



Köpeklerde Kutanöz Mast ve Histiositik Hücre Tümörlerinin Tanısında İmmun Belirteçlerin Kullanımı

Caner Övet, Nihat Toplu

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

Öz bilgi/Amaç: Köpeklerde deride yerleşim gösteren yuvarlak hücreli tümörler yuvarlak histomorfolojilerinden dolayı üst sınıflandırmada bu isimle anılır. Yuvarlak hücreli tümörler “mastositoma, histiyositoma, bulaşıcı venereal tümör, lenfoma, melanoma, plazmasitoma ve nöroendokrin hücre tümörleri” inden oluşur. Sunulan çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde tanımlanmış köpeklerin yuvarlak hücreli tümörlerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelenerek alt tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Adnan Menderes Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı arşivinde (1999-2015 yılları arası) yer alan toplam 20 adet olgu incelendi. Tümör ayırımında c-KIT, triptaz, CD1a, MHC-II ve vimentin belirteçleri kullanıldı. Yapılan bu değerlendirmede, on üç olgu mast hücre tümörü ve yedi olgu histiyositom olarak tanımlandı.

Sonuç: Yuvarlak hücreli tümörlerin ayırımında histomorfolojik bulgular ile tümör belirteçlerinin birlikte değerlendirilmesinin daha sağlıklı sonuçlar verdiği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Yuvarlak hücre, deri, mast hücre tümörü, histiyositom, TVT.

The Use of Immunmarkers in Diagnosis of Mast and Histiocytic Cell Tumors of Skin Tissue

Background/Aim: “Round cell tumor” localized in skin tissue of dog is called as “skin round cell tumor” in main classification because of their small, discrete (individualized), and round morphological characters. These tumors consisted of histiocytoma, mast cell tumor, transmissible venereal tumor, cutaneous lymphosarcoma, melanoma, plasmacytoma and neuroendocrine cell tumor. The aim of the present study is to carry out classification of skin round cell tumors of the dog in archive of department of pathology, faculty of veterinary Medicine, Adnan Menderes University, using histopathology, histochemistry and immunohistochemistry.

Materials and Methods: The study materials consisted of 20 cases with round cell tumors diagnosed between 1999-2015 in department of pathology, faculty of veterinary Medicine, Adnan Menderes University. The sections prepared from these paraffin tissue samples were stained with heamatoxylin-eosin and Giemsa. Immunohistochemically, the sections were stained with avidin-biotin peroxidase complex method with C-KIT, Triptaz, CD1a, MHC II ve Vimentin primary antibodies.

Conclusion: Histomorphologic findings of round cell tumor was not sufficient for differentiation. For this reason, immunomarkers were necessary for certain diagnosis of these tumors

Correspondence to: Nihat Toplu, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Adnan Menderes University. Isikli, Efeler-Aydın, Türkiye.

Giriş

Köpeklerde deride yerleşim gösteren yuvarlak hücreli tümörler, yuvarlak histomorfolojilerinden dolayı, üst sınıflandırmada bu isimle anılır. Yuvarlak hücreli tümörler “mastositoma, histoyositoma, bulaşıcı venereal tümör, lenfoma, melanoma, plazmasitoma ve nöroendokrin hücre tümörleri” inden oluşur (Bostock, 1986; Beale ve Bolon, 1993; Bergman, 2007). Köpeklerde görülen deri tümörleri, tüm tümörler içinde yaklaşık olarak %25-30 arası bir orana sahiptir (Affolter ve Moore, 2000; Affolter ve Moore, 2002; Goldschmidt ve Hendrick 2002).

Histiyositler, kemik iliğinde bulunan CD34+ prekürsör hücrelerden köken alan CD45+ ve CD18+ lökositlerdir (Affolter ve Moore 2000;). Bu hücreler, antijenlerin işlenmesi ve sunumu için özelleşmişlerdir ve bu yüzden CD1, MHC-II ve MHC-I gibi antijen sunucu moleküllerin salınımını meydana getirirler (Thongharb ve ark., 2016; Kiupel, 2017). Aktive olmamış Langerhans hücreleri ile birlikte epidermis ve folliküler epitel hücreleri homotipik olarak E-cadherin ile hücreler arası bağlantıyı kurmuş olur (Tang ve ark 1993, Munn ve Chu, 1998). Köpeklerin Langerhans hücreleri, Birbeck granüllerinden yoksun olduklarından insanlarda ve diğer türlerde kullanılan markırlar tarafından ultrastrüktürel bir ayırım bu şekilde yapılabilir (Kerlin ve ark 1996; Moore ve ark 1996). Histiyositomlar, CD45, CD18 ve bunların yanı sıra CD1+, CD11c+, CD90-, CD4-, MHC II+ ve ICAM 1+ gibi yaygın lökosit yüzey belirteçlerini sunar (Moore ve ark 1996; Pazdzior-Czapula ve ark., 2014). Birçok klinik olguda tümöral hücrelerin E-cadherin ekspresyonu ettiği de görülmüştür. Belirtilen bu immunofenotipik özellik, Langerhans hücreleri için karakteristik kabul edilmektedir (Nagata ve ark., 2000; Affolter ve Moore 2002). Kutanöz histiyositomlardan farklı olarak kutanöz lenfomalarda, dendritik hücre belirteçlerinden yoksundurlar. Kutanöz lenfomalarda ise en belirgin özellik CD3+ T hücrelerinin varlığıdır. Plazma hücre tümörleri asli olarak CD79a ve CD45 yüzey moleküllerine sahiptir ve bununla birlikte CD45RA+ hücreler de görülür. Mast hücre tümörleri CD45+’tir. Fakat tespit edilebilir düzeyde salınımlar CD18 ve türevi yüzey molekülleri ile olur (Goldschmidt ve Hendrick 2002; Kiupel, 2017). Transmissible venereal tümörler ise CD45, CD45RA ekspresyonuna sahiptirler ve daha az olarak CD49d salınımı da yaparlar. Histiyositomlar içerik bakımından Langerhans hücrelerini (E-cadherin+, CD4-, CD90-) içerirken reaktif histiyositozis CD90 ve CD4 ekspresyonu eden dermal dendritik hücreleri içerir (Fernandez ve ark 2003; Gross ve ark 2005)

