

NEVO-MELANOSİTER LEZYONLARDA DEĞİŞİK DİFERANSİYASYON ANTİJENLERİNİN DUYARLILIK ve ÖZGÜNLÜĞÜ: MART-1/Melan-A, TİROZİNAZ ve HMB45'in S100 ve NKI/C3 ile KARŞILAŞTIRILMASI*

Dr. Nesimi BÜYÜKBABANI

ÖZET: Melanositik lezyonların farklı kökenli diğer tümörlerden ayırıcı tanısı sık karşılaşılan bir sorundur. Bu amaçla immünohistokimyasal inceleme uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu çalışmada benign ve malign melanositik lezyonlar ve bir kontrol grubunda melanositik diferansiyasyon antijenleri MART-1/Melan-A, Tirozinaz ve HMB-45 antikorları, S100 ve NKI/C3 antikorları ile karşılaştırılarak reaktivite yaygınlık ve şiddeti değerlendirilmiş, bu antikorların duyarlılık ve özgünlükleri belirlenmeye çalışılmıştır. İmmünohistokimyasal incelemeler parafin doku materyelinde yapılmıştır. Anti-S100 antikorunun tüm benign ve malign melanositer lezyonlarda en yaygın ve kuvvetli reaksiyon gösteren antikor olduğu saptandı. NKI/C3 ile 12/28 nevüde, 13/25 primer melanomda ve 8/11 metastatik melanomda pozitif reaksiyon gözlemlendi ve nevo-melanositer lezyonlar için duyarlılığı en düşük antikor olduğu saptandı. MART-1/Melan-A ve Tirozinaz antikorlarıyla, S100 ile eşit duyarlılık ve en yüksek özgünlük oranları elde edildi. Bu iki antikorun nevüslerde özellikle yüzeyel hücrelerde daha belirgin bir reaksiyon gösterdikleri saptandı. HMB45 ile %87.5 duyarlılık ve %88.88 özgünlük oranları saptandı. Bu antikor ile reaktivitede en önemli kalitatif özellik gerek nevüsler, gerekse melanomlarda junctional/intraepidermik hücrelerin en kuvvetli reaksiyonu göstermeleri idi. MART-1/Melan-A ve Tirozinaz antikorlarının nevo-melanositer lezyonların ayırıcı tanısında immünohistokimyasal panelde yüksek duyarlılık ve özgünlükle kullanılabilecek antikorlar olduğu sonucuna varıldı. Bu iki antikor HMB45'ten daha yüksek güvenilirlik nedeniyle S100'ün tamamlayıcısı olarak kullanılabilir. Özellikle sentinel lenf nodu metastazlarının saptanmasında bu iki antikorun S100'e göre bazı üstünlükler gösterdiği düşünüldü.

ANAHTAR KELİMELE: Melanom, S100, NKI/C3, MART-1/Melan-A, Tirozinaz.

SUMMARY: SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF VARIOUS DIFFERENTIATION ANTIGENS IN NEVO-MELANOCYTIC LESIONS: COMPARISON OF MART-1/Melan-A, TYROSINASE AND HMB45 WITH S100 AND NKI/C3. Differential diagnosis of naevo-melanocytic lesions from other tumors is a relatively frequent problem. Immunohistochemistry is a valuable tool for the purpose and has been used for a long time. A panel of three antibodies that recognise melanocyte differentiation antigens MART-1/Melan-A, Tyrosinase and HMB45 has been compared to S100 and NKI/C3. Reactivity pattern has been assessed on a group of benign and malignant melanocytic lesions and a group of non-melanocytic tumors. The aim of this investigation was to determine the sensitivity and specificity of each antibody. Immunohistochemistry has been performed on paraffin-embedded archival material. Anti-S100 proved to be the antibody that showed the strongest and diffuse reaction in all benign and malignant melanocytic lesions. 12/28 naevi, 13/25 primary melanomas and 8/11 metastatic melanomas were labelled with NKI/C3, which showed to be the least sensitive for nevo-melanocytic lesions among all other antibodies. MART-1/Melan-A and Tyrosinase antibodies reached a comparable sensitivity level to S100 and were the most specific of all five antibodies tested. In naevi, these two stained superficial nevus cells more strongly than deep, spindle shaped cells. HMB45 has reached 87.5% sensitivity and 88.88% of specificity. Junctional and intraepidermic cells showed the strongest labelling with HMB45 in both naevi and melanomas. It is concluded that with their high sensitivity and specificity for naevo-melanocytic lesions, MART-1/Melan-A and Tyrosinase can be useful tools in the immune panel. Given their high accuracy, they can replace HMB45 as the traditional companion to S100. For melanoma micrometastasis detection in sentinel lymph node biopsies, these two antibodies seem to have some qualitative superiority over S100.

KEY WORDS: Melanoma, S100, NKI/C3, MART-1/Melan-A, Tyrosinase.

GİRİŞ

Melanom için immünoterapi yolunu araştırmak maksadıyla, özellikle kültür ortamındaki melanom hücrelerine karşı otolog sitotoksik T hücre yanıtının incelenmesi yoluyla yapılan araştırmalar, T lenfositleri tarafından tanınan bir dizi melanom asosiye antijen (MAA) tanımlanmasına yol açmıştır (1,2,3). Bu antijenler 4 kategoride toplanabilir. Birinci grupta tümör spesifik paylaşılan (ortak) antijenler vardır. Bu grupta MAGE (Melanoma Antigen Encoding Gene), BAGE ve GAGE aileleri sayılabilir (4). Normal melanositler tarafından eksprese edilmeyen bu antijenler, başka tümörlerin yanı sıra, melanomların bir kısmında eksprese edilir. Bu antijenleri eksprese eden tek normal doku testistir (4). İkinci grup, diferansiyasyon -veya lineage- spesifik antijenlerdir. Melanom için bu grupta melanosit spesifik melanozomal proteinler olan gp100, MART-1/Melan-A, tirozinaz, TRP-1 ve TRP-2 sayılabilir (1,2,3). Bunun dışın-

daki melanom asosiye antijenler tümör spesifik mutan proteinler (beta katenin, MUM-1 ve CDK-4) ve diğerlerinden (p15) oluşur (3). Yakın geçmişte gp100, MART (Melanoma Antigen Recognized by T-cells)-1 ve tirozinaz genleri identifiye edilmiş (5,6,7) ve melanom immünoterapisinde hedef adayları olan bu proteinlere karşı geliştirilmiş antikorlar tanımlanmıştır (8,9,10).

Melanositik lezyonların farklı kökenli diğer tümörlerden ayırıcı tanısı patoloji uygulamasında sık karşılaşılan bir sorundur. Ayırıcı tanı ve melanom hastalarında giderek daha sık uygulanmaya başlanan okült mikrometastazları saptamaya yönelik sentinel lenf nodu biyopsilerinin (SLNB) (11,12) immünohistokimyasal inceleme uzun yıllardır kullanılmaktadır (13). Halen rutin tanı amacıyla en yaygın olarak kullanılan ve "standart" olarak kabul edilen antikor poliklonal S100 antikorudur. Bu antikor melanositik tümörler için yüksek duyarlılığa sahip olmakla beraber, normal non-melanositik hücreler ve non-melanositik tümörler ile önemli oranda reaksiyon gösterme, yani düşük özgünlük sorunu mevcuttur (14).

Bunu izleyerek melanositik lezyonlar için daha spesifik oldukları öne sürülen HMB45 ve NKI/C3 gibi antikorlar

İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

* Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje No.: 1692/15082001

kullanıma girmeye başlamıştır. HMB45, bir melanosit diferansiyasyon antijeni olan gp100'e karşı geliştirilmiş monoklonal bir antikordur (10). HMB45'in "aktive" melanositlere karşı ileri derecede duyarlı ve özgün bir antikör olduğu ileri sürülmüş ve melanom tanısında birincil olarak kullanılan araçlar arasında yerini almıştır (15,16). Ancak HMB45'in duyarlılık ve özgünlüğünün sanılan kadar yüksek olmadığı yolunda son zamanlarda yapılmış olan bildirimler (17,18,19,20) nedeniyle, melanositik tümörlerin tanınmasında anti-S100'ün yanısıra immün paneli tamamlayıcı bir antikör olarak yaygın kullanımı sorgulanmaya başlamıştır. Monoklonal antikör NKI/C3, melanomların çoğu tarafından eksprese edilen sitoplazmik bir antijeni tanımlamaktadır (21,22). Ancak bu antikör bazı non-melanositik lezyonlarla reaksiyon göstermektedir (14).

