

Yumuşak doku tümörlerinde immünhistokimya ve elektronmikroskopik, moleküler teknikler

Dr. Gökhan Gedikoğlu*

Morfolojik görünümündeki benzerlikler ve çakışmalar nedeniyle yumuşak doku neoplazmlarının tanısı ve klasifikasyonu hala patoloğlara zorluklar çıkarmaktadır. Işık mikroskobu ile bazı karsinomlar, melanomlar ve lenfomalar sarkomalara benzer bir morfolojiyi yansıtmaktadır. Deneyimli patoloğların bile; sadece ışık mikroskobu ile; %10-20 vakada, sarkomaların klasifikasyonunda başarılı olamadığı belirtilmektedir.^{1,2} Bu amaçla bu metinde yumuşak doku neoplazmlarında ayırıcı tanıda kullanılan immünhistokimyasal belirleyiciler, proliferasyon kinetiğine ilişkin birkaç örnek ile, elektron mikroskopik özellikleri vurgulanmaya çalışılmıştır.

Intermediate Filaments (IF)

IF ultrastrüktürel olarak saptanabilen düz veya hafif kıvrımlı 8-10 nm çapında filamanlardır. IF 6 ayrı grupta incelenmektedir, bunlar; asidik ve bazik keratinler, vimentin, desmin, glial fibrillary acidic protein, periferin, nörofilamanlar, laminler ve nestindir.

Mikrofilamanlar 5-7nm çapında olup, aktin bu gruptadır.

Mikrotubuller ise 22-25nm çapındadır ve sillerin aksonemini, sentriolleri ve içi cismi oluşturlar. Ayrıca nöronların axoplazmasında, nöroblastom, ganglionöroblastom, ganglionöroma ve primitif nöroektodermal tümörlerin (PNET) nöritik elemanları ile, Schwann hücre tümörlerinde bulunurlar.

Kontraktil bir protein olan "myosin" ise yaklaşık 15nm çapındadır ve düz/çizgili kas hücrelerinde mevcuttur.

Vimentin (57 kd)

Fibroblast, endotel hücreleri, kondrositler, lenfositler, histiositler, glial hücreler ve kas hücreleri ile bunların neoplazmlarında bulunur. Bütün mezankimal hücreleri tanıdığı için sarkomalar için ortak bir belirleyicidir. Ancak

bazen normal epitel hücrelerinde, melanomlarda, lenfomalarda, tiroid, böbrek, endometrium ve over karsinomlarında da ekspresyonu izlenmiştir. Panel olmaksızın tek marker olarak kullanıldığında tanısız değeri sınırlıdır.

Desmin (53kd)

Asidik bir protein olup, iskelet kası, kalp kası ve visceral düz kaslar ile kalbin iletim sistemindeki Purkinje lifleri ile bazı damarlarda bulunur. İmmünelektron mikroskopik olarak lokalizasyonunun çizgili kas hücresinde sarkomemal plaklar ve sarkomerlerin Z diski olduğu gösterilmiştir. Düz kas hücresinde ise plasmalemmal dens plaklar ile aktin filamanlarında bulunduğu saptanmıştır.

Desmin myojenik farklılaşmayı gösteren oldukça iyi bir belirleyicidir.

Keratinler

Epitel hücresinin ana komponentidir. 40-68 kd arasında değişen molekül ağırlıklarında yaklaşık 30 keratin grubu mevcuttur. Epitel hücreleri ve karsinomlar yanı sıra immünhistokimyasal olarak ve Western blotting ile bazı myometrial düz kas hücrelerinde, aterom plaklarındaki myofibroblastlarda ve fetal myokardial hücrelerde keratin varlığı gösterilmiştir.

Keratinler genellikle; sinovyal sarkomlarda, epitelioid sarkomlarda ve bazen de rabdomyosarkom, leiomyosarkom, mezotelyoma ile menenjiomada saptanmıştır. Nadir olarak da anaplastik large cell lenfoma, melanoma ve gliomalarda izlenmiştir.

Nörofilamanlar

Fosforile protein yapısında olup, 3 subuniti vardır (NFL, NFM ve NFH). Molekül ağırlıkları 68, 160 ve 200 kd'dır. Genellikle santral ve periferik sinir sistemindeki matür nöronların aksonlarında bulunur. Elektron mikroskopik olarak nöronların sitoplazmasındaki mikrotubuller ve de nöroblastomların, ganglionöroblastomların nöritik

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

elemanlarında izlenir. Ganglionöroma, ganglionöroblastoma, nöroblastoma, estezyonöroblastoma, medulloblastoma ve pinealomaların nöral komponentleri ile, Merkel hücreli karsinomada, pankreasın adacık hücreli tümöründe, karsinoid tümörlerde, küçük hücreli karsinomlarda da eksprese olmaktadır.

