

Köpek Meme Tümörlerinde Sitokeratin, Vimentin ve Alfa-Düz Kas Aktin İntermedier ve Mikro Filamentlerinin İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu

Ümit H. MİLLİ, Rıfki HAZIROĞLU, Yılmaz AYDIN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

M. Yavuz GÜLBAHAR

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Van-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 02.11.1998

Özet: Formalin ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş 15'i benign, 31'i malign toplam 46 köpek meme tümörü immunohistokimyasal olarak incelendi. Bu incelemede sitokeratin peptid 18, pan sitokeratin, alfa-düz kas aktin ve vimentin monoklonal antikorları kullanıldı. Bazı tümörlerde negatif sonuç alınmasına karşın, sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin duktus ve asinus epitel hücrelerinde pozitif boyanmaya yol açtı. İki solid karsinomdaki metaplastik yassı hücrelerde sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratine karşı kuvvetli immunoreaktivite gelişti. Geniş spektrumlu pan sitokeratinin epitel hücrelerinin tümünde immunoreaktiviteye yol açmaması dikkat çekici bulundu. Benign ve malign tümörlerde yer alan myofibroblastlar alfa-düz kas aktin ve vimentin antikorları ile pozitif boyandı. Tümörlerde mezenşimal stromal hücreler ile metaplastik kıkırdak ve kemik hücrelerinde vimentine karşı immunoreaktivite kuvvetliydi. İki mekik hücre karsinomunda hücrelerin büyük bir kısmının alfa-düz kas aktin ile pozitif boyanması, bu tümörlerde myoepitel hücre kökeninin önemli bir bulgusu oldu. Myoepitel hücrelerinde proliferasyona duktal papillom (1/1), benign mikst tümör (1/5), tubuler adenokarsinom (3/6), papiller adenokarsinom (3/4), papiller kistik adenokarsinom (2/3), solid karsinom (4/8) ve malign mikst tümörlerde (2/4) rastlandı. Prolifere bu hücreler tubuler adenokarsinom, papiller adenokarsinom ve solid karsinomdaki birer olgu dışında alfa-düz kas aktin ile kuvvetli pozitif boyandı. Kondromüsinöz stroma ile kıkırdak ve kemik hücrelerinde alfa-düz kas aktin ile immunoreaktivitenin olmaması mikst meme tümörlerinde kemik ve kıkırdak doku oluşumunun stromal metaplazi sonu geliştiğini ortaya koymaktadır. Formalinle tespit edilmiş ve parafine gömülmüş köpek meme tümörlerinde monoklonal antikorların kullanımı ile yapılan immunohistokimyasal incelemelerin değeri bu çalışmayla da onaylanmıştır.

Anahtar Sözcükler: İmmunohistokimyasal, Köpek, Meme Tümörü.

Immunohistochemical Localization of Cytokeratin, Vimentin and Alpa-Smooth Muscle Actin Micro and Intermediate Filaments in Canine Mammary Tumors

Abstract: Forty-six formalin-fixed paraffin-embedded canine mammary tumors, 15 benign and 31 malignant, were studied immunohistochemically. Mouse monoclonal anti-alpha-cytokeratin 18, mouse monoclonal anti-alpha-cytokeratin (pan cytokeratin), mouse monoclonal anti-alpha-smooth muscle actin and mouse monoclonal anti-vimentin antibodies were used. The ductal and acinar epithelium stained positively for cytokeratin 18 and pan cytokeratin, although there was no immunoreactivity in some tumors. Metaplastic squamous cells in two solid carcinomas were positive for both cytokeratin 18 and pan cytokeratin. It was a notable finding that there were unreactive epithelial cells in some tumors for broad spectrum cytokeratin antibody (pan cytokeratin). Myofibroblasts in benign and malignant tumors were positive for both vimentin and alpha-smooth muscle actin antibodies. Stromal mesenchymal tissues, including metaplastic cartilage and bone, stained strongly positive for vimentin antibody. The majority of cells in two spindle cell carcinomas were immunoreactive with alpha-smooth muscle actin, being indicative of the myoepithelial origin of these tumors. Myoepithelial proliferation was prominent in ductal papilloma (1/1), benign mixed tumor (1/5), tubular adenocarcinomas (3/6), papillary adenocarcinomas (3/4), papillary cystic adenocarcinomas (2/3), solid carcinomas (4/8) and malignant mixed tumors (2/4). These proliferated cells stained positively for alpha-smooth muscle actin antibody except for those of a tubular adenocarcinoma, papillary adenocarcinoma and solid carcinoma. The absence of immunoreactivity with alpha-smooth muscle actin in chondromucinous stroma, cartilage and bone indicated that cartilage and bone formation in canine mammary tumors results from stromal metaplasia. The results of this study provide further evidence for the value and usefulness of immunohistochemical methods using monoclonal antibodies in formalin-fixed paraffin-embedded canine mammary tumors.

Key Words: Dogs, Immunohistochemistry, Mammary Gland Tumors.

Giriş

Köpeklerde meme tümörleri, deri tümörlerinden sonra en çok görülen neoplazmalardır. Bu tümörlere dışı köpeklerde çoğunlukla altı yaş ve sonrasında rastlanır. Erkek köpeklerde meme tümörleri çok ender olarak gözlenmektedir. Köpek meme tümörlerinde epitelial, myoepitelial ve destek doku komponentleri yer alır (1).

Histogenetik olarak meme tümörleri duktusları ve asinusları döşeyen luminal epitel hücrelerinden, myoepitel hücrelerinden ya da duktus ve asinusları çevreleyen bağ dokudan köken almaktadır. Köpek meme tümörlerinin histomorfolojik heterojenlik gösterdiği bilinmektedir. İyi huylu tümörlerin çoğunluğu kompleks ya da miks tümörlerdir (1-3).

Köpeklerde benign ve malign meme tümörlerinin ensidansı oldukça değişmektedir. Oranlar arasındaki belirgin varyasyon tümör sınıflandırmasındaki farklı yöntemlerden ve benign-malign meme tümörleri arasında diferensiyasyonu sağlayacak uniform kriterlerin eksikliğinden kaynaklanmaktadır (1). Ayrıca, köpek meme tümörlerinin histogenezisi konusundaki değişik görüşler farklı sınıflandırmaların yapılmasına yol açmıştır (1,2). Tümör sınıflandırmaları, diğer parametrelerle birlikte immunohistokimyasal özellikleri hakkında yeterli bilgi olmadığından çoğunlukla histopatolojiye dayanmaktadır (2).

Tümörlerde poliklonal ve monoklonal antikörlerin kullanımı ile gerçekleştirilen immunohistokimyasal incelemeler tümör değerlendirmesinde değerli ve objektif bir yöntemdir (3-6). Bunun sonucu olarak, insan meme tümörleri immunohistokimyasal olarak, özellikle intermedier filamentler ve diğer belirleyiciler yönünden, yaygın biçimde incelenmiştir (7,8). Köpek (3-5,6,9,10), kedi (11,12) ve sıçan (13) meme tümörleri de immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. İntermedier filamentler hücre iskeletinin bir bölümünü oluşturan değişik tip proteinlerdir. İntermedier filamentlerin fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte hücre iskeletinin komponentleri olarak hücre sel bütünlük, şekil ve organel pozisyonlarının korunması ile hücre sel ve hücre içi hareketlerin düzenlenmesinde rolleri olduğu ileri sürülmüştür. Sitokeratin filamentleri epitel hücrelerinde, vimentin filamentleri mezenseyal hücrelerde, desmin filamentleri kas hücrelerinde, nörofilamentler sinir hücrelerinde ve glial fibriler asidik protein filamentleri de astrositlerde bulunur (14). İntermedier filamentlerden başka diğer belirleyiciler de hücre tipini saptamada kullanılmaktadır. Örneğin, alfa-düz kas aktin mikrofilamentlerinin myoepitel hücreleri için belirleyici olduğu saptanmıştır (15,16).