Son yıllarda, tanımlanan melanosit spesifik melanomal proteinlerle ilgili gelişmeler çok önemli bir değişim getirmiştir. Ototoksik T hücreleri tarafından tanınan melanom antijenleri üzerindeki çalışmalar Coulie ve ark. tarafından (23) Melan-A geninin kodlanmasına yol açmıştır. Kawakami ve ark. da (6) bağımsız bir şekilde aynı geni klonlamışlar ve MART-1 olarak adlandırmışlardır. Yakın geçmişte rekombinan insan MART-1 proteini kullanılarak, yine bu iki ekip tarafından MART-1 (klon M2-7C10) (24) ve Melan-A (klon A-103) (9) olmak üzere, aynı antijeni tanıyan iki farklı antikör geliştirilmiştir. Normal insan hücreleri ve dokularında mRNA analizleri, Melan-A'nın deri, retina ve kültür ortamındaki melanositler tarafından eksprese edilen, ancak diğer dokularda eksprese edilmeyen bir melanosit diferansiyasyon antijeni kodladığını göstermiştir (6,23). Melanositik kökenli tümör dokularının değerlendirilmesi bu özgünlüğü doğrulamış ve Melan-A mRNA'sı örneklerin %87-100'ünde gösterilmiştir (9,23,25). Buna karşılık başka tür tümörlerde Melan-A mRNA ekspresyonu gösterilememiştir (6,23). Geliştirilen antikörlerle başlangıçta donmuş taze dokularda daha iyi immünreaktivite elde edilmiş, daha sonra mikrodalga bazlı antijen retrieval tekniklerinin kullanımı ile parafine gömülü dokularda bile MART-1 saptama duyarlılığının, taze sitolojik materyele yakın olduğu gösterilmiştir (26). Bu bulgular MART-1/Melan-A antikörünün gp100'e karşı geliştirilmiş olan HMB45'e benzer biçimde melanositik lezyonların tanısında kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Tirozinaz, melanin sentezinde anahtar rol oynayan bir enzim ve sitoplazmik bir melanosit diferansiyasyon proteindir. Sitotoksik T hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, tirozinazın immün sistem tarafından HLA-restricted bir biçimde tanındığını ortaya koymuştur (27). Bu özellik tirozinazın tanı amaçlı olarak kullanılabilecek yararlı bir araç olabileceğini düşündürmüştür. T 311, rekombinan tirozinaz proteini ile immünizasyon sonucu elde edilmiş monoklonal bir antikördür (8). Bu antikör melanomlarda yüksek bir duyarlılığı olduğu bildirilmektedir (28,29,30,31,32).

Bu çalışmanın amacı nevo-melanositler kökenli lezyonların ayırıcı tanısında ve melanom hastalarında giderek artan sayıda yapılmaya başlanan sentinel lenf nodu biyopsilerinde mikrometastazların saptanmasında yararlı olabilecek NKI/C3, MART-1/Melan-A ve Tirozinaz gibi antikörlerin daha uzun zamandır aynı amaçla kullanılan anti-S100 ve HMB45 antikörleri ile karşılaştırmaktır. Nevüsler, primer ve metastatik melanomlarda bu antikörle-

rın reaktivite yaygınlığı ve kalitatif özelliklerinin, nevo-melanositler dışı bir grup tümöral lezyon ile karşılaştırılması ve bu antikörlerin duyarlılık ve özgünlüklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYEL ve METOD

Vakaların Seçimi

Çalışma ve kontrol grubuna dahil edilen tüm olgular İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivlerinde bulunan formalin veya Hollande ile tespit edilmiş, parafine gömülmüş materyel arasından seçildi. Çalışma grubuna 28 adet nevüs (5 konjenital tipte intradermal, 5 intradermal, 3 konjenital tipte kompaund, 3 kompaund, 1 junctional, 3 displastik kompaund, 3 Spitz [1 desmoplastik], 1 pigmentli içsi hücreli (Reed), 4 mavi); 25 adet primer deri melanomu (4 LMM, 3 NMM, 3 ALM, 15 SSM); 11 adet metastatik melanom (5 lenf gangliyonu metastazi, 6 deri metastazi) olmak üzere toplam 64 nevo-melanositler lezyon alındı. Test edilecek antikörlerin nevo-melanositler kökenli lezyonları saptamada duyarlılık ve özgünlüklerini belirlemek amacı güdüldüğünden, kontrol gruplarına bazıları melanom ayırıcı tanısına girebilecek benign ve malign tümöral lezyonlar alındı. Toplam 27 vakadan oluşan kontrol grubuna 5 bazal hücreli karsinom, 1 bazoskuamöz karsinom, 3 skuamöz hücreli karsinom, 1 Bowen hastalığı (in situ skuamöz hücreli karsinom), 2 meme karsinomu deri metastazi, 1 müsinöz adenokarsinom deri metastazi, 1 ksantogranülom (deri), 1 nörofibrom (deri), 1 granüler hücreli schwannom (deri), 3 schwannom, 1 gangliyonörom, 4 malign periferik sinir kılıf tümörü ve 3 berrak hücreli sarkom dahil edildi. Tüm vakaların hematoksil-eozin (H-E) boyalı preparatları orijinal tanının doğrulanması amacıyla yeniden gözden geçirildi.

İmmünohistokimyasal inceleme

Çalışma ve kontrol gruplarına uygulanan immünohistokimyasal incelemede kullanılan primer antikörlerin özellikleri ve sulandırma oranları Tablo 1'de verilmektedir (Tablo 1).

Parafin bloklardan elde edilen 5µm'lik kesitler Histogrip (Zymed) ile kaplanmış lamalar üzerine alınarak, preparatlar 37°C etüvde bir gece kurutuldu ve kesitlerin yapılması sağlandı. İmmünohistokimyasal yöntemin uygulanacağı günün sabahı, yine 37°C etüvde 1 saatlik bir inkübasyonu izleyerek, ksilen serisinde deparafinizasyon işlemi tamamlandı. Azalan konsantrasyonlu etanol serisinden geçilerek distile suya kadar getirilen preparatlar hidrate edildi. Daha sonra S100, NKI/C3 (CD63), MART-1/Melan-A, HMB45 ile inkübe edilecek preparatlar için pH: 6, 10 mM sodyum sitrat tamponu içinde düdüklü tencerede standart yüksek basınçlı antijen unmasking işlemi yapıldı. Tirozinaz ile inkübe edilecek preparatlar için antijen unmasking işlemi pH: 8, 1mM EDTA (AP-9004-125, Lab Vision Corp. Fremont, CA, ABD) solüsyonu içinde, mikrodalga fırında (750 W), 3x5 dakika kaynatılarak yapıldı. Preparatların oda sıcaklığına inene kadar soğumalarından sonra immünohistokimyasal boyama yöntemine geçildi. Bu yöntemde, kısaca ifade edilecek olursa, %3 v/v H₂O₂ sudaki çözeltisi ile endojen peroksidaz inaktivasyonu (20 dak.), blok solüsyonu (20 dak., TA-125-UB,

TABLO 1: PRİMER ANTİKORLARIN ÖZELLİKLERİ

Antikör	Kaynak	Sulandırma Oranı
Monoklonal, mouse anti-S100 protein Ab-1 Clone 4C4.9	NeoMarkers Fremont, CA, ABD MS-296-P1	1:100
Monoklonal, mouse anti-CD63 Ab-1 Clone NK1/C3	NeoMarkers Fremont, CA, ABD MS-1118-P1	1:500
Monoklonal, mouse anti-MART-1/Me4A1 Ab-3 Clone M2-7C10+M2-9E3	NeoMarkers Fremont, CA, ABD MS-716-P1	1:50
Monoklonal, mouse anti-Melanoma (gp100) Ab-1 Clone HMB45	NeoMarkers Fremont, CA, ABD MS-964-S1	1:40
Monoklonal, mouse anti-tyrosinase Ab-1 Clone T311	NeoMarkers Fremont, CA, ABD MS-800-P1	1:50

Lab Vision Corp. Fremont, CA, ABD), primer antikör (tümü için oda sıcaklığında 60 dak.), biyotinitle keçi polivalent (anti-fare ve anti-tavşan) Ig içeren sekonder antikör (30 dak., TA-125-HL, Lab Vision Corp. Fremont, CA, ABD), HRP-streptavidin kompleksi (30 dak., TA-125-HL, Lab Vision Corp. Fremont, CA, ABD), AEC kromojen çözeltisi (10 dak., TA-125-HL, Lab Vision Corp. Fremont, CA, ABD) uygulandı. Aşamalar arasında 2x5 dak. PBS ile yıkama uygulandı. İşlemin tamamlanmasını takiben distile suda yıkama, Mayer hematoksilen ile zıt boyama ve gliserinli jel ile kapatma yapıldı. Negatif kontrol olarak primer antikör aşaması atlanarak yerine PBS kullanıldı.

Değerlendirme

Tüm vakalar boyanmanın yaygınlığı (%0, 1-5, 6-25, 26-50, 51-75, 76-100) ve şiddeti $\pm$: güçlükle farkedilebilen; +: zayıf; ++: orta; +++: kuvvetli) bakımından değerlendirildi. Tüm bu kategorilere bir puan değeri verilerek

(boyanan hücrelerin % oranı için sırasıyla 0, 1, 5, 10, 15 ve 20; boyanma şiddeti için sırasıyla 0, 1, 2, 3 ve 4) 0-80 arası puanlar içeren bir skorlama tablosu oluşturuldu (Tablo 2). İmmünreaktivite saptanmayan vakalar 0 (sıfır) puan ile skorlandı. Her vakada her antikör için yapılan değerlendirme sonrasında immünreaktivite yaygınlığı x şiddeti olarak ≥ 10 skor puanı elde edilen durumlarda, söz konusu antikör için pozitif immünreaktivite olduğu kabul edildi. Bu sınır değerin altında ise vakada o antikör için immünreaktivite negatif kabul edildi.