Aktin

Ökaryotik hücrenin mikofilamentöz iskeletindeki ana komponenttir. 6 izoformu vardır. Özellikle "skeletal muscle alpha", "smooth muscle alpha", "cardiac-alpha", ve "smooth muscle gama aktin" kas hücresinde eksprese olan izoformlarıdır. Leiomyosarkomlar ve rabdomyosarkomlar için oldukça duyarlı bir belirleyicidir.

Myosin (460-500kd)

Adenozin-trifostataz gibi enerji üretiminde rol alan bir enzimdir. İki ağır ve iki hafif zincirden oluşan hexamerik bir yapısı vardır. Kas hücresi yanı sıra, trombosit, fibroblast, granülosit ve endotel hücrelerinde de bulunur. Düz ve çizgili kasa özgü iki tipi vardır.

Polimorfik epitelyal mûsin

"Tumor-associated" mûsinlerden olup, laktasyonda olan meme epitel hücresinden ve diğer gland epitellerinden üretilmektedir. Bu gruptaki en önemli belirleyici **epitelyal membran antijen (EMA)** olup, EMA epitelyal neoplazmlar yanı sıra, mezotelyomalar, meningiomalar, epiteloïd sarkomlar, sinovyal sarkomlar, Ki-1 lenfomalarda da gösterilmiştir.

Endokrin Belirleyiciler

Enolaz, glikolitik "pathway"de rol alan dimerik bir enzimdir. 5 tipi vardır. Gama subuniti **Nöronspesifik enolaz (NSE)** olarak tanımlanmıştır. Bu enzim ilk olarak beyinde, daha sonra da nöroendokrin hücrelerde ve bunların tümörlerinde (nöroblastom, feokromositoma, paraganglioma) belirlenmiştir. Günümüzde NSE düz kas hücresi, trombositler, lenfositler, bazı epitel hücreleri gibi nonendokrin hücrelerde; böbrek, meme ve over karsinomu, seminom, kordoma, leiomyosarkom, rabdomyosarkom, alveolar soft part sarkoma (ASPS) ve bazı lenfomalar gibi nonendokrin neoplazmlarda eksprese olduğu gösterilmiştir.

Kromograninler (Cg)

Endokrin hücrelerin sekreter granüllerinde bulunan bir asidik peptid grubudur. Kromogranin-A endokrin farklılaşmayı gösteren iyi bir belirleyicidir. Endokrin pankreas tümörlerinde Grimelius boyası ile kromogranin arasında kuvvetli bir korelasyon saptanmıştır. Merkel hücreli karsinom, nöroblastoma ve küçük hücreli karsinomda da kromogranin izlenir.

Sinaptofizin

Siğir beyindeki presinaptik veziküllerden izole edilmiş bir glikoproteindir. Nöroendokrin hücrelerde ve bunların tümörlerinde izlenir. Melanomlarda eksprese olması avantajdır. Ancak formalin fiksasyonunda büyük ölçüde inaktive olur, alkol fiksasyonunda iyi korunur.

"Natural killer" lenfositleri tanımlamakla beraber, nöroendokrin hücrelerde, karsinoid tümörler ve küçük hücreli karsinomda da izlenir. Ayrıca daha nadiren fibrosarkom, leiomyosarkom, sinovyal sarkom, melanomlar, malign periferik nöroektodermal tümörler. Ewing sarkom, prostat karsinomu ve bazı meme karsinomlarında tanımlanmıştır.

CEA (Karsinoembriyonik Antijen, 180kd)

Başlangıçta fetal GIS ve kolon karsinomunda bulunduğu düşünülen CEA'nın günümüzde kolon, mide, akciğer, meme, endometrium, over adenokarsinomlarında, tiroïd medüller karsinomunda eksprese olduğu bilinmektedir. Ayrıca sinovyal ve epiteloïd sarkomlarda da bulunur. Lenfoma ve melanomlarda ise izlenmez.