Mast hücre prekürsörleri kemik iliğinden, kan aracılığıyla periferik dokuya göç ederek olgun mast hücrelerine dönüşme yönünde farklılaşırlar (Hill, 2002). Mast hücre tümörünü ayırımı histokimyasal boyamalar ile önemli ölçüde giderilse de, diğer yuvarlak hücre tümörlerin kesin tanısında immun belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (Gordon ve ark., 1990; Rabanal ve Ferrer, 2002). Bu belirteçlerden triptaz, kimaz, serotonin (Mast hücre), CD1a, CD18, MHC-II, E-cadherin (Histiyosit), CD3 (yaygın kullanılan bir T lenfosit işaretleyici) ve CD79a (yine yaygın kullanılan bir B lenfosit ve plazmasit işaretleyici)’dir (Davis ve ark., 1992; Welle 1997; Valent ve ark., 2001; Fernandez ve ark 2003; Gross ve ark., 2005). İnce iğne aspirasyon sitolojisi ile tümörün tipi tanımlanabilirken, derecelendirme (Grade) biyopsi dokusuna yapılan histopatolojik muayene ile mümkündür (Patnaik ve ark., 1984; Auxiella ve Hill, 2000). Yüksek dereceli kutanöz mast hücre tümörlerin sınıflandırılmasında aşağıda sıralanan kriterler göz önünde bulundurulur (Kiupel, 2017);

- 1) 40X büyütmede 7 mitotik figürün görülmesi
- 2) en az 3 dev hücrenin görülmesi

3) en az 3 adet biçimsiz (bizarre) çekirdekli hücre morfolojisinin dikkati çekmesi

4) tümör hücrelerinin en az %10’unda karyomegalinin görülmesi

Bunların dışında kalan kutanöz mast hücre tümörleri düşük dereceli olarak sınıflandırılır.

Mast hücrelerinin granüllü komponentleri (kimaz ve triptaz gibi), şüpheli protoonkogen defektleri (c-Kit, p53, p21 ve p27), enzimler (matriks metalloproteinazlar) ve proliferasyon markırları (PCNA [proliferating cell nuclear antigen]) immunohistokimyasal olarak belirlenebilmektedir (Jaffe ve ark., 2000; Zemke ve ark., 2002; Kiupel, 2017). Köpeklerin mast hücre tümörlerinde c-KIT (KIT veya CD117 olarak da bilinir) reseptör etkinliği ile patogeneze arasında bir ilişki olduğu araştırılmış ve açıklanmıştır (London ve ark 1999; London ve ark., 2003; Kiupel ve ark 2004).

Sunulan tez çalışmasında, 1999-2015 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan toplam 24 adet olgu histokimyasal, histomorfolojik ve immunohistokimyasal belirteçleri ile beraber değerlendirilmiştir.

Materyal ve Metot

Hayvan ve Doku

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı’na Aydın ve çevre illerden 1999-2015 yılları arasında, 24 adet olguyu kapsayan %10’luk formalin solüsyonu içinde getirilen deri biyopsileri ve Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerinden getirilen deriyle ilişkili eksize taze dokular çalışmanın materyalini oluşturdu.

Histopatolojik İnceleme

Alınan doku örnekleri 12-24 saat % 10’luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Trimleme işleminin ardından 6-8 saat süre ile akan çeşme suyu ile yıkandı, doku takip cihazında (Leica TP1020) bilinen yöntemlerle, alkol (70°, 80°, 90°, 96° ve 100°) ve ksilol serilerinde işlem gördükten sonra parafinde bloklandı. Bu bloklardan 5 µm kalınlığında normal ve Poly-L-lysin’li (Sigma-Aldrich) lamlara kesitler alındı (mikrotom, Leica RM 2135). Normal lamlara alınan kesitler, hematoksilin ve eozin (HE) ile boyandı (Luna 1968). Poly-L-lysin’li lamlara alınan kesitler ise immunohistokimyasal incelemeler için kullanıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelendi ve mikroskopik dijital fotoğraflar (Olympus C-5050) çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