Her antikör için duyarlılık ve özgünlük şu formüllere göre hesaplandı: Duyarlılık = Gerçek Pozitifler/Gerçek Pozitifler + Yalancı Pozitifler; Özgünlük = Gerçek Negatifler/Gerçek Negatifler + Yalancı Negatifler. İstatistiksel değerlendirmeler sanal ortamda (<http://faculty.vassar.edu/~lowry/vassarstats.html>; http://www.mhri.edu.au/biostats/DAG_stat/index.html) adreslerindeki hesaplama tabloları kullanılarak yapıldı. Karşılaştırmalarda χ^2 (ki-kare) testi (Yates modifikasyonu) ve Fisher kesin χ^2 testi kullanıldı. p değerinin <0.05 olması anlamlı, <0.01 olması ise ileri derecede anlamlı fark olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çeşitli tiplerde nevüsler içeren 28 vakalık benign melanositik lezyonlar grubunda saptanan immünreaktivite sonuçları Tablo 3'te gösterilmektedir. Kısaca, nevüslerin tümünde (%100) S100, MART-1/Melan-A ve Tirozinaz antikörleri ile tanımlanan kriterler çerçevesinde pozitif im-

TABLO 2: İMMÜNREAKTİVİTE DEĞERLENDİRMESİNDE KULLANILAN SKORLAMA TABLOSU

Boyanma	Boyanma Şiddeti	-	$\pm$	+	++	+++
Boyanma						
Yaygınlığı (%)	puan	0	1	2	3	4
0	0	0	0	0	0	0
1-5	1	0	1	2	3	4
6-25	5	0	5	10	15	20
26-50	10	0	10	20	30	40
51-75	15	0	15	30	45	60
76-100	20	0	20	40	60	80

TABLO 3: BENİGN MELANOSİTİK LEZYONLARDA İMMÜNPOZİTİVİTE

Nevüs Tipi	S100 (CD63)	NK1/C3	MART-1/Melan-A	HMB45	Tirozinaz
İntradermal nevüs	10/10	4/10	10/10	5/10	10/10
Kompaund nevüs	6/6	1/6	6/6	5/6*	6/6
Junctional nevüs	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Displastik nevüs	3/3	0/3	3/3	3/3**	3/3
Spitz nevüs	3/3	1/3	3/3***	2/3	3/3
Reed nevüs	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Mavi nevüs	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4
Toplam	28/28 (%100)	12/28 (%42.8)	28/28 (%100)	20/28 (%71.4)	28/28 (%100)

*: 4 vakada sadece junctional hücrelerde

**: 1 vakada sadece junctional hücrelerde

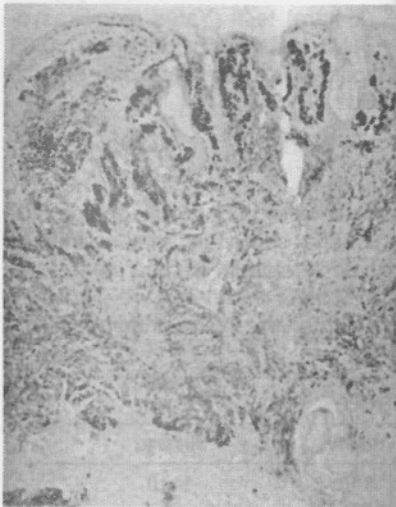
***: 1 vakada sadece junctional hücrelerde



Resim 1a: Papillomatöz yüzeysel konjenital tipte intradermal nevüste dermis derinine doğru nevüs hücrelerinde küçülme ve iğsi karakter kazanma özelliği (tip C hücreler) (H-E x32).



Resim 1b: Yüzeyden derine kadar tüm hücrelerde S100 ile yaygın ve kuvvetli, sitoplazma ve çekirdek immünreaktivitesi (anti-S100 x32).



Resim 1c: Özellikle üst dermal, epiteloïd morfolojili hücrelerde kuvvetli, derine doğru azalan şiddette sitoplazmik immünreaktivite (anti-MART-1/Melan-A x32).



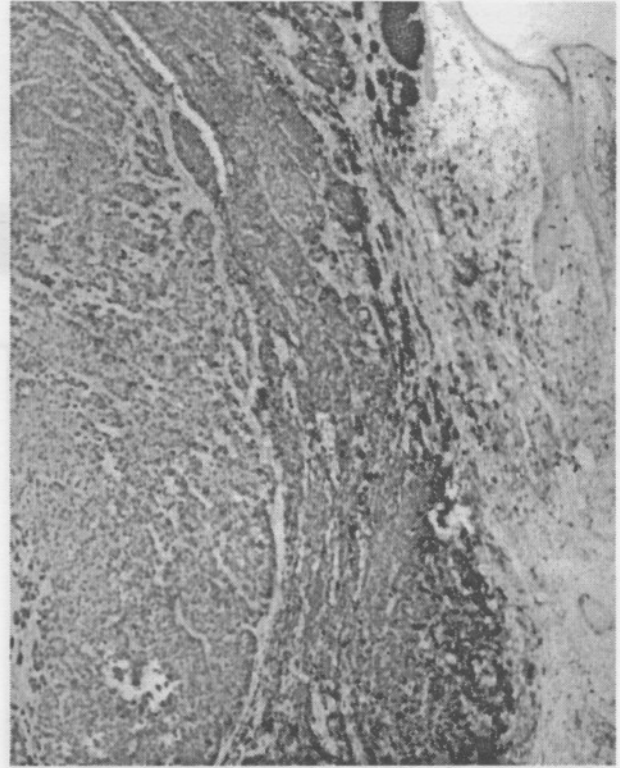
Resim 1d: Üst dermal hücrelerde daha kuvvetli, fokal nitelikli, derine doğru belirgin azalma gösteren sitoplazmik immünreaktivite (anti-Tirozinaz x32).



Resim 1e: Seyrek junctional ve üst dermal epiteloïd nevüs hücresinde fokal nitelikli sitoplazmik immünreaktivite. Derin dermal hücreler negatif (anti-HMB45 x32).



Resim 2a: Polipoid nodüler melanom. Clark IV. Dermis derinine doğru invazyon oluşturan epiteloïd morfolojili tümör hücreleri (H-E x32).



Resim 2b: Tümör hücrelerinde yaygın ve kuvvetli sitoplazma ve çekirdek immünreaktivitesi (anti-S100 x32).

münreaktivite saptandı. HMB45 (gp100) ve NKI/C3 (CD63) antikorlarıyla bu oran sırasıyla %71.4 ve %42.8 idi. Kalitatif olarak bakıldığında ise, S100 ile junctional ve dermal lokalizasyonlarından bağımsız olarak kuvvetli sitoplazmik ve çekirdek reaktivitesi gözlemlendi (Resim 1a ve 1b). Derin dermal hücreler küçülüp içi karakter kazandıklarında (schwannian diferansiyasyon veya tip C hücreler) immünreaktivitede hafif bir azalma mevcuttu. MART-1/Melan-A ve Tirozinaz antikorları ile tüm vakalarda immünreaktivite görülmekle beraber, özellikle junctional ve üst dermal epiteloïd (tip A) hücrelerde sitoplazmik reaktivitenin kuvvetli olduğu ve dermis derinine doğru gildiğinde, özellikle tip C hücrelerde belirgin olarak azaldığı saptandı (Resim 1c ve 1d). HMB45 (gp100) antikoruna reaktivitenin özellikle junctional ve üst dermal tip A hücrelerde konsantre olduğu ve diğer antikorlarla karşılaştırıldığında daha heterojen bir karakter arzettiği saptandı (Resim 1e). NKI/C3 (CD63) ile sadece 12/28 vakada reaktivite saptandı. Bu olgularda da daha çok junctional ve tip A dermal hücrelerde heterojen karakterli reaktivite mevcuttu. NKI/C3 ile lezyon içinde veya çevresinde

deki normal dokularda bulunan mast hücrelerinde şiddeti (+) ile (+++) arasında değişen reaktivite izlendi. Yine normal doku komponenti olarak lezyon çevresi derisinde bulunan ektrin ter bezlerinde apikal sekret granülleri ile uyumlu bir immünpozitivite saptandı.

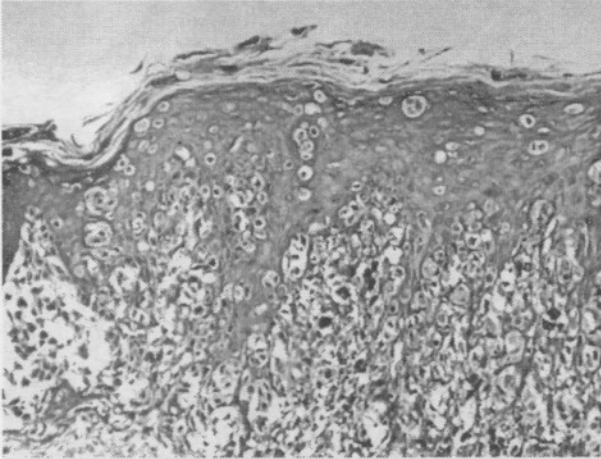
Primer deri melanomları, lenf gangliyonu ve deri metastazlarını içeren melanomlar grubunda immünreaktivite sonuçları Tablo 4'te gösterilmektedir. Kısaca, primer veya metastatik melanomların tümü (%100) S100, MART-1/Melan-A, HMB45 ve Tirozinaz antikorları ile, tanımlanan kriterler ışığında pozitif kabul edilen reaktivite gösterdi. NKI/C3 (CD 63) ile global pozitiflik oranı %58.3 iken, en yüksek reaktivite deriye metastaz yapmış melanomlarda (%83) saptandı. Primer melanomlar ile lenf gangliyonu metastazları ve deri metastazları gruplarında NKI/C3 ile saptanan immünreaktivite oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde değildi (Fisher one tailed exact probability test; sırasıyla $p=0.56$ ve $p=0.17$). Kalitatif olarak bakıldığında S100 ile vakaların tamamı yakınında yaygın (%76-100 hücrede) ve kuvvetli (+++) reaktivite görüldü (Resim 2a ve 2b). MART-1/Melan-A ve Ti-