Endotelyal Belirleyiciler

FVIII R Ag (1000kd)

Pıhtılaşma sistemindeki F8 kompleksinin bir parçasıdır. Endotel hücresi, megakaryositler, trombositler ve endotel kökenli tümörlerin tanısında kullanılmaktadır. Glomeruler endotel hücreleri ile (-), büyük damarların ve dalak, karaciğer sinüsoidlerinin endotelleri ile zayıf bir reaksiyon verir. Anjiosarkomların hepsiyle de reaksiyon vermez.

UEAI (Ulex europaeus agglutinin I)

Bir lektin olup, oldukça duyarlı bir endotelyal belirleyicidir. Anjiosarkomlarda duyarlılığı yüksektir. Ancak bazı karsinomlar da UEAI'e duyarlıdır.

Thrombomodulin

UEAI'e göre endotel hücresine daha özgül ancak daha duyarlı bir belirleyicidir. Normal endotel hücreleri yanı sıra normal plasenta, mezotel hücreleri ve mezotelyomalarda da eksprese olur.

S100 protein

Siğir beyinden izole edilmiş olup, %100'lük amonyum sülfatta solubl hale geldiği için bu ismi almaktadır. S-100 protein hücre siklusunda, farklılaşmasında ve "cytoskeleton-membrane" etkileşiminde rol alan kalsiyum yüklü modulator bir proteindir. Glial, Schwann hücreleri ile kondrosit, adiposit ve bazı histiositlerde, melanositlerde eksprese olur. Dolayısıyla malign melanom, glioma, Schwann hücre tümörleri, liposarkomlar, histiositozis-x, kıkırdak tümörleri ve kordomalarda, ayrıca bazı karsi-

nomlar, sinovyal sarkomlar, leiomyosarkom ve rabdomyosarkomlarda (+) sonuç verirler.

LCA (Leukocyte common antijen, T-200, CD45)

T ve B lenfositlerin çoğunu tanımlar. Birbiri ile ilişkili 4 glikoprotein grubundan oluşur. Granülosit, timosit, makrofaq, monosit ve immatür eritroid hücreler gibi kemik iliği kökenli hücrelerin yüzeyinde izlenir.^{1,2,3,4}

PCNA (Cyclin)

36kd ağırlığında, nonhiston nükleer bir protein olup, S evresinde DNA sentezi ile korele olarak exprese olmaktadır.^{5,6}

MPM2 (Monoclonal antibody to proteins of mitotic cells)

70kd, 118kd, 182kd ağırlıklarında olup, nonhiston polipeptid yapısındadır. G2-M evrelerinde exprese olmakta olup, sitoplazmik bir boyanma göstermektedir.

P53

53kd ağırlığında nükleer bir fosfoprotein olup, 17 kromozomun kısa kolunda lokalizedir ve S-evresinde exprese olmaktadır. Hücre proliferasyonunda düzenleyici bir rolü vardır. P34 kinase ile birlikteliğinde hücrenin G0/G1 evresinden S/mitoz evresine geçişte rol aldığı düşünülmektedir. Ayrıca neoplastik transformasyonda p53 gene mutasyonlarının olduğu gösterilmiştir.

RABDOMYOSARKOMA

Myoglobin iskelet kasına spesifik olmasına rağmen, sadece iyi diferansiye tümörlerde exprese olmaktadır. Yalancı (+) olarak tümörle infiltre nekrotik kas liflerinde izlenebilir.

Fosfokinaz-MM, Kreatinin fosfokinaz-BB protein-Z de rabdomyosarkomada izlenir, ancak hiçbirisi spesifik değildir.

%50-100'ü desminle (+) reaksiyon verir. Bu oran tümörün diferansiyasyonuna, dokunun bu antikora olan afinitesine bağlıdır.

Muscle-specific actin düz kasda exprese olmasına rağmen sıklıkla rabdomyosarkomada da kullanılır.

Titin; sarkomerik kas proteinlerinin ana öğelerinden biridir. Çizgili kas ve rabdomyosarkomada (+) olması, düz kas ve tümörlerinde (-) olması avantajı, dondurulmuş dokuda çalışması ise devazantajdır.

Myo D1; çizgili kas hücrelerinde exprese olan, nükleusun fosfoprotein yapısında bulunan regülatör bir genidir. Ancak dondurulmuş dokuda değerlendirilebilmektedir.

Elektron mikroskopisinde (EM) ise; İnce aktin, kalın myosin filamanları ve "Z band substance" izlenmektedir.

