

MELANOTİK TÜMÖRLERİN TANISINDA S-100 PROTEİN'İN KULLANIMI

Uz. Dr. Taner KABADAYI • Prof. Dr. M Şerefettin CANDA • Prof. Dr. Tülay CANDA (*)

ÖZET: Bu çalışmada, formalin fikse, parafin gömülü normal ve tümör dokularında (14 kütanöz malign melanom, 2 lenf düğümünde metastatik melanom, 8 nevüs, 2 normal deri dokuları) hazırlanan kesitlere immunperoksidaz yöntemi ile rabbit anti sheep S-100 protein anti serumu uygulanmıştır. Bulgularımız, S-100 protein'in melanotik tümörler için duyarlı bir belirleyici olduğunu, özellikle amelanotik melanomların tanısında ve lenf düğümü ile, diğer organlardaki küçük metastatik odakların saptanmasında yararlı olduğu düşüncesini desteklemektedir.

SUMMARY: In this study, we sought S-100 protein in sections prepared from formalin fixed paraffin embedded tumor and normal tissues (14 cutaneous malignant melanomas, 2 metastatic melanoma in lymph nodes, 8 benign nevi, 2 normal skin tissues) by an immuno peroxidase technique with a rabbit anti sheep S-100 protein antiserum. It is suggested, therefore, that antibody to S-100 protein is the reagent of choice for demonstration of melanocytic tumours, and may be especially valuable in the diagnosis of amelanotic melanoma or in detected small foci of metastatic melanoma in lymph nodes and other tissues.

GİRİŞ

Histopatolojik incelemelerde malign melanom tanısında güçlüklerle karşılaşıldığı durumlar sık olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin, primer ve metastatik amelanotik melanomlarda, tümör hücrelerinin anaplastik karsinom, büyük hücreli lenfoma ve sarkomlara benzerlik göstermeleri nedeniyle ayırıcı tanı yapılamamaktadır. Primer kütanöz melanomlarda, junctional bağlantının ülserasyonla kaybolduğu olgularda, deri dışı alışılmadık yerleşim gösteren melanomlarda ve az sayıda kuşkulu melanom hücresi içeren biopsilerde melanin pigmentinin yokluğu da benzer tanı sorunları doğurmaktadır (1,3,5,7,10,16).

Bu nedenle, bu tür tanı sorunlarını çözmek amacıyla, melanotik kökenin gösterilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Melanin boyaları, flouresans, enzim histokimyası, doku kültürü ve elektron mikroskopik inceleme gibi yöntemler belirli yararlar sağlarsa da, istenilen duyarlılıkta sonuçlar elde edilememiştir (5,10,16). İmmunhistokimyasal yöntemlerin uygulamaya girmesiyle melanomlara özgü birçok monoklonal antikor geliştirilmiş olmakla birlikte, bunların duyarlılığının sınırlı olması ve diğer dokularla kros tepkimeye girmeleri nedeniyle sağlıklı sonuçlara varılamamıştır (8,14,15).

Günümüzde malign melanom tanısında en duyarlı ve yararlı yöntemin, dokularda S-100 proteinin gösterilmesi olduğu düşünülmektedir. Bu protein, her ne kadar melanotik tümörlere özgü olmasada, melanomların ayırıcı tanısında karıştırılabileceği karsinom, sarkom, lenfoma ve fibrohistiositik tümörlerin çoğunda bulunmamaktadır (2,7,11,14).

İlk kez, 1967'de Moore tarafından siçir beyini ekstratlarından elde edilen S-100 proteinin önceleri merkezi sinir sistemine özgü olduğu düşünülmüştür (11). Daha sonraları yapılan çalışmalarda ise Schwann, Langerhans, T-zon histiositer, myoepitelial ve satelliit hücreler ile liposit, kondrosit ve bazı ekzokrin bez epitellerinde S-100 proteinin varlığı gösterilmiştir. Bu hücrelerden köken alan tümörlerde de değişik yoğunlukta immunoreaktivite saptanmıştır (2,6,7,8,9,11,13).

(*) Dokuz Eylül Üniv. Tıp Fak. Patoloji ABD. İnciraltı-İZMİR

Biz, S-100 proteinin melanotik tümörlerin tanısındaki yerini belirlemek amacıyla, toplam 26 normal ve tümöral dokuda immün reaktiviteyi araştırdık ve literatür bilgileri ışığında sonuçlarımızı tartıştık.

