

MALIGN MELANOM İLE SPITZ NEVUS VE ATİPİK SPITZ TÜRÖR AYRIMINDA Ki-67 VE P53'ÜN DEĞERİ

Dr. Taner AKALIN, Dr. Ayla YÜCETÜRK, Dr. Gülşen KANDİLOĞLU

ÖZET: Bu çalışmada; 22 nodüler malign melanom (NMM), 25 Spitz nevus (SN) ve 8 atipik Spitz tümör (AST) olgusuna immunhistokimyasal yöntemle Ki-67 (MIB-1) ve p53 (D0-7) uygulandı. P53 immunreaktivitesi açısından, NMM ile SN arasındaki fark anlamlı iken ($p=0,0001$), NMM ile AST arasındaki fark anlamlı değildi. Ki-67 indeks değerleri, NMM ile AST ($p=0,013$) ve NMM ile SN ($p=0,0001$) arasında anlamlı idi. AST ile SN arasında p53 değerleri istatistiksel olarak farklı iken ($p=0,0002$), Ki-67 değerleri açısından fark saptanmadı. Malign melanom ile AST ve SN histopatolojik ayrımında Ki-67 ve p53'ün immunhistokimyasal olarak değerlendirilmesi konvansiyonel histolojik bulgulara yardımcı yöntemlerdir. Özellikle atipik Spitz tümör olguları düşünüldüğünde Ki-67, p53'e göre daha değerlidir. Histolojik olarak Spitz nevustan farklı yönleri olan ancak konvansiyonel malign melanom tanısı koymak için yeterli bulgunun olmadığı olguları atipik Spitz tümör olarak adlandırmanın uygun olduğu düşüncesindeyiz. Bu olgulara reeksizyon ve klinik takip önermek uygun olacaktır.

ANAHTAR KELİMELE: Spitz nevus, malign melanom, immunhistokimya, Ki-67, p53.

SUMMARY: UTILITY OF Ki-67 AND p53 IN DISTINGUISHING BETWEEN MALIGNANT MELANOMA, SPITZ NEVUS AND ATYPICAL SPITZ TUMOR. In this study, immunohistochemically Ki-67 (MIB-1) and p53 (D0-7) were applied to 22 nodular malignant melanomas (NMM), 25 Spitz nevi (SN) and eight atypical Spitz tumors (AST). In terms of p53, a significant difference was found between NMM and SN ($p=0,0001$), but the difference between NMM and AST was insignificant. Ki-67 index values were significant between NMM and AST ($p=0,013$), and also between NMM and SN ($p=0,0001$). The p53 values have significant difference between AST and SN ($p=0,0002$), but not the Ki-67 values. Immunohistochemical detection of Ki-67 and p53 are additional means to conventional histopathologic findings to differentiate between malignant melanoma, SN and AST. Specially considering AST cases, Ki-67 is more valuable than p53. We think, it is reasonable to label the cases as atypical Spitz tumor which have different aspects from Spitz nevus but also have no sufficient findings to be diagnosed as conventional malignant melanoma. It is reasonable to suggest reexcision and clinical follow-up for these cases.

KEY WORDS: Spitz nevus, malignant melanoma, immunohistochemistry, Ki-67, p53.

GİRİŞ

Spitz nevus, özellikle sitolojik detayda malign melanoma benzeyen ancak gelişim paterni ve kliniği ile malign melanomdan ayrımı genellikle mümkün olan bir lezyondur. Bazı lezyonlarda mevcut histolojik bulgularla bu ayrımı yapmanın mümkün olmadığı belirtilmiştir (1-3). Spitz nevus malign melanom ayrımında Ki-67 ve p53 gibi immunhistokimyasal (İHK) belirleyicilerin katkısı araştırılmıştır (4-9).

Bu çalışmada bir grup Spitz nevus, nodüler malign melanom (NMM) ve atipik Spitz tümör (AST) olarak adlandırılan ara olguya Ki-67 (MIB-1) ve p53 (D0-7) uygulandı. Söz konusu immunhistokimyasal belirleyicilerin NMM ile SN ve AST olgularının ayırıcı tanısına katkısı araştırıldı.