İmmunohistokimyasal İnceleme

Streptavidin peroksidaz Kompleks metot [Invitrogen Histostain Plus Detection Kit, USA] ilgili firmanın direktifleri doğrultusunda dokulara uygulandı. Testin her aşaması nemli kamerada gerçekleştirildi ve bloking aşamasında normal keçi serumu aşaması hariç, takipler arasında kesitler 3x5 dakika süreyle fosfat tamponlu solüsyonu (PBS, pH 7,2) ile yıkandı. Parafin kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek parafini giderildi ve rehidre edildi. Lamlar doymuş metanolde hazırlanmış % 3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 30 dakika süreyle inkübe edilerek dokuların endojen peroksidaz aktivitesi engellendi. Antijenik yapıların açığa çıkarılması amacıyla, kesitler sitrat buffer solüsyonunda (pH: 6.0) 600 W’lık güçte 10 dakika süreyle mikrodalga fırında tutuldu. Kesitler, spesifik olmayan antijenik bağlanmaları engellemek için, kesitlere % 3’lük normal keçi serumu damlatıldı ve oda ısısında 10 dakika süreyle inkübe edildi. Sonraki adımda, lamlar triptaz, c-KIT, CD1a ve sMHC-II

Tablo1. Çalışmada kullanılan markırlar, bu markırların boyadığı dokular, dilüsyon oranları ve ilgili markırların hücresele lokalizasyonları.

| Antikor | Ticari Firma | Boyadığı Hücre/Hücre Grubu | Sulandırma Oranı (PBS'de) | Hücresele Lokalizasyon |
|----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Triptaz | Novus (nb 100 64820) Lot: 1112 | Dendritik hücreler, makrofajlar | 1/100 | İntrasitoplazmik |
| c-KIT | Novus (nbp1-19865) Lot: CA36131 | Mast hücreleri | 1/100 | İntrasitoplazmik Membranöz |
| CD1a | Santa Cruz (Sc-5265) Lot: K1907 | Dendritik hücreler, makrofajlar | 1/100 | İntrasitoplazmik |
| MHC-II | Bioss (bs-4298r) Lot: YE1214W | Dendritik hücreler, makrofajlar | 1/100 | İntrasitoplazmik Membranöz |
| Vimentin | Abcam (Ab8069-1) Lot: 605663 | Dendritik hücreler, hücre iskeleti | 1/100 | İntrasitoplazmik, Membranöz |

ve vimentin primer antikorları ile kaplandı ve +4°C'de bir gece süreyle inkübe edildi. Bunu takiben dokular, biyotin ile işaretli sekonder antikor ile kaplandı ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra, kesitler horseradish streptavidin peroksidaz konjugatı ile yine oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübe edildi ve 15 dakika DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAKO)-H₂O₂ substratı uygulandıktan sonra işlem sonlandırıldı. Harris hematoksilen ile karşıt boyama yapıldıktan sonra dokular alkol serilerinde dehidre edildi. Ksilolde şeffaflandırılan kesitler yapıştırıcı (Entellan-Merck) ile kapatıldı. Tüm kesitlerin aynı şartlarda ve prosedürde boyanmasından sonra, sonuçlar ve dokulardaki ekspresyon yoğunlukları ışık mikroskopunda semikantitatif olarak değerlendirildi. Bulgular, neoplastik hücrelerde sitoplazmik ekspresyona bağlı olarak; ekspresyon yok (-); % 1-25 zayıf ekspresyon (+); % 26-50 orta derecede ekspresyon (++); % 51 ve üzeri kuvvetli ekspresyon (+++) şeklinde gruplandırıldı.

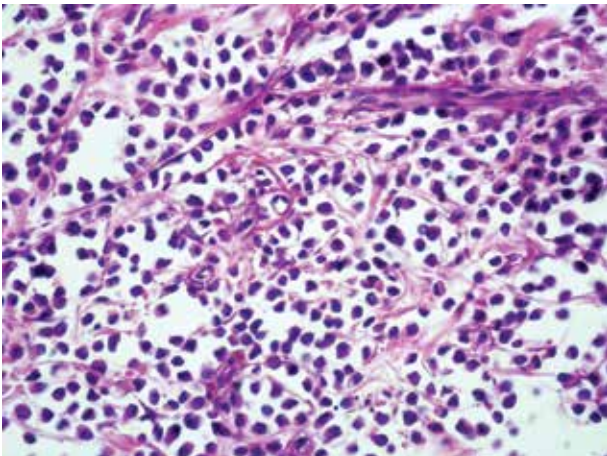
**Şekil 1.** İnce fibröz septalar ile bölünmüş oval yapıda atipik morfoloji gösteren mast hücre tümörü. Hx E, 40X.

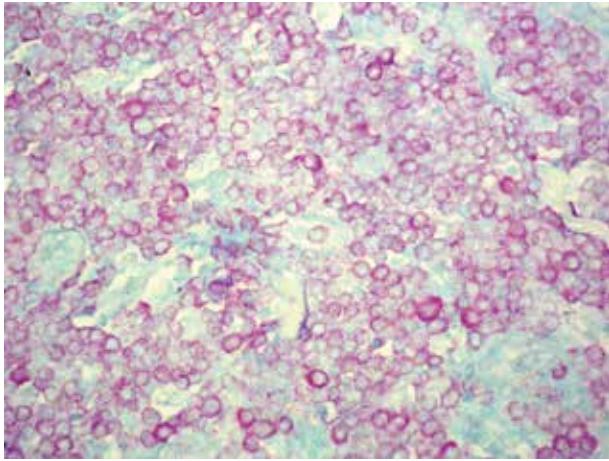
Figure 1. Mast cell tumor with atypical morphology separated by thin fibrous septae.