Veteriner hekimlikte rutin olarak rastlanmakta olan tümörlerde intermedier filamentlerin analizi sınırlı olmuştur. Köpeklerde yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda insan kökenli intermedier filamentlere karşı geliştirilen antikörler kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar insan ve köpek dokularında eşdeğer immun boyanmanın olduğunu göstermiştir (3).

Bu çalışmanın amacı değişik tipte benign ve malign köpek meme tümörlerinde sitokeratin 18, pan sitokeratin ve vimentin intermedier filamentleri ile alfa-düz kas aktin mikrofilamentinin immunohistokimyasal ekspresyonlarını araştırarak bu tümörlerin histogenezisi hakkında bilgi elde etmektir.

Materyal ve Metot

Meme Tümörleri. Çalışmada AÜ Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalına fakültenin değişik kliniklerinden gönderilen 46 meme tümörü retrospektif olarak incelendi. Tümörler % 10 formol solüsyonunda tespit edilerek 5 µm kalınlığında kesildi ve hematoksilin-eozin ile boyanan kesitler ışık mikroskopunda incelendi. Sınıflandırma Dünya Sağlık Teşkilatı'nın daha önce belirlenen kriterlerine göre yapıldı (2). Beş köpekte tümöral odakların yakınında yer alan normal meme dokuları karşılaştırmalı immunohistokimyasal değerlendirmede kullanıldı.

Antikörler. Immunohistokimyasal incelemede ticari olarak sağlanan fare monoklonal anti-alfa-sitokeratin 18, fare monoklonal anti-alfa-sitokeratin (pan sitokeratin), fare monoklonal anti-alfa-düz kas aktin ve fare monoklonal anti-vimentin kitleri (Sigma, St Louis, MO, USA) kullanıldı.

İmmunohistokimyasal İncelemeler. Tümörlerden hazırlanan parafin kesitlerde intermedier ve mikrofilamentlerin varlığı ve lokalizasyonlarını belirlemek için ExtrAvidin-Biotin metodu kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyama kitleri içerisinde yer alan prosedüre göre yapıldı. Kesitlerin ksilol ile deparafinizasyonları ve seri alkollerle hidrasyonları yapıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için kesitler deiyonize suda hazırlanmış % 3'lük hidrojen peroksitte 5 dakika tutuldu. PBS ile her defasında 2 dakika olmak üzere iki kez vibratörle yıkandı ve silindi. Kesitler normal keçi serumu ile (blocking reagent, tamponlu salinde % 1'lik) 10 dakika inkübe edildi ve serum fazlası döküldü. Kesitlere primer antikordan iki damla damlatıldı ve 60 dakika inkübe edildi. PBS ile iki kez yıkandı ve silindi. Kesitlere iki damla biotinle işaretlenmiş sekonder antikör (keçide hazırlanmış anti-

fare immunglobulin) damlatıldı ve 20 dakika inkübe edildi. PBS ile iki kez yıkandı ve silindi. Kesitlere iki damla peroxidase reagent damlatıldı ve 20 dakika inkübe edildi. Kesitlere substrat ilave edildi (4 ml deiyonize su; iki damla acetate buffer; bir damla AEC kromojen ve bir damla % 3'lük hidrojen peroksit) ve mikroskopta renk gelişimleri kontrol edilerek 10 dakikaya kadar inkübe edildi. Yeterli boyanma geliştiğinde kesitler deiyonize suda 5 dakika yıkandı ve suyun fazlası döküldü. Karşıt boyama için kesitler Mayer'in hematoksileninde 2 dakika boyandı. Kesitler mavi renk alınıncaya kadar çeşme suyunda yıkandı ve gliserol jelatin ile yapıştırıldı. İmmunohistokimyasal boyamada negatif kontrol olarak PBS ve normal fare serumu kullanıldı. Tüm inkübasyonlar oda ısısında ve nem odalarında gerçekleştirildi.

Bulgular

İncelenen ve Dünya Sağlık Teşkilatı sınıflamasına göre sınıflandırılan 46 meme tümörünün tipleri ve sayıları Tablo 1'de gösterildi. On beş tümör benign (% 32,6), 31 tümör de malign (% 67,4) karakterdeydi. Beş normal meme dokusu karşılaştırmalı immunohistokimyasal değerlendirmede kullanıldı. On beş benign meme tümörü ve hiperplazisinde hücre tiplerinin immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu Tablo 2'de, 31 malign meme tümöründe hücre tiplerinin immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu da Tablo 3'de özetlendi.

Normal Meme Dokusu. Tümör odakları çevresinde bulunan ve neoplastik karakter göstermeyen normal meme dokusunda asinus ve duktus epitelleri hem sitokeratin peptid 18 hem de pan sitokeratin ile pozitif boyandı. Asinus ve duktuslar çevresinde düzenli bir tabaka şeklinde yer alan myoepitel hücreleri alfa-düz kas aktin ile kuvvetli, vimentin ile daha hafif boyanma özelliği gösterdi. Alfa-düz kas aktin ayrıca, kan damarlarındaki düz kas hücrelerinde kuvvetli pozitif reaksiyon oluşturdu. Stromal hücreler kuvvetli vimentin pozitif

Adenom (4 olgu). Bu tümörlerin hepsi asinulardan ve çok az olarak duktuslardan köken alan lobüler adenom yapısındaydı. Asinus epitelleri bir olguda sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin, bir olguda da yalnızca sitokeratin peptid 18 ile boyanma özelliği göstermezken diğer olgularda zayıftan kuvvetliye değişen derecede pozitif olarak boyandı (Şekil 1). Boyanma kuvvetli olmayıp, kimi asinus ve duktuslarda negatifti. Bir olguda sitokeratin peptid 18 ile oldukça kuvvetli reaktiviteye rastlanırken pan sitokeratin ile boyanma gözlenmedi. Myoepitel hücreleri sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin ile boyanmadı. Aynı şekilde, alfa-düz kas aktin duktus ve asinus luminal epitel hücreleri için reaktif

Tablo 1. İncelenen köpek meme tümörlerinin tipleri ve sayıları.

Tümör tipi	Olgu sayısı
<i>Benign tümörler ve hiperplaziler</i>	
Adenom	4
Duktal papillom	1
Perikanaliküler fibroadenom	1
Benign mikst tümör	5
Fibrom	1
Hemangioperisitom	1
Osteokondrom	1
Lobüler hiperplazi	1
<i>Malign tümörler</i>	
Tubuler adenokarsinom	6
Papiller adenokarsinom	4
Papiller kistik adenokarsinom	3
Solid karsinom	8
Mekik hücreli karsinom	2
Anaplastik karsinom	1
Fibrosarkom	1
Osteosarkom	1
Osteokondrosarkom	1
Malign mikst tümör	4
<i>Toplam</i>	46

değildi. Asinus ve duktuslar çevresinde düzenli bir tabaka şeklinde yer alan myoepitel hücreleri alfa-düz kas aktin ile kuvvetli pozitif. Myoepitel hücreleri vimentin ile bir olguda hafif, diğerlerinde kuvvetli boyanma özelliği gösterdi. Bir olguda stromada yer alan myofibroblastlar hem alfa-düz kas aktin hem de vimentin ile pozitif boyandı.

Duktal Papillom (1 olgu). Prolifere duktus epitelleri sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin ile kuvvetli pozitif boyandı (Şekil 2). Alfa-düz kas aktin duktuslar çevresinde yoğun proliferasyon gösteren myoepitel hücreleri için kuvvetli reaktifti. Bazı duktus epitelleri vimentin ile zayıf boyanma özelliği gösterdi.