MATERYEL ve METOD

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1980 ile 1999 yılları arasında tanı almış olgular arasından 25 Spitz nevus (SN), 22 nodüler malign melanom (NMM) ve 8 atipik Spitz nevus-Spitzoid minimal deviasyon melanom spektrumunda yer alan ve atipik Spitz tümör (AST) olarak adlandırılan ara olgu olmak üzere seçilen 55 olguya immunhistokimyasal yöntemle Ki-67 (MIB-1) ve p-53 (D0-7) uygulandı.

Formalin ile fikse edilip parafine gömülmüş dokulardan alınan kesitler bir gece etüvde (60°C) bekletildikten sonra deparafinize ve rehidrate edildi. Antijen retrieval amacıyla, mikrodalgada (600 watt) Ki-67 için 5 kez 5 dakika, p53 için 2 kez 5 dakika sitratlı solüsyon (pH:6) içinde muamele edildi. Soğuya bırakılan kesitler daha sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %3'lük hidrojen peroksit içinde yarım

saat bekletildi. Primer antikor ile (Ki-67 için Dako, MIB-1, 1/100 dilüsyon; p53 için Dako, D0-7, 1/100 dilüsyon) oda sıcaklığında yarım saat muamele edilip tris buffer ile iki kez 5 dakika yıkandıktan sonra sekonder antikor (Dako LSAB 2) ile 15 dakika muamele edildi. Daha sonra tekrar tris buffer ile yıkayıp streptavidin solüsyonu ile 15 dakika muamele edilip tekrar tris buffer ile yıkandı ve Ki-67 için diaminobenzidin, p53 için AEC kromojeni kullanılarak hematoksilin ile zıt boyaması yapıldı. Sayım iki araştırmacı tarafından yapıldı ve birbirine yakın değerlerin ortalaması alındı. Eğer fark %5'ten fazla ise preparat iki gözlemci tarafından tekrar değerlendirildi. Sayım işlemi p53 için 100'lük büyütmede tüm kesit taranıp en yoğun boyanmanın olduğu 2-4 alan seçilip 400'lük büyütmede zemindeki tüm hücelere oranı verildi (En az 1000 hücre olmak üzere). Yüzlük büyütmede pozitiflik saptanamadığı takdirde tüm kesit 200'lük büyütmede tekrar tarandı ve tüm kesitte net olarak seçilebilen 3 nükleer boyanma saptandığında %1 değeri verilerek pozitif kabul edildi. Ki-67 için epidermisteki bazal hücreler ve deri ekleri iç kontrol olarak kabul edildi ve iç kontrolünde pozitiflik saptanmayan 2 SN, 6 NMM ve 3 AST olgusu değerlendirmeye alınmadı. Değerlendirmeye alınan olgularda 100'lük büyütmede tüm kesit tarandı ve en yoğun boyanan 2-4 büyük büyütme ($\times 400$) alanındaki tüm hücelere oranı verildi (En az 1000 hücre olmak üzere).

Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W ve Kruskal-Wallis istatistik yöntemi kullanıldı ve $p<0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Olgulara ait immunhistokimyasal pozitiflik oranları Tablo 1'de verilmektedir. Gruplar arasındaki Ki-67 ve p53 oranları arasındaki istatistiksel değerler Tablo 2'de verilmektedir.

Spitz nevus olgularında p53 pozitifliği saptanmadı. Atipik Spitz tümör olgularının yarısında ve herbirinde %2 oranında pozitiflik saptandı. NMM olgularının 15'inde (%68) p53 ile pozitif sonuç alındı. Değerler %1-16 arasında değişiyordu ve %2'den fazla pozitiflik olguların 5'inde saptandı (Resim 1).