Bulgular

Kutanöz Mast Hücre Tümörü

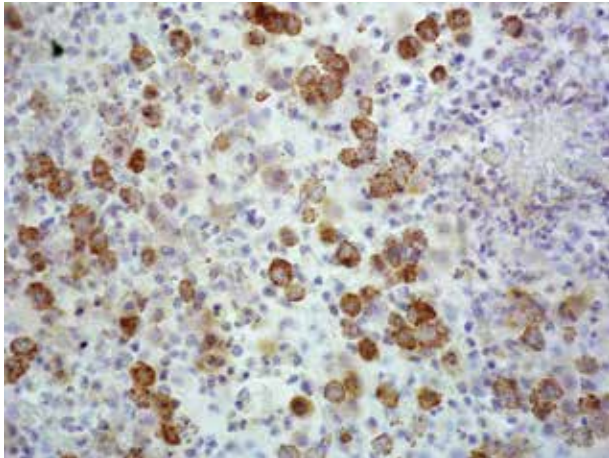
Histopatolojik, histokimyasal ve immunohistokimyasal veriler ışığında on üç olgu (no: 1-13) mast hücre tümörü olarak değerlendirildi (Tablo 2). Literatür bilgilerinin eşliğinde, histolojik morfolojilerine göre mast hücre tümörleri yüksek ve düşük dereceli olmak üzere iki grupta sınıflandırıldı (Kiupel, 2017). Buna göre 2,5, 10-12 no'lu olgular yüksek dereceli; 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 13 no'lu olgular ise düşük dereceli kutanöz mastositomlar olarak değerlendirildi. Sitoplazmik boyanma genellikle hafif eozinofilikten koyu eozinofiliğe değişmekle birlikte, bazı olgularda da bazofilik bir görünüme sahipti. Çekirdek boyanmaları altı olguda önkromatik, bir olguda normokromik, altı olguda hiperkromatik görünüme sahipti (Şekil 1). Stromal yapı genel olarak zayıftı ve tümöral yapı içerisine ince demetler halinde dağılmıştı. Tümöral doku içerisinde en dikkat çekici bulgulardan eozinofil lökosit infiltrasyonları 8 olguda hafiften şiddetliye kadar değişen bir yayılım sergilemekte idi. Tümöral dokuda nekroza ilişkin değişiklikler bir olguda not edildi. May-Grünwald- Giemsa boyamalarda, tümöral hücreler olgulara göre hafiften şiddetliye kadar değişen derecelerde bazofilik renkte granüllere sahip oldukları görüldü (Şekil 2).

İmmunohistokimyasal boyamalarda, c-Kit belirteci perimembranöz, lokal ve sitoplazmik olmak üzere üç farklı hücre lokalizasyonunda boyandı. 6 olguda (no: 2-4,8-10) şiddetli, 5 olguda (5-7,11,12) da orta şiddette reaksiyonlardan oluştuğu görüldü (Şekil 3). Triptaz reaksiyonu 4 olguda (no: 1, 2, 6,10) hafif, bir olguda (no:11) şiddetli idi. MHC-II markırı yönünden 6 olguda (no:3,6,8,10,11,12) tümöral mast hücreler arasında yayılım gösteren reaktif makrofajlarda pozitif reaksiyonlar dikkati çekti (Tablo 3).



Şekil 2. Mast hücrelerin sitoplazmalarında belirgin granüler yapılar. May Grünwald-Giemsa boyama. 40X.

Figure 2. Secretory granules in cytoplasm of mast cells



Şekil 3. Mast hücre tümöründe güçlü c-KIT belirteç ekspresyonu. Streptavidin peroksidaz metot. 40X.

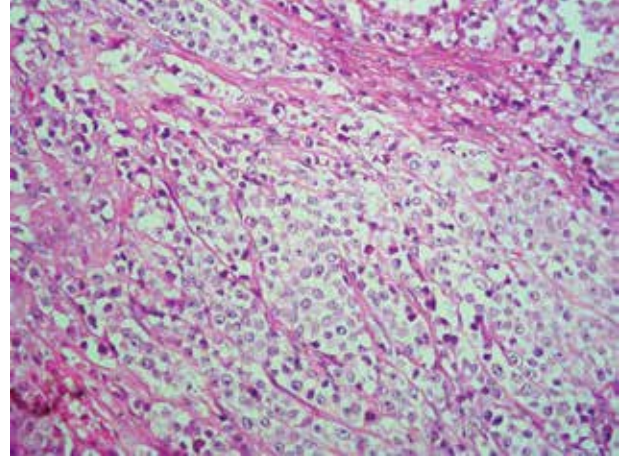
Figure 3. c-KIT expression in mast cell tumor. Streptavidin peroxidase method.

Tablo 3. Mast hücre tümörü (MCT) ve histiyositik hücre tümörü (HCT) tanısı konulan olguların immunohistokimyasal değerlendirmesi.

