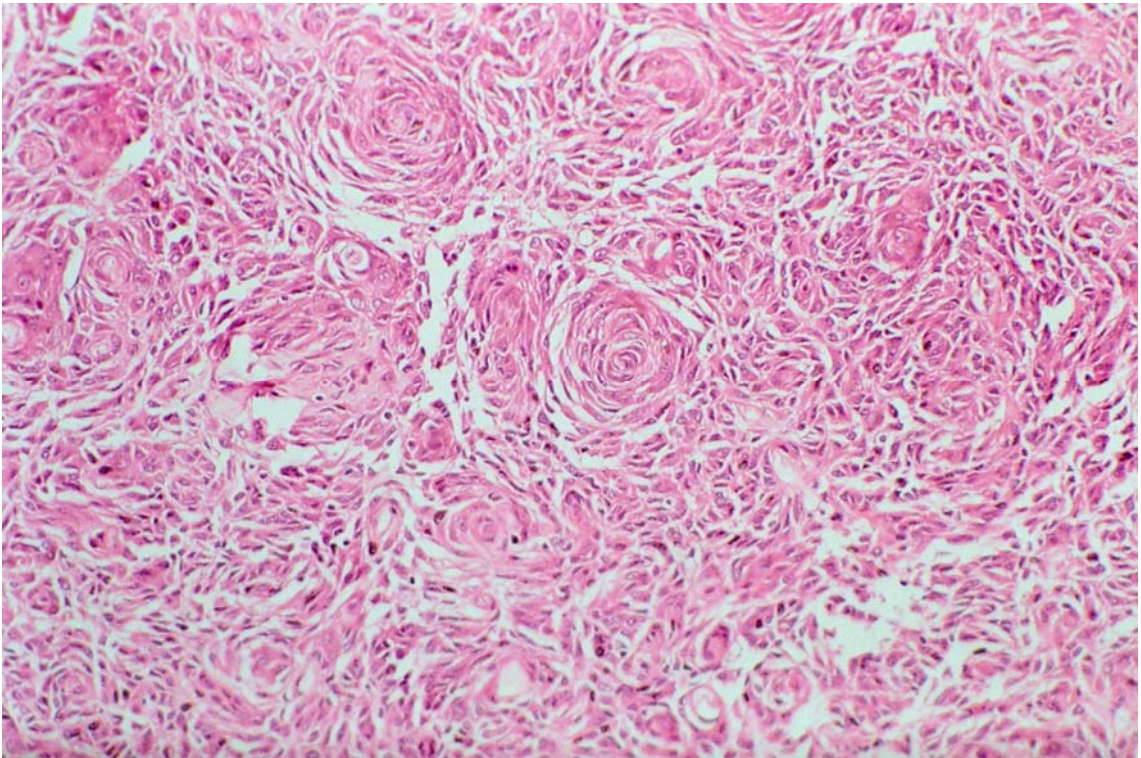
Şekil 9a. Olgu 32. Malign fibröz histiyositom olarak teşhis edilen dokuda ilkel palizatlar oluşturan çekirdekler (Verocay cisimcikleri) HE, 400x



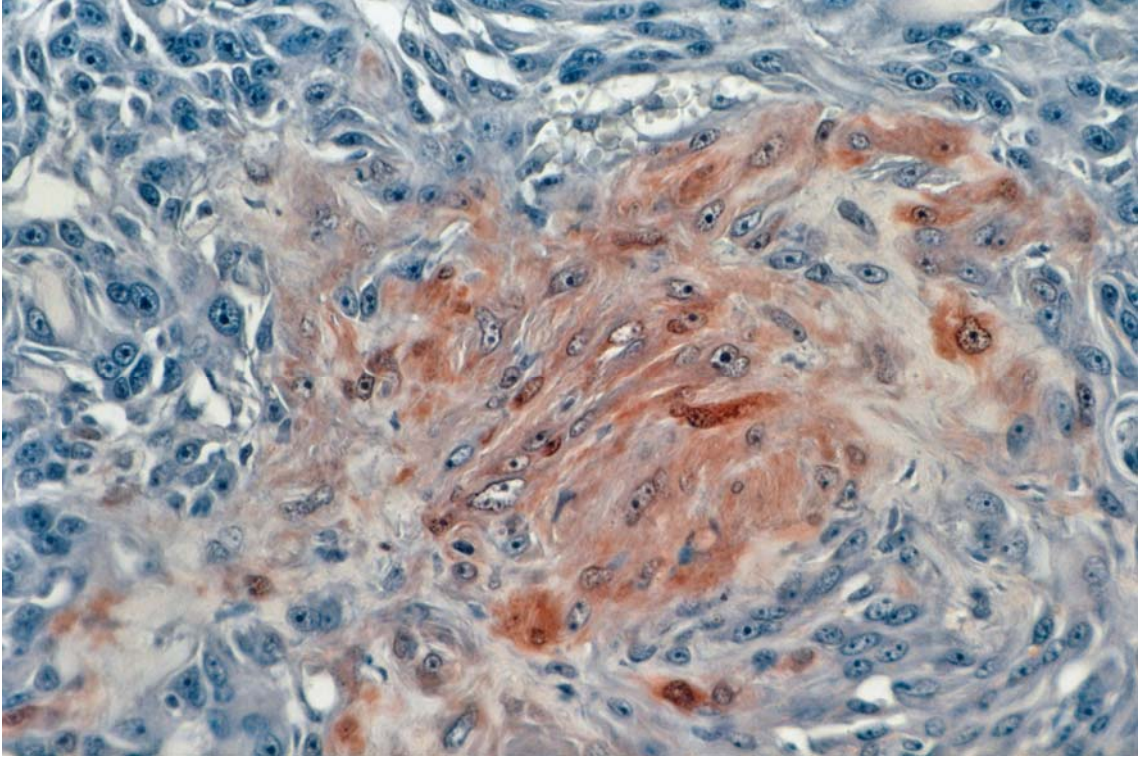
Şekil 9b. Olgu 32. Malign fibröz histiyositom olarak teşhis edilen dokuda parmak izi paterni HE, 400x



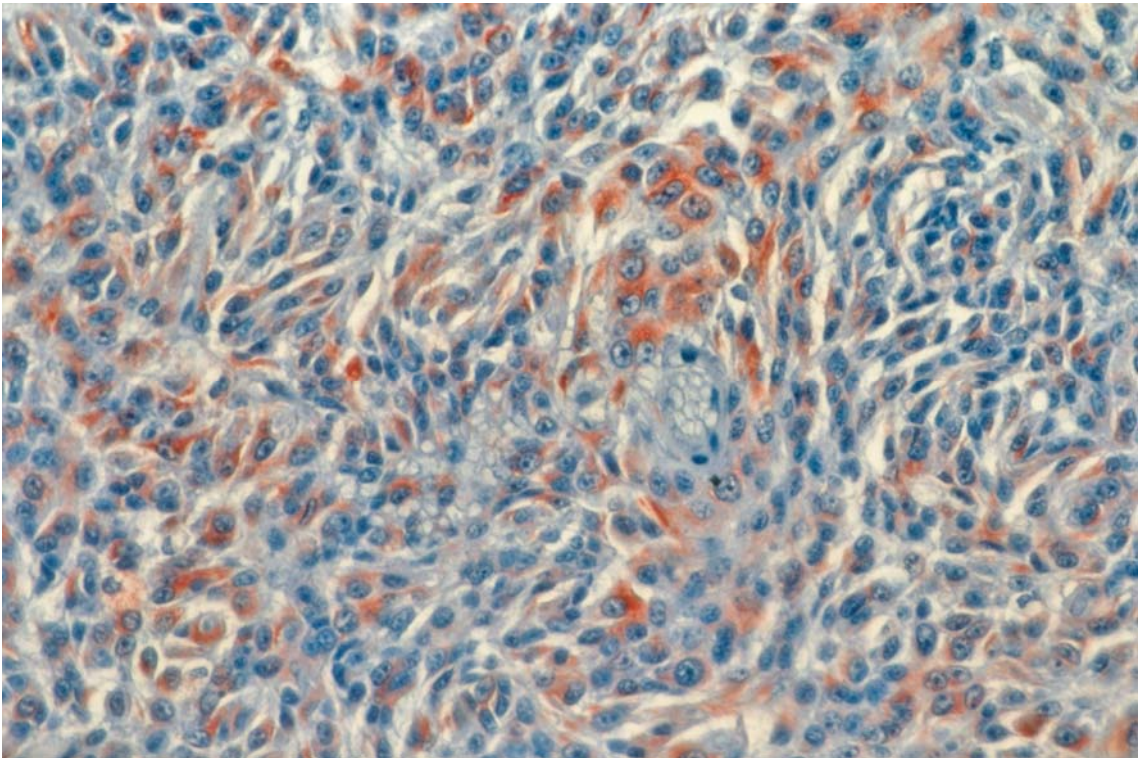
Şekil 9c. Olgu 32. Yaygın s-100 boyanması. Son teşhis: Malign periferik sinir kılıfı tümörü. İmmunperoksidaz, 200x



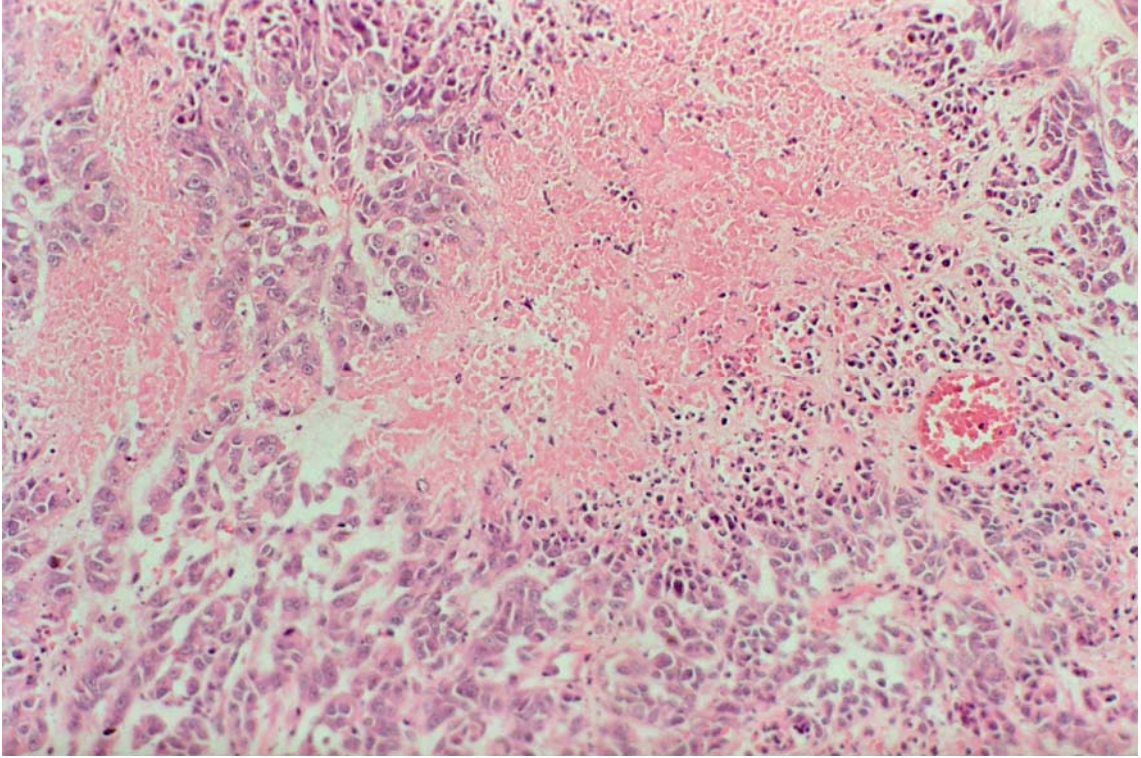
Şekil 10a. Olgu 44. Periferik sinir kılıfı tümörü. Küçük girdap yapıları. HE, 200x



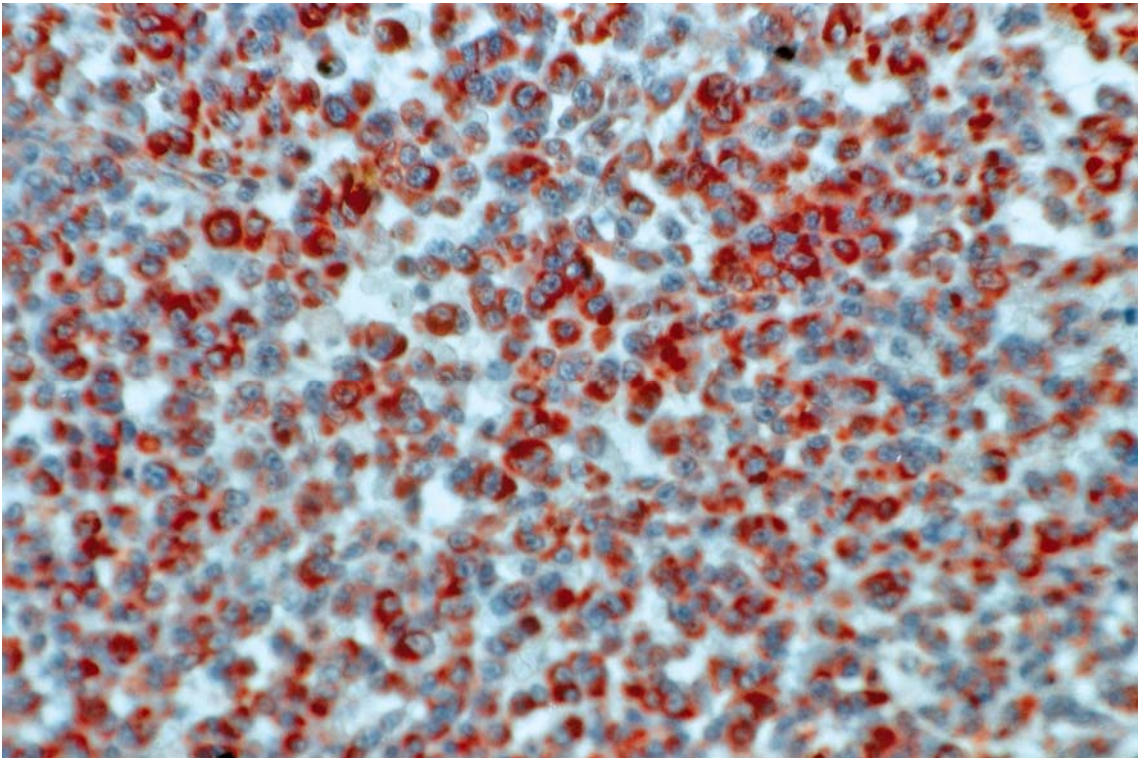
Şekil 10b. Olgü 44. Periferik sinir kılıfı tümörü. Odaksal s-100 boyanması. İmmunperoksidaz, 600x