TABLO 1: OLGULARIN TÜMÖR KALINLIĞI, Ki-67 ve p53 DEĞER ORTALAMALARI

	Tümör kalınlığı (mm) (Breslow'a göre)	Ki-67 (%)	P53 (%)	P53 (+) olgu yüzdesi
Spitz nevus	2,4±1,1	2,2±3,5	0	0 (0/26)
Atipik Spitz tümör	5,7±3,2	3,5 ±3,0	1,0±1,0	%50 (4/8)
Nodüler Melanom	6,2±5,3	16,8±11,8	2,4±3,9	%68 (15/22)

TABLO 2: Ki-7 ve p53 PARAMETRELERİNİN GRUPLAR ARASINDAKİ P DEĞERLERİ

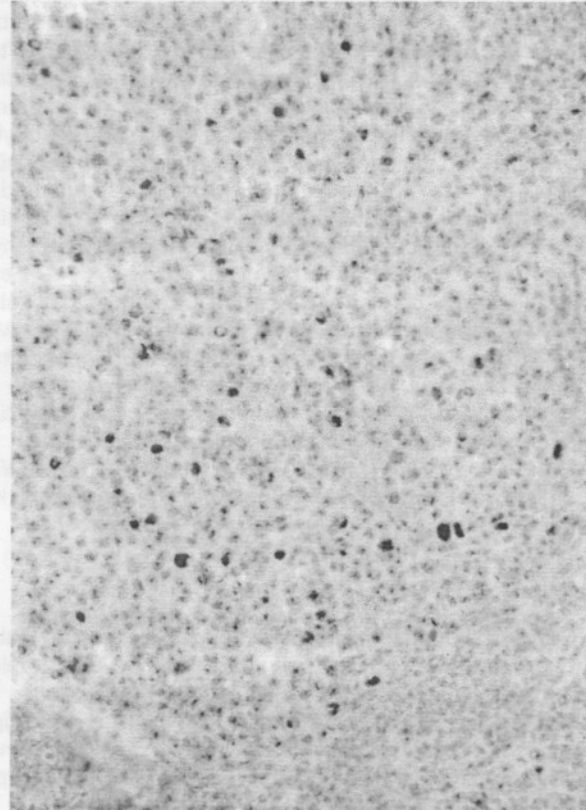
	Ki-67	P53
SN ile AST*	P=0,132	P=0,0002
SN ile NMM*	P=0,0001	P=0,0001
NMM ile AST*	P=0,013	P=0,435
SN, NMM ve AST**	P=0,0001	P=0,0093

SN: Spitz nevus, NMM: Nodüler malign melanom, AST: Atipik Spitz tümör.

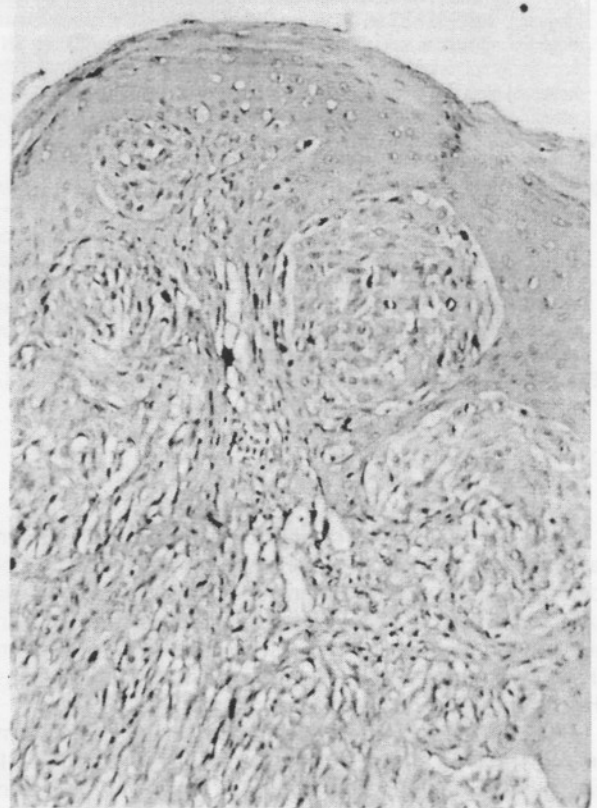
* Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W İstatistik Yöntemi