Kutanöz Histiyositik Hücre Tümörü

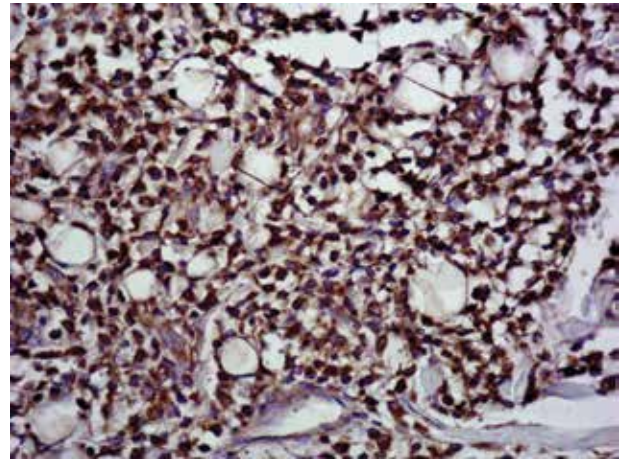
Tümöral hücreler poligonal yapıda idi. Çekirdeklerinin belirgin ve hücrenin büyük bir kısmını doldurduğu görüldü. Pleomorfizm beş olguda (no: 14-18) şiddetli, iki olguda (no: 19, 20) orta şiddette idi. Tümöral hücrelerin sitoplazmaları genel olarak zayıf eozinofilik bir boyanmaya sahipti. Çekirdek boyanmaları dört olguda (no: 15, 16, 18, 20) hiperkromatik; üç olguda (no: 14, 17, 19) ise ökromatik bir görünümde idi (Şekil 4). Stroma genel olarak ince filamentöz yapılar halinde tümöral doku içerisine yayılmış ve septalar halinde tümöral dokuyu bölmüştü. Giemsa boyamalarda tümöral hücrelerin granül içermediği kaydedildi. Nekroz yalnızca ondört ve yirmi no'lu olgularda hafif şiddette idi. Triptaz markırı ile yapılan boyamalarda reaksiyon bir olguda (no: 15) şiddetli, bir başka olguda (no: 17) ise zayıftı (Şekil 5). Diğer beş olguda ise reaksiyon tanımlanmadı. c-KIT belirteğine ilişkin reaksiyonlarda; bir olguda (no: 15) zayıf reaksiyon, bir olguda (no: 20) negatif reaksiyon meydana gelirken, diğer beş olguda (no:14, 16-19) ise reaksiyon şiddetliydi. MHC-II belirteğine ilişkin reaksiyonlar

ise orta derecede ya da şiddetli idi (Şekil 6).**Şekil 4.** Belirgin fibröz septalar ile bölünmüş oval yapıda sitoplazmik yapısı silik histiyositik hücre tümörü. HxE 40X. **Figure 4.** Histiocytic cell tumor separated by thin fibrous septae.



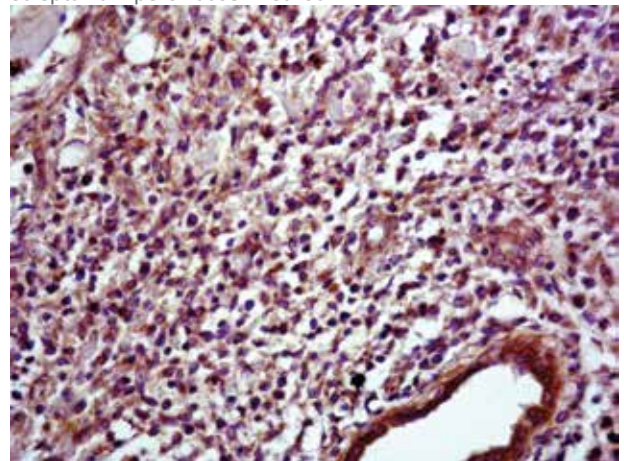
Şekil 4. Belirgin fibröz septalar ile bölünmüş oval yapıda sitoplazmik yapısı silik histiyositik hücre tümörü. HxE 40X.

Figure 4. Histiocytic cell tumor separated by thin fibrous septae.



Şekil 5. Histiyositik hücre tümöründe yaygın triptaz pozitif boyanmalar. Streptavidin peroksidaz metot metot, 40X.

Figure 5. Triptase immunolabelling in histiocytic cell tumor. Streptavidin peroxidase method.



Şekil 6. Histiyositik hücre tümöründe MHC-II pozitif reaksiyonlar. Streptavidin peroksidaz metot. 40X.

Figure 6. MHC-II immunolabelling in histiocytic cell tumor. Streptavidin peroxidase method.

Tablo 2. Mast ve histiyotik hücre tümörlerinin anatomik lokalizasyonları.
Table 2. Anatomical localization of mast and histiocytic tumors.