LEİOMYOSARKOMA

Desmin pozitifliği %0-85 arasındadır. "Anti-muscle-specific actin" desminden daha duyarlıdır.

EM: İnce aktin filamanları, "dense body", "attachment" plakları ve nükleusun "cigar" şeklinde olması ile karakterizedir.

MALİGN SCHWANNOMA

S-100 protein, myelin basic protein ve Leu-7, M. Schwannoma tanısında kullanılmakla beraber spesifik değildir ve duyarlılıkları düşüktür.

EM: Nörofilaman tipi IF ve pinositik veziküller ile karakterizedir.

ANJİOSARKOMA

Klasik vazoformative anjiosarkomalarda tanı kolaydır. Ancak solid ve epiteloid ve/veya içsi hücrelerden oluşmalarında tanı güçtür. FVIII R Ag yardımcı bir belirleyicidir, ancak solid olanlarında %20 oranında (-)'dir.

UEAI daha az özgül olmasına rağmen, hemen tüm endotelial tümörlerde izlenir. Ancak UEAI bazı karsinomlarda da izlenmektedir.

Thrombomodulin ve CD34 ayırıcı tanıda kullanılan diğer belirleyicilerdir.

EM: Endotelial tipte hücreler, perisitler ve Weibel-Palade cisimleri ile karakterizedir.

YUMUŞAK DOKULARIN MELANOMU

Derinin melanomuna benzer patternededir. Bunlarda da pigmente melanoma cell line'i Mel-1'e karşı geliştirilmiş olan HMB-45 exprese olmaktadır. İlginç olmak üzere HMB-45 melanositlerle, intradermal nevüslerle reaksiyon vermezler, ama junctional nevüste, Spitz nevüste, blue nevüste ve melanomlarda (+) reaksiyon gösterirler.

EM: Premelanozom ve melanozomlar ile karakterizedir.

FİBROSARKOMA

Vimentin exprese ederler, ayrıca çoğunda fokal "smooth muscle actin" pozitifliği bulunur, bu da myofibroblastik farklılaşmayı gösterir. Schwann hücre tümörlerinden ayırımında S-100, içsi hücreli karsinom ve monofazik sinovyal sarkomdan ayırımında ise keratin faydalı belirleyicilerdir.

EM: Homojen bir hücresel popülasyona sahip olup, hücreler düz endoplazmik retikulumdan zengindir ve hücreler arasında kollajen lifleri mevcuttur.

MALİGN FİBRÖZ HİSTİOSİTOM (MFH)

Alpha-1 antitripsin ve antikimotripsin histiositik hücreleri gösterebilir. MFH.ların %50'inden çoğunda "alpha-smooth muscle actin" pozitifliği (myofibroblastik diferansiyasyon) gösterilmiştir.

Tablo I: İğsi hücreli neoplazmlarda immünohistokimyasal bulgular

	FVIII	UEAI	Desmin	Aktin (SMA)	Vimentin	Keratin	S100
Fibrosarkoma	—	—	—	+	+	—	—
Leiomyosarkoma	—	—	+	+	+	+/-	+
Hemangioperistoma	—	—	—	—	+	—	—
Synovial sarkoma	—	—	—	—	+	+	+
Spindle cell angiosarcoma	+	+	—	—	+	+/-	—
M. Schwannoma	—	—	+/-	+/-	+	—	+
Karsinoma	—	+	—	—	+	+	—

Tablo II: Yuvarlak hücreli neoplazmlarda immünohistokimyasal bulgular

	Keratin	EMA	Vimentin	NF	NSE	Desmin	S-100	Cg	LCA
Neuroblastoma	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Karsinoma	+	+	-	+	+	-	-	+	-
Rhabdomyosarcoma	+/-	-	+	+/-	+	+	+	-	-
Ewing's sarcoma	+/-	-	+	-	+	-	+	-	-
Lenfoma	-	+	+	-	+	-	+	-	+
Melanoma	+/-	-	+	-	+	-	+	-	-