** Kruskal-Wallis İstatistik Yöntemi

Nodüler malign melanom olgularında Ki-67 immunreaktivitesi, SN ve AST olgularına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek idi (Tablo 2). Ki-67 değerleri SN olgularının 16'sında %1 ve altında, 4'ünde %1-5 arasında, 3 olguda %10-12 arasında saptandı (Resim 2). Pozitif hücreler genelde yüzeysel dermiste lokalize olup, iki olguda derin dermiste birbirinden ayrı birkaç hücrede pozitiflik saptandı. NMM olgularında Ki-67 pozitif hücrelerin dağılımı açısından yüzeysel ve derin dermis arasında bir fark saptanmadı (Resim 3). AST olgularında Ki-67 değerleri 4 olguda %5 veya altında iken, 1 olguda



Resim 1: Malign melanom olgusunda nükleer p53 pozitifliği (x200).



Resim 2: Spitz nevus olgusunda %10 oranında nükleer Ki-67 pozitifliği (x200).

bulgular ile karakterli tipik Spitz nevus olgusu, Resim 4'te gösterilmektedir. Konvansiyonel Spitz nevusta beklenen bulgulardan farklı yönleri olan 8 AST olgusuna ait bulgular Tablo 3'te verilmektedir. Söz konusu kriterlerden orta-fokal belirgin sitolojik atipi Resim 5'te görülmektedir.

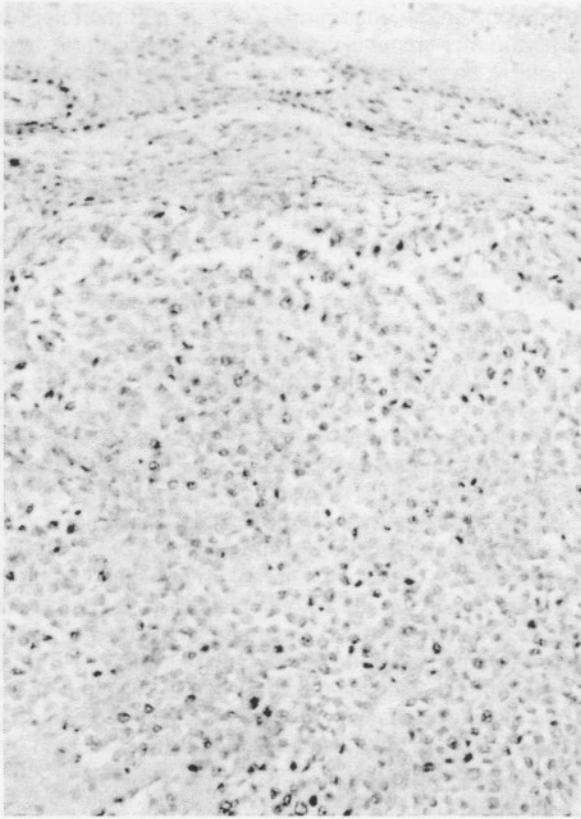
Bir, iki, dört, altı ve yedi no'lu olguların, takipleri yoktur. Üç, beş ve sekiz no'lu olgulara bir-üç cm çevre normal dokuyu içeren reeksizyon uygulandı. Sırasıyla sekiz yıl, on yıl ve ondört aylık takipte nüks saptanmadı.

TARTIŞMA

Melanositik lezyonlarda p53 aşırı ekspresyonu immun-histokimyasal yöntem ile araştırılmış ve oldukça değişken sonuçlar elde edilmiştir. Malign melanom olgularında p53 pozitifliği ile ilgili %5 ile %97 arasında değişen oranlar verilmiştir (10,11). Benign melanositik lezyonlarda da p53 pozitifliği saptanabildiği belirtilmiş ve bu oran Spitz nevus (SN) olguları için %0 (0/7), %7 (2/26) %14 (1/7) ve %30 (3/10) olarak verilmiştir. Aynı çalışmalarda malign melanom olguları için pozitiflik oranları sırasıyla %41 (11/27), %31 (8/26), %35 (20/58) ve %72 (13/18) olarak belirtilmiş ve malign melanom ol-

%8 saptandı. Ki-67 değerleri NMM olgularının 4'ünde %2-8 arasında, 3'ünde %9-15 arasında, 9'unda %15 ve üzerinde saptandı. Ki-67'nin istatistiksel değerlendirmesinde AST olguları ile SN olguları arasında anlamlı bir fark yoktu (Tablo 2).