| Olgu No | Olgunun Rutin Numarası | Dokunun Alındığı Anatomik Bölge |
|---------|------------------------|--|
| 1 | 299-14 | Dorsal, torakal ve lomber bölgeden alınan üzeri deriyle kaplı kitle. |
| 2 | 93-10 | Ön bacakta interdigital bölgeden kitle |
| 3 | 67-13 | Sağ tarafta son kosta hizasından alınan kitle. |
| 4 | 40-09 | Sağ articulatio humeri hizasından kitle. |
| 5 | 110-04 | Kayıt yok (bilinmiyor). |
| 6 | 32-01 | Sol nazal kaviteden kitle |
| 7 | 164-06 | Dış yüzü deri ile kaplı kitle. Alındığı yer bilinmiyor. |
| 8 | 49-14 | Axillar bölgeden alınan kitle. |
| 9 | 96-06 | Perineal bölge ile sol vulva hizasından alınan üzeri deri ile kaplı kitle. |
| 10 | 09-12 | Alt çeneden alınan fındık büyüklüğünde kitle. |
| 11 | 213-10 | Sağ arka baktan alınan kitle. |
| 12 | 187-11 | Testis bölgesinden alınan ve üzeri açık yara bulunan kitle. |
| 13 | 469-14 | Kayıt yok (Bilinmiyor). |
| 14 | 126-11 | Kuyruk altından alınan, üzeri deri ile kaplı sert kıvamlı kitle. |
| 15 | 02-99 | Sol ön memenin önünden alınan kitle. |
| 16 | 92-04 | Kulak kepçesinden alınan kitle. Üzeri kıllı deri ile kaplı. |
| 17 | 113-06 | Üst damaktan alınan kitle. |
| 18 | 36-06 | Sağ regio tarsiden alındığı bildirilen kitle. |
| 19 | 37-08 | Sol tarafta son kosta hizasından alınan kitle. |
| 20 | 81-10 | Ksifoid kırkdak hizasından alındığı bildirilen kitle. |

Tartışma

Sunulan çalışmada histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak on bir olgu mast hücre tümörü olarak tanımlanmıştır. Mast hücre tümörlerinin ırk predispozisyonu incelendiğinde boxer, pug, Boston terrier, bull terrier, weimaraner ve Labrador retriever gibi ırklarda bu tümörün solit veya multisentrik formuna karşı yatkınlık olduğu yapılan çalışmalarda kaydedilmiştir (Goldschmidt ve Shoefer, 1992; Gross ve ark., 2005). Sunulan çalışmada mast hücre tümürlü on bir olguyu teşkil eden köpeklerin ırkları; boxer, setter, rottweiler, Alman çoban köpeği, Fransız buldoğu, terrier, golden retriever ve tanımlanmamış üç melez ırk oluşturmuştur.

Mast hücre tümörleri, CD45, CD45Ra ve CD18 gibi yaygın lökosit antijenlerini eksprese eder (Moore ve ark 2003). CD45 markırı mast hücrelerinin yanı sıra derinin diğer yuvarlak hücreli tümörlerinden lenfositler, plazma hücreleri, histiyositler ve TVTlerde de pozitif reaksiyon verdiği bilinir (Kiupel, 2017). Bu nedenle çalışmada CD45 markırının kullanımına gidilmedi. Antitriptaz ve antikimaz gibi enzimler de kullanılarak mast hücre kökenine ilişkin bulgular elde edilebilir ancak triptaz markırı mast hücreleri için güçlü bir belirleyici değildir (Fernandez ve ark 2003; Gross ve ark., 2005). Köpeklerin neoplastik mast hücreleri aynı zamanda KIT proteini eksprese etmektedir ve ekspresyon ile tümörün derecesi ile doğru orantılı bir bağ bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmada özellikle mast hücre tümörlerini tanımlamak adına c-KIT markırı kullanılmıştır. Çünkü literatür veriler de incelendiğinde c-KIT mutasyonları üzerinden

yapılan çalışmalarda en çok mutasyona Exon 11 bölgesinde rastlanılmıştır (Jones ve ark 2004; Letard ve ark 2008). Mast hücre tümörü hastası köpeklerden alınan kan örneklerinde ise c-KIT mRNA düzeyleri de tespit edilebilmektedir (Turin ve ark 2006). Sunulan çalışmada mast hücre tümörlerinde en belirleyici c-KIT markırı immunohistokimyasal olarak tüm mast hücre tümürlü olgularda çeşitli şiddet ve yayılımda pozitif reaksiyon verdiği görülmüştür. Histiyositler için belirleyici olan Triptaz markırının reaksiyonu çalışmanın mast hücre tümör kesitlerinde değişkenlik göstermekle birlikte bir kısım olguda negatif (7/12), bir kısım olguda ise zayıf pozitif (2/12) reaksiyonların alındığı görülmüştür. Yine histiyosit belirteçlerinden olan MHC-II markırı reaksiyonu ise yalnızca bir olguda belirgin pozitif reaksiyon verirken beş olgu zayıf pozitif, beş olgu ise negatif reaksiyon vermiştir. Triptaz ve MHC-II pozitif reaksiyonları, literatürlerde vurgulandığı gibi (Well 1997, Hahn ve ark 2007), mast hücre tümörü aralarında yer alan makrofaj yanıtı ile ilişkilendirilmiştir.

Sunulan çalışmada histolojik bakı ve immunohistokimyasal belirteçler eşliğinde yedi olguda histiyotik hücre tümörü tanımlanmıştır. Irklarla ilgili yapılan çalışmalarda Scottish terrier, bull terrier, boxer, English cocker spaniel, düz tüylü retriever, doberman pinscher ve Shetland sheepdog gibi safkan köpek ırkların kutanöz histiyositomlara daha yatkın olduğu dikkati çekmiştir (Goldschmidt ve ark 1998). Sunulan çalışmada histiyotik hücre tümörü tanısı konulan 7 olguyu; Alman çoban köpeği (2 olgu), Pekinese (1 olgu), Seter (1 olgu) ve Rotweiler

Tablo 3. Mast hücre tümörü (MCT) ve histiyositik hücre tümörü (HCT) tanısı konulan olguların immunohistokimyasal değerlendirmesi.