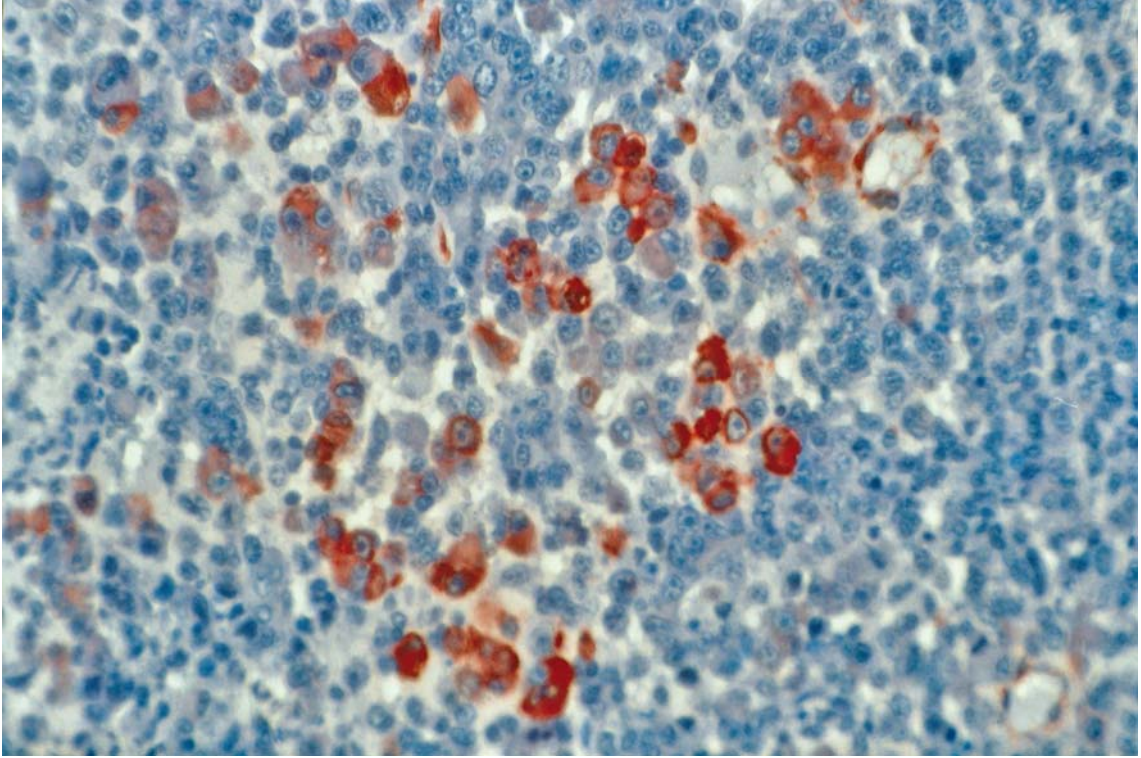
Şekil 10c. Olgü 44. Periferik sinir kılıfı tümörü. Yaygın vimentin boyanması. İmmunperoksidaz, 400x



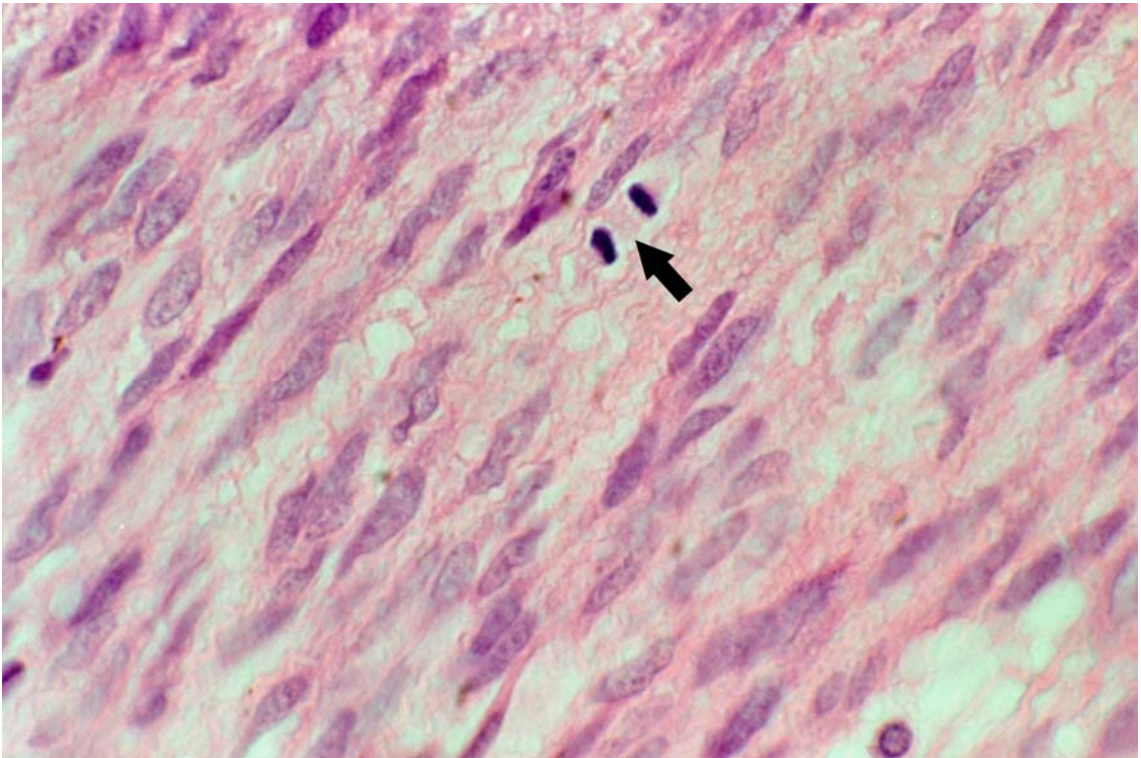
Şekil 11a. Olgu 40. Leiomyosarkom. Tümör nekrozu. HE, 200x



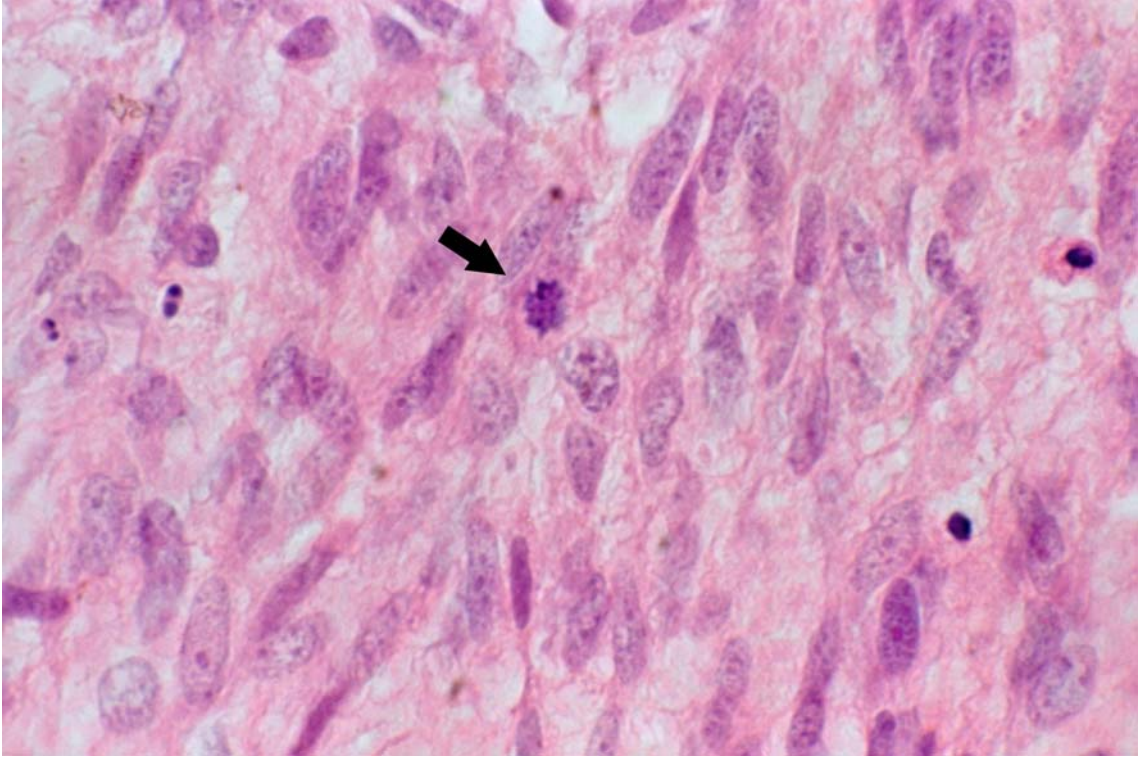
Şekil 11b. Olgu 40. Leiomyosarkom. Epiteloid neoplastik hücrelerde yaygın vimentin boyanması. İmmunperoksidaz, 400x



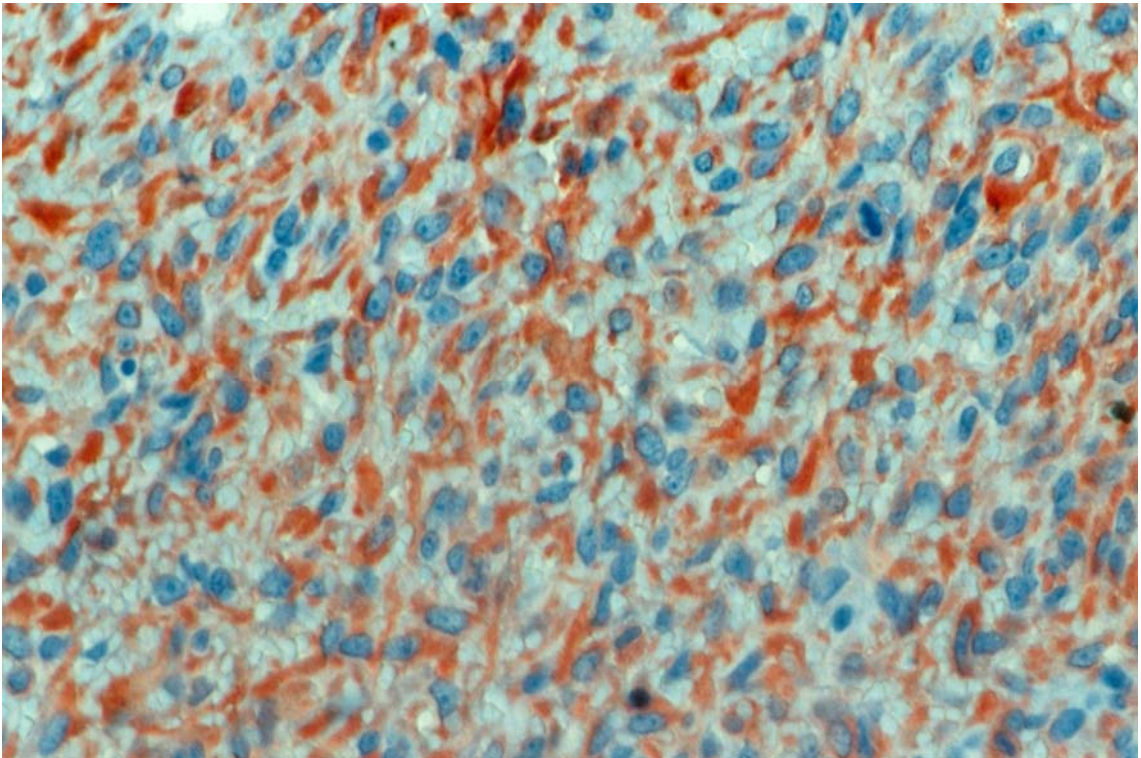
Şekil 11c. Olgu 40. Leiomyomiyosarkom. Epiteloid neoplastik hücrelerde güçlü odaksal SMA boyanması. İmmunperoksidaz, 400x



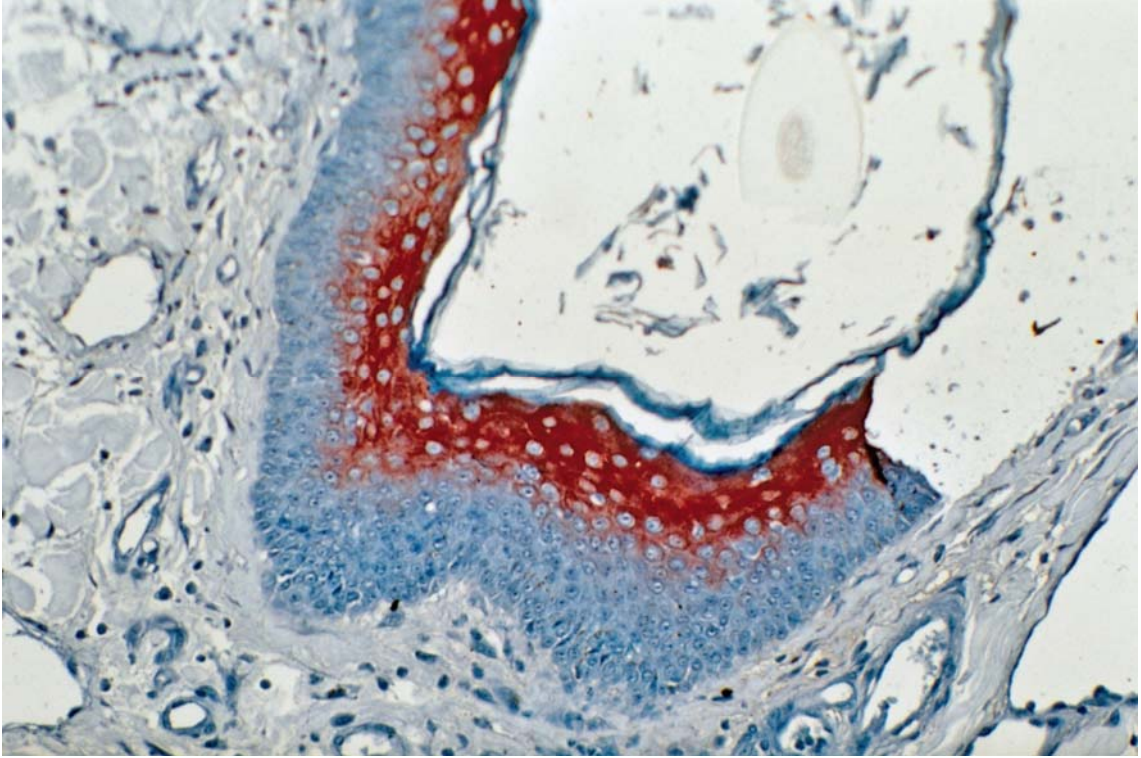
Şekil 12a. Olgu 49. Fibrosarkom. Mitotik figür (ok işareti) HE, 1000x