"Raining down" paterni, yuvalar etrafındaki ayrılma artefaktı, epidermis ile düzenli ilişki gibi konvansiyonel Spitz nevus lehine



Resim 3: Malign melanom olgusunda nükleer Ki-67 pozitifliği (x200).



Resim 4: Tipik Spitz nevus olgusunda "raining down" patern ve ayrılma artefaktı (HE x100).

gularında daha güçlü ve yüksek oranda pozitif olduğu belirtilmiştir (4,7). Malign melanomda p53'ün immunhistokimyasal yöntemle saptanması ile ilgili genel kabul edilen bulgu, tümör kalınlığı fazla olan ve metastatik melanom olgularında daha yüksek olması, dolayısı ile p53 aşırı ekspresyonunun geç dönemde ortaya çıkan bir değişiklik olduğu şeklindedir (7,11,13). P53 aşırı ekspresyonunun prognozla ilişkisi olduğu ve daha yüksek p53 pozitiflik indeksine sahip olguların daha kısa yaşam süreleri olduğu ileri sürülmüştür (7,14).

Bu çalışmada, NMM olgularının %68'inde p53 pozitifliği saptandı. Spitz nevus olgularında p53 pozitifliğinin saptanmamış olması ayırıcı tanıda önemli gibi görünmekte, ancak AST olgularının yarısında saptanması, p53 pozitifliğinin NMM ile SN ve AST ayırıcı tanısındaki değerini sınırlandırmaktadır. Literatürde belirtilen oldukça farklı p53 pozitiflik oranları,

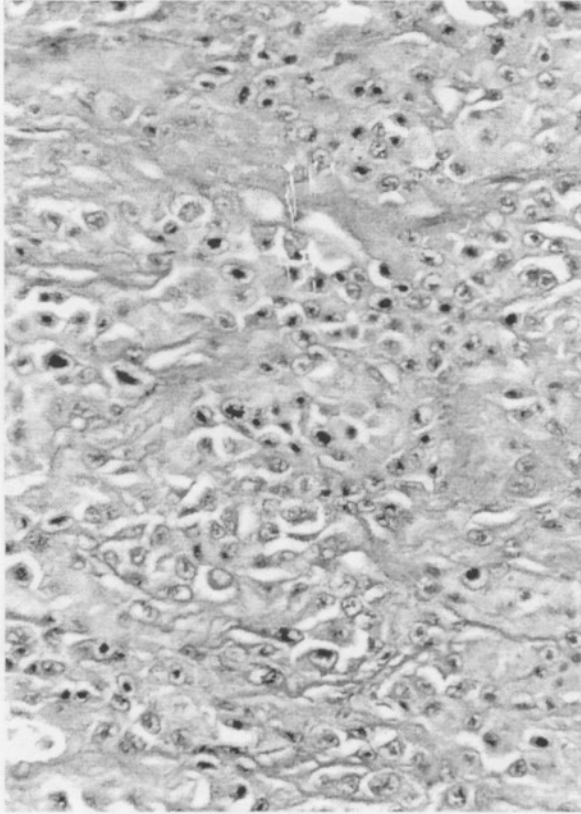
olguların seçimi, kullanılan primer antikorların farklılığı, laboratuvarlar arasındaki metodoloji farklılıkları gibi faktörler ile ilişkili olabilir.