TABLO 4: MELANOMLARDA İMMÜNPOZİTİVİTE

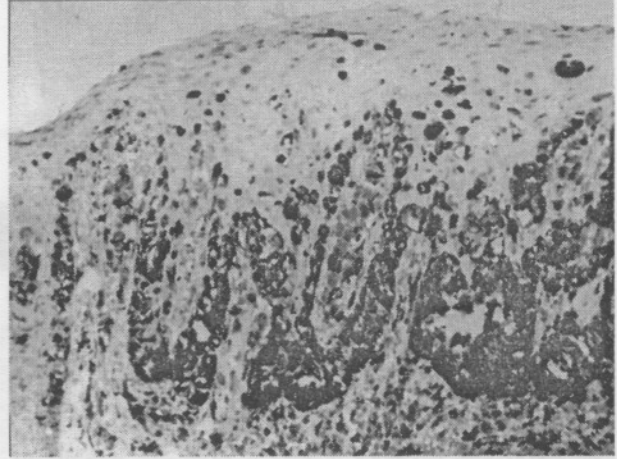
Melanom tipi	S100	NKI/C3 (CD63)	MART-1/Melan-A	HMB45	Tirozinaz
Primer melanomlar	25/25	13/25*	25/25	25/25**	25/25
Lenf gangliyonu metastazı	5/5	3/5	5/5	5/5	5/5
Deri metastazı	6/6	5/6	6/6	6/6	6/6
Toplam	36/36 (%100)	21/36 (%58.3)	36/36 (%100)	36/36 (%100)	36/36 (%100)

*: 1 vakada sadece junctional hücrelerde

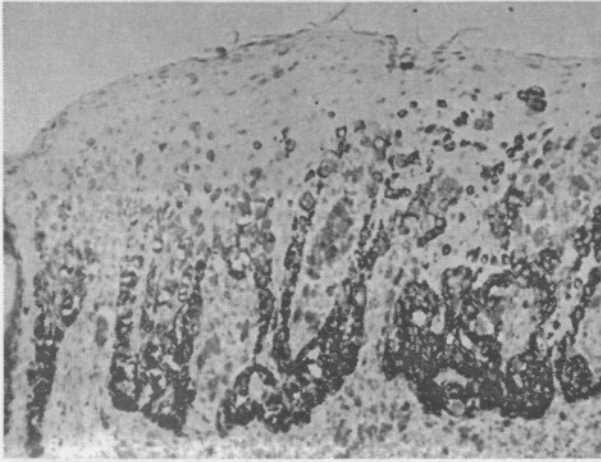
**: 6 vakada sadece junctional/intraepidermik hücrelerde



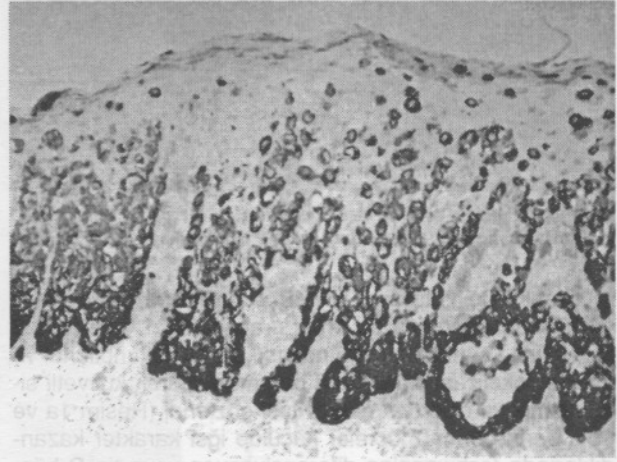
Resim 3a: Yüzeyel yayılan melanom. Clark III. Junctional bölgede, papiller dermiste ve pagetoid yayılım gösteren çok sayıda intraepidermik hücre (H-E x125).



Resim 3b: Tümör hücrelerinde yaygın ve kuvvetli immünreaktivite (anti-S100 x125).



Resim 3c: Tümör hücrelerinde yaygın ve kuvvetli sitoplazmik immünreaktivite (anti-MART-1/Melan-A x125).



Resim 3d: Tümör hücrelerinde yaygın ve kuvvetli sitoplazmik immünreaktivite (anti-Tirozinaz x125).

rozinaz antikorları ile daha düşük olmakla beraber, buna yakın yaygınlık ve yoğunlukta reaktivite gözlemlendi (Resim 3a, 3b, 3c ve 3d). HMB45 ile 6/25 vakada sadece junctional ve intraepidermik komponentte reaktivite gözlemlendi (Resim 4a ve 4b). Bu antikor ile reaktivite, primer melanom vakalarında junctional ve intraepidermik komponentte daha yaygın ve güçlü idi. Primer ve metastatik melanomlar grubunda S100 ile en az (2 vaka) olmak üzere, tüm diğer antikorlarla aynı oranda (sekizer vaka) reaktivitenin fokal karakterli olduğu gözlemlendi.

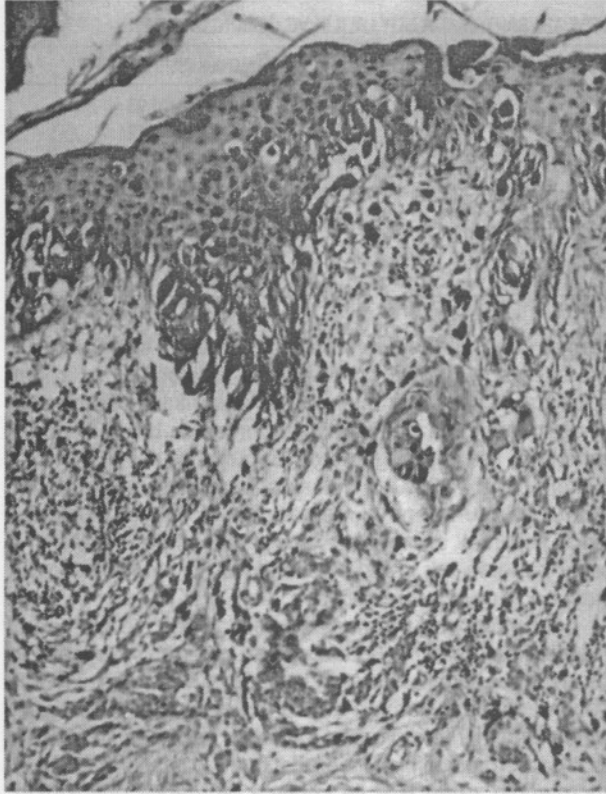
Lenf gangliyonu metastazlarının değerlendirilmesinde S100 antikoruna ile metastatik odaklar net bir biçimde görülmekle beraber, parakortikal bölgede çok sayıda poligonal-dendritik morfolojili hücrenin kuvvetli reaksiyon gösterdiği saptandı. H-E kesitler ile karşılaştırıldığında bunların metastatik melanom hücreleri olmadığı, lenfoid parenkime ait hücreler oldukları gözlemlendi. Diğer antikorlarla yukarıda tanımlanan türde bir reaktivite görülmediğinden, metastatik melanom hücreleri temiz bir zemin üzerinde net bir şekilde gözlemlendi.

İğsi hücrelerin baskın olduğu primer ve metastatik

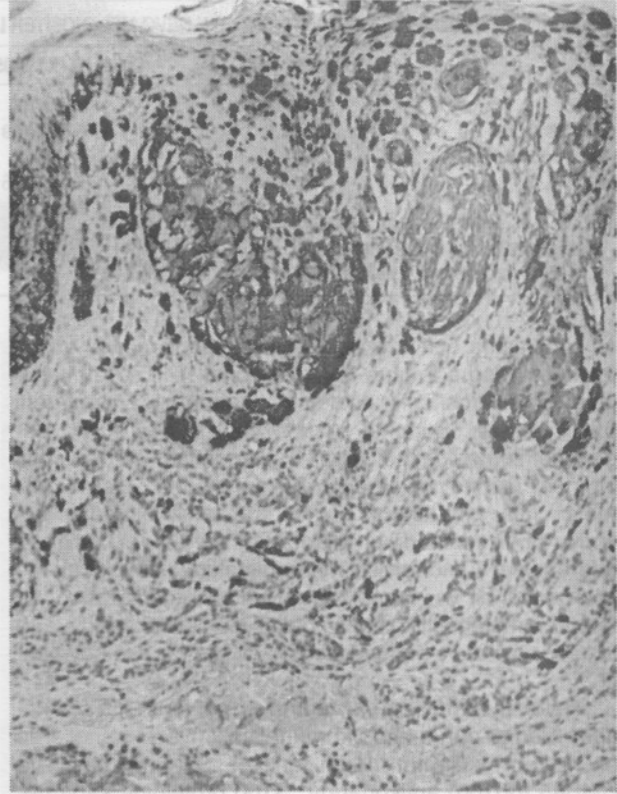
melanomlarda S100 antikoruna ile tüm vakalarda yaygın ve kuvvetli pozitif reaksiyon saptandı. Test edilen diğer antikorların tümüyle iğsi hücreli melanomlarda pozitif reaksiyon elde edilmekle birlikte, bunun daha az yaygın ve daha zayıf olması dikkat çekiciydi.