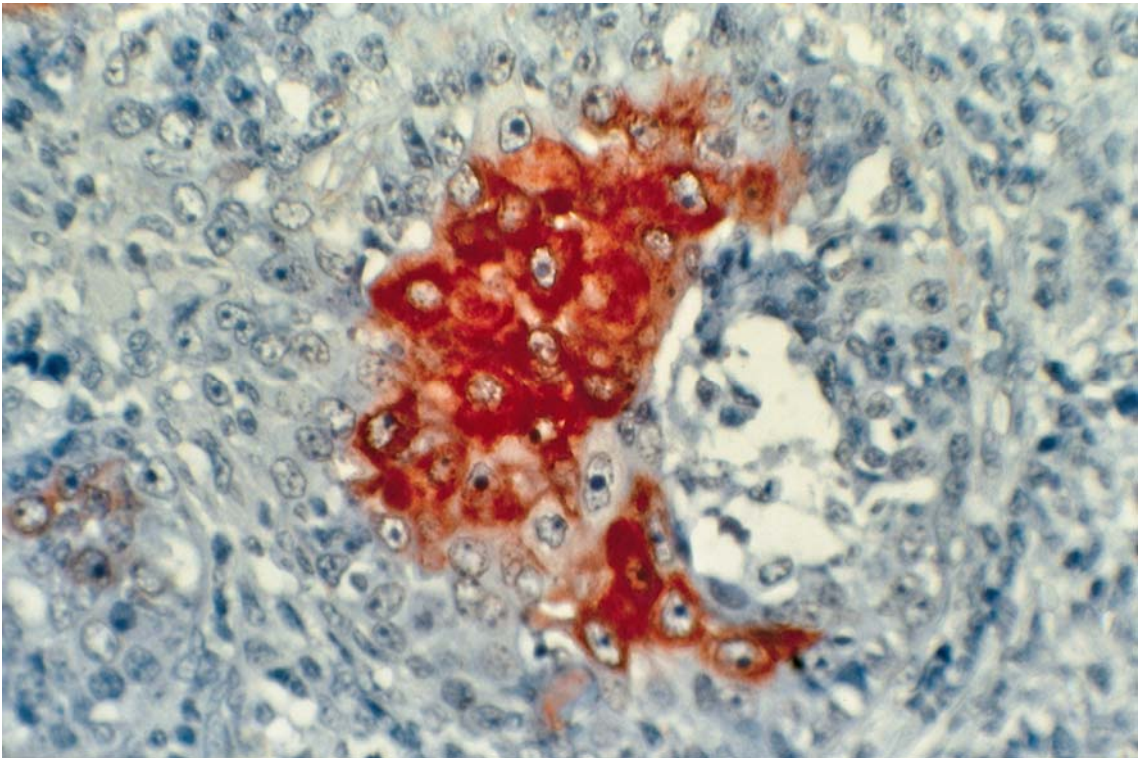
Şekil 12b. Olgu 49. Fibrosarkom. Atipik mitotik figür (ok işareti) HE, 1000x



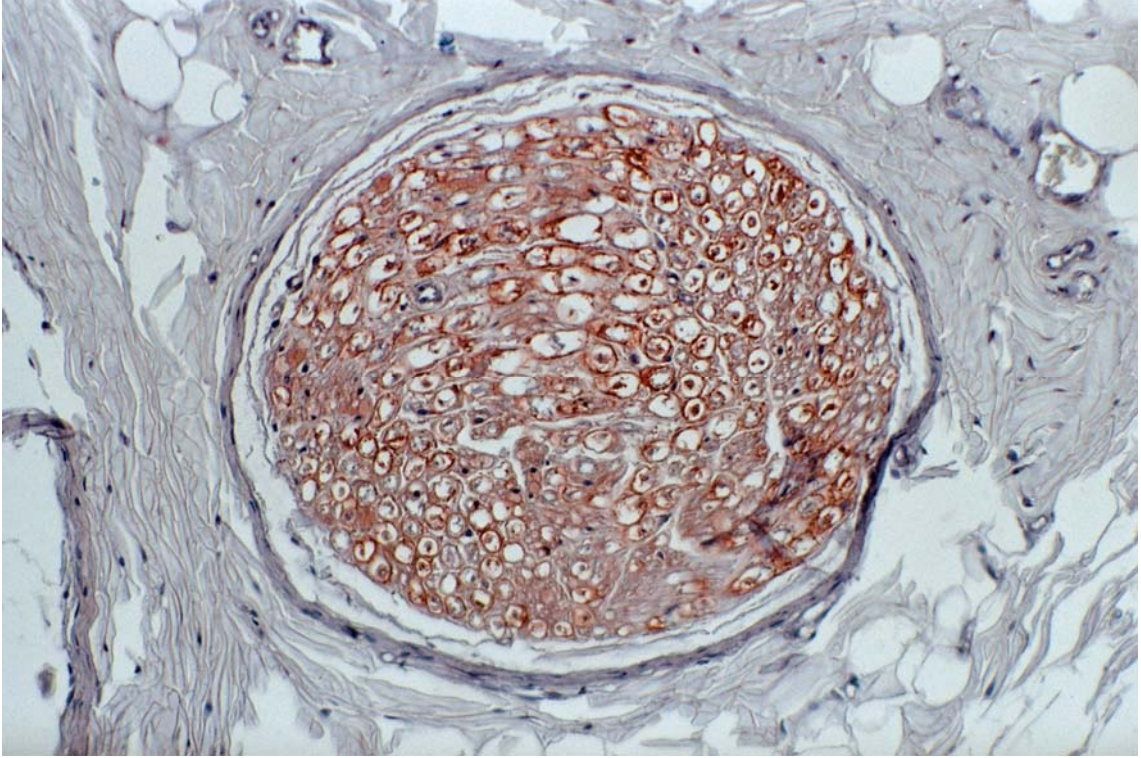
Şekil 13. Kontrol doku. Fibrosarkom. Tombul ovoid çekirdekli neoplastik hücrelerde yaygın sitoplazmik vimentin boyanması. İmmunperoksidaz, 400x



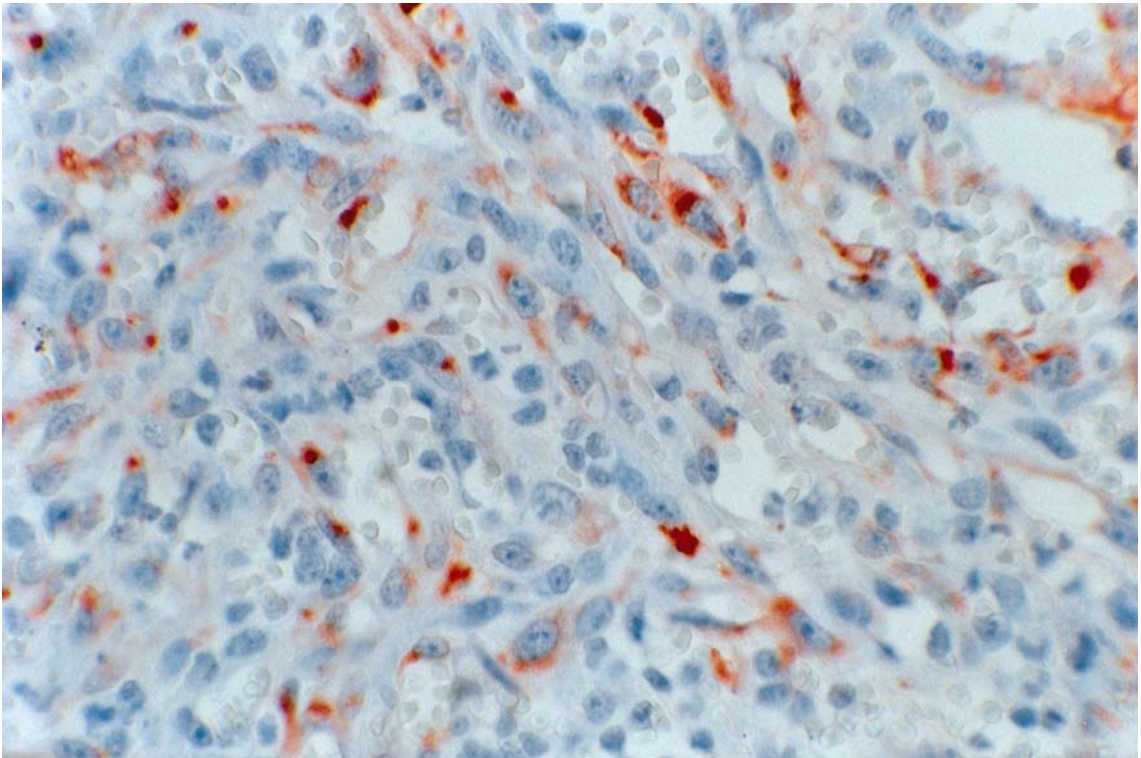
Şekil 14a. Köpek derisi. Epidermisin kornifiye hücrelerinde keratin boyanması. İmmunperoksidaz, 200x



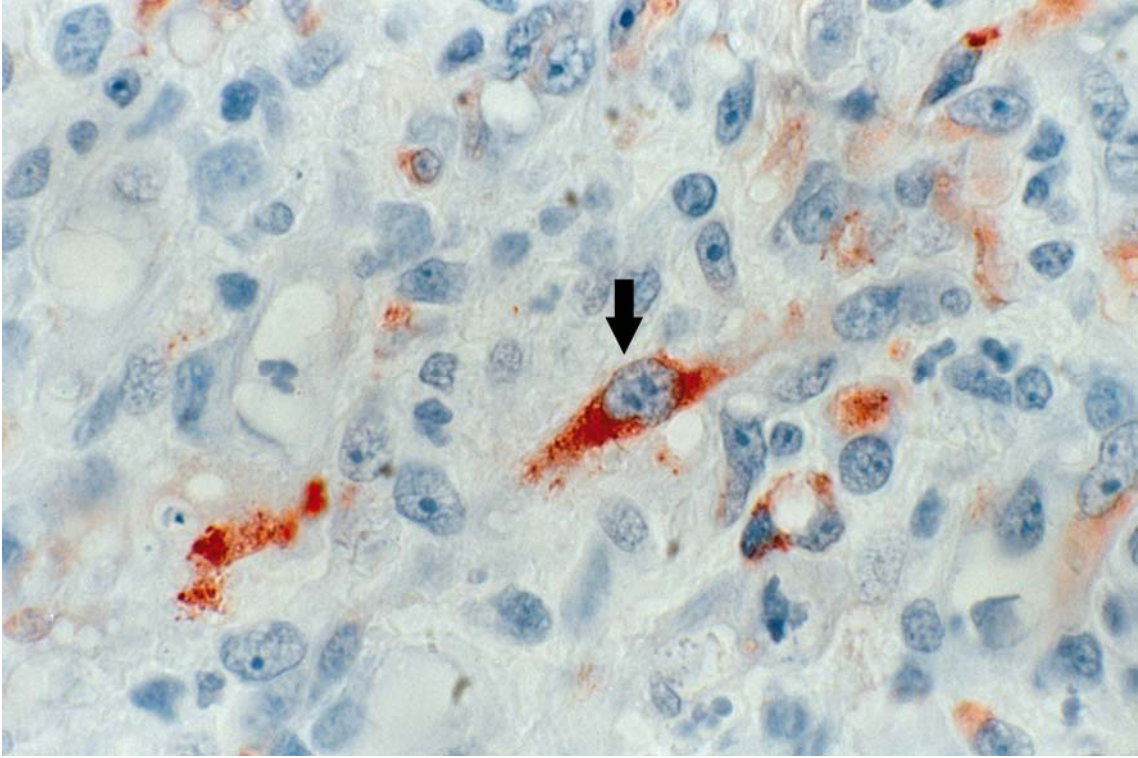
Şekil 14b. Tükürük bezi adenokarsinomu (Köpek dokusu). Bez epitellerinde keratin boyanması. İmmunperoksidaz, 600x



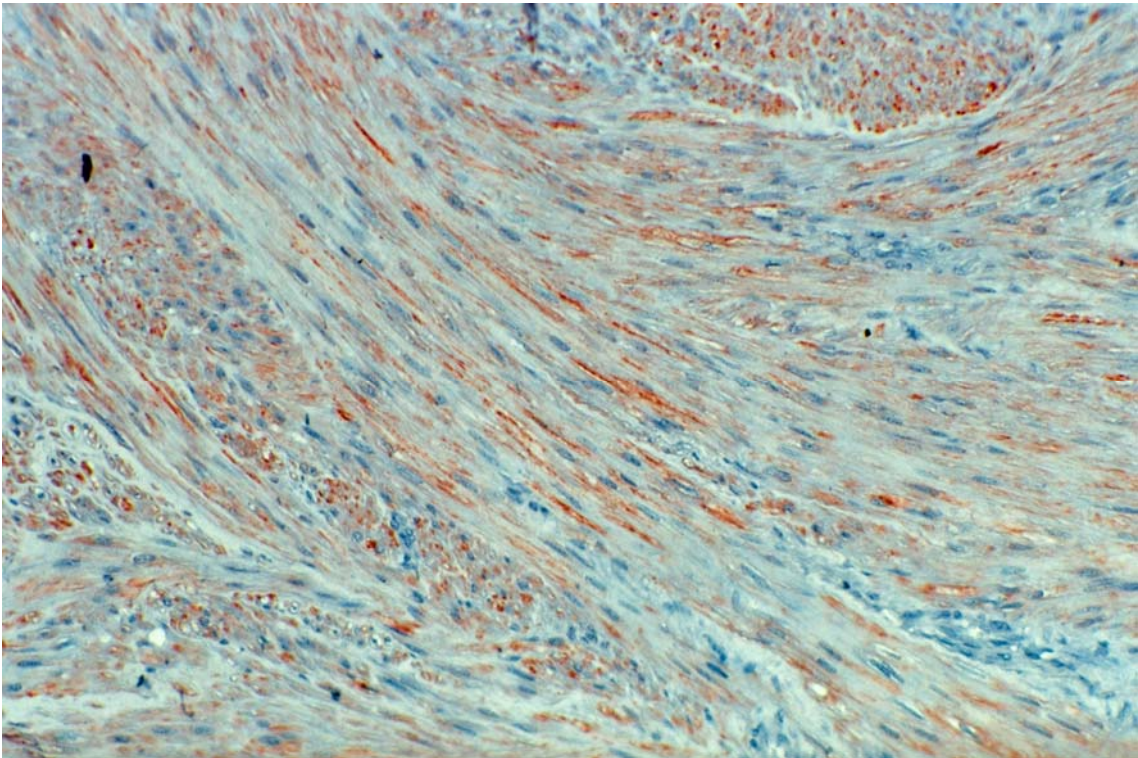
Şekil 15. Periferik sinir (köpek). Schwann hücrelerinde sitoplazmik s-100 boyanması
İmmunperoksidaz, 200x