Perikanaliküler Fibroadenom (1 olgu). Epitel hücreleri sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin ile boyanmadı. Myoepitel hücreleri alfa-düz kas aktin ve vimentin ile pozitif boyanırken (Şekil 3), proliferen stromal hücrelerde vimentin pozitiflik oldukça yoğundu.

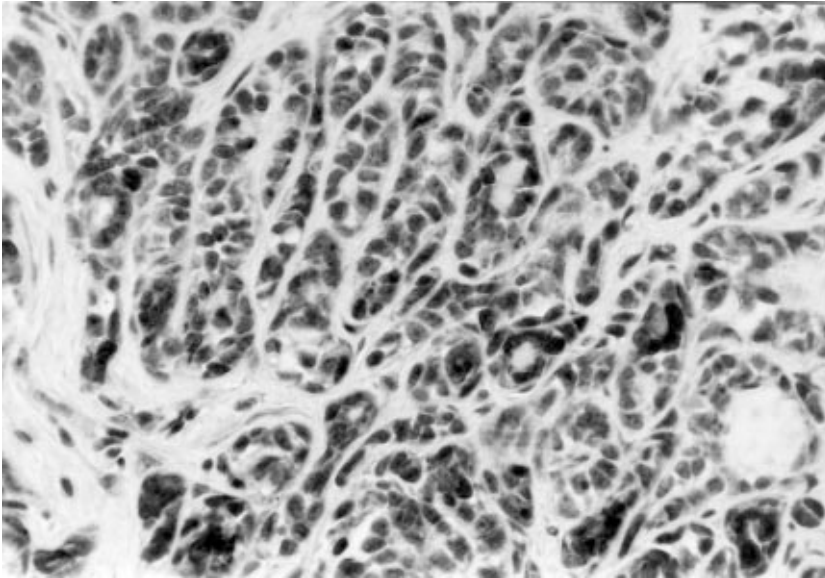
Benign Mikst Tümör (5 olgu). Bu tümörlerde hem glandüler hücrelerde hem de stromada proliferasyon görüldü. Tümörlerin hepsinde stromanın yer yer kıkırdak ve kemiğe metaplazileri şekillenmişti. Epitel hücrelerinde sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin ile ortadan

Tablo 2. İncelenen 15 benign meme tümörü ve hiperplazisinde immunohistokimyasal boyanma.

Tümör tipi	Hücre tipleri ve immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu				
	Olgu no	Pan sitokeratin	Sitokeratin peptid 18	Alfa-düz kas aktin	Vimentin
Adenom	1	–	–	M***	F***,M***
	2	E***	–	M***,MF***	F***,M***,MF***
	3	E**	E**	M***	F***,M***
	4	E*	E*	M***	F***,M*
Duktal papillom	1	E***	E***	PM***	E*,F***
Perikanaliküler fibroadenom	1	–	–	M***	M***,F***
Benign mikst tümör	1	E***	E***	M***,MF***	F***,K***,O***,M***, MF***
	2	E**	E**	M***	F***,K***,O***,M***
	3	E**	E***	M***,MF***	F***,K***,O***,M**,MF**
	4	E**	E***	M***	F***,K***,O***,M***
	5	E*	E*	PM***	E*,F***,K***,PM***
Fibrom	1	–	–	–	F***
Hemangioperisitom	1	–	–	–	F***
Osteokondrom	1	–	–	–	O***,K***
Lobüler hiperplazi	1	–	–	M***	F***

E= Alveolar ya da duktal epitel hücreleri; M= Myoepitel hücreleri; PM= Proliferatif myoepitel hücreleri; MF=Myofibroblastlar; F= Fibroblastlar; K= Kıkırdak hücreleri; O= Osteoid hücreler.

* = Zayıf boyanma; ** = Orta derecede boyanma; *** = Kuvvetli boyanma.



Şekil 1. Adenom. Asinus hücrelerinin bir kısmında pan sitokeratine karşı immunoreaktivite. ExtrAvidin-Biotin metodu. Mayer'in hematoksileni ile karşı boyama. x 510.

kuvvetliye değişen pozitiflik görüldü (Şekil 4). Alfa-düz kas aktin myoepitel hücreleri ve iki olguda görülen myofibroblastlar için reaktifti. Metaplastik kıkırdak ve kemik hücreleri, fibroblastlar, myoepitel hücreleri ve myofibroblastlar vimentin ile pozitif boyandı.

Fibrom (1 olgu). Fibröz doku vimentin ile pozitif boyandı. Alfa-düz kas aktin ise yalnızca tümör yapısında yer alan damarlardaki düz kas hücreleri için kuvvetli reaktifti.

Tablo 3. İncelenen 31 malign meme tümöründe immunohistokimyasal boyanma.

Tümör tipi	Hücre tipleri ve immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu				
	Olgu no	Pan sitokeratin	Sitokeratin peptid 18	Alfa-düz kas aktin	Vimentin
Tubuler adenokarsinom	1	E**	E**	M***,MF***	E*,F***,M***,MF***
	2	E*	E***	M***,MF***	F***,M**,MF**
	3	E*	E**	PM***	F***,PM***
	4	E*	E**	M***	E*,F***,M**
	5	E*	E**	M***	E*,F***,PM*
	6	-	E**	PM**,MF***	E*,F***,PM*,MF*
Papiller adenokarsinom	1	E*	E*	M***,MF***	F***,M***,MF***
	2	E**	E**	PM***,MF***	F***,PM**,MF**
	3	E***	E***	PM***	F***,PM*
	4	E**	E***	M***	E*,F***,M**
Papiller kistik adenokarsinom	1	-	E**	M***	E*,F***,M**
	2	E***	-	PM***	F***,PM*
	3	E*	E*	PM***,MF***	F***,PM***,MF***
Solid karsinom	1	-	-	MF***	F***,MF***
	2	-	-	M***	F***,M***
	3	-	-	M***	F***,M***
	4	-	-	M***	F***,M***
	5	E*	E**	PM***	F***,PM***
	6	E***	E**	PM***	F***,PM***
	7	E*,S***	E*,S**	PM***,MF***	F***,PM*,MF***
	8	E*,S***	S***	M***,MF***	F***,MF***,S***
Mekik hücreli karsinom	1	-	-	PM***	F***,PM**
	2	E*	E*	PM***	F***,PM***
Anaplastik karsinom	1	-	-	-	F***
Fibrosarkom	1	-	-	-	F***
Osteosarkom	1	-	-	-	O***
Osteokondrosarkom	1	-	-	-	O***,K***
Malign mikst tümör	1	E***	E***	M***	F***,K***,M***
	2	E**	E*	PM***,MF***	E*,F***,K***,PM**,MF**
	3	E**	-	M***	F***,K***,M***
	4	E*	E*	PM**	F***,K***,PM***

E= Alveoler ya da duktal epitel hücreleri; S= Skuamöz epitel hücreleri; M= Myoepitel hücreleri; PM= Proliferatif myoepitel hücreleri;

MF=Myofibroblastlar; F= Fibroblastlar; K= Kıkırdak hücreleri; O= Osteoid hücreler.