| OLGU NUMARASI | TRİPTAZ | c-KIT | MHC-II | TANI |
|------------------|---------|-------|--------|------|
| 1 | + | ++ | ++ | MCT |
| 2 | + | +++ | + | MCT |
| 3 | - | +++ | ++ | MCT |
| 4 | - | +++ | + | MCT |
| 5 | - | ++ | + | MCT |
| 6 | + | ++ | +++ | MCT |
| 7 | - | ++ | + | MCT |
| 8 | - | +++ | ++ | MCT |
| 9 | - | +++ | ++ | MCT |
| 10 | + | +++ | + | MCT |
| 11 | ++ | +++ | + | MCT |
| 12 | - | + | ++ | MCT |
| 13 | + | +++ | ++ | MCT |
| 14 | - | +++ | ++ | HCT |
| 15 | - | + | ++ | HCT |
| 16 | - | +++ | ++ | HCT |
| 17 | + | +++ | +++ | HCT |
| 18 | - | +++ | +++ | HCT |
| 19 | +++ | +++ | ++ | HCT |
| 20 | - | - | + | HCT |

(1 olgu) teşkil etmiştir. Histiyositomlar, CD45, CD18 ve bunların yanı sıra CD1+, CD11c+, CD90-, CD4-, MHC II+ ve ICAM 1+ gibi yaygın lökosit yüzey belirteçlerini sunarlar (Moore ve ark 1996; Moore, 2017). Birçok klinik vakada tümöral hücrelerin E-cadherin ekspresye ettiği de görülmüştür (Affolter ve Moore 2002). Belirtilen bu immunofenotipik özellik, Langerhans hücreleri için karakteristik kabul edilmektedir. Regrese olmuş histiyositomlarda reaktif histiyositik infiltrasyon, CD1+, CD11c+, MHC II+, CD90+ dermal dendritik hücreleri de içerir. Böyle hücrelerde ise E-cadherin ekspresyonu azalma gösterir.

Sunulan çalışmada histolojik bulgulara göre histiyositom tanısı konulan 7 olguda; immunohistokimyasal olarak MHC II reaksiyonunun 4 olguda güçlü pozitif, bir olguda zayıf pozitif ve iki olguda ise negatif olduğu belirlenmiştir. MHC-II belirteç incelemeleri 7 olgudan 3'ünün, histomorfolojik uyumuna karşın, tümörün immunofenotipik olarak histiyositik kökenli olmadığını göstermiştir. Bu üç olguda kesin ayırım için lenfosit markırları yönünden de ilave çalışmaları gereksinim duyulmaktadır. Diğer yandan histiyositom tanısı konulan olgularda düşük triptaz reaksiyonunun tümörde dağılım gösteren mast hücreleri ile ilişkilendirilmiştir.

Sonuçta, histopatolojik inceleme sonuçları ile, hücre morfolojilerinin birbirine benzerliği nedeniyle, yuvarlak hücreli tümörlerin diferensiyasyonunda yeterli sonuç alınmayacağı sunulan çalışmada da görülmüştür. Histokimyasal olarak mast hücre tümörünün diğer tümörlerden ayırımında giemsa boyama sonuçlarının olguların büyük çoğunluğunda yeterli olduğunu; ancak çalışmada da kaydedildiği gibi agranülositik mast hücre tümörlerinin tanısında histokimyasal boyamaların

yetersiz kaldığı görülmüştür. Özellikle immunohistokimyasal bulgularla birlikte değerlendirme yapıldığında, yalnızca histomorfolojik ve histokimyasal verilere dayanarak tanı konulmasının hatalara yol açabileceği, immunohistokimyasal bulgularla tanının desteklenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Diğer taraftan beklenildiği üzere c-KIT markırı mast hücre tümörlerinde, MHC-II ve triptaz markırı histiyositomlarda daha çok ekspresye edilmiştir. Ancak bu markırların düşük oranlarda da olsa diğerlerinde de ekspresye edildiği belirlenmiştir. Örneğin mast hücre tümörü ile histiyositik hücre tümörlerinin ayırımında literatür verilerinin doğrultusunda, yalnızca triptaz markırı ile yapılan boyamalar yeterince güvenilir sonuç vermemektedir. Bu iki tümörün ayırımında MHC-II markırı kullanımının histiyositik hücre tümörünün tanısını daha da güçlendirdiği görülmüştür. Bu nedenle yuvarlak hücreli tümörlerde yalnızca temsil ettiği hücreye ait markır/markırlara gereksinim olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Diğer taraftan, sunulan çalışmada iki farklı üretici firmanın CD1a markırı ile yapılan testlerde sonuç alınamaması; veteriner alanda hayvan hücre klonlarına yönelik spesifik ticari antikorların üretilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Günümüzde ticari hücre markırlarının büyük çoğunluğu insan ya da fare hücre antijen hatlarına karşı hazırlanmış olması; aynı antijenik yapıyı temsil etmesine rağmen hayvanlardaki sonuçları olumsuz yönde etkilediği bu çalışmada da kaydedilmiştir.

Kaynaklar

Affolter VK, Moore PF (2000) Canine cutaneous and systemic histiocytosis: a reactive histiocytosis of dermal dendritic origin. Am J Dermatopathol 22, 40–8.