Gerek nevüsler, gerekse primer ve metastatik melanomlar grubunda birçok vakada tek veya topluluklar halinde yer yer rastlanan, sitoplazmik melanin granülleri içeren, ancak oval-veziküler, atipi göstermeyen çekirdekli melanofajlar, uygulanan antikorlardan hiçbirisi ile spesifik olarak kabul edilebilecek reaksiyon göstermedi.

Kontrol grubunu oluşturan çeşitli selim ve malign tümörler grubunda genel sonuçlar Tablo 5'te gösterilmektedir (Tablo 5). Kısaca MART-1/Melan-A ve Tirozinaz ile bir berrak hücreli sarkom vakası dışında immünreaktivite gözlemlenmedi. S100 ve NKI/C3 (CD 63) antikorlarının paralel bir immünreaktivite gösterdiği, Schwann hücresi kökenli veya bu elemanların katıldığı nöral orijinli 10 vakanın dokuzunda S100, altısında ise CD63 ile reaktivite saptandı. Ancak S100 ile pozitif olan tüm bu vakalarda reaktivite yaygın (%76-100) ve kuvvetli (+++) iken, CD63



Resim 4a: Nevüs üzerinde gelişen yüzeysel yayılan melanom. Clark III. Intraepidermik, junctional ve papiller dermisteki tümör hücreleri. En derinde ise lenfositlerle birlikte gruplar oluşturan, öncü lezyona ait kalıntı nevüs hücreleri görülmekte (H-E x125).



Resim 4b: Özellikle junctional ve intraepidermik tümör hücrelerinde kuvvetli immünreaktivite. Yüzeysel dermisteki nevüs hücreleri ise negatif (anti-HMB45 x125).

ile reaktivite hücrelerin yaklaşık yarısında ve zayıf ($\pm$ +) şiddette idi.

Berrak hücreli sarkomlarda (3 vaka), S100 ve HMB45 ile tüm vakalarda yaygın ve kuvvetli pozitif reaksiyon saptandı. MART-1/Melan-A ve Tirozinaz ile 1 olguda (aynı olgu) hücrelerin %26-50'sinde fokal karakterli, sırasıyla (++) ve (+) reaktivite gözlemlendi. CD 63 ile farklı bir olguda %76-100 hücrede (++) reaksiyon saptandı.

Sonuçlar bütün olarak değerlendirildiğinde her antikorun nevo-melanositer lezyonları saptama açısından duyarlılık ve özgünlüğü Tablo 6'da gösterilmektedir (Tablo

6). Nevo-melanositer lezyonlar ile kontrol grubu incelenen antikorlarla pozitif immünreaktivite açısından karşılaştırıldığında, S100 için (Fisher) $p < 0.01$, NKI/C3 için (Yates) $p = 0.04$, MART-1/Melan-A, Tirozinaz ve HMB45 için (Yates) $p < 0.01$ olarak saptandı.

TARTIŞMA

Primer veya metastatik melanom olgularının çoğunda yapısal (epidermis ile ilişki, asimetri, bağımsız tümör nodülü oluşumu, vb ...) ve sitolojik (hücrel atipi, çekirdek

TABLO 5: KONTROL GRUBU LEZYONLARINDA İMMÜNPOZİTİVİTE

	S100	NKI/C3 (CD63)	MART-1/Melan-A	HMB45	Tirozinaz
BCC	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Bazoskuamöz Ca	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
SCC+Bowen	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Meme Ca Deri Met.	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Müsinöz Adeno Ca Deri Met.	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
Ksantogranülom	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Nörofibrom	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Granüler Hücreli Schwannom	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1
Schwannom	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3
MPNST	3/4	2/4	0/4	0/4	0/4
Gangliyonörom	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1
Berrak Hücreli Sarkom	3/3	1/3	1/3	3/3	1/3
Toplam	12/27	7/27	1/27	3/27	1/27

TABLO 6: PRİMER ANTİKORLARIN NEVO-MELANOSİTER LEZYONLARI SAPTAMADA DUYARLILIK VE ÖZGÜNLÜKLERİ

	Duyarlılık (%)*	Duyarlılık (%) (%95 CI)**	Özgünlük (%)*	Özgünlük (%) (%95 CI)**
S100	100	92.94-100	55.55	35.63-73.96
NK1/C3 (CD63)	51.56	38.84-64.09	74.07	53.40-88.12
MART-1/Melan-A	100	92.94-100	96.29	79.11-99.80
HMB45	87.5	76.30-94.06	88.88	69.70-97.08
Tirozinaz	100	92.94-100	96.29	79.11-99.80

*: Tahmin edilen (estimated) değer
 **: %95 güven aralığının (confidence interval) dikkate alındığı değer

ve sitoplazma özellikleri, melanin pigmenti içeriği, vb ...) özellikler, doğru tanının konvansiyonel H-E boyalı kesitlerin ışık mikroskopik incelemesi ile konması için yeterli olabilmektedir. Bununla birlikte, yapısal özelliklerin değerlendirilemediği metastatik melanomlar, az veya hiç pigment içermeyen amelanotik melanomlar, iğsi hücreli melanomlar gibi tanının hemen konulabilir olmadığı lezyonlarda ve melanomun ayırıcı tanı içinde yer aldığı az diferansiye tümörlerde immünhistokimyasal inceleme çok önemli bir yer tutmaktadır. Bu incelemede amaç, bir tümörün melanositik kökenli olduğunu yüksek bir duyarlılık (sensitivite) ve özgünlükle (spesifisite) ortaya koymaktır.

Halen melanositik lezyonların ayırıcı tanısının söz konusu olduğu durumlarda immünhistokimyasal panellerde en yaygın kullanım bulan antikor S100 proteini ve HMB45 (gp100) antikorlarıdır. S100 proteinine karşı geliştirilmiş poliklonal antikorlar yüksek duyarlılıklarından ötürü immünhistokimyasal tanıda geleneksel olarak "altın standart" olarak kabul edilmiştir (30). Gown ve ark. tarafından 1986 yılında bildirilen (10) ve bir melanosit diferansiyasyon antijeni olan gp100'e karşı geliştirilmiş HMB45, özgünlüğünün yüksekliği yolundaki bildirimler (33) nedeniyle tamamlayıcı antikor olarak yaygın kullanım bulmuştur. NK1/C3 antikor 1980'li yılların ortalarında kullanıma girmiştir (21,34). Son yıllarda ise, yeni kuşak melanosit diferansiyasyon antijenlerine karşı geliştirilen antikorlar büyük ilgi uyandırmıştır. Bunlar arasında MART-1/Melan-A (M2-7C10 ve A-103 klonları), Tirozinaz (T311), MITF (Microphthalmia Transcription Factor) (35,36), MAG (57B) (37) gibi tümü parafin doku incelemelerine olanak tanıyan antikorlar üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmada amaç melanositik kökenli benign ve malign tümörler ile bir kontrol grubu üzerinde monoklonal anti-S100, NK1/C3 (CD63), MART-1/Melan-A, HMB45 ve Tirozinaz antikorları ile çalışarak, bunların duyarlılık ve özgünlüklerini saptamak ve kalitatif değerlendirmelerde bulunmak olmuştur.

Bu çalışmada 21-24 kDa'luk S100 proteininin A ve B subünitlerini tanıyan monoklonal bir antikor kullanılmış olmakla beraber, nevo-melanositler lezyonlar için poliklonal antikorlarla bildirilen (30) yüksek duyarlılık oranının sağlanmış olduğu görülmektedir. Benign melanositik nevüs, primer ve metastatik melanom olgularının tümü pozitif immünreaktivite göstermiştir. Bu antikoron melanositik kökenli lezyonlar için duyarlılığı %100'dür. Ancak bu antikoron özgünlüğü açısından üzerinde durulması gereken birçok nokta bulunmaktadır. Çalışmamızda nevüs ve melanom olgularında bu antikor ile bazen intraepidermik melanositlerle ayırımı son derece zorlaştıran biçimde epi-

dermal Langerhans hücreleri ile kuvvetli bir immünreaktivite saptandı. Kontrol grubunda bu antikor ile, melanom ayırıcı tanısına girebilecek nöral ve sinir kılıfı kökenli tüm benign ve malign neoplastik lezyonlar ve berrak hücreli sarkomlar reaksiyon gösterdi. Bunun sonucu olarak özgünlük oranı %55.5 seviyesinde saptandı. Bu sonuç, S100 antikoronun nevo-melanositler bir lezyonun ayırıcı tanısı yapmak amacıyla düzenlenen bir immünhistokimyasal panelde tek başına güvenilir bir biçimde kullanılamayacağını göstermektedir.

Lenf gangliyonu metastazı vakalarında ise melanom hücrelerinin yanısıra, parakortikal bölgede çok sayıda dendritik morfolojili hücrenin reaksiyon gösterdiği izlendi. Çalışmamızda kullanılan antikoron lenf gangliyonu parakorteksindeki interdigitating retikulum hücreleri ile reaksiyon gösterdiği bilinmektedir (13). Metastatik melanom hücrelerinin zaten H-E ile kolayca tanınabilir büyüklükte topluluklar oluşturduğu durumlarda bu özelliğin bir olumsuzluk oluşturması beklenmez. Ancak birkaç hücrelik küçük grupların, parakorteksteki çok sayıda interdigitating retikulum hücresi arasında farkedilmesi çok zor olabilir. Bu nedenle S100 antikoronun önerildiği gibi (30) küçük büyütmelerde melanom mikrometastazı aranan sentinel lenf gangliyonlarının taranması amacına uygun olmadığı kanısındayız.