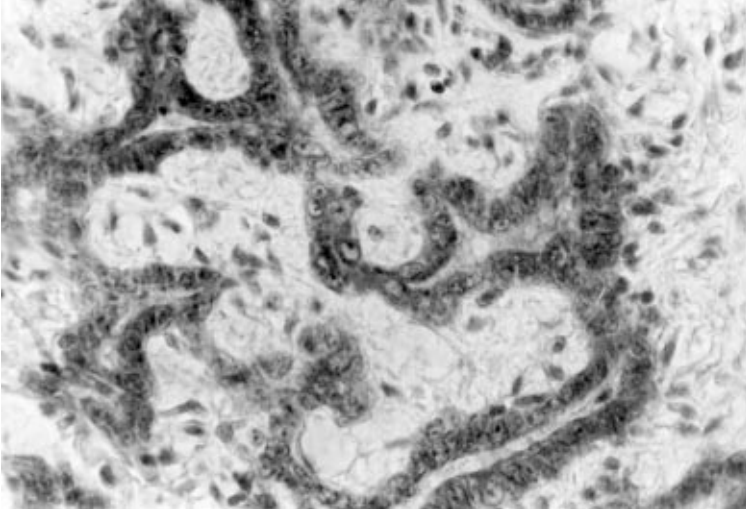
* =Zayıf boyanma; ** = Orta derecede boyanma; *** = Kuvvetli boyanma.

Hemangioperisitom (1 olgu). Tümör hücrelerinde vimentin ile ortadan kuvvetli düzeye değişen derecede pozitif reaksiyon görüldü (Şekil 5). Damar duvarlarında alfa-düz kas aktin ile pozitif boyanmaya rastlandı.

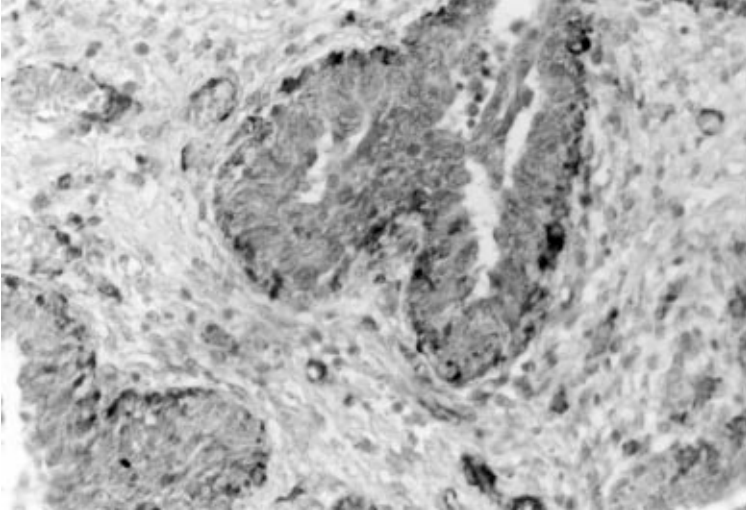
Osteokondrom (1 olgu). Yer yer kıkırdak dokuya da rastlanan ve hemen tümünü kemik dokusunun oluşturduğu bu tümörde vimentin her iki doku hücrelerinde pozitif boyanmaya yol açtı.

Lobüler Hiperplazi (1 olgu). Sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin ile epitel hücre reaktivitesine rastlanmadı. Alfa-düz kas aktin ile myoepitel hücreleri kuvvetli pozitif boyandı (Şekil 6).

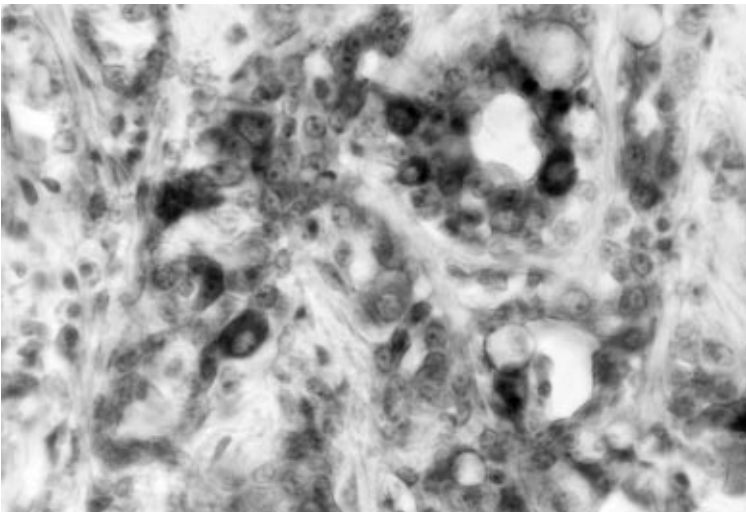
Tubuler Adenokarsinom (6 olgu). Glandüler epitel hücrelerinin çoğunlukla tubuler yapılar şeklinde dizilim gösterdiği bu tümörlerin üçünde myoepitel hücrelerine benzeyen mekik hücre proliferasyonları belirgindi. Duktus



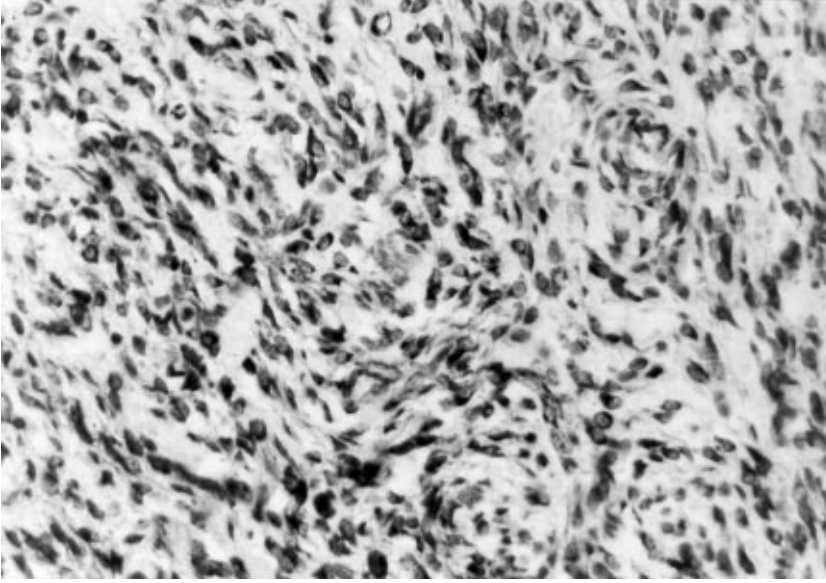
Şekil 2. Duktal papillom. Duktal hücrelerin luminal yüzlerinde sitokeratin peptid 18 immunoreaktivitesi. ExtrAvidin-Biotin metodu. Mayer'in hematoksileni ile karşıt boyama. x 510.



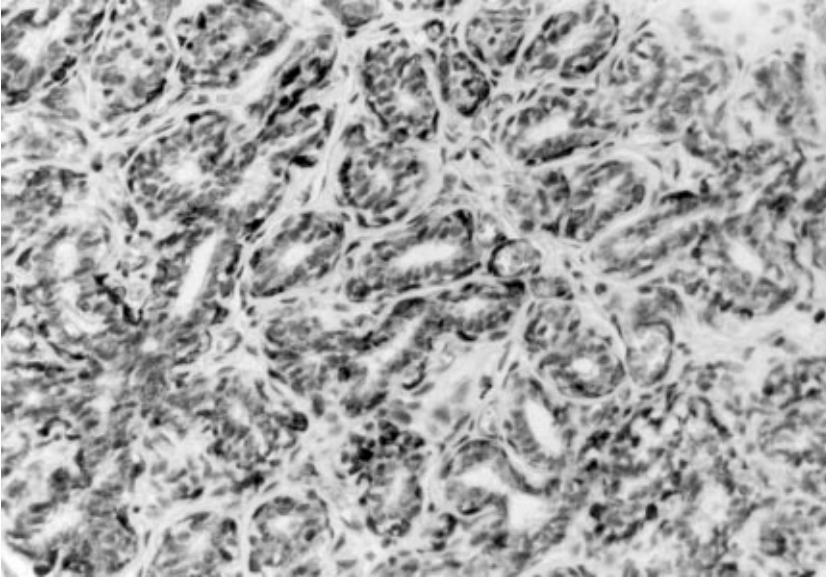
Şekil 3. Perikanaliküler fibroadenom. Myoepitel hücrelerinde alfa-düz kas aktine karşı immunoreaktivite. ExtrAvidin-Biotin metodu. Mayer'in hematoksileni ile karşıt boyama. x 320.