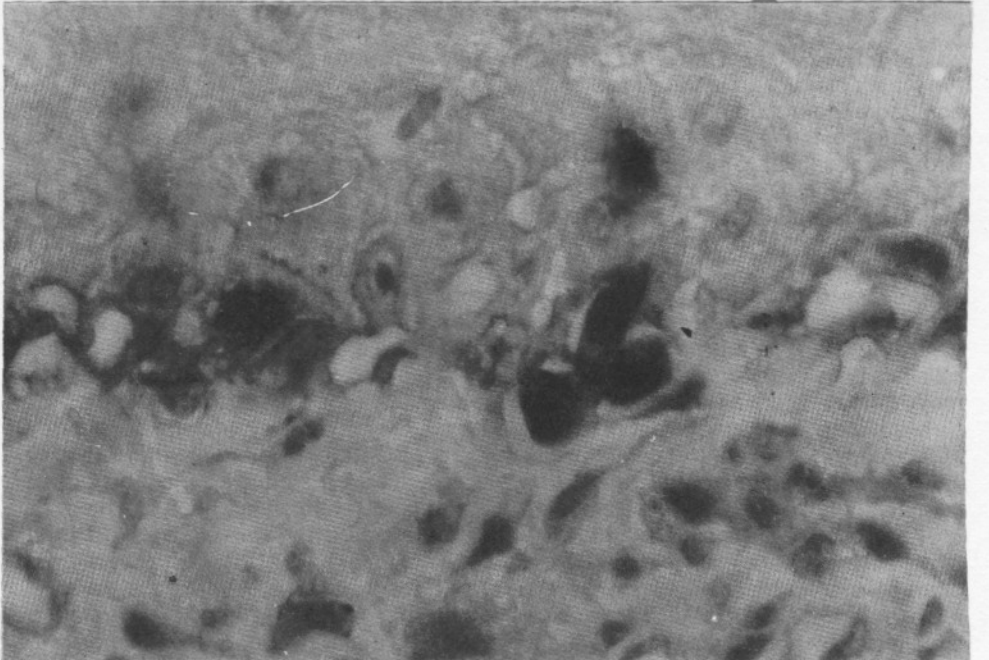
YÖNTEM VE GEREÇ

Çalışmada formalin fikse, parafin gömülü dokulardan yapılan 5 mikronluk kesitlere PAP yöntemi ile, Ortho Diagnostic Systems Inc'den sağlanan anti S-100 protein primer antikoru uygulanmıştır. Kullanılan diğer reaktifler (Hidrojen peroksit, normal koyun serumu, bağlayıcı antikor ve PAP kompleksi) Cambridge Research Laboratory'den sağlanmıştır.

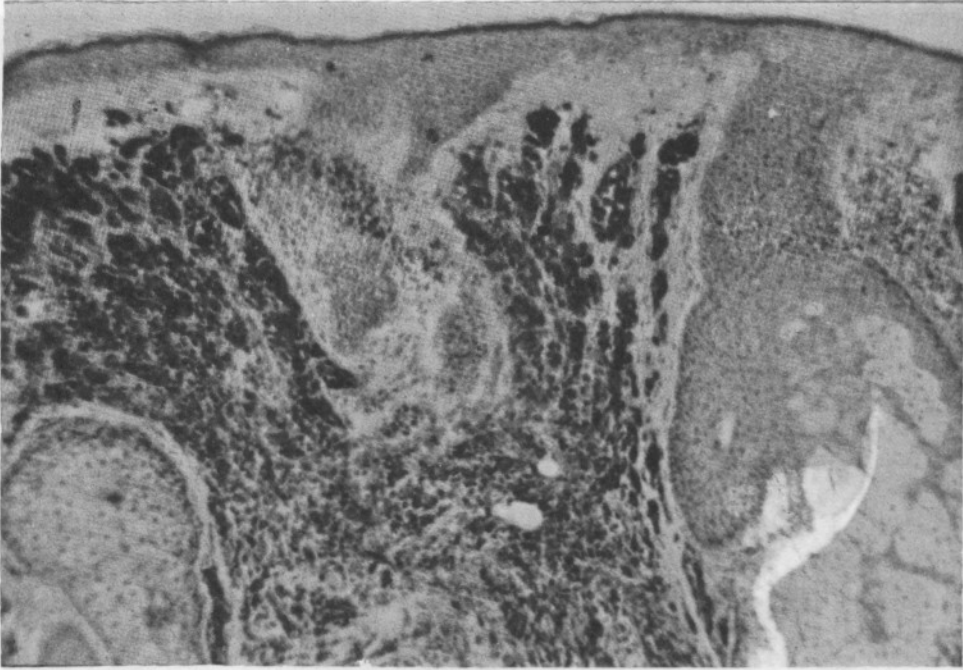
Araştırma kapsamında, 2 normal deri dokusu (melanositlerde sayıca artış gösteren, 8 nevüs (1 junctional, 1 compound, 3 intradermal, 1 blue, 1 neuro ve 1 Spitz nevüs), 14 kütanöz malign melanom (2 lentigo maligna melanoma, 2 superficial yayılan melanoma, 1 acral lentiginous melanoma, 9 nodüler melanoma) ve 2 metastatik melanom yer almaktadır. Malign melanom olgularının 2'si amelanotik, 5'i oligomelanotik olup diğer tümörler değişik alanlarda, farklı yoğunlukta melanin pigmenti içeriyorlardı.