- Affolter VK, Moore PF (2002) Histiocytes in skin disease. In: *Advances in Veterinary Dermatology*, Vol. 4 (eds K. Thoday & C. Foil, R. Bond). pp. 111–30. Blackwell Publishing, Oxford.
- Auxilia ST, Hill PB (2000) Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanation for the predilection sites of atopic dermatitis? *Veterinary Dermatology* 11, 247–54.
- Beale KM, Bolon B (1993). Canine cutaneous lymphosarcoma: epitheliotropic and non-epitheliotropic, a retrospective study. In: *Advances in Veterinary Dermatology*, Vol. 2 (eds P.J. Ihrke, I.S. Mason & S.D. White), pp. 273–84. Pergamon Press, Oxford.
- Bergman PJ (2007). Canine oral melanoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 22,2,55-60.
- Bostock DE (1986). Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *British Veterinary Journal* 142,1,1–19.
- Davis BJ, Page R, Sannes PL et al (1992). Cutaneous mastocytosis in a dog. *Veterinary Pathology* 29, 363–365.
- Fernandez N, West K, Jackson M et al (2003). Immunohistochemical and enzyme histochemical stains for the diagnosis of canine cutaneous mast cell tumors and histiocytomas. *Veterinary Pathology*, 40, 613.
- Goldschmidt MH, Shofer FS (1992). *Skin Tumors of the Dog and Cat*, pp. 2–3, 265–70. Pergamon Press, Oxford.
- Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK (2005). *Skin Diseases of the Dog and Cat*. Blackwell p562-893
- Gordon JR, Burd PR, Galli SJ (1990). Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunology Today* 11, 458-464.
- Hill PB (2002). Mast cells: a review of their biology and role in cutaneous inflammation, In: *Advances in Veterinary Dermatology*, Vol. 4 (ed. K.L. Thoday, C. Foil & R. Bond), pp. 161–77. Blackwell Publishing, Oxford.
- Jaffe MH, Hosgood G, Taylor HW et al (2000). Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 37, 40-46.
- Jones CL, Grahn RA, Chien MB, Lyons LA, London CA (2004). Detection of c-kit mutations in canine mast cell tumors using fluorescent polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 16,2, 95-100.
- Kerlin RL, Hendrick MJ (1996). Malignant fibrous histiocytoma and malignant histiocytosis in the dog-convergent or divergent phenotypic differentiation? *Veterinary Pathology* 33,713-716.
- Kiupel, M. (2017). Mast cell tumors. *Tumors in Domestic Animals* (Edt by. Donald J. Mueten). Pp. 176.Wiley Blackwell.
- Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB et al (2004) The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Pathology*, 41, 371-377.
- Letard S, Yang Y, Hanssens K, Palmérini F, Leventhal PS, Guery S, Moussy A, Kinet JP, Hermine O, Dubreuil P. (2008). Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. *Molecular Cancer Research*, 6,7,1137-45.
- London CA, Galli SJ, Yuuki T et al (1999) Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplication of the proto-oncogene c-kit. *Experimental Hematology* 27, 687–697.
- London CA, Seguin B (2003) Mast cell tumors in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33, 473–89.
- Moore P.F. (2017). Canine and Feline Histiocytic Diseases, *Tumors in Domestic Animals* (Edt by. Donald J. Mueten). Pp. 322.Wiley Blackwell.
- Moore PF, Schrenzel MD, Affolter VK et al (1996). Canine cutaneous histiocytoma is an epidermotropic Langerhans cell histiocytosis that expresses CD1 and specific beta-2-integrin molecules. *American Journal of Pathology* 148, 1699–708.
- Munn S, Chu AC (1998). Langerhans cell histiocytosis of the skin. *Hematology Oncology Clinics of North America Journal* 12, 269–86.
- Nagata M, Hirata M, Ishida T et al (2000). Progressive Langerhans' cell histiocytosis in a puppy. *Veterinary Dermatology* 11, 241–246.
- Pazdzior-Czapula, K., Rotkiewicz, T., Otrocka-Domagala, I., Gesek, M., Smiech, A. (2014). Morphology and immunophenotype of canine cutaneous histiocytic tumours with particular emphasis on diagnostic application. *Veterinary Research Communication* DOI 10.1007/s11259-014-9622-1
- Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG (1984). Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology* 21, 469–474.
- Rabanal R, Ferrer L (2002). Mast cell tumors: from the molecular biology to the clinic. In: *Proceedings of the ISVD Meeting, Nice*, pp. 11–26.
- Scott DW, Miller WH, Griffin CE (2001). *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 6th edn, pp. 1347–50. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Tang A, Amagai M, Granger LG et al (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by Ecadherin. *Nature* 361, 82–5.
- Thongtharb, A, Uchida, K., Chambers, J.K., Kagawa, Y., Nakayama, H. (2016). Histological and immunohistochemical studies on primary intracranial canine histiocytic sarcomas. *Journal of Veterinary Medical Science*. 78,4, 593–599
- Valent P, Horny HP, Li CY et al (2001). Mastocytosis (mast cell disease). In: *Pathology and Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Vol. 1 (eds E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein & J.W. Vardiman), pp. 292–302. IARC Press, Lyon.
- Welle M (1997). Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *Journal of Leukocyte Biology*, 61, 233–245.
- Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V (2002). Mutations in the juxtamembrane domain of c-kit are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Veterinary Pathology*, 39, 529-535.