Şekil 4. Benign mikst tümör. Epitel hücrelerinde sitokeratin peptid 18 antikoruna ile kuvvetli pozitif boyanma. ExtrAvidin-Biotin metodu. Mayer'in hematoksileni ile karşıt boyama. x 510.



Şekil 5. Hemangioperisitom. Neoplastik hücrelerin hepsinde vimentine karşı kuvvetli immunoreaktivite. ExtrAvidin-Biotin metodu. Mayer'in hematoksileni ile karşıt boyama. x 320.



Şekil 6. Lobüler hiperplazi. Myoepitel hücrelerin alfa-düz kas aktin antikoruna ile kuvvetli pozitif boyanması. ExtrAvidin-Biotin metodu. Mayer'in hematoksileni ile karşıt boyama. x 320.

ve asinus epitel hücreleri sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin ile zayıftan-kuvvetliye değişen pozitiflik gösterdi (Şekil 7). Pozitif boyanma tümörün her tarafında görülmedi. Bir tümörde pan sitokeratin ile pozitif boyanma oluşmadı. Kimi tümörlerde duktus epitelindeki reaktivite asinus epitellerine göre daha yoğundu. Aynı şekilde sitokeratin peptid 18, pan sitokeratine göre daha kuvvetli boyanma sağladı. Myoepitel hücrelerine benzeyen mekik hücrelerinin tümör yapısına katıldığı üç olgudan ikisinde bu hücreler alfa-düz kas aktin ile pozitif boyandı. Bunlardan birinde

reaktivite mekik hücre kümelerinin periferiyle sınırlıydı. Myoepitel hücre benzeri olan ve alfa-düz kas aktinle boyanmayan hücreler, vimentin ile zayıf pozitiflik gösterdi. Vimentin dört tümörde epitel hücrelerinde zayıf boyanmaya yol açtı. Üç tümörde intersitisyumda alfa-düz kas aktin ve vimentin ile tipik reaktivite veren myofibroblastlara rastlandı.

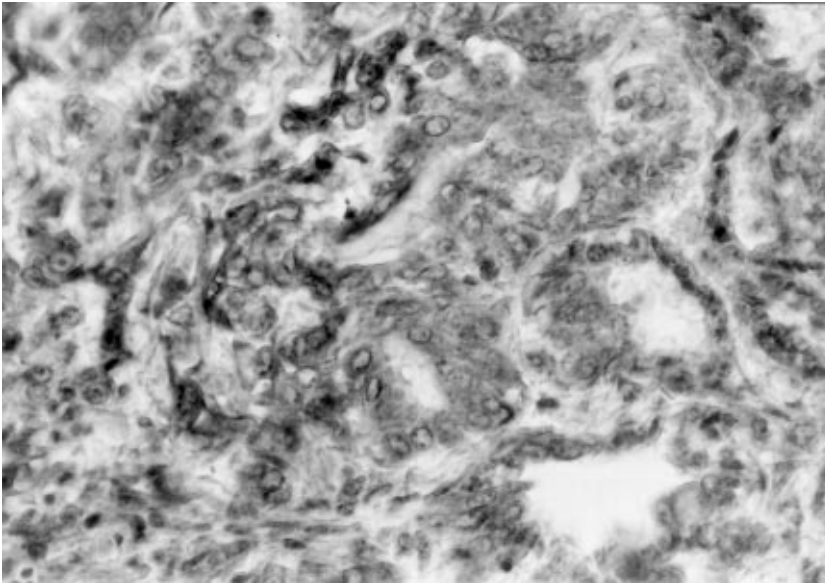
Papiller Adenokarsinom (4 olgu). Bu tip tümörlerde tubullerdeki silindirik ya da kübik hücreler geniş tabanlı ya da saplı papiller uzantılar oluşturmuşlardı. Epitel hücreleri sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin ile zayıftan

kuvvetli dereceye değişen pozitiflik gösterdi (Şekil 8). Dört tümörden üçünde myoepitel hücre proliferasyonu belirgindi. Bu üç tümörden ikisinde myoepitel hücreleri alfa-düz kas aktin ile kuvvetli pozitif boyandı (Şekil 9). Bir tümörde rastlanan miksomatöz alanlardaki hücreler alfa-düz kas aktin negatif ve vimentin pozitif. Bir tümörde duktus epitel hücreleri vimentinle yer yer zayıf boyandı. İki tümörde intersitsiyel dokuda vimentin ve alfa-düz kas aktinle pozitif boyanan myofibroblastlar görüldü.

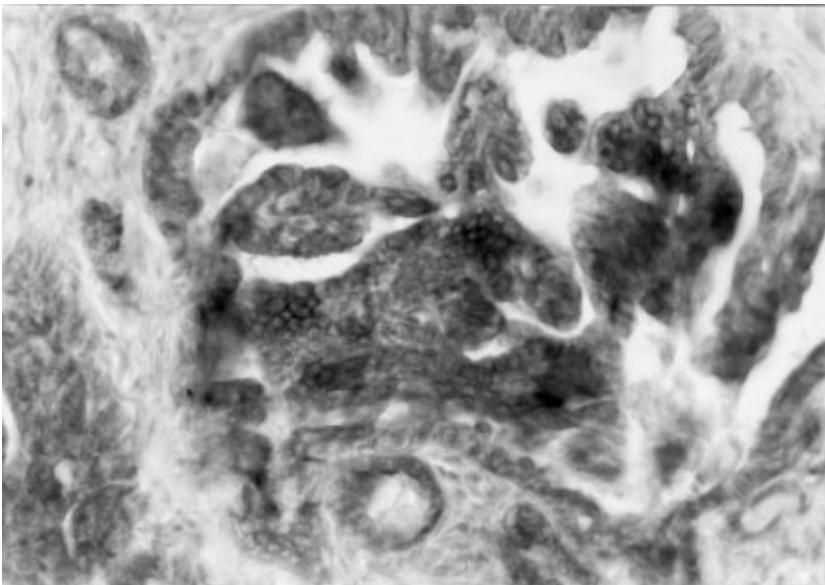
Papiller Kistik Adenokarsinom (3 olgu). Bu tümörlerde papiller alanlar yanında yer yer kistik yapılara

da rastlandı. Epitel hücrelerinde sitokeratinlerle değişken pozitiflik saptanırken tümörlerden birinde hücreler pan sitokeratin negatif, diğerinde sitokeratin peptid 18 negatif. Myoepitel hücre proliferasyonunun görüldüğü iki tümörde bu hücreler alfa-düz kas aktin ile kuvvetli pozitif boyandı. Vimentin stromal hücrelerde pozitif boyanmaya yol açarken bir tümörde zayıf epitel hücre boyanması oluşturdu. Bir olguda intersitsiyel myofibroblastlara rastlandı. Bu hücreler alfa-düz kas aktin ve vimentinle kuvvetli pozitif boyandı.

Solid Karsinom (8 olgu). Bu tümörlerde hücreler tubul ya da lumen oluşturmadan solid kümeler ya da



Şekil 7. Tubuler adenokarsinom. Epitel hücrelerinde sitokeratin peptid 18'e karşı immunoreaktivite. ExtrAvidin-Biotin metodu. Mayer'in hematoksileni ile karşıt boyama. x 510.