BULGULAR

Normal deri dokularında, özellikle melanositlerin sayıca arttığı alanlarda kuvvetli boyanma gözlenmiştir. Nevüs olgularımızda değişik yoğunlukta immunoreaktivite izlenmiştir. En kuvvetli boyanma neuronevüste oluşurken, dermiste fibrokollagen doku içine yerleşmiş işçi hücrelerden oluşan blue nevüste zayıf granüler boyanma görülmüştür (Resim 1,2).



Resim 1: Normal deri dokusunda S-100 protein immunoreaktivitesi gösteren melanositler (H. E400X).



Resim 2: Intradermal nevüs hücrelerinde pozitif boyanma (H. E10X).

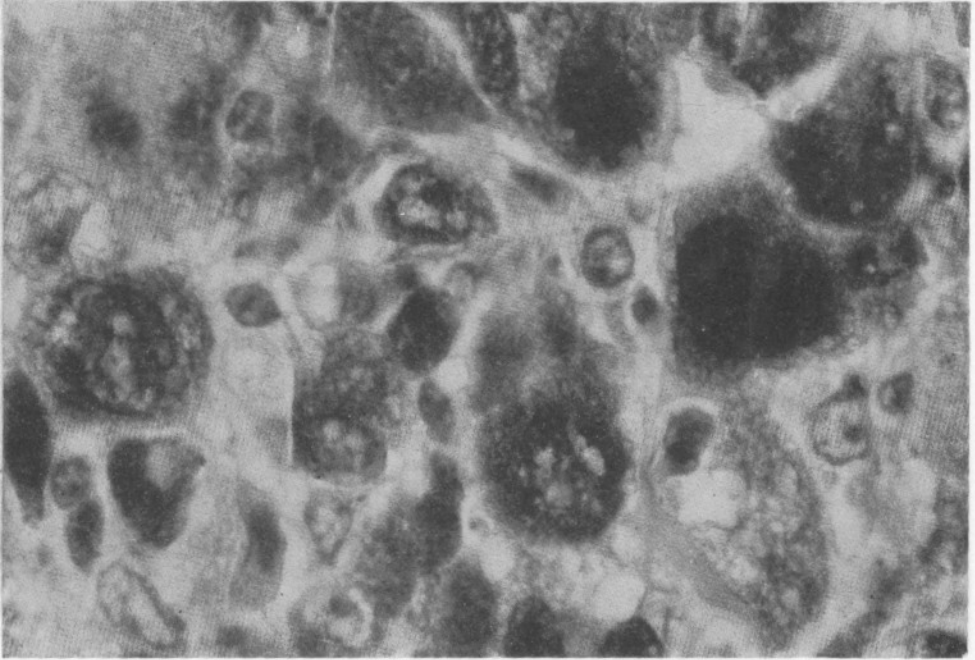
Tüm primer ve metastatik melanom kesitlerinde belirgin S-100 protein immunoreaktivitesi saptanmıştır. Boyanma, epitelooid hücreler kadar iğsi hücrelerde de kuvvetli reaksiyon oluşturmuştur. S-100 protein immunoreaktivitesinin tümörün pleomorfizmi ve melanin düzeyi ile bağlantılı olmadığı dikkati çekmiştir. Ayrıca, S-100 protein boyanması ile tümör dokusunun altında derin dermiste ve lenf düğümlerindeki okkult melanom hücrelerinin varlığı ortaya çıkarılmıştır (Resim 3).