İğsi hücreli ve desmoplastik melanomlar ayırıcı tanı zorluğu en yüksek olan neoplaziler arasında sayılabilir. Özellikle desmoplastik melanomun immünhistokimyasal olarak belirlenebilmesinde S100'ün hala en geçerli antikor olarak değerini koruduğu bildirilmektedir (30,35). HMB45 ile bu tümörlerin negatif oldukları (35,38,39,40) veya nadiren fokal/zayıf reaksiyon gösterdikleri (30) bildirilmektedir. MART-1/Melan-A ile yaklaşık %30 oranında (30,40), Tirozinaz ile %12.5 (31) ile %50 (30) arasında değişen oranlarda pozitivite bildirmektedir. NK1/C3 ile de %50 vakada pozitif reaksiyon bildirilmiştir (30). Bu sonuçlarla, gerçek desmoplastik, sklerotik stromalı melanomlarda S100 antikoronun hala pozitif olma şansı en yüksek antikor olduğu söylenebilir. Serimizde desmoplastik melanom bulunmakla birlikte, iğsi hücrelerin baskın olduğu primer ve metastatik melanomlarda S100 antikoru ile tüm vakalarda yaygın ve kuvvetli pozitif reaksiyon saptandı. Test edilen diğer antikorların tümüyle iğsi hücreli melanomlarda pozitif reaksiyon elde edilmekle birlikte, bunun daha az yaygın ve daha zayıf olması dikkat çekiciydi.

Evre 1-3 melanozomlarda eksprese edilen bir melanosit diferansiyasyon antijeni olan gp100'e karşı geliştirilmiş HMB45 antikoru (10), melanositik lezyonların ayırıcı tanısında S100 ile birlikte kullanılan en "popüler" antikor olma özelliğini sürdürmektedir. Serimizde elde edilen so-

nuçlara bakıldığında, benign nevüsler grubunda olguların 20/28 (%71.42)'inin global olarak pozitif immünreaktivite gösterdiği saptanmıştır. İmmünreaktivitenin kalitatif özelliklerine bakıldığında ise, bu antikorun özellikle intraepidermik ve junctional bölgede lokalize hücrelerde kuvvetli ve yaygın reaksiyon gösterdiği, dermis derinine doğru reaktivitenin keskin bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Bu özellik serimizdeki 4/10 intradermal nevüsün negatif olması ve pozitif olan 5/6 kompaund nevüs olgusunun dördünde immünreaktivitenin sadece junctional hücrelere sınırlı olması ile belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Buna karşılık mavi nevüs olgularında, dermal dendritik ve berrak hücreler söz konusu olmasına karşın, 3/4 vakada pozitif reaksiyon saptandı. Serimizdeki melanom olgularının tümünde reaktivite saptanmakla beraber, 6/25 olguda reaktivitenin sadece junctional hücrelerle sınırlı olması, aynı özelliğin malign melanositik lezyonlarda da korunduğunu göstermektedir. Bu özellik yapılan birçok çalışmada gözlemlenmiş bir bulgudur (30,38,40,41,42).

Çalışmamızda kontrol grubunda berrak hücreli sarkom olguları dışındaki olgularda HMB45 ile reaktivite gözlemlenmedi. Bu durumda serimizde HMB45 ile melanositik lezyonlar açısından saptanan özgünlük oranı %88.88 gibi yüksek bir değere ulaşmaktadır. Kullanıma girdiği yıllarda melanositik lezyonlar için yüksek bir duyarlılık ve özgünlüğü olduğu ileri sürülen HMB45'in anjiyomiyolipomlar, lenfanjiyoleiyomiyomatozis, akciğerin "sugar cell" tümörü (43), meme kansinömleri (44), feokromositomlar, gliyosarkomlar ve ependimomlar (45) tarafından eksprese edildiği bildirilmiştir. Bonetti ve ark. (19) tarafından yapılan çalışmalar normal ter bezleri, meme bezi ve meme kansinömlerinde görülen çapraz reaktivitenin, antikorun üretimi sırasında asit sıvısının intermediyer filament antikorlarıyla kontaminasyonu sonucu meydana geldiğini ortaya koymuştur. Bu özelliklerin bilinmesi ve dikkate alınması halinde HMB45, negatif oldukları bilinen desmoplastik melanomlar dışında nevo-melanositer kökenli lezyonların saptanmasında oldukça yüksek duyarlılık ve özgünlük oranlarıyla kullanılabilecek bir antikor olma özelliğini korumaktadır. Bu antikorun gerek nevüslerde, gerekse melanomlarda özellikle intraepidermik/junctional ve üst dermal hücreleri gözlemede yararlı olduğu söylenebilir.

Monoklonal NKI/C3 (CD63) antikorunu melanom hücreleri sitoplazmik vezikül membranlarının başlıca iç yüzünde lokalize 25-110 kDa'luk heterojen bir glikoproteini tanımlamaktadır. Bu antijenin formalin ile tespit edilmiş, parafine gömülmüş dokularda 25 kDa'luk non-glikozile bir öncüsü bulunmaktadır (21). Bu antikorun melanositik lezyonlar için iyi bir duyarlılığa sahip olduğu bildirilmekle birlikte (34), en önemli handikapı mast hücreleri, tükrük bezleri, ter bezleri, bronşiyal bezler, pankreas ve prostat gibi normal hücreler (21,22,46) ve hücreler nörotekom, granüler hücreli tümör (schwannom) (14), mukus üreten tümörler, karsinoidler, tiroid kansinömleri (21,22,46) ile reaksiyon göstermesidir. Çalışmamızda lezyon içinde veya çevresindeki normal dokularda mast hücrelerinde, lezyon çevresi deride ekrin ter bezlerinde apikal sekret granülleri ile uyumlu bir immünpozitivite saptandı. Ancak bu özelliklerin nevo-melanositer lezyonların ayırıcı tanısında bir handikap oluşturmaları olası değildir.

Kontrol grubu lezyonlarında ise literatür bilgileri ile uyumlu biçimde 1 müsinoz adenokarsinom deri metastaza-

zi, 1 granüler hücreli schwannom ve schwannom/sinir kılıfı kökenli 4/8 tümörde reaktivite gözlemlendi. Çalışmamızda genel olarak NKI/C3'ün nevo-melanositer lezyonları saptamada duyarlılığı %51.56, özgünlüğü ise %74.07 olarak hesaplanmıştır. Bu oranlar, söz konusu antikorun melanositik lezyonların ayırıcı tanısında kullanılmak için çok uygun olmadığını ortaya koymaktadır.

Yakın geçmişte melanosit diferansiyasyon antijenleri-ne karşı geliştirilen MART-1/Melan-A ve Tirozinaz gibi antikorlarla melanomlarda %80-100 gibi oranlarda immünpozitivite saptanması, bu yeni kuşak antikorların ilgi odağı haline gelmesine neden olmuştur (30,31,39,40). Bu antikorların HMB45'in aksine, aktive melanositler kadar, istirahat halindeki normal melanositleri de boyadığı bildirilmektedir (31,39).

MART-1 (klon M2-7C10) ve Melan-A (klon A103), farklı gruplar tarafından geliştirilmiş, ancak aynı antijeni tanıyan iki antikordur (47). Bu nedenle literatürde bu antikordan MART-1/Melan-A olarak bahsedilmektedir. İki antikor arasında sürrenal adenomları, sürrenal kansinömleri, over ve testisin Leydig ve Sertoli-Leydig hücreli tümörleri gibi "steroid üreten" tümörlerle non-spesifik reaksiyon açısından bir fark bulunmakla beraber (A103 klonu bu tümörlerle reaksiyon gösterir), melanositik lezyonlarda reaktivite farklılığı bulunmadığı bildirilmektedir (47). Melan-A (klon A103) ile Jungbluth ve ark. (39) tarafından yapılan öncü çalışmada metastatik melanomları saptamada HMB45 ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir oran elde edilmiş ve bunu benign lezyonların da test edildiği çalışmalar izlemiştir (30,38,40,41,48). M2-7C10 klonu ile de bu tür çalışmalar mevcuttur (42,49). Bu çalışmada M2-7C10 ve M2-9E3 klonlarından elde edilen kokteyl bir antikor kullanılmıştır (24). Çalışmamızda nevüsler, primer ve metastatik melanomlar grubunda yer alan tüm vakalarda global olarak pozitif değerlendirme sınırları içinde kalan yaygınlık ve yoğunlukta immünreaktivite saptanmıştır. Kalitatif olarak bakıldığında, nevüslerde junctional ve yüzeyel hücrelerde yaygın ve kuvvetli immünreaktivite olduğu, ancak nörotizasyon gösteren vakalarda derin dermiste reaktivitenin belirgin olarak zayıfladığı saptanmıştır. Bu bulgu çeşitli araştırmacılar (38,40) tarafından da bildirilmekte, hatta nörotizasyonun belirgin olduğu durumlarda nevüs hücrelerinin negatif olduğu belirtilmektedir.