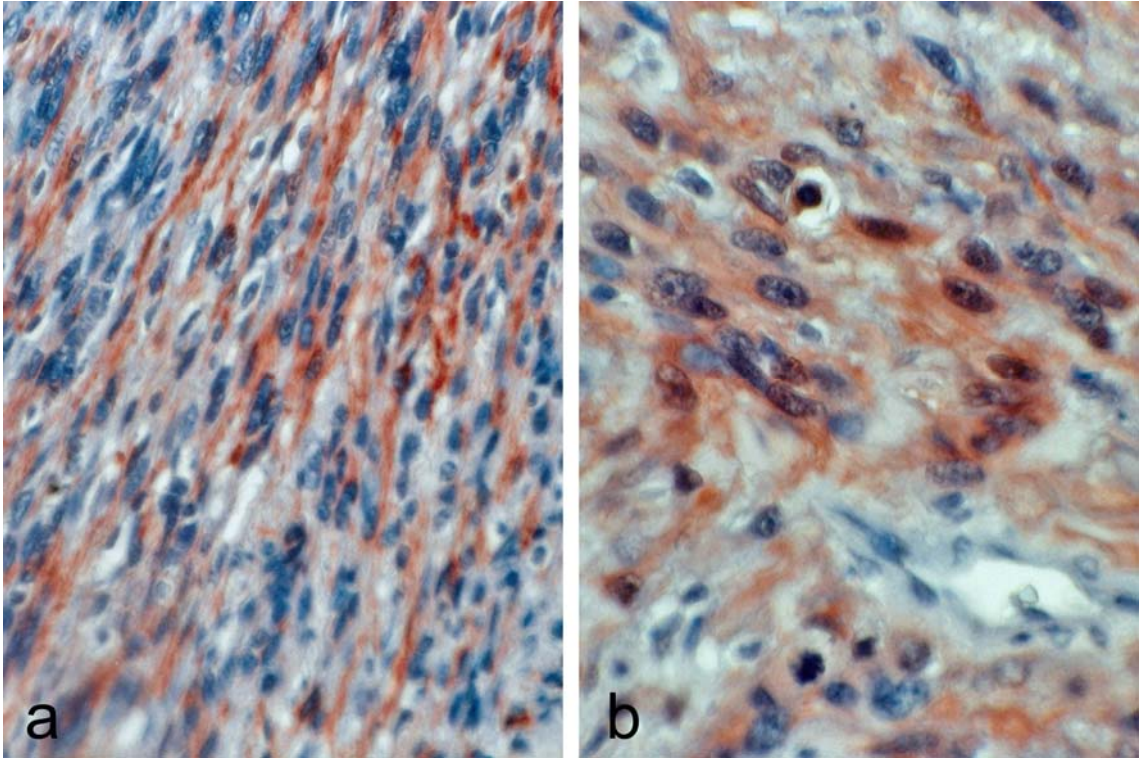
Şekil 16a. Olgu 17. Hemanjiyosarkom. F-VIII boyanması. İmmunperoksidaz, 400x



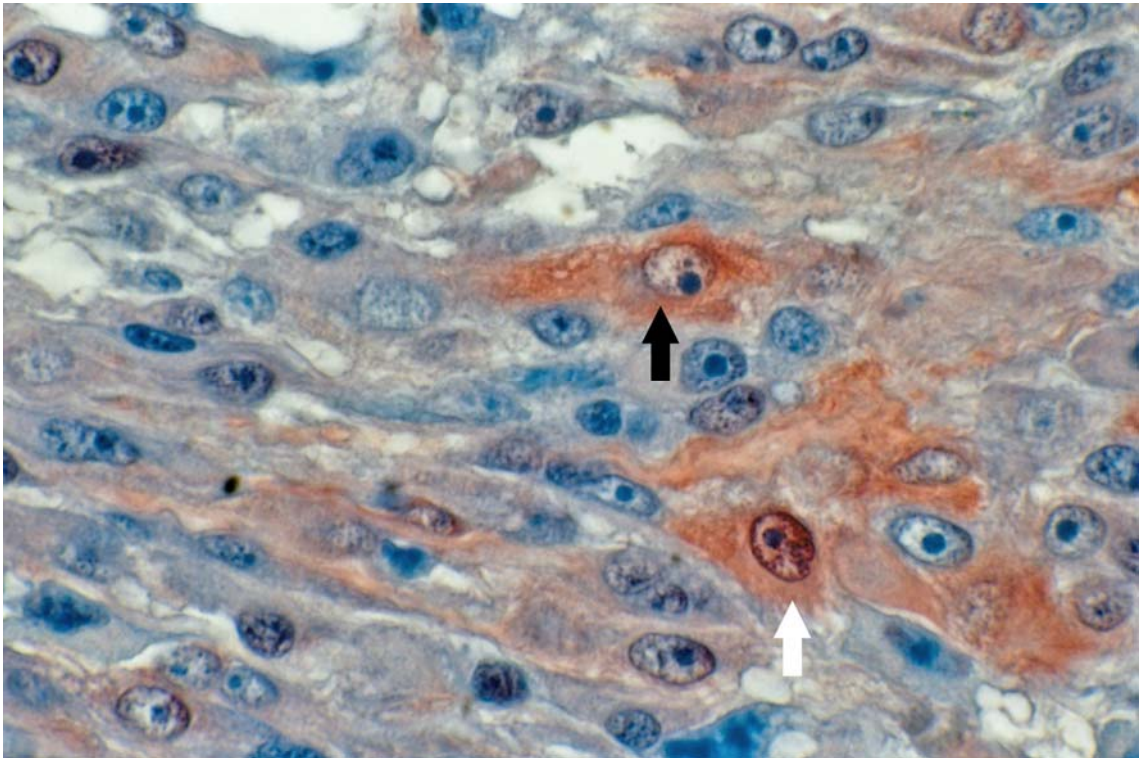
Şekil 16b. Olgu 17. Hemanjiyosarkom. Neoplastik hücrelerde sitoplazmik F-VIII boyanması (ok işareti). İmmunperoksidaz, 1000x



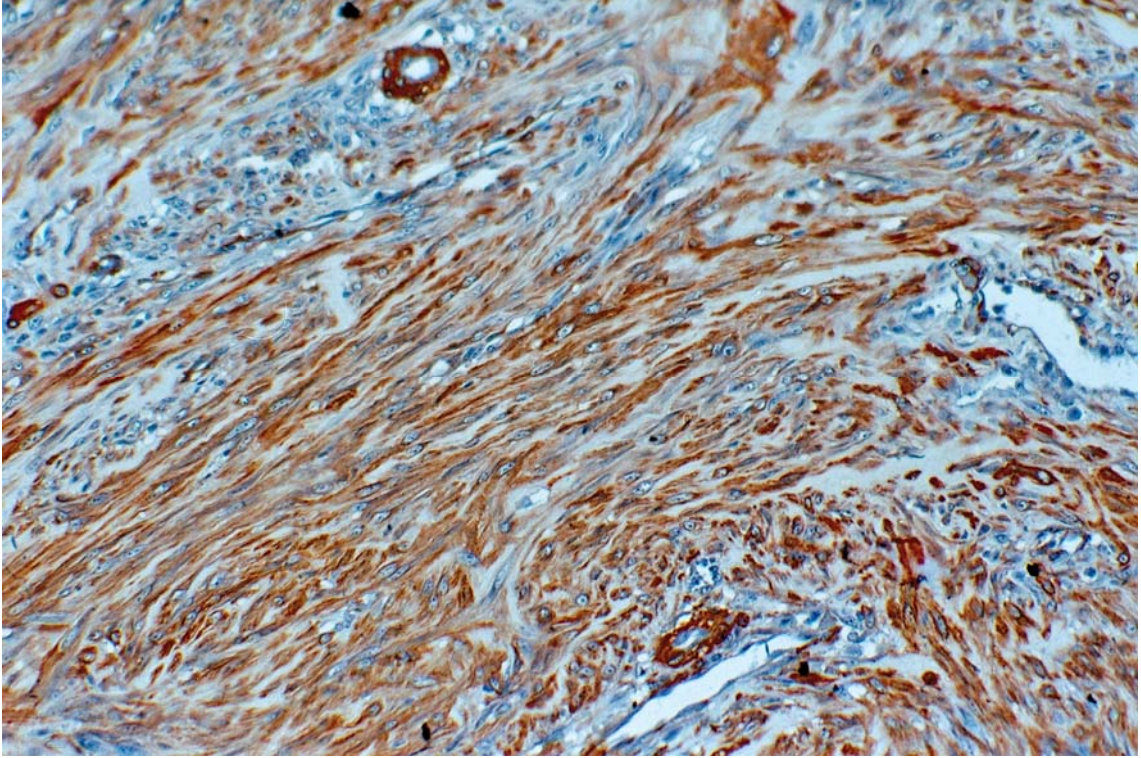
Şekil 17. Olgu 20. Leyomyiom. Kesişen demet yapıları ve yaygın desmin boyanması. İmmunperoksidaz, 200x



Şekil 18. Olgu 27. Leiomyosarkom. Demet yapan mekik hücrelerinde SMA (a) ve non-spesifik s-100 (b) boyanması. İmmunperoksidaz, 400x (a) ve 600x (b)



Şekil 19. Olgu 43. Schwannom. Sitoplazmik (siyah ok) ve perinükleer (beyaz ok) s-100 boyanması. İmmunperoksidaz, 1000x



Şekil 20. Olgu 48. Leiomyosarkom. Yaygın SMA boyanması. Doku içi kontrol dokularında (vasküler perisitlerde) pozitif reaksiyon. İmmunperoksidaz, 200x

5. TARTIŞMA

Neoplastik oluşumların morfolojik olarak sınıflandırması, biyolojik davranışı belirleyen histolojik kriterlerin oluşturulması ve en uygun tedavi yönteminin seçilmesi bakımından onkolojik araştırmalarda büyük önem taşımaktadır (118), ancak ışık mikroskopisiyle yapılan geleneksel histolojik değerlendirmede karşılaşılan en büyük sorun aynı histolojik kriterler için farklı gözlemcilerin farklı yorumlarda bulunması, yani değerlendirmenin subjektif olmasıdır.

Yumuşak doku neoplazileri, histogenetik çeşitliliklerine rağmen ortak histolojik özellikler sergilemeleri, aynı neoplastik oluşumun içerisinde farklı yönlerde diferensiyasyon olabilen hücresel varyantlar içermeleri bakımından sınıflandırması en güç tümör grubudur (5, 6).

Machida ve ark (8), 8 yaşlı golden retriever ırkı bir köpeğin atriyal septumunda tespit edilen bir primer kardiyak tümörü olgusunda neoplastik lezyonun fibrosarkomatöz, rabdomiyosarkomatöz, liposarkomatöz ve kondrosarkomatöz alanların bir arada bulunduğu anaplastik ve pleomorfik mezenşimal hücrelerden meydana geldiğini göstermişlerdir.

Smolowitz ve Carpenter (11), 14 köpekte saptanan osteosarkomatöz komponent içeren splenik sarkom olgularının, histolojik olarak değişen yaygınlıkta osteoid yapımının yanı sıra kesişen demetler, solid alanlar ve perivasküler girdaplar, hatta bazı vakalarda vasküler yarıklanmalar gibi farklı yumuşak doku tümörlerinde görülen değişik paternler sergilediklerini, neoplastik hücre popülasyonunun yine diğer sarkomlarda görülebilen yuvarlak-ovoid çekirdeğe sahip dalgalı eozinofilik sitoplazmalı mekik hücreler ve çok çekirdekçikli tümör dev hücreleri ve bazılarında osteoklastik dev hücrelerden meydana geldiğini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar pek çok sarkom olgusunun farklı diferensiyasyon gösteren hücre popülasyonlarından oluşmuş çeşitli neoplastik komponentler (leiomyosarkomatöz, fibrosarkomatöz, liposarkomatöz, kondrosarkomatöz ve rabdomiyosarkomatöz) ve bazılarının diferensiyasyon yönünün mevcut histolojik kriterler ile saptanamadığı alanlar içerdiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak bu tümörlerin malign karakterde ilkel multipotent hücrelerden köken almış

olabilecekleri ve dolayısıyla kötü diferensiye mezenşimal tümörler olarak adlandırılacakları bildirilmiştir.

Leiomyosarkomlar, hemanjiyoperisitomlar, malign melanomlar, miksosarkomlar ve bazı undiferensiye sarkomlar gibi mezenşimal kökenli tümörlerin morfolojik benzerlikleri ve fibrosarkomatöz alanlar içermeleri nedeniyle geleneksel histopatolojik yöntemlerle ayırt edilemedikleri ve önceki yıllarda genel bir eğilimle fibrosarkom olarak adlandırıldıkları literatürde bildirilmiştir (13).