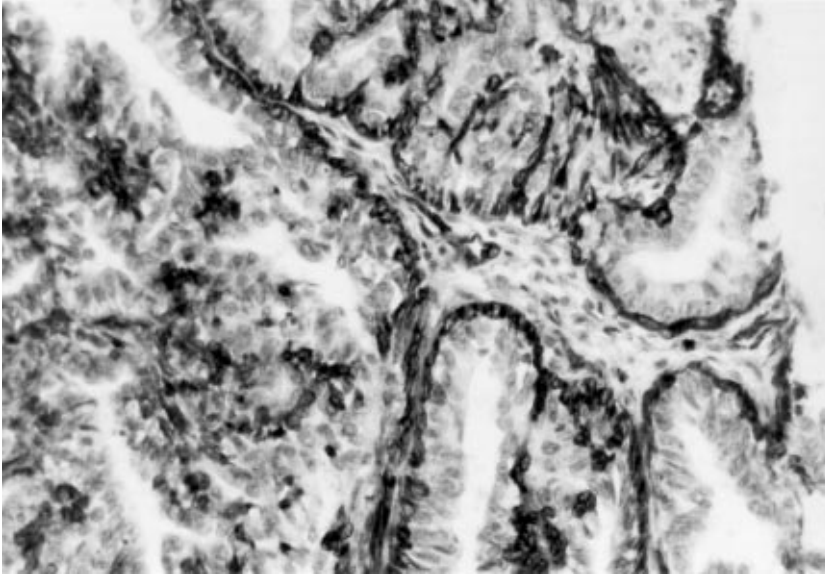


Şekil 8. Papiller adenokarsinom. Neoplastik hücrelerde sitokeratin peptid 18'e karşı kuvvetli immunoreaktivite. ExtrAvidin-Biotin metodu. Mayer'in hematoksileni ile karşıt boyama. x 510.

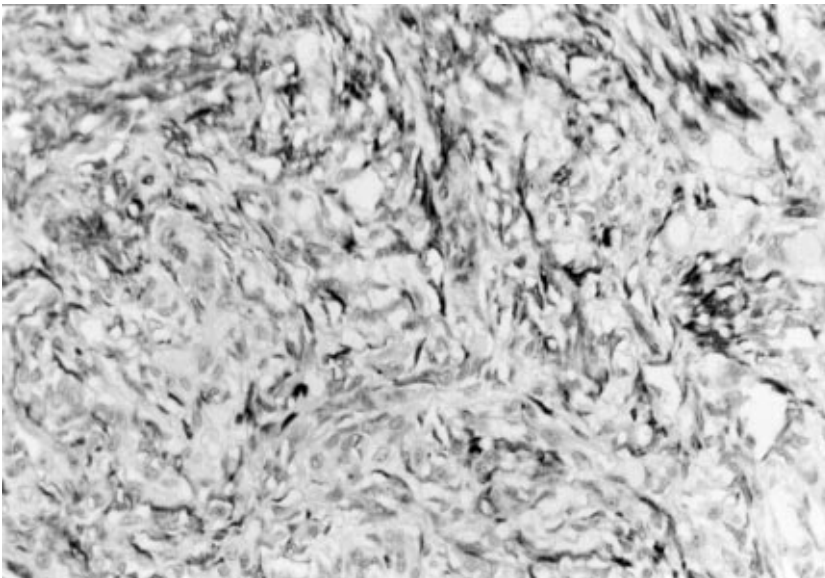
kordonlar şeklinde dizilim göstermekteydi. Tümörlerden dördünde myoepitel hücre proliferasyonu şekillenmişti. Sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin ile dört tümörde epitel hücrelerinde zayıftan-kuvvetli dereceye değişen pozitif boyanma saptanırken, dördünde ise epitel hücrelerinde hiç reaktivite oluşmadı. Myoepitelial proliferasyonun görüldüğü dört tümörden üçünde alfa-düz kas aktin ile kuvvetli pozitif boyanma oluşurken, birinde bu hücrelerde reaksiyon negatifti. Myoepitel hücre proliferasyonunun da görüldüğü iki tümörde yer yer skuamöz metaplazi gösteren alanlara rastlandı. Skuamöz

hücreler sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin ile kuvvetli pozitif boyanırken bir tümörde vimentin ile boyanmada da bu hücrelerde reaktiviteye rastlandı. Üç tümörde intersitisyumda vimentin ve alfa-düz kas aktinle kuvvetli pozitif boyanan myofibroblastlar saptandı.

Mekik Hücreli Karsinom (2 olgu). Bu tümörlerdeki mekik hücrelerinin büyük bir çoğunluğu alfa-düz kas aktin ve vimentin ile kuvvetli pozitif boyandı (Şekil 10). Tümörlerden birinde yer yer rastlanan asinuslar ve duktuslarda pan sitokeratin ile zayıftan-orta şiddete değişen reaktivite görüldü.



Şekil 9. Papiller adenokarsinom. Myoepitel hücrelerinde alfa-düz kas aktine karşı kuvvetli immunoreaktivite. ExtrAvidin-Biotin metodu. Mayer'in hematoxileni ile karşıt boyama. x 510.



Şekil 10. Mekik hücreli karsinomda alfa-düz kas aktin antikoruna pozitif boyanan hücreler. ExtrAvidin-Biotin metodu. Mayer'in hematoxileni ile karşıt boyama. x 320.

Anaplastik Karsinom (1 olgu). Büyük pleomorfik hücrelerden oluşan bu tümörde yer yer çok çekirdekli hücrelere de rastlandı. Tümör hücreleri uygulanan hiçbir antikora boyanmadı. Tümör içinde yer alan stroma vimentin pozitifliği.

Fibrosarkom (1 olgu). Bu sarkomdaki tümör hücreleri vimentin ile kuvvetli pozitif boyandı.

Osteosarkom (1 olgu). Tümör hücreleri vimentin ile kuvvetli pozitif boyandı.

Osteokondrosarkom (1 olgu). Geniş kondromatöz alanların yer aldığı bu tümörde hem kemik hem de kıkırdak doku hücrelerinde vimentine karşı kuvvetli reaktivite görüldü.

Malign Mikst Tümör (4 olgu). Bu tümörlerin epitelial dokusu sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratine karşı değişen yoğunlukta reaktivite gösterdi. Bir tümörde epitel hücreleri sitokeratin peptid 18 ile boyanmadı. Yki tümörde proliferasyon gösteren myoepitel hücreleri alfa-düz kas aktin ve vimentin ile kuvvetli pozitif boyandı. Tümör yapısında yer alan kıkırdak doku hücreleri yalnızca vimentine karşı reaktifti.

Tartışma

Köpeklerde meme tümörleri üzerinde yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda malign tümör hücreleri keratin 1, 4-8, 10, 18 ve 19 ile pozitif boyanmış, benign tümör hücrelerinde ise keratin 1, 4-6, 8, 18 ve 19'a karşı immunoreaktivite saptanmıştır (3, 4, 6, 9,10).

İncelenen adenom, duktal papillom ve benign mikst tümörlerde sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin ile boyanma özelliklerinde göze çarpan bir farklılık yoktu. İmmunoreaktiviteye neoplastik epitel hücrelerinin hepsinde rastlanmadı. Bir adenomda hem sitokeratin peptid 18, hem de pan sitokeratin olumsuz sonuç verirken bir diğerinde sitokeratin peptid 18 ile boyanma gözlenmedi. Perikanaliküler fibroadenomda ve lobüler hiperplazide de duktus ve asinus hücrelerinde sitokeratinlere karşı immunoreaktiviteye rastlanmadı.