TARTIŞMA

Amelanotik ve oligomelanotik melanomlarda görülen epitelooid hücreler anaplastik karsinom hücrelerine, iğsi melanom hücreleri ve desmoplazik melanomun hücreleri de yumuşak doku sarkomlarının hücrelerine büyük benzerlik gösterirler. Bunun yanısıra seyrek olarak görülen yuvarlak nükleuslu, küçük hücreli melanomları lenfomalardan, pleomorfik dev hücreli melanomları da malign fibröz histiositomlardan ayırd etmek çok güçtür (13,16). Örneğin Jundt ve arkadaşları, 16 amelanotik melanom olgusunu kapsayan bir araştırmada, immunhistokimyasal incelemeden önce, olgulara epidermoid karsinom, bronşiyal karsinom, küçük hücreli karsinom, leiomyosarkom, spindle hücreli sarkom, non-Hodgkin lenfoma tanılarını koyduklarını bildirmişlerdir (10).

Bu tür tanı zorluklarıyla sanıldığından daha sık karşılaşılmaktadır. Melanomların % 4'ünü oluşturan amelanotik melanomlar seyrek görülseler de, bunların % 12-29'u ilk bulgu olarak metastazlarla kendilerini gösterirler. Melanomların daha büyük yüzdesi ise oligomelanotiktir ya da melanin pigment içeriğinin farklı dağılım gösterdiği tümörlerdir. Ayrıca, bazı pigmenter melanomlar apigmenter metastazlarla ortaya çıktığı bilinmektedir (2,10,16).

Bir tümörün melanotik olduğunu kanıtlamak için kullanılan en eski yöntem olan Fonta-



Resim 3: Malign melanom hücrelerinde sitoplazmik S-100 protein boyanması (H. E100X).

na boyası ile, pozitif reaksiyon veren melanin granüllerinin gösterilmesi oligomelanotik melanomların tanısına yardımcı olabilmektedir (10). Melanin pigmentini gösteren Wartin-Starry boyama yöntemi ise, daha duyarlı olup oligo ve amelanotik tümörlerin % 56'sında olumlu sonuç verdiği bildirilmiştir. Ancak bu yöntem epoxy gömülü dokulardan yapılan ultratrom kesitlere uygulanabilmektedir (2).

Boyanmamış parafin kesitlerde izlenen formalince oluşturulmuş, melanin pigmentine özgü, altın sarısı renkteki flourosans melanotik kökeni gösterebilmektedir. Amelanotik melanomların % 44'ünde bu yöntemle flourosans saptanmıştır. Fakat flourosans veren pigmentin, melanom hücrelerinin stoplazmasına yerleştiğini belirlemek ve boyanmamış parafin kesitlerde benzer flourosans veren elastik fibriller, eritrositler, ter bezi, epitel hücreleri ile makrofajların granüllerinden ayırd etmek güç olabilmektedir (16). Görüldüğü gibi, yukarıda sayılan yöntemler melanin pigmentinin varlığında sonuç verebilmektedir ve hiç pigment içermeyen amelanotik melanomların tanı ve ayırıcı tanılarında yararlı değildirler.

Enzim histokimyasal yöntemler ile melanogeneziste tamamlayıcı enzim olan DOPA-oksidad tyrozinaze'nin dokularda gösterilmesi melanom tanısı koydurabilmektedir. Taze doku gerektiren bu yöntem, entim düzeyinin düşük olduğu ıgı hücreli malenomlarda boyanma oluşturmamakta, böylece yanlış-negatif sonuçlar alınmasına yol açmaktadır (2,10).

Kimi amelanotik melanomların doku kültürlerinde yoğun melanin pigmentinin izlenmesi tanıya yardımcıdır. Ancak bu yöntem taze doku ve teknik araç gerektirdiği, ve zaman alıcı olduğundan uygulama alanı sınırlıdır (2). Ayırıcı tanısı yapılamıyan apigmenter melanom olgularında, elektron mikroskobu incelemesi sorunu çözebilir. Melanositik hücrelerde melanozom ve premelanozomların görülmesinin tanı koydurucu özelliği bulunmaktadır. Bu-