Histolojik olarak çok farklı tümör grubunun bulunduğu çalışmamızda neoplastik hücrelerin yalnızca hücresel morfolojileri değerlendirildiğinde adı geçen tüm neoplazilerin büyük oranda pleomorfik olduğu ve belirgin tek ya da çok çekirdekçikli, veziküler tombul çekirdekli çekik eozinofilik sitoplazmalı mekik hücreler ile hiperkromatik çekirdekli ince eozinofilik sitoplazmalı iğsi hücrelerden meydana geldiği görülmektedir. En yaygın histolojik paternin miyojenik diferensiyasyon gösteren tümörlerdeki kesişen yatay ve dikey demet yapıları dışında malign fibröz histiyositom ve dermatofibrosarkom protüberens olgularıyla birlikte fibrositik tümörlerde de görülen storiform patern ve konsantrik dizilimli iğsi hücrelerin oluşturduğu perivasküler girdap yapıları (fingerprint patern) olduğu dikkati çekmektedir. Bu histolojik yapıların pek çok farklı yumuşak doku tümöründe bulunabileceği veteriner literatürde bildirilmiştir. Köpek hemanjiyoperisitomlarının ayırıcı histolojik özelliklerinden biri olduğu çeşitli araştırmalarda (21, 66) gösterilen parmak izi (fingerprint) paterni, Perez ve ark. (66)'ın çalışmasında schwannomlar, benign fibrohistiyositik tümörler, leiomyosarkomlar ve fibrosarkomlarda; Chijiwa ve ark. (22)'in çalışmasında malign periferik sinir kılıfı tümörlerinde; Hendrick ve ark (61)'in çalışmasında ise dalak tutulumlu malign fibröz histiyositom olgularında bildirilmiştir. Storiform patern köpeklerde hemanjiyoperisitom (21), dermatofibrosarkom protüberens (55), sinoviyal sarkom (110), melanositik schwannom (102) ve malign periferik sinir kılıfı tümörlerinde (47); pleomorfik-storiform patern malign fibröz histiyositomlarda (10, 15) gösterilmiştir. Öte yandan demetler, storiform yapı, palizatlar ve miksoid patern gibi histolojik özellikler gösteren hatta epiteloid alanlara sahip hemanjiyoperisitomlar çeşitli çalışmalarda köpeklerde bildirilmiştir (21, 66). Fibrosarkomlar ve leiomyosarkomlar dışında köpeklerdeki malign periferik sinir kılıfı tümörleri gibi yumuşak doku tümörlerinde de kesişen demet

yapıları gösterilmiştir (101). Yukarıda bahsedilen bu histolojik özelliklerin, bizim çalışmamızın histopatolojik bulgularıyla da uyumlu olarak pek çok yumuşak doku tümöründe görülmesi sebebiyle patognomik olarak değerlendirilemeyeceği kanısındayız.

Her ne kadar onkolojik vakaların %90'ının HE ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskopisiyle teşhis edildiği bildirilmiş (116) olsa da, yumuşak doku tümörlerinin köken aldıkları hücre tipi bahsedilen morfolojik benzerlikleri nedeniyle geleneksel tanı yöntemleriyle belirlenemeyebilir (4) ve bu durumda immunohistokimya gibi yardımcı teşhis yöntemlerine ihtiyaç duyulur (117). İmmunohistokimya doku kesitlerinde spesifik antijenlerin saptanması amacıyla monoklonal ve poliklonal antikorların kullanımına dayalı yardımcı bir tanı yöntemidir. HE ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskopisiyle yapılan geleneksel morfolojik değerlendirmeye eşlik etmeli, ancak yerine geçecek bir tanı yöntemi gibi kabul edilmemelidir (17). Neoplastik lezyonlarda immunohistokimyanın çıkış noktası, neoplastik hücrelerin en azından belli oranlarda taklit ettikleri, yani diferensiye oldukları normal doku komponentine benzer kimyasal özellikler göstermeleridir. Dolayısıyla diyagnostik immunohistokimyanın temel prensibi şüphe edilen teşhisi doğrulayacak tek bir antikor kullanımı yerine, incelenen tümöral dokuda pozitif reaksiyon vermesi beklenen ve negatif reaksiyon verdiği düşünülen bir dizi antikoru birlikte içeren “antikor paneli” uygulamasıdır (18). Bu uygulamanın yararlılığı farklı şekillerde açıklanabilir: İlk olarak pek çok antijen farklı tümör grupları tarafından sunulabilir (112). İkincisi doku takip prosedürü ve fiksasyon işlemlerinde yapılan hatalar, yanlış antikor seçimi, görüntüleme sisteminin yeterince hassas olmayışı ve hayvan türlerine özgü spesifik antikorların yokluğu gibi teknik sorunlar hatalı pozitif ya da hatalı negatif sonuçlara yol açabilir (37, 113) ve son olarak malign hücreler beklenmeyen, kuraldışı antijen sunulumu gösterebilir. Anaplastik ya da pleomorfik tümörlerde diferensiye olan hücrenin antijenik özelliklerinin değiştiği ya da kaybolduğu literatürde bildirilmiştir (37, 57).

Hem insan patolojisi, hem de veteriner patolojide immunohistokimyanın diyagnostik yaklaşımdaki önemini bildirilen pek çok çalışma mevcuttur.

De Jong ve ark (130), yetişkinlerdeki pleomorfik rabdomiyosarkom, malign fibröz histiyositom, leiomyosarkom ve liposarkom olgularının benzer histolojik özellikleri nedeniyle rutin ışık mikroskopisiyle teşhis edilemeyeceğini, farklı histogeneze sahip dokular için spesifik olduğu bilinen antikor paneli kullanılarak hücrelerin antijenik özelliklerine göre sınıflandırma yapmanın daha doğru olduğunu göstermişlerdir.

Leong ve Wright (20), insanlarda yuvarlak ve mekik hücreli anaplastik tümörlerin antijenik özelliklerini ortaya koyarak immunohistokimyanın histopatolojik teşhisleri doğrulama oranını araştırmışlardır. İmmunohistokimyanın rutin teşhis yöntemlerine katkısını beş kategoride incelemişler ve buna göre olguların %53'ünde morfolojik tanıyı doğruladığı, %14.5'inde önerilen teşhis seçeneklerinden biriyle uyumlu antijenik sunulum gösterdiği, %18'inde ayırıcı tanıya götürdüğü, %13.5'inde teşhise katkı sağlamadığı, % 1'inde ise tamamen farklı bir teşhise yönlendirdiğini göstermişlerdir.

Andreasen ve ark (39), köpeklerin deri ve yumuşak doku tümörlerinde intermediate filamanlara (sitokeratin, vimentin ve desmin) karşı geliştirilen antikorların boyanma özelliklerini araştırdıkları çalışmada pozitif ya da negatif immunreaksiyonun histolojik tanıyı doğrulama oranını hesaplamışlar ve gerçek pozitiflerin % 76; gerçek negatiflerin %83 oranında tanıyı desteklediğini saptamışlardır. Aynı çalışmada fiksasyon ve doku takip işlemlerindeki farklılıkların (fiksasyon çözeltisinin tipi, fiksasyon süresi, ısı vb) hatalı negatif reaksiyonlara yol açabileceği de belirtilmiştir.

Desnoyers ve ark (121)'in bir çalışmasında desmin, vimentin ve keratin gibi intermediate filaman proteinlerine karşı geliştirilmiş antikorların anaplastik köpek tümörlerinin tanısında kullanılması gereken ayırıcı tümör belirteçleri olduğu belirtilmiş, toplam 62 sarkom olgusunun 2'si hariç tümünde immunohistokimyanın morfolojik tanıyı desteklediği gösterilmiştir. Bahsedilen iki olguda fiksasyon ve doku takip işlemlerindeki teknik hatalar nedeniyle yanlış negatif sonuç elde edilmiş olabileceği vurgulanmıştır.

Sanders ve ark (14), 6 aylık bir köpekte histopatolojik olarak undiferensiye sarkom olarak tanımlanmış metastazik kitleleri mevcut servikal kitlenin pleomorfik mezenşimal hücrelerden (iri poligonal, küçük yuvarlak ve mekik) meydana geldiğini göstermişler, immunohistokimyasal olarak güçlü desmin ve HHF35 immunreaktivitesi göstermesi sebebiyle rabdomiyosarkom olabileceğini bildirmişlerdir.

Tümöral dokuların anatomik özelliklerine göre sınıflandırıldığı ve bu sınıflandırmaya bağlı olarak önerilen muhtemel histogenezleri ile neoplastik hücrelerin immunohistokimyasal özelliklerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada (124) miyojenik kökenli olmayan tümörlerde, şaşırtıcı bir biçimde immunohistokimyasal olarak miyoid dokunun varlığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada köpeklerde fibrosarkom, leiomyosarkom ve undiferensiye sarkomlar olarak tanımlanan tümör grupları arasında ayırt edici belirgin morfolojik özelliklerin bulunmadığı bildirilmiş ve leiomyosarkomların yanı sıra fibrosarkomlar, histiyositik sarkomlar ve undiferensiye sarkomlarda da desmin ve düz kas aktini gibi miyojenik diferensiyasyon belirteçleri ile pozitif reaksiyon saptanması sebebiyle bu neoplazilerin ortak bir histogeneze sahip olabilecekleri ya da farklı bir hücre grubu olan miyofibroblastların profilersasyonu ile gelişmiş olabilecekleri vurgulanmıştır. Miyofibroblastların, ultrastrüktürel olarak, hem miyosit hem de fibroblastların anatomik ve fonksiyonel özelliklerine sahip çok küçük morfolojik farklılıklar gösteren, ancak histogenetik olarak çeşitlilik gösteren bir grup heterojen hücreyi kapsadığı ve immunohistokimyasal olarak farklı derecelerde vimentin, desmin ve düz kas aktini eksprese ettikleri gösterilmiştir (62).

Öte yandan McColl-Williamson ve Middleton (112), köpeklerin kutanöz yumuşak doku tümörlerinde diferensiyasyon ve histogenezi araştırdıkları çalışmalarında morfolojik tanının fibrosarkom, hemanjiyoperisitom ve schwannom gibi tümörlerde hücresel diferensiyasyonun gösterilmesi açısından çok az kesinlik taşıdığını vurgulamışlardır. Bu çalışmada fibrom, fibrosarkom, miksosarkom, lipom, liposarkom, hemanjiyom, hemanjiyosarkom, hemanjiyoperisitom, schwannom ve undiferensiye tümörlerden oluşan toplam 74 mezenşimal tümör vimentin, keratin, desmin, F-VIII ve s-100 için geliştirilmiş antikorlardan oluşan bir antikor paneli kullanarak immunohistokimyasal olarak incelenmiş ve olguların %97'sinde vimentin için pozitif reaksiyon saptanmıştır. S-100 belirtecinin nöronal ve non-nöronal tümörlerin ayırımında

spesifik bir antikor olduğu belirtilmekle birlikte schwannomların yanı sıra fibrosarkom, miksosarkom, hemanjiyoperisitom gibi tümörlerde bazı olgularda s-100 pozitifliği tanımlanmıştır. Vasküler kökenli tümörlerde endotelial diferensiyasyon doğrulanırken bir schwannom ve üç undiferensiyel mezenşimal tümörde F-VIII pozitifliği gösterilmiş ve bu üç olgu hemanjiyosarkom olarak yeniden adlandırılmıştır. McColl-Williamson ve Middleton, schwannom ve hemanjiyoperisitom gibi terimlerin doğrudan beşeri patolojiden adapte edilmiş bir terminoloji olduğunu ve hayvanlardaki gerçek hücre kökenini işaret etmeyebileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra morfolojik tanının tümör hücre diferensiyasyonu ile çok az ilişkili olduğunu ve immunohistokimyasal bulguların fibrosarkom, hemanjiyoperisitom ve schwannom gibi tümörler arasındaki morfolojik ayrımı desteklememekle birlikte bu adlandırmaların hücrel diferensiyasyona ilişkin çok az kesinlik taşıdığını savunmuşlardır. Ve sonuç olarak mevcut adlandırmalar yerine yumuşak dokunun mekik hücreli tümörleri terimini önermişlerdir.

Kosmehl ve ark (9), deneysel rabdomiyosarkom oluşturdıkları bir çalışmada aynı neoplastik oluşumun ve rabdomiyosarkomatöz alanların yanı sıra malign fibröz histiyositom benzeri pleomorfik-storiform yapılara da sahip olabileceğini ışık mikroskopisi ve immunohistokimyanın yanı sıra ultrastrüktürel olarak da göstermişlerdir. Bu iki farklı histogenetik komponentin bir arada bulunması nedeniyle bu tümörlerin ikili fenotipik yapı gösteren ortak ilkel bir hücre klonundan (multipotent öncü hücreler) gelişmiş olabileceğini ya da malign fibröz histiyositom komponentinin gerçek bir neoplastik lezyon yerine dediferensiyel bir sarkom formunda olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma malign tümörlerin dediferensiyasyon ile birlikte hücrel antijenik özelliklerini de kaybedebileceğini göstermektedir. Antikorların immun reaktivitesindeki değişkenliğin neoplastik hücrelerin olgunluk (maturite) derecesi ve sunulan antijen miktarıyla ilişkili olabileceği Hayden ve ark (87) tarafından sunulan bir köpek hemanjiyosarkom olgusunda bildirilmiştir. Adı geçen yazarlara göre neoplastik hücrenin yüzeyinde sunulan ve bir primer antikorun bağlandığı antijenik epitoplardaki farklılık hücrenin maturasyonu ile değişen moleküler varyasyonlara bağlıdır ve hücre boyanmasını doğrudan etkiler. Bu durum çalışmamızda histolojik yapılanması özellikle nörojenik diferensiyasyon ile uyumlu bazı tümöral dokulardaki s-100 negatifliği

örneğinde olduğu gibi bazı malign tümörlerde immunohistokimyanın yararlılığını geçersiz kılmaktadır.

Çalışmamızın materyalini oluşturan 50 olguda da vimentin immun reaktivitesinin saptanması muhtemel mezenşimal kökeni doğrulayan önemli bir bulgudur ve veteriner literatürde köpeklerin neoplastik lezyonlarında immunohistokimyasal yöntemlerin uygulandığı pek çok çalışma ile uyumludur (14, 15, 21, 23, 30, 38, 61, 66, 112, 113, 121, 124). Öte yandan çalışmamızdaki yumuşak doku tümörlerinin tümü keratin antijeni için negatiftir. Özellikle diferensiyasyon yönü belirlenemeyen anaplastik ve pleomorfik tümör tiplerinde vimentin pozitifliğine eşlik eden keratin negatifliğinin mezenşimal kökeni işaret ettiği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (39, 121, 113).