Çalışmamızda primer ve metastatik melanomların tümünde pozitiflik sınırları içinde kalan bir immünreaktivite gözlemlendi. Literatürdeki çalışmalarda Busam ve ark. (40), nörotize nevüsler dışında çeşitli tipten test ettikleri 48 nevüsün tümünde, desmoplastik melanom dışında çeşitli tiplerden 26 primer melanomun tümünde pozitif immünreaktivite bildirmiştir. Jungbluth ve ark. (39) 61/75 (%81) metastatik melanomda pozitif immünreaktivite bildirmektedir. Orchard (30), çeşitli tiplerden 45 nevüste %100, 26 konvansiyonel melanomda %83, 9 deri metastazında %78, 15 lenf gangliyonu metastazında %69 oranında pozitiflik bildirmiştir. Hofbauer ve ark. (50) da A103 antikorunu ile melanom için %88 duyarlılık ve melanositik hücreler için çok yüksek bir özgünlük bildirmektedir.

Kontrol grubundaki lezyonlardan sadece 1 berrak hücreli sarkomda pozitiflik saptanmış ve MART-1/Melan-A antikorunu için nevo-melanositer lezyonlarda duyarlılık %100, özgünlük ise %96.29 olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular ve literatür bilgileri ışığında MART-1/Melan-A

antikorunun melanositik lezyonların ayırıcı tanısında yüksek güvenilirlikle kullanılabilecek bir antikor olduğu sonucuna varılmıştır.

Tirozinaz, melanin pigmenti biyosentezi yolunda birçok aşamada katalizör rolü oynayan, bakır içeren bir metalloglikoproteindir. Tirozinaz antikoru (klon T311) 70-80 kDa ağırlığında, tirozinaz olarak identifiye edilen bir grup proteini tanıır (8). Bu antikor ile nevüsler grubunda değerlendirilen 28 lezyonun tümünde belirlenen kriterlere göre pozitif reaksiyon saptandı. Yapılan çalışmalarda da %100 pozitiflik oranları bildirilmektedir (30,31,32). Kalitatif olarak bakıldığında ise hücrelerin tamama yakınında (%76-100) ve kuvvetli (+++) boyanmanın junctional ve üst dermal, poligonal şekilli, sitoplazmik melanin içeriği gözlenebilecek miktarda olan tip A hücrelerde görüldüğü, dermis derinine doğru nevüs hücrelerinde küçülme, sitoplazmik pigment içeriğinde azalma ve schwannian diferansiyasyon gösteren tip B ve tip C hücrelerde ise reaktivite yaygınlığı ve şiddetinin belirgin bir şekilde azaldığı saptandı. Bu özelliği ile reaktivite paterninin genel olarak MART-1/Melan-A antikoru ile elde edilene paralellik gösterdiği söylenebilir. Tirozinaz ile benzer bir reaktivite dağılımı başka araştırmacılar tarafından da bildirilmektedir (31,32). Jungbluth ve ark.'nın (31) yorumuna göre tirozinaz immünreaktivitesi nevüs hücresinin boyutu ile ilişkili olmalıdır. Bu bulgunun hücrenin boyutundan çok, belki de onunla ilişkili olan sitoplazmik melanin içeriği ve bunun yansıttığı melanin sentezi yolunun aktivite düzeyi ile bağlantılı olması olasıdır: yüzeyde lokalize poligonal şekilli, tip A olarak tanımlanan nevüs hücrelerinde sitoplazmik melanin içeriğinin derindeki içsi hücrelere göre daha fazla olduğu bilinmektedir.

Primer ve metastatik melanomlar grubunda da tüm olgularda pozitif immünreaktivite saptandı. Kalitatif olarak bu grupta reaktivite, bazı olgularda S100 ile saptanandan daha az yaygın ve kuvvetli olmakla beraber, MART-1/Melan-A veya HMB45 ile karşılaştırılabilir düzeyde idi. Amelanotik melanom vakaları üzerindeki çalışmalarında Kaufmann ve ark. (51) 72 amelanotik melanom metastazı üzerinde yaptıkları çalışmada HMB45, Melan-A ve Tirozinaz antikorlarının bu metastazları saptamadaki duyarlılık ve özgünlüklerinin yüksek (%85) ve karşılaştırılabilir nitelikte olduğunu bildirmektedir. Lenf gangliyonu metastazlarında gangliyon parenkimine ait herhangi bir hücrede reaktivite gözlenmediğinden, tümör hücreleri küçük gruplar oluştursalar bile net olarak farkedilebilir özelliği göstermekteydi. Orchard (30) konvansiyonel melanomlarda %90, 9 deri metastazında %89, 15 lenf gangliyonu metastazında %73 reaktivite saptamıştır. Jungbluth ve ark. (31) 75 metastatik melanom olgusunda %84 oranında pozitif reaksiyon bildirmektedir. Orchard (30), desmoplastik melanomlarda %50 (3/6) Jungbluth ve ark. ise (31) sadece 1/8 desmoplastik melanom olgusunda hücrelerin %25-50'sinde zayıf reaksiyon gözlemişlerdir. Serimizde desmoplastik melanom olgusu yoktur. Ancak içsi hücrelerin baskın olduğu melanom vakalarında da hücrelerin yarısından fazlasında +/+++ arasında değişen ve kolaylıkla farkedilebilir bir reaktivite gözledik.

Kontrol grubunda ise 1 berrak hücreli sarkom olgusu dışında reaksiyon gözlenmedi. Bu sonuçlar ile tirozinaz antikorunun melanositik lezyonlar için duyarlılığının %100, özgünlüğünün ise %96.29 olduğu saptandı.

Jungbluth ve ark. (31) tarafından Tirozinaz (T311) antikorunun özgünlüğünü belirlemek amacıyla, değişik kökenli normal ve tümöral dokular içeren çok geniş bir grup üzerinde yapılan çalışmada tirozinaz antikorunun %100'e ulaşan bir özgünlüğü olduğu anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada melanositik diferansiyasyon antijenlerinden MART-1/Melan-A ve Tirozinaz'a karşı son yıllarda geliştirilmiş olan antikorların yüksek duyarlılık ve özgünlüğe sahip oldukları ve nevo-melanositer lezyonların ayırıcı tanısında immünhistokimyasal panelde kullanılması yararlı olabilecek araçlar olduğu saptandı. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, söz konusu panelin, elde bulunan değişik alternatifler kullanılarak amaca yönelik biçimde her olguda düzenlenmesi gerektiğini düşündürmektedir. Örneğin genel ayırıcı tanı amacına yönelik panellerde S100'ün klasik tamamlayıcısı olarak HMB45 yerine, daha yüksek özgünlüğe sahip MART-1/Melan-A veya Tirozinaz antikorları kullanılabilir. Junctional/intraepidermik bölgedeki olası nevo-melanositer bir patolojinin incelenmesi için ise HMB45 antikoru daha yararlı olabilir. Ancak yukarıda sayılan antikorlardan hiçbirinin nevüs/melanom ayırımı yapmada bir değeri olmadığını bir kez daha vurgulamak yerinde olacaktır.

Yakın geçmişte önemi giderek artmaya başlayan, melanom hastalarında sentinel lenf gangliyonunun okült metastazlar açısından rutin olarak immünhistokimyasal incelemesi amacına yönelik olarak ise, S100'ün değerlendirmeyi zorlaştıran parakortikal interdigitating retikulum hücresi boyanmasına neden olması, HMB45'in daha düşük duyarlılık ve özgünlüğü nedeniyle, bu panelin MART-1/Melan-A (52) ve Tirozinaz antikorlarından oluşması gerektiği düşünülmüştür. Serimizde desmoplastik melanom vakaları bulunmamakla birlikte, literatür bilgileri, bu tipin ayırıcı tanısında panelin, en duyarlı antikor olarak S100'ü mutlaka içermesi gerektiği yönündedir.

Kısaltmalar:

LMM: Lentigo malign melanom
NMM: Nodüler malign melanom
ALM: Akral lentiginöz melanom
SSM: Yüzeyel yayılan (superficial spreading) melanom
BCC: Bazal hücreli karsinom
SCC: Skuamöz hücreli karsinom
MPNST: Malign periferik sinir kılıf tümörü

Teşekkürler:

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi sırasında, teknik aşamalarındaki özverili desteklerinden ötürü Ünzile KÖSE, Afife KAYA, Fatma AY ve Esra AKARSU'ya şükranlarımı sunarım.