Tablo III: Malign yuvarlak hücreli tümörlerde ultrastrüktür

	Nöroblastoma	Ewing's Sarkoma	Rabdomiyosarkom	Lenfoma	Küçük hücreli karsinom
Hücre elemanları	Belirgin, dendritik	Belirsiz	Belirsiz	Belirsiz	+
Intersellüler junction'lar	Desmozomal, sinaptik	Nadir, membrana bitişik küçük kalınlaşmalar	Genellikle belirsiz, alveolar tipte desmozomal	-	Dağınık, intermediate ve desmozomal
Filamanlar	Nörofilamanlar (8-12nm)	-	Aktin (5-6nm) Myosin (15nm) Z-band	-	Belirsiz
Mikrotübüller	Nörotübül	Belirsiz	Belirsiz	Belirsiz	Belirsiz
Granüller	Nörosekretuar (90-240nm)	Nadiren lizozomlar	Nadiren lizozomlar	Nadiren lizozomlar	Sporadik nörosekretuar (80-200nm)
Glikojen	Belirsiz	+	Genellikle belirgin	Belirsiz	Belirsiz
		Gölcükler tarzında ve rozet formasyonu	"Monoparticulate"		
Kromatin	Dağınık	Dağınık	Kondanse	Dağınık	Kondanse
Nukleolus	Küçük	Küçük/filamentöz	Belirgin	Orta/geniş çaplı	Belirsiz

EM: Heterojen bir hücresel popülasyona ve dolayısıyla heterojen hücresel elemanlara (lizozom, lipid vakuoller) sahiptir.

SİNOVİYAL SARKOMA

Monofazik tipi fibrosarkom, M. Schwannom, hemanjioperistoma ve leiomyosarkoma ile karıştırılabilir. Keratin sadece epitelial hücrelerde değil, iğsi hücrelerde de ifade olabilir. Bifaziklerin epitelial komponentlerinde EMA reaksiyonu izlenebilir. CEA ise nadiren monofazik iğsi hücrelerde ifade olmaktadır.

EM: Bazal lamina, glandlardakine benzer lümen, mikrovillus tarzında projeksiyonlar mevcuttur.

EPİTELOİD SARKOMA

Vimentin ve keratin aynı hücrede reaksiyon göstermektedir. Bazen EMA pozitifliği de izlenebilir.

ALVEOLER SOFT PART SARCOMA (ASPS)

Desmin ekspresyonu genellikle fokaldir. Ayrıca Myo D1 ekspresyonu da kas orijini destekler niteliktedir.

EWING'S SARKOMA

LCA lenfomalarından, desmin rabdomyosarkomalarından ayırt edilmesinde faydalıdır.

HBA-71; PNET hücrelerinden üretilmiştir. Kısmen Ewing's sarkomada kısmen de PNET'lerde belirlenmesi, bu iki neoplazmin aynı kökenden geldiğini düşündürmektedir. Her ikisinde de 11 ve 22 kromozomların uzun kolunda t(11;22) (q24;q12) resiprokal translokasyonu veya

kromozom 22'nin uzun kolunda delesyon mevcuttur.⁷ Ayrıca yine her ikisinde MIC2 gen overekspresyonu izlenir.

EM: Bol "nonmembrane bound" glikojen granülleri

Tablo 1 ve 2'de içsi hücreli ve yuvarlak hücreli neoplazmların immünohistokimyasal olarak ayırıcı tanısı, Tablo 3'de ise yuvarlak hücreli neoplazmlardaki elektron mikroskopik bulgular⁸ özetlenmektedir.

KAYNAKLAR

- 1 - Ordonez NG. Immunocytochemistry in the diagnosis of soft tissue sarcomas Cancer Bull 1993; 45: 13-23.
- 2 - Miettinen M. Immunohistochemistry of soft tissue tumors. Possibilities and Limitations in Surgical Pathology. Pathology Annual 1990; 25: 1-35.
- 3 - Meckersheimer G. Towards the phenotyping of soft tissue tumors by cell surface molecules. VA Pathol Anat. 1991; 419: 7-28.
- 4 - Ardenne A, Kirkpatrick P, Sykes BC. Distribution of laminin, fibronectin and interstitial collagen type III in soft tissue tumors. J Clin Pathol 1984; 37: 895-904.
- 5 - El-Naggar A. DNA flow cytometric analysis in the assessment of soft tissue neoplasms Cancer Bull 1993; 45: 24-28.
- 6 - Sahin AA, Ro JY, Brunner J. Morphologic assesment of tumor proliferative fraction. Cancer Bull 1993; 45: 37-43.
- 7 - Molenaar WM, Dejong B, Buist J et al. Chromosomal analysis and the classification of soft tissue sarcomas. Lab Invest. 1989; 60: 266-274.
- 8 - Nash AD. Soft Tissue Sarcomas, 1st ed, New York: Raven Press, 1989; 223-257.