Morfolojik tanıya göre başlangıçta hemanjiyoperisitom olarak değerlendirilen olguda s-100 ile pozitif immun reaksiyon gözlenmesi tümöral kitlenin periferik sinir kılıfı tümörü olduğunu düşündürmüştür. Köpek hemanjiyoperisitomları ve periferik sinir kılıfı tümörlerinin morfolojik olarak benzer neoplaziler olduğu veteriner literatürde de gösterilmiştir (21, 66). Histolojik olarak nörojenik diferensiyasyon alanlarına sahip bu tümörün başlangıçta hemanjiyoperisitom olarak değerlendirilmesi özellikle parmak izi görünümündeki perivasküler girdap yapılarının köpeklerde perisitik diferensiyasyon gösteren tümörlerde tipik patern olarak bildirilmesinden kaynaklanmıştır (42). Perez ve ark (66)'ın köpek hemanjiyoperisitomlarında yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada hemanjiyoperisitom olguları ile birlikte fibrosarkom, schwannom, benign fibrohistiyositik tümörler ve leiomyosarkomlar da değerlendirilmiş kas aktini (HHF35 klonu) ve s-100 antikorlarının ayırıcı tanıda belirleyici olduğu gösterilmiştir. Köpek hemanjiyoperisitomları ile birlikte sadece leiomyosarkomlarda sunulan HHF35 antikoruna ile diğer yumuşak doku tümörlerinde reaksiyon izlenmemiştir. Schwannomlarda olduğu gibi hemanjiyoperisitomlarda da s-100 için immunreaksiyon izlenmiştir. Dolayısıyla HHF35 antijeninin varlığı bu iki tümör için ayırıcı bir immunohistokimyasal bulgudur. Perisitik hücrelerden farklılaştığı düşünülen bu tümörlerin HHF35 için işaretlenmesi beklenen bir durumdur. Literatürde köpeklerde bu antikorun arteriyol, venül ve kapillar damarların dış hücre katmanı yani perisitler ile reaksiyon verdiği gösterilmiştir (21). Çalışmamızda da anti-HHF35'in perisitlerde

pozitif reaksiyon gösterdiği saptanmış, ancak bu vakada sadece s-100 antikoru ile immun reaksiyon vermesi nedeniyle bu olgu periferik sinir kılıfı tümörü şeklinde yeniden adlandırılmıştır.

Çalışmamızda kısa demetler yapan dalgali, içsi hücrelerin bazı alanlarda belirsiz storiform patern oluşturduğu ve morfolojik olarak dermatofibrosarkom protuberans şeklinde adlandırılan bir olguda birkaç alanda s-100 pozitifliği saptanmış ve son olarak periferik sinir kılıfı tümörü olarak tanımlanmıştır. Bu tümöral dokunun periferinde yer alan rabdomyoblastik hücrelerin varlığı insanlarda rabdomyoblastik bileşeni bulunan malign schwannomlar ya da başka bir terimle Triton tümörler ile benzerlik göstermektedir (67). Bu hücrelerde histolojik olarak çizgili yapı tespit edilememiştir, ayrıca sarkomerik aktin ya da miyogloblin gibi çizgili kasa özgü tümör belirteçlerinin antikor panelimiz içerisinde yer almaması nedeniyle bu tümörlerin gerçekte çizgili kas diferensiyasyonu gösterip göstermediği immunohistokimyasal olarak da saptanamamıştır.

Çalışmamızda ilk histolojik değerlendirmeye göre fibrom ve fibrosarkom olarak teşhis edilen olgularda vimentin dışındaki tümör belirteçleri ile pozitif reaksiyon saptanmamıştır. Fibrom ve fibrosarkomlar için spesifik tümör belirteçlerinin mevcut olmadığı ve mezenşimal diferensiyasyonu işaret eden vimentin pozitifliği dışında immunohistokimyasal profillerinin negatif olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (23, 52, 62, 121). Öte yandan fibrosarkomlarda miyofibroblastik diferensiyasyonun varlığıyla ilişkili olduğu düşünülen desmin ve kas aktini gibi miyoid diferensiyasyonu gösteren tümör belirteçleri ile pozitif immun reaksiyon saptanmıştır (15, 30). Vascellari ve ark (30), köpeklerde aşı ilişkili sarkomları araştırdıkları bir çalışmada muhtemel aşı bölgelerinde lokalize olmuş fibrosarkom olgularında kitlenin periferindeki bir grup hücrede odaksal SMA ve HHF35 pozitifliği bildirmişlerdir. Miyofibroblastik fenomen olarak adlandırılan bu bulgunun, miyofibroblastların doku onarım süreci ve neoplastik lezyonlara karşı gelişen stromal reaksiyonların yanı sıra reaktif lezyonlar, benign tümörler, lokal agresiflik gösteren fibromatozlar ve miyofibroblastik diferensiyasyon gösteren sarkomların önemli bir hücresel bileşeni olduğu literatürde gösterilmiştir (131). Öte yandan çalışmamızda başlangıçta undiferensiyel mezenşimal tümör olarak değerlendirilen belirsiz storiform ve demet yapıları yapan mekik hücrelerden oluşan iki

tümöral doku, immunohistokimyasal bulgulara göre fibrosarkom olarak yeniden adlandırılmıştır. Bir dokunun vimentin dışındaki antikor ile negatif reaksiyon verdiği, diğerinde vimentine eşlik eden odaksal SMA pozitifliği gösterilmiş ve yine tümörün periferinde yer alan anti-SMA ile boyanan bu hücrelerin varlığı stromal miyofibroblastik proliferasyon ile ilişkilendirilmiştir.

Yukarıdaki tümöral doku örneklerinde, tümör nekrozu ile birlikte tipik ya da atipik mitotik figür izlenişi olgunun malign olarak tanımlanmasına yol açmıştır. Mitotik indeks ve tümör nekrozunun yumuşak doku tümörlerinde en önemli malignite kriterlerinden biri olduğu köpeklerde yapılan çeşitli prognostik çalışmalarda gösterilmiştir (3, 117, 119). Dolayısıyla çalışmamızda yer alan tümörlerin adlandırmasında bu iki parametre göz önünde bulundurularak benign ya da malign ayrımı yapılmıştır.

Nörofibrosarkomların vimentin ve s-100 pozitif olduğu literatürde (64) bildirilmiştir. Çalışmamızda histolojik özelliklerine göre nörofibrom şeklinde sınıflandırılan bir olguda vimentin dışındaki antikorlar ile immun reaksiyon elde edilememiş ve son sınıflandırmada bu olgu fibrom olarak adlandırılmıştır. Miksoid matriks içerisinde yapılanmış, dalgalı ve içsi hücrelerin belirsiz storiform patern ve palizatlar oluşturduğu diğer nörofibrom olgusunda yine sadece vimentin pozitifliği gösterilebilmiş ve bu doku tümör nekrozu, infiltratif büyüme ve mitotik figür izlenmeyişi nedeniyle benign mezenşimal tümör olarak tanımlanmış, ancak diferensiyasyon yönü saptanamamıştır.

Damar düz kas hücrelerinin genellikle vimentin ve düz kas aktini ve sadece bazı durumlarda desmin içerdiği gösterilmiştir (126). Çalışmamızda hemanjiyosarkom olgularında görülen düz kas aktini pozitifliği, neoplastik endotel hücrelerinin değil yeni oluşan vasküler yapıların perisitik hücrelerinin işaretlendiğini göstermektedir. Zaten bu olguların hepsinde damar endotelyal diferensiyasyon belirteci olan F-VIII antikoruna ile pozitif reaksiyon izlenmiştir ve bu antikorun köpeklerin vasküler kökenli tümörlerinde spesifik ve güvenilir bir antikor olduğunu gösteren çalışmalarla (87, 88, 98) uyumludur. Bu bulgular ışığında çalışmamızda F-VIII antijeni için zayıf, ancak yaygın pozitif

reaksiyon görülen bir undiferensiye mezenşimal tümör olgusu da hemanjiyosarkom olarak yeniden adlandırılmıştır.

LaRock ve Ginn (64), düz kas diferensiyasyonu gösteren tümörlerde vimentin sunulumunu malignite ile ilişkilendirmiş, iyi diferensiye leiomyomların düz kas aktini ve desmin antikorları ile pozitif, vimentin için negatif; leiomyosarkomların farklı olarak anti-vimentin ile pozitif olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda leiomyom olarak teşhis edilen tüm olgularda Bettini ve ark (25)'in çalışmasıyla uyumlu olarak vimentin için güçlü ve yaygın pozitif reaksiyon elde edilmiştir. Düz kas aktini belirteci olan SMA antikorunun düz kas diferensiyasyonu gösteren tümörlerde spesifik ve güvenilir olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (25, 49, 64, 69, 72, 84).

Çalışmamızdaki 8 leiomyom olgusunun 7'si; 3 leiomyosarkom olgusunun ikisi güçlü ve yaygın SMA sunulumu göstermiştir. Bir vaginal leiomyom olgusunda SMA için immun reaksiyon izlenmeyişi ve bir alanda fokal HHF35 sunulumu nedeniyle bu tümör fibrom olarak yeniden adlandırılmıştır. İdrar kesesinde lokalize olmuş bir leiomyosarkom olgusu pleomorfik-storiform alanların varlığı ve SMA pozitifliğinin sadece bir alanda ve az sayıda hücrede gösterilmesi sebebiyle malign fibröz histiyositom olarak yeniden adlandırılmıştır. Aynı olguda fokal desmin pozitifliğinin yanı sıra vimentin sunulumunun da birkaç alanda ancak şaşırtıcı bir şekilde odaksal olduğu gözlenmektedir. Doku takibi ya da antijen giderme işlemleri sırasında yapılan hatalı bir uygulamanın, neoplastik hücrelerin bir kısmının antijenik yapılarında değişime yol açtığını düşünmekteyiz. Öte yandan çalışmamızda yer alan olgulara ait yeterli klinik bilgi sağlanamayışı pek çok tümörde olduğu gibi bu tümörün de metastazik bir kitle mi, yoksa bir primer tümör mü olduğu konusunda şüphe yaratmaktadır. Metastazik neoplastik lezyonlarda, hücrel transformasyonla ilişkili olarak yapısal antijenik epitopların farklılaşması ya da bazı özelliklerini kaybetmesine bağlı olarak antijen sunulum paterninde değişimlerin ortaya çıktığı literatürde bildirilmiştir (132). Ayrıca köpeklerde idrar kesesinin primer malign fibröz histiyositik tümörüne ilişkin veteriner literatürde yayımlanmış bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır.

Çalışmamıza dahil edilen düz kas kökenli benign ve malign tümörlerde desmin ve HHF35 için immun boyanma paterni incelendiğinde kas aktini pozitifliğinin desmine

göre daha güçlü olduğu görülmektedir. HHF35 antikorunun desmine göre çok daha spesifik olduğu literatürde çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (29, 61, 66, 76, 78, 81). Başlangıçta undiferensiye mezenşimal tümör olarak tanımlanan iki malign tümör, güçlü ve yaygın SMA pozitifliği görülmesi nedeniyle leiomyosarkom olarak yeniden adlandırılmıştır. Güçlü vimentin pozitifliğinin yanı sıra farklı alanlarda odaksal, ancak güçlü SMA pozitifliği gösteren yuvarlak epitelooid hücrelerden meydana gelen diğer bir olgu da blastik hücrelerin izlendiği leiomyosarkom olarak yeniden sınıflandırılmıştır.

Çalışmamızda malign fibröz histiyositom olarak teşhis edilen olguların ikisinde SMA antikoru ile odaksal düz kas diferensiyasyonu gösterilmiştir. Bu miyojenik antikorların odaksal pozitif reaksiyonunun köpeklerde malign fibröz histiyositomların immunohistokimyasal özelliklerinin araştırıldığı çalışmalarla uyumlu (10, 15, 61) olarak miyofibroblastik diferensiyasyon ile ilişki olduğunu düşünmekteyiz. Öte yandan iğsi ve histiyositik hücrelerin belirsiz storiform patern oluşturduğu ve dev hücrelerin izlendiği bir undiferensiye mezenşimal tümör, malign fibröz histiyositom olarak yeniden kategorize edilmiş ve odaksal HHF35 pozitifliği gösterdiği bildirilmiştir. Sadece vimentin pozitifliği gösteren eozinofilik çekirdekli histiyositik neoplastik hücrelerin perivasküler girdaplar ve storiform paten oluşturduğu bir başka olgu da mitotik figür ve nekroz izlenmemesi sebebiyle benign fibrohistiyositik tümör olarak yeniden adlandırılmıştır.

S-100 antikorunun köpek yumuşak doku tümörlerinde nörojenik diferensiyasyonu işaret eden önemli bir antikor olduğu literatürde bildirilmiştir (7, 22, 47, 99). Çalışmamızda undiferensiye mezenşimal tümör olarak tanımlanan üç dokuda farklı alanlarda s-100 pozitif hücre grupları izlenmiş ve son sınıflandırmada periferik sinir kılıfı tümörleri şeklinde adlandırılmışlardır. Bu dokulardan ilkinde dağınık demet yapıları, ikincisinde fibriler yapılar ve palizatlar, üçüncüsünde konsantrik dizilimli hücrelerin meydana getirdiği küçük girdaplar gözlenmiştir. Her üç histolojik yapı da daha önce köpeklerin periferik sinir kılıfı tümörlerinde bildirilmiştir (22, 102).

İlk histolojik değerlendirmede malign fibröz histiyositom olarak adlandırılan veziküler blastik hücrelerin storiform yapı, girdaplar ve verocay cisimcikleri oluşturduğu bir olgu da güçlü ve yaygın s-100 pozitifliği izlenmesi sebebiyle malign

periferik sinir kılıfı tümörü olarak yeniden adlandırılmıştır. Çeşitli araştırmacılar köpeklerin malign fibrohistiyositik tümörlerine ilişkin çalışmalarında aktin ve desmin pozitif küçük hücre gruplarının yanı sıra zayıf s-100 sunulumu göstermişlerdir (38, 52, 61). Öte yandan Morris ve ark (15) yangısal, dev hücreli ve pleomorfik-storiform yapı gösteren köpek malign fibröz histiyositomların hiçbirinde bu antikor ile pozitif immunreaksiyon saptamamışlardır. O'Brien ve ark (10), iki köpekte multisentrik malign fibröz histiyositom dokularının yine s-100 için negatif olduğunu göstermişlerdir.

Histolojik olarak diferensiyasyon yönü saptanamamış iki benign; iki malign mezenşimal tümör olgusu immunohistokimyasal olarak da tanımlanamamıştır. Malign tümörlerde kontrol dokularda pozitif reaksiyon gözlenirse bile malign dönüşüm gösteren neoplastik hücrelerde, diferensiyasyon derecelerine göre antijenik yapılarının değişime uğradığı ve dolayısıyla tümöral alanda reaksiyon oluşmadığı kanısındayız. Storiform yapı oluşturan genelde mekik hücrelerden meydana gelen her iki benign mezenşimal tümörün de fibromatöz alanlar gösterdiğini düşünmekteyiz.

Çalışmanın planlanma sürecinden önce doku takip işlemlerinden geçirilen ve fiksasyon süreleri bilinmeyen tümöral dokularda fikzatif olarak kullanılan formol çözeltisi ya da fiksasyon süresine ilişkin artefaktlara bağlı hatalı negatif reaksiyon gelişebileceğinin de dikkate alınması gerektiği kanısındayız.