KAYNAKLAR

1. Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. J Exp Med 1996 Mar 1;183(3):725-729.
2. Robbins PF, Kawakami Y. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. Curr Opin Immunol 1997;8:628-636.
3. Kawakami Y, Robbins PF, Wang RF, Rosenberg SA. Identification of tumor-regression antigens in melanoma. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Important Advances in Oncology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:3-21.
4. De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, et al. Structu-

- re, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 1994;40(5):360-369.
5. Adema GJ, de Boer AJ, van 't Hullenaar R, Denijn M, Ruiter DJ, Vogel AM, Figgord CG. Melanocyte lineage-specific antigens recognized by monoclonal antibodies NK1-beteb, HMB-50, and HMB-45 are encoded by a single cDNA. *Am J Pathol* 1993 Dec;143(6):1579-1585.
6. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Apr 26;91(9):3515-3519.
7. Kwon BS, Haq AK, Pomerantz SH, Halaban R. Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Nov;84(21):7473-7477.
8. Chen YT, Stockert E, Tsang S, Coplan KA, Old LJ. Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Aug 29;92(18):8125-8129.
9. Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, Tsang S, Coplan KA, Scanlan MJ, Old LJ. Serological analysis of Melan-A(MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jun 11;93(12):5915-5919.
10. Gown AM, Vogel AM, Hook D, McNutt MA. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumours distinguish sub-populations of melanocytes. *Am J Pathol* 1986;123:195-203.
11. Hauschild A, Christophers E. Sentinel node biopsy in melanoma. *Virchows Arch* 2001;438:99-106.
12. Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, Lee JE, Colome MI, Tseng CH, Lee JJ, Balch CM, Reintgen DS, Ross MI. Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol* 1999;17:976-983.
13. Cochran AJ, Wen DR, Morton DL. Occult tumor cells in the lymph nodes of patients with pathological stage I malignant melanoma. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 1988;126:612-618.
14. Orchard GE, Wilson Jones E. Immunocytochemistry in the diagnosis of malignant melanoma. *Br J Biomed Sci* 1994;51:44-56.
15. Carrel S, Rimoldi D. Melanoma-associated antigens. *Eur J Cancer* 1993;29A(13):1903-1907.
16. Ruiter DJ, Brocker EB. Immunohistochemistry in the evaluation of melanocytic tumors. *Semin Diagn Pathol* 1993 Feb;10(1):76-91.
17. Wick MR, Swanson PE, Rocamara A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB 45. *J Cut Pathol* 1988;15:201-207.
18. Wick MR, Swanson PE, Ritter JH, Fitzgibbon JF. The immunohistology of cutaneous neoplasia. *J Cut Pathol* 1993;20:481-497.
19. Bonetti F, Pea M, Martignoni G, Mombello A, Colombiari R, Zamboni G, Scarpa A, Piubello G, Bacchi C, Gowen A. False positive immunostaining of normal epithelia and carcinomas with ascites fluid preparations of antimelanoma monoclonal antibody HMB 45. *Am J Clin Pathol* 1991;95:454-459.
20. Kanitakis J, Hermier C, Cinouvet B, Thivolet J. Reactivity of HMB 45 monoclonal antibody with sweat-gland tumours of the skin. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1991;71:426-428.
21. Vennegoer C, Calafat J, Hageman P, van Buitenen F, Janssen H, Kolk A, Rumke P. Biochemical characterization and cellular localization of a formalin-resistant melanoma-associated antigen reacting with monoclonal antibody NK1/C-3. *Int J Cancer* 1985 Mar 15;35(3):287-295.
22. Hagen EC, Vennegoer C, Schlingemann RO, van der Velde EA, Ruiter DJ. Correlation of histopathological characteristics with staining patterns in human melanoma assessed by (monoclonal) antibodies reactive on paraffin sections. *Histopathology* 1986 Jul;10(7):689-700.
23. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1994 Jul 1;180(1):35-42.
24. Kawakami Y, Battles JK, Kobayashi T, Ennis W, Wang X, Tupesis JP, Marincola FM, Robbins PF, Hearing VJ, Gonda MA, Rosenberg SA. Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1. *J Immunol Methods* 1997 Mar 10;202(1):13-25.
25. Sarantou T, Chi DD, Garrison DA, Conrad AJ, Schmid P, Morton DL, Hoon DS. Melanoma-associated antigens as messenger RNA detection markers for melanoma. *Cancer Res* 1997 Apr 1;57(7):1371-1376.
26. Fetsch PA, Cormier J, Hijazi YM. Immunocytochemical detection of MART-1 in fresh and paraffin-embedded malignant melanomas. *J Immunother* 1997 Jan;20(1):60-64.
27. Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, De Plaen E, Lethe B, Coulie P, Boon T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993 Aug 1;178(2):489-495.
28. de Vries TJ, Smeets M, de Graaf R, Hou-Jensen K, Brocker EB, Renard N, Eggermont AM, van Muijen GN, Ruiter DJ. Expression of gp100, MART-1, tyrosinase, and S100 in paraffin-embedded primary melanomas and locoregional, lymph node, and visceral metastases: implications for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC Melanoma Cooperative Group. *J Pathol* 2001 Jan;193(1):13-20.
29. de Vries TJ, Fourkour A, Wobbes T, Verkroost G, Ruiter DJ, van Muijen GN. Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res* 1997 Aug 1;57(15):3223-3229.
30. Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J* 2000 Aug;32(8):475-481.
31. Jungbluth AA, Iversen K, Coplan K, Kolb D, Stockert E, Chen YT, Old LJ, Busam K. T311—an anti-tyrosinase monoclonal antibody for the detection of melanocytic lesions in paraffin embedded tissues. *Pathol Res Pract* 2000;196(4):235-242.
32. Clarkson KS, Sturdge IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). *J Clin Pathol* 2001 Mar;54(3):196-200.
33. Bacchi CE, Bonetti F, Pea M, Martignoni G, Gown AM. HMB-45. A review. *Appl Immunohistochem* 1996;4:73-85.
34. Mackie RM, Campbell I, Turbitt ML. Use of NKIC3 monoclonal antibody in the assessment of benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 1984;37:367-372.
35. King R, Googe PB, Weibaecker KN, Mihm MC Jr, Fisher DE. Microphthalmia transcription factor expression in cutaneous benign, malignant melanocytic, and nonmelanocytic tumors. *Am J Surg Pathol* 2001 Jan;25(1):51-57.
36. O'Reilly FM, Brat DJ, McAlpine BE, Grossniklaus HE, Folpe AL, Arbiser JL. Microphthalmia transcription factor immunohistochemistry: a useful diagnostic marker in the diagnosis and detection of cutaneous melanoma, sentinel lymph node metastases, and extracutaneous melanocytic neoplasms. *J Am Acad Dermatol* 2001 Sep;45(3):414-419.
37. Busam KJ, Iversen K, Berwick M, Spagnoli GC, Old LJ, Jungbluth AA. Immunoreactivity with the anti-MAGE antibody 57B in malignant melanoma: frequency of expression and correlation with prognostic parameters. *Mod Pathol* 2000 Apr;13(4):459-465.
38. Orosz Z. Melan-A/Mart-1 expression in various melanocytic lesions and in non-melanocytic soft tissue tumours. *Histopathology* 1999 Jun;34(6):517-525.
39. Jungbluth AA, Busam KJ, Gerald WL, Stockert E, Coplan KA, Iversen K, MacGregor DP, Old LJ, Chen YT. A103: An anti-melan-a monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol* 1998 May;22(5):595-602.
40. Busam KJ, Chen YT, Old LJ, Stockert E, Iversen K, Coplan KA, Rosai J, Barnhill RL, Jungbluth AA. Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 1998 Aug;22(8):976-982.
41. Evans MJ, Sanders DS, Grant JH, Blessing K. Expression of Melan-A in Spitz, pigmented spindle cell nevi, and congenital nevi: comparative immunohistochemical study. *Pediatr Dev Pathol* 2000 Jan-Feb;3(1):36-39.
42. Kageshita T, Kawakami Y, Hirai S, Ono T. Differential expression of MART-1 in primary and metastatic melanoma lesions. *J Immunother* 1997 Nov;20(6):460-465.
43. Fetsch PA, Fetsch JF, Marincola FM, Travis W, Batts KP, Abati A. Comparison of melanoma antigen recognized by T cells (MART-1) to HMB-45: additional evidence to support a common lineage for angiosarcoma, lymphangiosarcoma, and clear cell sugar tumor. *Mod Pathol* 1998 Aug;11(8):699-703.
44. Bonetti F, Colombiari R, Manfrin E, Zamboni G, Martignoni G, Mombello A, Chilosì M. Breast carcinoma with positive results for melanoma marker (HMB-45). HMB-45 immunoreactivity in normal and neoplastic breast. *Am J Clin Pathol* 1989 Oct;92(4):491-495.
45. Zimmer C, Gottschalk J, Goebel S, Cervos-Navarro J. Melanoma-associated antigens in tumours of the nervous system: an immunohistochemical study with the monoclonal antibody HMB-45. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;420(2):121-126.
46. Palmer AA, Hall BE, Lew M. A comparison of some methods for identifying amelanotic and oligomelanotic melanoma metastases in paraffin sections. *Pathology* 1985 Apr;17(2):335-339.

47. Fetsch PA, Marincola PM, Abati A. The new melanoma markers: MART-1 and Melan-A (the NIH experience). *Am J Surg Pathol*. 1999 May;23(5):607-610.
48. Bergman R, Azzam H, Sprecher E, Manov L, Munichor M, Friedman-Birnbaum R, Ben-Itzhak O. A comparative immunohistochemical study of MART-1 expression in Spitz nevi, ordinary melanocytic nevi, and malignant melanomas. *J Am Acad Dermatol* 2000 Mar;42(3):496-500.
49. Mehregan DR, Hamzavi I. Staining of melanocytic neoplasms by melanoma antigen recognized by T cells. *Am J Dermatopathol* 2000 Jun;22(3):247-250.
50. Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Boni R, Dummer R. Me-
- lan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Melanoma Res* 1998 Aug;8(4):337-343.
51. Kaufmann O, Koch S, Burghardt J, Audring H, Dietel M. Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. *Mod Pathol* 1998 Aug;11(8):740-746.
52. Shidham VB, Qi DY, Acker S, Kampalath B, Chang CC, George V, Komorowski R. Evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma: higher diagnostic accuracy with Melan-A and MART-1 compared with S-100 protein and HMB-45. *Am J Surg Pathol* 2001 Aug;25(8):1039-1046.