Altı tubuler adenokarsinomda neoplastik hücrelerdeki pozitif boyanma yoğunluğu sitokeratin 18'de pan sitokeratine oranla daha fazlaydı. Tümörlerden birinde de pan sitokeratin ile immunoreaktivite görüldü. Dört papiller adenokarsinomda her iki keratinle benzer boyanma özelliğine rastlanırken üç papiller kistik adenokarsinomdan birinde sitokeratin peptid 18, diğerinde ise pan sitokeratin ile negatif sonuç alındı. Sekiz

solid karsinomdan dördünde her iki sitokeratine karşı immunoreaktivite görülmezken diğer dördünde benzer boyanma özelliklerine rastlandı. İki solid karsinomda yer yer rastlanan metaplastik yassı hücre kümelerinde immunoreaktivite hem sitokeratin peptid 18, hem de pan sitokeratin için kuvvetliydi. Anaplastik karsinomda ise tümör hücrelerinde her iki sitokeratine karşı immunoreaktiviteye rastlanmadı. Vimentin duktal papillomda, benign mikst tümörde (1/5), tubuler adenokarsinomda (4/6), papiller adenokarsinomda (1/4) ve papiller kistik adenokarsinomda (1/3) bazı neoplastik epitelde zayıf ve bir solid karsinomdaki skuamöz hücrelerde kuvvetli boyanmaya yol açtı. Vimentin-immunoreaktif epitel hücreleri bazı köpek meme tümörlerinde de bildirilmiştir (3,5).

İncelenen benign ve malign meme tümörlerindeki luminal epitel hücrelerinde sitokeratin peptid 18'e karşı pozitif boyanmanın saptanması daha önceki raporlarla uyum içindedir (3,6,9,10). Tümörlerde bu sitokeratine karşı farklı reaktivitenin görülmesi ve bazı hücrelerde negatif sonuç alınması bu hücrelerde diğer sitokeratin filamentlerinin bulunduğunu ortaya koymaktadır. Buna karşılık, geniş spektrumlu pan sitokeratine karşı reaktivite göstermeyen hücrelerin varlığı dikkat çekici bulunmuştur. Rabanal ve Else (10) köpek meme tümörlerinde kullandıkları düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı keratinleri içeren geniş spektrumlu keratinle yaptıkları çalışmada benzer sonuçları almışlar ve bu keratinin köpek meme bezinde epitel hücreleri için belirleyici olmadığını bildirmişlerdir.

Tümörlerde mezenşimal stroma vimentin ile kuvvetli boyanma özelliği gösterdi. Vimentin reaktivitesi perikanaliküler fibroadenom, fibrom ve osteokondromda yer alan fibroblastlar, kemik ve kıkırdak hücreleriyle fibrosarkom, osteosarkom, osteokondrosarkom ve malign mikst tümör yapısını oluşturan fibroblastlar, kemik ve kıkırdak hücrelerinde çok belirgindi. Ayrıca, hemangioperisitomdaki hücreler de yalnızca vimentin pozitif boyandı. Köpeklerde mezenşimal kökenli tümörlerde hücrelerin vimentin ekspresyonları diğer çalışmalardaki bulgularla benzerlik içindedir (3-6, 9, 10).

Mekik hücreli karsinomun iki olgusunda da tümör hücrelerinin çoğunluğu alfa-düz kas aktin ve vimentin ile kuvvetli pozitif boyandı. Bu hücrelerde sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratine karşı bir reaktivite gözlenmedi. Vos ve ark. (6) köpeklerde inceledikleri iki mekik hücre karsinomunda tümör hücrelerinin keratin 5, 8, 14 ve 17 gibi myoepitel hücreleri için belirleyici olan antikolar ile boyandıklarını, fakat alfa-düz kas aktin ile

boyanmadıklarını bildirmişler ve bu tümörlerde myoepitel hücre kökeninin olası olmadığını düşünmüşlerdir. Yine de, myoepitel hücrelerin malign şekle dönüşümü sırasında alfa-düz kas aktin ekspresyonunda bir kayba uğramış olabileceklerini de gözardı etmemek gereği aynı araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir. Bu çalışmadaki iki mekik hücre karsinomunda hücrelerin büyük bir kısmının alfa-düz kas aktin ile pozitif olarak boyanması myoepitel hücre kökeninin önemli bir bulgusu olmuştur.

Bu çalışmada duktus ve asinuslarda bazal olarak yerleşme gösteren myoepitel hücreleri alfa-düz kas aktin ve vimentin ile kuvvetli pozitif boyandı. Alfa-düz kas aktin mikofilamentleri myoepitel hücreleri için belirleyici olarak kabul edilmektedir (15, 16). Myoepitel hücrelerinin vimentin ile de pozitif reaksiyon gösterdiği saptanmıştır (3). Bu çalışmada kimi tümörlerde vimentin ile immunoreaktivite alfa-düz kas aktine göre daha hafifti. Sitokeratin peptid 18 ve pan sitokeratin ile myoepitel hücrelerinde negatif sonuç alındı. Myoepitel hücrelerinde yalnızca keratin 5, 14 ve 17'ye karşı immunoreaktivite saptanmıştır (5, 6, 9, 17, 18). İyi ve kötü huylu tümörlerin çoğunda myoepitel hücreleri duktus ve asinusları döşeyen tek sıralı hücre tabakası şeklinde görüldü. Buna karşılık duktal papillom (1/1), benign mikst tümör (1/5), tubuler adenokarsinom (3/6), papiller adenokarsinom (3/4), papiller kistik adenokarsinom (2/3), solid karsinom (4/8) ve malign mikst tümörlerde (2/4) myoepitel hücrelerinde belirgin proliferasyonlar görüldü. Prolifere myoepitel hücreleri tubuler adenokarsinom, papiller adenokarsinom ve solid karsinomdaki birer olgu dışında alfa-düz kas aktin kuvvetli pozitif boyandı.

Bu çalışmada elde edilen immunohistokimyasal veriler Dünya Sağlık Teşkilatı'nın meme tümörleri sınıflandırmasıyla uygunluk içinde bulundu (2). Bu sınıflandırmada yer alan "kompleks tip" tümörlerde belirgin myoepitel hücre proliferasyonu söz konusudur. Buna karşılık, hematoksilen-eozin ile boyanan tümörlerden üçünde gözlenen myoepitel benzeri hücre proliferasyonlarında hücrelerin alfa-düz kas aktine karşı reaktivite göstermemeleri bunların stromal hücre olduklarını ortaya koymuştur. Meme karsinomlarında myoepitel hücre proliferasyonlarının hiç olmadığı yönündeki görüş de (1) bu çalışmada gözlemlenen bulgularla uyumsuzdur, çünkü toplam 11 malign meme tümöründe immunohistokimyasal olarak da saptanan myoepitel hücre proliferasyonu görülmüştür.

İnsan meme karsinomlarında aktin ile pozitif boyanan myoepitel hücrelerinin yokluğu bildirilmişse de (16), bu

çalışmada olduğu gibi köpeklerde (4,9) ve insanlarda (8) yapılan diğer immunohistokimyasal çalışmalar meme karsinomlarında myoepitel hücrelerinin varlığını ortaya koymuştur. Vos ve ark. (5, 6, 18) köpeklerde normal meme bezinde ve benign tümörlerde myoepitel hücrelerinde alfa-düz kas aktine karşı immunoreaktivite saptarlarken, malign tümörlerde alfa-düz kas aktin pozitif myoepitel hücrelerinin bulunmayışını köpek meme tümörlerinin malign yapısına bağlamışlardır.