Sonuç olarak;

1. Farklı tümör gruplarına ait benign ya da malign yumuşak doku tümörlerinin benzer histolojik özellikler ortak histolojik yapılar sergilediği ve dolayısıyla bu yapıların hiçbir tümör grubu için patognomik olmadığı görülmektedir. Çalışmamızın bulgularına göre toplam 50 tümöral dokunun %44'ünde storiform yapı izlenmektedir. Dolayısıyla tek başına morfolojik adlandırmanın tümörün histogeneziyi yansıtmadığı kanısındayız.
2. Yetersiz ve eksik klinik bilgi sebebiyle değerlendirilen malign tümörlerin primer tümör ya da metastazik oluşum olup olmadığı anlaşılamadığı gibi metastazik tümörlerde hücresel antijen sunulumu ve immunohistokimyasal boyanma paterni değişebilmekte ve hatalı negatif sonuçlar elde edildiği görülmektedir.

3. Doku takip işlemleri ve formol fiksasyon süresinde standardizasyon sağlanamayışı tümörlerin immunohistokimyasal boyanma özelliklerini değiştirebilmektedir.
4. İmmunohistokimya özellikle heterojen bir grubu temsil eden yumuşak doku tümörlerinin tanısında rutin olarak uygulanmalı, ancak HE ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskopisi ile yapılan geleneksel histopatolojik değerlendirmenin yerini tutacak diagnostik bir yöntem gibi algılanmamalıdır. İmmunohistokimyasal tekniklerin uygulandığı araştırmalar, ultrastrüktürel ve moleküler düzeyde incelemelerle paralel yürütülmelidir.
5. Kanımızca en önemli nokta hayvanlardaki yumuşak doku tümörleri sınıflandırmasının özellikle hemanjiyoperisitomlar ve sinoviyal sarkomlar gibi histogenezi karmaşık tümörlerde insanlardaki sınıflandırma sisteminden doğrudan adapte edilmiş ve bağımsız histopatolojik kriterler oluşturulamamış olmasıdır. Bu durum ışık mikroskopisi ile yapılan teşhislerde hatalı yönlendirmelere ve ayırıcı tanı için belirlenen tümör kategorilerindeki hatalı bir seçim yanlış ya da eksik antikor panelinin uygulanmasına sebep olmaktadır.
6. Çalışmamızda farklı tümör gruplarına ait 35 olgudan 7'si immunohistokimyasal özelliklerine göre yeniden adlandırıldı, 28 olguda teşhis değişmedi. Başlangıçta nörofibrom olarak değerlendirilen bir olgu beklendiği şekilde s-100 pozitif reaksiyon göstermediği, ancak fibrom ile uyumlu histopatolojik özellikler sergilemediği için de benign mezenşimal tümör olarak isimlendirildi. Diferensiyasyon yönü tanımlanamamış 15 olgudan 4'ü hariç tümü immunohistokimyasal özelliklerine göre teşhis edildi. Malign özellikler sergileyen 2 olgu undiferensiye sarkom; benign karakterde 2 olgu da benign mezenşimal tümör olarak isimlendirildi. Dolayısıyla bu bulgulara göre immunohistokimyanın, köpeklerin yumuşak doku tümörlerinde düz kas ve endotelial diferensiyasyonun, kısmen de nörojenik diferensiyasyonun gösterilmesi amacıyla Anabilim Dalımız Patoloji laboratuvarında başarıyla kullanılabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Weiss SW, Goldblum JR. General Considerations. In: Weiss SW, Goldblum JR. Enzinger & Weiss's Soft Tissue Tumors. 4thed. Mosby, St Louis, London, Philadelphia, Sydney, Toronto 2001; 1-19.
2. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji. 6. baskı. Nobel-Yüce Yayınları, İstanbul 2000; 691-696.
3. Ettinger SN. Principles of treatment for soft-tissue sarcomas in the dog. Clin Tech Small Ani Pract. 2003; 18(2):118-122.
4. Wick MR, Swanson PE, Manivel JC. Immunohistochemical analysis of soft tissue sarcomas, comparisons with electron microscopy. Soft Tissue Tumours. Appl. Pathol 1988; 6:169-196.
5. Angervall L, Kindblom LG, Rydholm A, Stener B. The diagnosis and prognosis of soft tissue tumors. Semin Diagn Pathol 1986; 3(4):240-258.
6. McEwen EG, Withrow SJ. Soft tissue sarcomas. In: Withrow SJ, MacEwen EG. Small Ani Clin Oncol. 2nded. Saunders Co, Philadelphia 1996; 211-226.
7. Anderson GM, Dallaire A, Miller LM, Miller CW. Peripheral nerve sheath tumor of the diaphragm with osseous differentiation in a one-year-old dog. J Am Ani Hosp Assoc 1999; 35:319-322.
8. Machida N, Kobayashi M, Tanaka R, Katsuda S, Mitsumori K. Primary malignant mixed mesenchymal tumour of the heart in a dog. J Comp Pathol 2003; 128:71-74.
9. Kosmehl H, Langbein L, Katenkamp D. Experimental rhabdomyosarcoma with regions like malignant fibrous histiocytoma (MFH) - a true double phenotypic pattern. J Pathol 1990; 160:135-140.
10. O'Brien RT, Hendrick MJ, Evans SM, Brooks JJ. Pathological and radiographical features of multicentric malignant fibrous histiocytoma in two dogs. J Comp Pathol 1991; 105:423-430.
11. Smolowitz RM, Carpenter JL. Canine splenic sarcomas with an osteosarcomatous component. Vet Pathol 1988; 25:246-248.
12. Goldschmidt MH, Hendrick MJ. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals. 4thed. Iowa State Press, Iowa 2002; 45-117.
13. Pulley LT, Stannard AA. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: Moulton JE. Tumors in Domestic Animals. 3rded. University of California Press, Berkeley 1990; 23-87.
14. Sanders NA, Kerlin RL, Dambach DM. Aggressive, undifferentiated sarcoma with widespread metastasis in a six-month-old neopolitan mastiff. J Am Anim Hosp Assoc. 1996; 32:97-101.
15. Morris JS, McInnes EF, Bostock DE, Hoather TM, Dobson JM. Immunohistochemical and histopathologic features of 14 malignant fibrous histiocytomas from flat-coated retrievers. Vet Pathol 2002; 39:473-479.
16. Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. Cancer Invest 2000; 18(8):781-792.
17. Folpe AL, Gown AM. Immunohistochemistry for analysis of soft tissue tumors. In: Weiss SW, Goldblum JR. Enzinger & Weiss's Soft Tissue Tumors. 4thed. Mosby, St Louis, London, Philadelphia, Sydney, Toronto 2001; 199-245.

18. Folpe AL. Practical applications of immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue neoplasms. *Surg Oncol* 1999; 8:197-203.
19. Gatter KC. Diagnostic immunohistochemistry: Achievements and challenges. *J Pathol* 1989; 159:183-190.
20. Leong AS-Y, Wright J. The contribution of immunohistochemical staining in tumour diagnosis. *Histopathology* 1987; 11:1295-1305.
21. Mazzei M, Millanta F, Citi S, Lorenzi D, Poli A. Haemangiopericytoma: Histological spectrum, immunohistochemical characterization and prognosis. *Vet Dermatol* 2002; 13:15-21.
22. Chijiwa K, Uchida K, Tateyama S. Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. *Vet Pathol* 2004; 41:307-318.
23. Rabanal RH, Fondevila DM, Montane V, Domingo M, Ferrer L. Immunocytochemical diagnosis of skin tumors of the dog with special reference to undifferentiated types. *Res Vet Sci* 1989; 47:129-133.
24. Del Piero F, Summers BA, Cummings JF, Mandelli G, Blomme EA. Gastrointestinal stromal tumors in equids. *Vet Pathol* 2001; 38:689-697.
25. Bettini G, Morini M, Marcato PS. Gastrointestinal spindle cell tumours of the dog: Histological and immunohistochemical study. *J Comp Pathol* 2003; 129:283-293.
26. Mauldin GN. Soft Tissue Sarcomas. *Veterinary Clinics of North America: Small Ani Pract* 1997; 27(1):139-148.
27. Madewell BR, Griffey SM, McEntee MC, Leppert VJ, Munn RJ. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). *Vet Pathol*. 2001; 38:196-202.
28. Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ, Gliatto JM. Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *JAVMA* 1994; 205(10):1425-1429.
29. Zabka TS, Lavelly JA, Higgins RJ. Primary intra-axial leiomyosarcoma with obstructive hydrocephalus in a young dog. *J Comp Pathol* 2004; 131:334-337.
30. Vascellari M, Melchiotti E, Bozza MA, Mutinelli F. Pathology: Fibrosarcomas at presumed sites of injection in dogs: characteristics and comparison with non-vaccination site fibrosarcomas and feline post-vaccinal fibrosarcomas. *J.Vet. Med. A.* 2003; 50:286-291.
31. Bellah JR, Ginn PE. Gastric leiomyosarcoma associated with hypoglycemia in a dog. *J Am Ani Hosp Assoc* 1996; 32:283-286.
32. Bagley RS, Levy JK, Malarkey DE. Hypoglycemia associated with intra-abdominal leiomyoma and leiomyosarcoma in six dogs. *JAVMA* 1996; 208(1):69-71.
33. Gonin-Jmaa D, Paulsen DB, Taboada J. Pericardial effusion in a dog with rhabdomyosarcoma in the right ventricular wall. *J Small Ani Pract* 1996; 37:193-196.
34. Ueno H, Kadosawa T, Isomura H, Okada Y, Ochiai K, Umemura T, Okumura M, Fujinaga T. Perianal rhabdomyosarcoma in a dog. *J Small Ani Pract*. 2002; 43:217-220.
35. Ginel PJ, De Las Mulas MJ, Lucena R, Millan Y, Novales M. Short communications: Skeletal muscle rhabdomyosarcoma in a dog. *Vet Rec* 2002; 151:736-738.

36. Forrest LJ, Chun R, Adams WM, Cooley AJ, Vail DM. Postoperative radiotherapy for canine soft tissue sarcoma. *J Vet Intern Med.* 2000; 14:578-582.
37. Fox DB, Cook JL, Kreeger JM, Beissenherz M, Henry CJ. Canine synovial sarcoma: A retrospective assessment of described prognostic criteria in 16 cases (1994-1999). *J Am Anim Hosp Assoc.* 2002; 38:347-355.
38. Spangler WL, Kass PH. Pathologic and prognostic characteristics of splenomegaly in dogs due to fibrohistiocytic nodules: 98 cases. *Vet Pathol* 1998; 35:488-498.
39. Andreasen CB, White MR, Swayne DE. Desmin as a marker for canine botryoid rhabdomyosarcomas. *J Comp Pathol* 1988; 98:23-29.
40. Kobayashi M, Sakai H, Hirata A, Yonemaru K, Yanai T, Watanabe K, Yamazoe K, Kudo T, Masegi T. Expression of myogenic regulating factors, myogenin and myoD in two canine botryoid rhabdomyosarcomas. *Vet Pathol* 2004; 4(3):275-277.
41. Kuntz CA, Dernell WS, Powers BE, Devitt C, Straw RC, Withrow SJ. Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986-1996). *JAVMA.* 1997; 211(9):1147-1151.
42. Postorino NC, Berg RJ, Powers BE, McChesney AE, Taylor RA, Withrow SJ. Prognostic variables for canine hemangiopericytoma: 50 cases (1979-1984). *J Am Ani Hosp Assoc* 1988; 24:501-509.
43. Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore FM, Vos JH, Walder EJ., Histological Classification of Mesenchymal Tumors of Skin and Soft Tissues of Domestic Animals. World Health Organization 2nd series, vol.2. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington DC, 1998.
44. Walder EJ, Gross TL. Neoplastic Diseases of the Skin. Part VI. Fibrocytic Tumors. In: Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ. *Vet Dermatopathol.* Mosby Year Book, St Louis Missouri 1992; 407-418.
45. Esplin DG. Urinary bladder fibromas in dogs: 51 cases (1981-1985). *JAVMA* 1987; 190(4):440-444.
46. Bostock DE, Dye MT. Prognosis after surgical excision of canine fibrous connective tissue sarcomas. *Vet Pathol.* 1980; 17:581-588.
47. Patnaik AK, Zachos TA, Sams AE, Aitken ML. Malignant nerve-sheath tumor with divergent and glandular differentiation in a dog: A case report. *Vet Pathol* 2002; 39:406-410.
48. Summers BA, Cummings JF, Lahunta A. Neoplasia of the Peripheral Nervous System. In: *Veterinary Neuropathology*, Mosby -year Book, St Louis, 1995: 472-501.
49. Reis-Filho JS, Gonçalves C, Gärtner F. Rectal leiomyosarcoma in a dog and review of gastrointestinal stromal tumours. *Vet Rec* 2003; 153:215-216.
50. Callanan JJ, McCarthy GM, McCallister H. Primary pulmonary artery leiomyosarcoma in an adult dog. *Vet Pathol* 2000; 37:663-666.
51. Hong Suh C, Ordonez NG, Mackay B. Fibrosarcoma: Observations on the ultrastructure. *Ultrastruct Pathol* 1993; 17:221-229.
52. Thoolen RJMM, Vos JH, Van Der Linde-Sipman JS, DeWeger RA, VanUnnik JAM, Misdorp W, Van Dijk JE. Malignant fibrous histiocytomas in dogs and cats: An immunohistochemical study. *Res Vet Sci* 1992; 53:198-204.
53. Roholl PJM, DeJong ASH, Ramaekers FCS. Application of markers in the diagnosis of soft tissue tumours. *Histopathology* 1985; 9:1019-1035.