Proliferasyon belirleyicisi olarak kullanılan Ki-67'nin malign melanom (MM) ve Spitz nevus (SN) ayırıcı tanısına katkısını araştıran çalışmalarda Ki-67 pozitifliği SN için %1,4 ve %4 olarak, MM için %16 ve %30 olarak verilmiş ve ayırıcı tanıya katkısı olduğu belirtilmiştir (8,9). Her iki çalışmada da SN'ta yüzeysel dermiste yüksek Ki-67 pozitif odaklar olabileceği belirtilmiştir. Kanter ve ark., nevus benzeri görüntüsü olup nüks ve/veya metastaz ile malignite potansiyeli ortaya konmuş olguları da içeren bir grup melanositik lezyonda Ki-67 (MIB-1) çalışmışlar ve nevus benzeri malign potansiyel taşıyan olgularda, malign melanoma yakın Ki-67 değerleri saptamışlar ve proliferasyon belirleyicilerinin ayırıcı tanıda

TABLO 3: ATİPİK SPİTZ OLGULARINA AİT BULGULAR

Ast olguları	Yaş	Asimetri	Belirgin Sellülarite	Sitolojik atipi	Ekspansiv nodül	Mitoz 10 BBA*	Atipik Mitoz	Matürasyon	Tümör Kalınlığı	Tümör boyutu	Ki-67 (%)	p53 (%)
Olgu 1	7	+	+	Orta-fokal belirgin	+	1	-	-	3,3 mm	6 mm	İptal	2
Olgu 2	4	+	+	Hafif-orta	-	1	-	+	3,5 mm	9 mm	0,5	-
Olgu 3	5	-	+	Orta	-	8	+	-	2,7 mm	5,5 mm	5	2
Olgu 4	6	-	±	Orta	-	8	-	-	3,6 mm	7,5 mm	İptal	-
Olgu 5	7	-	+	Orta-fokal belirgin	+	5	+	-	5,5 mm	10 mm	8	2
Olgu 6	10	-	±	Hafif-orta	-	2	-	+	7,2 mm	11 mm	İptal	-
Olgu 7	17	-	+	Orta-fokal belirgin	-	1	-	-	7,6 mm	15 mm	2	2
Olgu 8	18	-	±	Orta-fokal belirgin	+	1	-	-	12 mm	22 mm	1,8	-

*BBA: Büyük büyütme alanı (x100)



Resim 5: 8 no'lu atipik Spitz tümör olgusunda orta-fokal belirgin sitolojik atipi (HE x400).

konvansiyonel histolojik bulgulara katkısı olduğunu vurgulamışlardır (15). Ancak söz konusu çalışmada Spitz nevus grubu çalışılmamış ve sadece "Spitz nevusta proliferasyonun yüksek olabileceği" gibi bir yorum yapılmıştır (15). Buna benzer bir başka çalışmada Ki-67 indeksi Spitz nevus için %1-3, malign melanom için %13 olarak verilmiş ve nevoid malign melanom adı altında ele alınan 14 olgu histolojik düzeyde incelenmiş ancak MIB-1 çalışılmamıştır (16). Söz konusu çalışmada, proliferasyon belirleyicilerinin nevoid melanom ile Spitz nevus ayırıcı tanısına yardımcı yöntemler olduğu belirtilmiştir (16).

Çalışmamızda Ki-67 pozitifliği, NMM olgularında SN ve AST olgularına göre, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı. Atipik Spitz tümör olguları ile Spitz nevus olguları arasında Ki-67 değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamış olması, AST olgularının abartılı histolojik görüntüsüne rağmen Spitz nevusa daha yakın olduğu şeklinde yorumlanabilecek bir bulgudur.

Ki-67 ve p53 değerlerinin birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Çalışmamızda, NMM ile AST olguları arasında p53 değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı, ancak Ki-67 değerleri açısından anlamlı bir ilişki saptandı. Bu çalışmada ortaya çıkan sonuç, özellikle AST olguları da göz önüne alındığında NMM ile AST ve SN ayırıcı tanısında Ki-67'nin p53'e oranla daha fazla katkısı olduğu şeklindedir.