nunla birlikte, kimi melanom hücrelerinde bu organeller gözlenmemektedir. Gözlenen melanozomların tümör hücrelerine yerleştiğine karar vermek de oldukça güç bir konudur. Makrofajlar, keratinositler, Schwann hücreleri de oldukça güç bir konudur. Makrofajlar, keratinositler, Schwann hücreleri de melanozom kompleksi içermektedirler. Periferik siir tümörleri, nöroblastom, parangangliom ve clear-cell sarkomlarda da benzer organeller görüldüğünden, bazen ayırıcı tanıya ulaşılammamaktadır. Çalışmalarda bazı olgularda, lizo- zomlar ve rezidüel cisimlerin yanlışlıkla melanozom olarak değerlendirilgi görülmüştür. Son olarak da, bu yöntemin elektron mikroskobu, taze doku, özel fiksatif ve uzman tek- nik eleman gerektirmesi uygulamada sorun yaratmaktadır (2,10,14,16).

Son yıllarda immunohistokimyasal yöntemlerin gelişmesiyle, melanomlara özgü NKI/ C-3, HMB-45, P 97 gib monoklonal antikorlar elde edilmiştir. Bu monoklonal antikorların melanom olgularının çoğunda immunoreaktivite oluşturmalarına karşın, kimi olgularda yanlış negatif sonuçlar vermeleri ve çok sayıda karsinom, lenfoma ve nöroendokrin tü- mörlerle çapraz reaksiyon vermeleri nedeniyle tanı değerleri sınırlıdır. Ayrıca tüm bu mo- noklonal antikorlar yalnız frozen kesitlere uygulanabilmektedir (2,7,10,14,17). Kimi mela- nom olgularında izlenebilen vimentin ve nöron spesifik enolaz (NSE), diğer tümörlerde de yaygın olarak bulunduğundan malign melanomların tanısında yararlı değildirlir (5).

Günümüzde, malign melanomların saptanmasında en pratik yöntem, S-100 protein'in immunohistokimyasal olarak gösterilmesidir. S-100 proteini, çalışmamızda da izlendiği gi- bi tüm melanotik tümörlerde gözlenmektedir. Bu protein melanotik tümörlere özgü olmasa da, ayırıcı tanıda melanomlar ile karıştırılabilen anaplastik karsinom, spindle cell sarkom ve large cell lenfomaların hemen hemen tümünde izlenmemektedir. S-100 proteini immun- histokimyasal olarak frozen ve parafin kesitler ile sitolojik yaymalara başarıyla uygulan- abilmektedir. Dokularda S-100 protein immunoreaktivitesi düzeyi melanomun pleomorfizmi ve melanin pigment yoğunluğuna bağlı değildir (3,8,13). Kaynaklardaki çok sayıda çalış- mada melanotik tümörler için çok yararlı bir belirleyici olduğu gösterilen S-100 proteinin diğer bir yararı, çalışmamızda da belirlediğimiz gibi, tümör dokusundan daha derinlere yayılmış tek tek tümör hücrelerini ve komşu lenf düğümlerindeki okkult metastazları orta- ya çıkartmasıdır. Cohran ve arkadaşları evre I'deki 100 hastadan alınmış lenf düğümlerin- de HE boyası ile hiç tümör hücresi görmezken, S-100 boyanması ile 2227 lenf düğümü- nün16'sında okkult melanom metastazı saptamışlardır. Benzer olarak, evre II'deki 36 ha- stadan alınan 794 lenf düğümünde HE ile 128'inde metastaz gösterilirken, bu sayı S-100 boyanması ile 362'ye çıkmıştır. Malign melanom olgularında prognoz Breslow ya da Clark yöntemiyle ölçülen tümör kalınlığı ile lenf düğümü metastazı ve sayısıyla bağlantılı oldu- ğundan, S-100 protein boyanması ile daha sağlıklı veriler elde edilebilir (3,4).

Kernohan ve arkadaşları, melanomlarda S-100 protein yoğunluğu ile yaşam süresi arasındaki bağlantıyı araştırmışlar ve S-100 protein'in ayrıca prognostik bir değeri olduğu- nu ileri sürmüşlerdir. Çalışmalarında 1 yıldan az yaşayan 13 melanom olgusunun 11'inde zayıf immunoreaktivite gözlerken, 10 yıldan uzun yaşayan 14 olgunun 12'sinde kuvvetli boyanma saptamışlardır (12).