Benign ve malign mikst tümörler epitel, myoepitel, kıkırdak ve kemik hücreleri kapsar (1). Mikst tümörlerde kıkırdak ve kemiğin kökeni ise tartışmalıdır. Kimi araştırmacılar kıkırdak ve kemiğin myoepitel hücrelerinin metaplazisinden geliştiğini ileri sürerken (19, 20), kimi araştırmacılar da stromal bağ dokudan metaplazi ile şekillendiğini ifade etmişlerdir (5, 21). Bu çalışmada gerek kondromsinöz stromada gerekse kıkırdak ve kemik dokularında alfa-düz kas aktin ile immunoreaktivitenin olmaması ve sözü edilen dokuların yalnızca vimentin pozitif olması mikst meme tümörlerinde kemik ve kıkırdak doku oluşumunun stromal metaplazi sonu geliştiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, literatür bilgisinin de ışığında değerlendirildiğinde köpek meme tümörlerinde epitel hücrelerinin immunohistokimyasal özelliklerinde heterojenlik söz konusudur. Köpek meme tümörlerinin immunohistokimyasal incelenmesinde düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı keratinleri içeren geniş spektrumlu keratinle yapılacak çalışmaların yararlı sonuç vermeyeceği görülmektedir. Meme tümörlerinde önemli bir hücresel komponenti oluşturan myoepitel hücrelerinin alfa-düz kas aktin antikoru ile immunohistokimyasal demonstrasyonu oldukça iyi sonuç vermiştir. Mekik hücre karsinomlarında köken hücrenin myoepitel hücreleri olduğu alfa-düz kas aktinle yapılan immunohistokimyasal boyamada ortaya çıkmaktadır. Dünya Sağlık Teşkilatı'nın kabul ettiği sınıflandırma (2) içinde yer alan "kompleks tip" tümörlerde hematoksilen-eozin ile boyanan preparatların incelenmesinin tanı için yeterli olamayacağı görülmektedir. Bu çalışma sonucunda köpeklerde kimi malign meme tümörlerinde myoepitel hücrelerinin proliferasyonu da tanımlanmıştır. Ayrıca, benign ve malign meme tümörlerinde görülen kıkırdak ve kemik dokularının myoepitel hücre transformasyonlarından değil, stromal metaplaziden kaynaklandığı da saptanmıştır. Formalinle tespit edilmiş köpek meme tümörlerinde monoklonal antikoların kullanımı ile yapılan immunohistokimyasal incelemenin değeri, bu çalışmayla da onaylanmıştır.

Kaynaklar

1. Moulton, J.E., Tumors of the Mammary Gland. in *Tumors in Domestic Animals*, ed: Moulton, J.E., University of California Press, Berkeley, 1990, p.518-52.
2. Hampe, J.F., Misdorp, W., Tumours and Dysplasias of the Mammary Gland, *Bulletin World Health Organization*, 1974; 50, 111-133.
3. Hellmén, E., Lindgren, A., The Expression of Intermediate Filaments in Canine Mammary Glands and Their Tumors, *Vet Pathol*, 1989; 26, 420-428.
4. Destexhe, E., Lespagnard, L., Degeyter, M., Heymann, R., Coignoul, F., Immunohistochemical Identification of Myoepithelial, Epithelial, and Connective Tissue Cells in Canine Mammary Tumors, *Vet Pathol*, 1993; 30, 146-154.
5. Vos, J.H., van den Ingh, T.S.G.A.M., Misdorp, W., Molenbeek, R.F., van Mil, F.N., Rutteman, G.R., Ivanyi, D., Ramaekers, F.C.S., Immunohistochemistry with Keratin, Vimentin, Desmin, and α -Smooth Muscle Actin Monoclonal Antibodies in Canine Mammary Gland: Benign Mammary Tumours and Duct Ectasias, *Veterinary Quarterly*, 1993; 14, 89-95.
6. Vos, J.H., van den Ingh, T.S.G.A.M., Misdorp, W., Molenbeek, R.F., van Mil, F.N., Rutteman, G.R., Ivanyi, D., Ramaekers, F.C.S., Immunohistochemistry with Keratin, Vimentin, Desmin, and α -Smooth Muscle Actin Monoclonal Antibodies in Canine Mammary Gland: Malignant Mammary Tumours, *Veterinary Quarterly*, 1993; 14, 96-102.
7. Bartek, J., Taylor-Papadimitriou, J., Miller, N., Millis, R., Patterns of Expression of Keratin 19 as Detected with Monoclonal Antibodies in Human Breast Tissues and Tumors, *Intern J Cancer*, 1985; 36, 299-306.
8. Raju, U., Crissman, J.D., Zarbo, R.J., Gottlieb, C., Epitheliosis of the Breast. An Immunohistochemical Characterization and Comparison to Malignant Intraductal Proliferations of the Breast, *Am J Surgical Pathol*, 1990; 14, 939-947.
9. Griffey, S.M., Madewell, B.R., Dairkee, S.H., Hunt, J.E., Naydan, D.K., Higgins, R.J., Immunohistochemical Reactivity of Basal and Luminal Epithelium-Specific Cytokeratin Antibodies within Normal and Neoplastic Canine Mammary Glands, *Vet Pathol*, 1993; 30, 155-161.
10. Rabanal, R.M., Else, R.W., Immunohistochemical Localisation of Cytokeratin and Vimentin Intermediate Filament Proteins in Canine Mammary Tumours, *Res Vet Sci*, 1994; 56, 225-233.
11. Ivanyi, D., Minke, J.M.H.M., Hagemans, Ph.F.C., Groeneveld, F., Doornewaard, G.van., Patterns of Expression of Feline Cytokeratins in Healthy Epithelia and Mammary Carcinoma Cells, *Am J Vet Res*, 1992; 53, 304-314.
12. Martin de las Mulas, J., Espinosa de los Monteros, A., Bautista, M.J., Gomez-Villamandos, C., Morales, C., Immunohistochemical Distribution Pattern of Intermediate Filament Proteins and Muscle Actin in Feline and Human Mammary Carcinomas, *J Comp Pathol*, 1994; 111, 365-381.
13. Russo, J., Gusterson, B.A., Rogers, A.E., Russo, I.H., Wellings, S.R., Zwieten, M.J. van., Biology of Disease. Comparative Study of Human and Rat Mammary Tumorigenesis, *Lab Invest*, 1990; 62, 244-278.
14. Ghadially, F.N., Intracytoplasmic Filaments. In: *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*, Vol.II. Butterworths, London, 1988, p: 839-922.
15. Gugliotta, P., Sapino, A., Macri, L., Skalli, O., Gabbiani, G., Bussolati, G., Specific Demonstration of Myoepithelial Cells by Anti-Alpha Smooth Muscle Actin Antibody, *J Histochem and Cytochem*, 1988; 36, 659-63.
16. Tsukada, T., McNutt, M.A., Ross, R., Gown, A.M., HHF 35, A Muscle Actin Specific Monoclonal Antibody. II. Reactivity in Normal, Reactive and Neoplastic Human Tissues, *Am J Pathol*, 1987; 127, 389-402.
17. Nagle, R.B., Bocker, W., Davis, J.R., Heid, H.W., Kaufmann, M., Lucas, D.O., Jarasch, E.D., Characterization of Breast Carcinomas by Two Monoclonal Antibodies Distinguishing Myoepithelial from Luminal Epithelial Cells, *J Histochem and Cytochem*, 1986; 34, 869-881.
18. Vos, J.H., van den Ingh, T.S.G.A.M., Misdorp, W., Molenbeek, R.F., van Mil, F.N., Rutteman, G.R., Ivanyi, D., Ramaekers, F.C.S., Immunohistochemistry with Keratin, Vimentin, Desmin, and α -Smooth Muscle Actin Monoclonal Antibodies in Canine Mammary Gland: Normal Mammary Tissue, *Veterinary Quarterly*, 1993; 14, 102-107.
19. Cotchin, E., Mammary Neoplasms of the Bitch, *J Comp Pathol*, 1958; 68, 1-22.
20. Moulton, J.E., Taylor, D.O.N., Dorn, C.R., Andersen, A.C., Canine Mammary Tumors, *Pathol Vet*, 1970; 7, 289-320.
21. Palmer, T. E., Monlux, W., Acid Mucopolysaccharides in Mammary Tumors of Dogs, *Vet Pathol*, 1979; 16, 493-509.