54. Craig LE, Julian ME, Ferracone JD. The diagnosis and Prognosis of Synovial Tumors in Dogs. *Vet Pathol* 2002; 39:66-73.
55. Walder EJ, Gross TL. Neoplastic Diseases of the Skin. Part VI. Mesenchymal Tumors. In: Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ. *Vet Dermatopathol Mosby Year Book*, St Louis Missouri 1992; 430-450.
56. Pool RR, Thompson KG. Tumors of Joints. In: Meuten DJ. *Tumors in Domestic Animals*. 4thed. Iowa State Press, Iowa 2002; 199-243.
57. Hong Suh C, Ordonez NG, Mackay B. Malignant fibrous histiocytoma: An ultrastructural Perspective. *Ultrastruct Pathol* 2000; 24:243-250.
58. Waters CB, Morrison WB, DeNicola DB, Widmer WR, White MR. Giant cell variant of malignant fibrous histiocytoma in dogs: 10 cases (1986-1993). *JAVMA* 1994; 205(10):1420-1424.
59. Kerlin RL, Hendrick MJ. Malignant fibrous histiocytoma and malignant histiocytosis in the dog - convergent or divergent phenotypic differentiation. *Vet Pathol* 1996; 33:713-716.
60. Weiss SW, Goldblum JR. Malignant Fibrohistiocytic Tumors. In: Weiss SW, Goldblum JR. *Enzinger & Weiss's Soft Tissue Tumors*. 4th ed. Mosby, St Louis, London, Philadelphia, Sydney, Toronto 2001; 535-569.
61. Hendrick MJ, Brooks JJ, Bruce EH. Six cases of malignant fibrous histiocytoma of canine spleen. *Vet Pathol* 1992; 29:351-354.
62. Miettinen M. Antibody specific to muscle actins in the diagnosis and classification of soft tissue tumors. *Am J Pathol* 1988; 130(1):205-215.
63. Cooper BJ, Valentine BA. Tumors of Muscle. In: Meuten DJ. *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press, Iowa 2002; 319- 369.
64. LaRock RG, Ginn PE. Immunohistochemical staining characteristics of canine gastrointestinal stromal tumors. *Vet Pathol* 1997; 34:303-311.
65. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors – definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001; 438:1-12.
66. Perez J, Bautista MJ, Rollon E, DeLara FC-M, Carrasco L, De Las Mulas JM. Immunohistochemical characterization of hemangiopericytomas and other spindle cell tumors in the dog. *Vet Pathol* 1996; 33:391-397.
67. Dewit L, Albus-Lutter CE, De Jong ASH, Voute PA. Malignant schwannoma with a rhabdomyoblastic component, a so-called triton tumor. *Cancer* 1986; 58:1350-1356.
68. Hulland TJ. Tumors of the Muscle. In: Moulton JE. *Tumors in Domestic Animals*. 3rded. University of California Press Ltd, Berkeley, Los Angeles, London 1990; 88-101.
69. Boy SC, Van Herden WFP, Steenkamp G. Diagnosis and treatment of primary intraoral leiomyosarcomas in four dogs. *Vet Rec* 2005; 156(6):510-513.
70. Kapatkin AS, Mullen HS, Matthiesen DT, Patnaik AK. Leiomyosarcoma in dogs: 44 cases (1983-1988). *JAVMA* 1992; 201(7):1077-1079.
71. Weinstein MJ, Carpenter JL, Mehlhaff Schunk CJ. Nonangiogenic and nonlymphomatous sarcomas of the canine spleen: 57 cases (1975-1987). *JAVMA* 1989; 195(6):785-788.
72. Liu SM, Mikaelian I. Cutaneous smooth muscle tumors in the dog and cat. *Vet Pathol* 2003; 40:685-692.
73. Brodey RS, Roszel JF. Neoplasms of the canine uterus, vagina and vulva: A clinicopathologic survey of 90 cases. *JAVMA* 1967; 151(10):1294-1307.

74. Carpenter JL, Hamilton TA. Angioleiomyoma of the nasopharynx in a dog. *Vet Pathol* 1995; 32:721-723.
75. Cohen M, Post GS, Wright JC. Gastrointestinal leiomyosarcomas in 14 dogs. *J Vet Intern Med* 2003; 17:107-110.
76. Sato T, Aoki K, Shibuya H, Machida T, Watari T. Leiomyosarcoma of the kidney in a dog. *J Vet Med A* 2003; 50:366-369.
77. Laratta LJ, Center SA, Flanders JA, Dietze AE, Castleman WL. Leiomyosarcoma in the duodenum of a dog. *JAVMA* 1983; 183(10): 1096-1097.
78. Hayden DW, Klausner JS, Waters DJ. Prostatic leiomyosarcoma in a dog. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11:283-286.
79. Meuten DJ, Calderwood-Mays MB, Dillman RC, Cooper BJ, Valentine BA, Kuhajda FP, Pass DA. Canine laryngeal rhabdomyoma. *Vet Pathol* 1985; 22:533-539.
80. O'Hara AJ, McConnel M, Wyatt K, Huxtables C. Laryngeal rhabdomyoma in a dog. *Aust Vet J* 2001; 79(12):817-821.
81. Reams-Rivera YR, Carlton WW. Lingual rhabdomyoma in a dog. *J Comp Pathol* 1992; 106:83-87.
82. Eusebi V, Ceccarelli C, Gorza L, Schiaffino S, Bussolati G. Immunohistochemistry of rhabdomyosarcoma : The use of four markers. *Am J Surg Pathol* 1986; 10(4):293-299.
83. Tazawa K, Tsukada K, Makuuchi H, Tsutsumi Y. An immunohistochemical and clinicopathological study of gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* 1999; 49:786-798.
84. Frost D, Lasota J, Miettinen M. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: A histopathologic, immunohistochemical and molecular genetic study of 50 cases. *Vet Pathol* 2003; 40:42-54.
85. Ma CK, Amin MB, Kintanar E, Linden MD, Zarbo RJ. Immunohistologic characterization of gastrointestinal stromal tumors: a study of 82 cases compared with 11 cases of leiomyomas. *Mod Pathol* 1993; 2:139-144.
86. Srebernik N, Appleby EC. Breed prevalence and sites of haemangioma and haemangiosarcoma in dogs. *Vet Rec* 1991; 129:408-409.
87. Hayden DW, Bartges JW, Bell FW, Klausner JS. Prostatic hemangiosarcoma in a dog : Clinical and pathological findings. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4:209-211.
88. Hilbe M, Hauser B, Zlinszky K, Ehrensperger F. Haemangiosarcoma with a metastasis of a malignant mixed mammary gland tumour in a dog. *J Vet Med A* 2002; 49:443-444.
89. Clifford CA, Mackin AJ, Henry CJ. Treatment of canine hemangiosarcoma: 2000 and beyond. *J Vet Intern Med* 2000; 14:479-485.
90. Zhao D, Yamaguchi R, Tateyama S, Ogawa H, Yamazaki Y. Canine splenic hemangiosarcoma with abdominal dissemination. *J Vet Med Sci* 1994; 56(4):753-755.
91. Brown NO, Patnaik AK, MacEwen EG. Canine hemangiosarcoma: Retrospective analysis of 104 cases. *JAVMA* 1985; 186(1):56-58.
92. Prymak C, McKee LJ, Goldschmidt MH, Glickman LT. Epidemiologic, clinical, pathologic, and prognostic characteristics of splenic hemangiosarcoma and splenic hematoma in dogs: 217 cases (1985). *JAVMA* 1988; 193(6):706-712.
93. Mellanby RJ, Chantrey JC, Baines EA, Ailsby RL, Herrtage ME. Urethral haemangiosarcoma in a boxer. *J Small Ani Pract* 2004; 45:154-156.

94. Ramirez O, Bliss S. Vet Med Today: What is your diagnosis? JAVMA 1999; 215(5):625-626.
95. Johnson KA, Powers BE, Withrow SJ, Sheetz MJ, Curtis CR, Wrigley RH. Splenomegaly in dogs. J Vet Int Med 1989; 3:160-166.
96. Liptak JM, Dernell WS, Withrow SJ. Haemangioma of the urinary bladder in a dog. Aust Vet J 2004; 82(4):215-217.
97. Day MJ, Lucke VM, Pearson H. A review of pathological diagnoses made from 87 canine splenic biopsies. J Small Ani Pract. 1995; 36:426-433.
98. Von Beust BR, Suter MM, Summers BA. Factor VIII-related antigen in canine endothelial neoplasms: An immunohistochemical study. Vet Pathol 1988; 25:251-255.
99. Sawamoto O, Yamate J, Kuwamura M, Hagiwara R, Kurisu K. A canine peripheral nerve sheath tumor including peripheral nerve fibers. J Vet Med Sci. 1999; 61(12):1335-1338.
100. LeCouteur RA. Tumors of the Nervous System. İçinde: Withrow SJ, MacEwen EG. Small Animal Clinical Oncology. 2nded. WB.Saunders Company, Philadelphia, 1996: 393-419.
101. Garcia P, Sanchez B, Sanchez MA, Gonzales M, Rollan E, Flores JM. Epithelioid malignant peripheral nerve sheath tumour in a dog. J Comp Pathol 2004; 131:87-91.
102. Patnaik AK, Erlandson RA, Lieberman PH. Canine malignant melanotic schwannomas : A light and electron microscopic study of two cases. Vet Pathol. 1984; 21:483-488.
103. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji. 6. baskı. Nobel-Yüce yayınları, İstanbul 2000; 713-744.
104. Koestner A, Higgins RJ. Tumors of the nervous System. In: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals. 4thed. Blackwell publishing company, Iowa, 2002: 697- 738.
105. Troncoso P, Ordonez NG, Raymond AK, Mackay B. Malignant granular cell tumor: Immunohistochemical and ultrastructural observations. Ultrastruct Pathol 1988; 12:137-144.
106. Patnaik AK. Histologic and immunohistochemical studies of granular cell tumors in seven dogs, three cats, one horse and one bird. Vet Pathol. 1993; 30:176-185.
107. Rallis TS, Tontis DK, Soubasis NH, Patsiaura KK, Papazoglou LG, Adamama-Moraitou KK. Case report. Immunohistochemical study of a granular cell tumor on the tongue of a dog. Vet Clin Pathol. 2001; 30(2):62-66.
108. Ordonez NG, Mahfouz SM, Mackay B. Synovial sarcoma: An immunohistochemical and ultrastructural study. Hum Pathol 1990; 21(7):733-749.
109. Folpe AL, Schmidt RA, Chapman D, Gown AM. Poorly differentiated synovial sarcoma. Am J Surg Pathol 1998; 22(6):673-682.
110. Loukopoulos P, Heng HG, Arshad H. Canine biphasic synovial sarcoma: case report and immunohistochemical characterization. J Vet Sci 2004; 5(2):173-180.
111. Weiss SW, Goldblum JR. Perivascular Tumors. In: Weiss SW, Goldblum JR. Enzinger & Weiss's Soft Tissue Tumors. 4thed. Mosby, St Louis, London, Philadelphia, Sydney, Toronto 2001; 985-1035.
112. McColl-Williamson M, Middleton DJ. Cutaneous soft tissue tumours in dogs: classification, differentiation and histogenesis. Vet Dermatol 1998; 9:43-48.

113. Moore AS, Madewell BR, Lund JK. Immunohistochemical evaluation of intermediate filament expression in canine and feline neoplasms. *Am J Vet Res* 1989; 50(1):88-92.
114. Tan AWH, Tan SH. Dermatofibrosarcoma protuberans: A clinicopathological analysis of 10 cases in Asians. *Aust J Dermatol* 2004; 45:29-33.
115. Weiss SW, Goldblum JR. Fibrohistiocytic Tumors of Intermediate Malignancy. In: Weiss SW, Goldblum JR. *Enzinger & Weiss's Soft Tissue Tumors*. 4th ed. Mosby, St Louis, London, Philadelphia, Sydney, Toronto 2001; 491-534.
116. Powers BE. The Pathology of Neoplasia. In: Withrow SJ, MacEwen EG. *Small Animal Clinical Oncology*. 2nd ed. Saunders Co, Philadelphia 1996; 4-15.
117. Newman SJ. Diagnostic pathology for the cancer patient. *Clin Tech Small Ani Pract* 2003; 18(2):139-144.
118. Graadt van Roggen JF. The histological grading of soft tissue sarcomas: Current concepts. *Curr Diagn Pathol*. 2001; 7:1-7.
119. Powers BE, Hoopes PJ, Ehrhart EJ. Tumor diagnosis, grading and staging. *Semin Vet Med and Surg (Small Ani)* 1995; 10(3):158-167.
120. Weiss SW, Goldblum JR. Approach to the Diagnosis of Soft Tissue Sarcomas In: Weiss SW, Goldblum JR. *Enzinger & Weiss's Soft Tissue Tumors*. 4th ed. Mosby, St Louis, London, Philadelphia, Sydney, Toronto 2001; 191- 245.
121. Desnoyers MM, Haines DM, Searcy GP. Immunohistochemical detection of intermediate filament proteins in formalin fixed normal and neoplastic canine tissues. *Can J Vet Res* 1990; 54:360-365.
122. Andreasen CB, Mahaffey EA, Duncan JR. Intermediate filament staining in the cytologic and histologic diagnosis of canine skin and soft tissue tumors. *Vet Pathol* 1988; 25:343-349.
123. Gatter KC, Alcock C, Heryet A, mason DY. Clinical importance of analyzing malignant tumours of uncertain origin with immunohistochemical techniques. *The Lancet* 1985.
124. Spangler WL, Culbertson MR, Kass PH. Primary mesenchymal (nonangiomatous/nonlymphomatous) neoplasms occurring in the canine spleen: Anatomic classification, immunohistochemistry and mitotic activity correlated with patient survival. *Vet Pathol*. 1994; 31:37-47.
125. Cullen JM, Page R, Misdorp W. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management. In: Meuten DJ. *Tumors in Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press, Iowa 2002; 3-44.
126. Andreasen CB, Mahaffey EA. Immunohistochemical demonstration of desmin in canine smooth muscle tumors. *Vet Pathol*. 1987; 24:211-215.
127. Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, Johnson GC, pace LW, Fard A, Kottler SJ. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet Pathol* 2000; 37:597-608.
128. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42:405-426.
129. Miller RT. Technical Immunohistochemistry: Achieving reliability and reproducibility of immunostains. Society for Applied Immunohistochemistry, Annual Meeting, NY, USA 2001.

130. De Jong ASH, Van Kessel-Van Mark M, Albus-Lutter CHE. Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adults: Immunohistochemistry as a tool for its diagnosis. *Hum Pathol* 1987; 18(3):298–303.
131. Mentzel T, Fletcher CDM. The emerging role of myofibroblasts in soft tissue neoplasia. *Am J Clin Pathol* 1997; 107:2–4.
132. Vos JH, van Den Ingh TSGAM, Ramaekers FCS, Molenbeek RF, De Neijs M, van Mil FN, Ivanyi D. The expression of keratins, vimentin, neurofilament proteins, smooth muscle actin, neuron-specific enolase and synaptophysin in tumors of the specific glands in the canine anal region. *Vet Pathol* 1993; 30:352–361.

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında İzmir’de doğdum. İlk ve orta eğitimimi İzmir’de tamamladım. 1993 yılında İzmir Özel Fatih Lisesi Anadolu Lisesi Bölümünden mezun oldum. 1998 yılında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden mezun oldum. 1999 yılında İstanbul Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimime başladım ve aynı yıl Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım ve halen bu görevime devam etmekteyim.