Malign melanom olgularına ayırıcı tanı amacıyla S-100 protein uygulanırken, bu protei- nin normal ve neoplastik dokularda dağılımı göz önünde bulundurulmalıdır. Özellikle bazı meme ve tükrük bezi karsinomları S-100 proteini içerdiklerinden, tek bir belirleyici ile yan- lış sonuçlara ulaşılabilir. Günümüzde indifferansiye tümörlerin histogeneze ve ayırıcı ta- nısına ulaşmada tek bir belirleyiciye güvenmekten çok, geniş bir belirleyici paneli kullanıl- ması önerilmektedir. Sitokeratin, epithelial membrane antigen (EMA), leucocyte common antigen (LCA), vimentin, chromagranin gibi başlıca epiteliel, lenfoproliferatif, yumuşak doku ve nöroendokrin tümör belirleyicileri ile birlikte melanotik tümör belirleyicisi olarak S-100 proteinin kullanılmasıyla, malign melanomların tanı ve ayırıcı tanı sorunları sağlıklı bir biçimde çözülebilir.

KAYNAKLAR

1. Barbagli G, Natali A, Ursoc A, Barbanti G, Menchi I, Moroni F: Primary malignant melanoma of

- the female urethra. *Urol Int* 43: 110-112, 1988.
2. Cohran AJ, Wen DR: S-100 protein as marker for melanocytic and other tumours. *Pathology* 17: 340-345 1985.
 3. Cohran AJ, Wen DR, Hershman IIR: Occult melanoma in lymph nodes detected by antiserum to S-100 protein. *Int J Cancer* 34: 159- 163, 1984.
 4. Cohran AJ, Wen DR, Morton DL: Occult tumor cells in the lymph nodes of patients with pathologically stage I malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 12: 612-618, 1988.
 5. Duinen SG, Ruiter DJ, Hageman P, Vennegour C, Dickersin GR, Schefer E, Rümke P: Immunohistochemical and histochemical tools in the diagnosis of amelanotic melanoma. *Cancer* 53: 1566-1573, 1984.
 6. Dwarakanath S, Lee AKC, Delehs RA, Silverman ML, Frasca L, Wolfe HJ: S-100 protein positivity in breast carcinomas *Hum Pathol* 18: 1144-1148, 1987.
 7. Gatter KC, Ralfkiar E, Skinner J, Brown D, Heryet A, Pulford KAF, How JK, Mason DY: An immunohistochemical study of malignant melanoma and its differential diagnosis from other malignant tumours. *J Clin Pathol* 38: 1353-1357, 1985.
 8. Hachisika H, Sukomoto N, Nomura H, Mori O: Immunohistochemical study of S-100 protein and NSE in melanocytes and related tumors. *Acta Histochem* 80: 215-223, 1986.
 9. Herrera GA, Turbat HIEA, Loll RL: S-100 protein expression by primary and metastatic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 2: 168-176, 1989.
 10. Jundt G, Schulz A, Paul E, Cohran AJ, Herschman IIR: S-100 protein in amelanotic melanoma. *Path Res Pract* 181: 37-44, 1986.
 11. Kahn HJ, Marx A, Thom H, Baumul R: Role of antibody to S-100 protein in diagnostic pathology. *Am J Clin Pathol* 79: 341-347, 1983.
 12. Kernohan NM, Rankin R: S-100 protein: a prognostic indicator in cutaneous malignant melanoma. *Histopathology* 11: 1285-1293, 1987.
 13. Kindblom LG, Lodding P, Rosengren L, Baudier J: S-100 protein in melanocytic tumors. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sec A* 92: 219-230, 1984.
 14. Logmans HSC, Maijer CJ, Ruiter DJ, Mullink A: Diagnostic application of panels of antibodies in mucosal melanomas of the head and neck *Cancer* 61: 702-711, 1988.
 15. Paul E, Cohran AJ, Wen DR: Immunohistochemical demonstration of S-100 protein and melanoma associated antigens in melanotic nevi. *J Cutan Pathol* 15: 161-165, 1988.
 16. Pulmer AA, Hall BE, Lew M: A comparison of some methods for identifying amelanotic and oligomelanotic melanoma metastases in paraffin sections. *Pathology* 17: 335-339, 1985.
 17. Vennegerer C, Nohuijs HV, Ruiter DJ, Caletat J, Ringens PJ: A monoclonal antibody specific for cells of the melanotic lineage. *Am J Pathol* 130: 179-192, 1988.