Morfolojik bulgularla, atipik Spitz tümör başlığı altında ele alınan olguların p53 pozitifliği saptanan 1,3,5 ve 7 no'lu olguların Ki-67 değerleri, malign melanom olgularının %75'inin (12/16) Ki-67 değerlerinin altındadır. Ki-67 pozitif hücrelerin malign melanomda yüzeide ve derinde, Spitz nevusta ve atipik Spitz tümör olgularında genelde yüzeide lokalize olduğu

kriteri de göz önüne alındığında Ki-67 ve p53 morfolojik bulgulara yardımcı immunhistokimyasal belirleyicilerdir. İstatistiksel olarak da aradaki fark belirgin olmakla birlikte, olgu bazında her üç grupta da örtüşen değerler söz konusudur. Gerçek laboratuvarlar arasındaki metodoloji farklılıkları, gerekse örtüşmüyor gibi görünen bazı olgulardaki yakın değerler nedeniyle genel güvenli bir bölgeden söz etmek mümkün değildir.

Çalışmamızda da atipik Spitz tümör adı altında ele alınan ara olguların, Ki-67 değerleri açısından Spitz nevusa, p53 değerleri açısından nodüler malign melanoma yakın olduğu saptandı. Oldukça abartılı histolojik bulguları olan sırasıyla 5 ve 7 yaşındaki 3 ve 5 no'lu AST olguları uzun süreli takipleri ile de ortaya konduğu üzere, tümör kalınlığı 4mm'den fazla konvansiyonel malign melanom olgularından beklenebilecek agresiv tavrı sergilememiş ve bir anlamda atipik Spitz tümör tanısını doğrulamıştır. Ayrıca bu olgular özellikle, düşük Ki-67 değerleri ile de Spitz nevusa yakın bölgededir.

Sonuç olarak, konvansiyonel histolojik bulgular ile Spitz nevus ve malign melanom ayırımı yapmanın ve tümörün biolojik davranışını öngörmenin mümkün olmadığı olgular vardır. Bu çalışmada yer alan immunhistokimyasal belirleyiciler yardımcı olmakla birlikte tek başına ve kesin belirleyici değildir. Bu lezyonları Spitz nevus veya malign melanom grubuna yerleştirmeye çalışmak yerine, atipik Spitz tümör veya spitzoid minimal deviasyon melanom şeklinde adlandırıp gerekli reeksizyon ve yakın klinik takip önermenin uygun olduğu düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

- Barnhill RL, Flotte TJ, Fleischli M and Perez-Atayade A. Cutaneous melanoma and atypical Spitz tumors in childhood. *Cancer* 1995; 76: 1833-45.
- Spatz A, Calonje E, Handfield-Jones S, Barnhill RL. Spitz tumors in children. A grading system for risk stratification. *Arch Dermatol* 1999; 135: 282-5.
- Barnhill RL, Argenyi ZB, From L, et al. Atypical Spitz nevi/tumors: lack of consensus for diagnosis, discrimination from melanoma and prediction of outcome. *Hum Pathol* 1999; 30: 513-20.
- Lee CS, Pirdus A, Lee MW. P53 in cutaneous melanoma: immunoreactivity and correlation with prognosis. *Australas J Dermatol* 1995; 36 (4): 192-5.
- Bergman R, Shemer A, Levy R et al. Immunohistochemical study of p53 protein expression in Spitz nevus as compared with other melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 1995; 17(6): 547-50.
- Sparrow LE, Soony R, Dawkins HJ et al. P53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 1995; 5(2): 93-100.
- McGregor JM, Yu CC-W, Dublin EA, et al. P53 immunoreactivity in human malignant melanoma and dysplastic naevi. *British J Dermatol* 1993; 128: 606-11.
- Rudolph P, Schubert C, Schubert B and Parwaresch R. Proliferation marker Ki-S5 as a diagnostic tool in melanocytic lesions. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37: 169-78.
- Kanter-Lewensohn L, Hedblad MA, Wejde J and Larsson O. Immunohistochemical markers for distinguishing Spitz nevi from malignant melanomas. *Mod Pathol* 1997; 10(9): 917-20.
- Asklen LA and Morkve O. Expression of p53 protein in cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1992; 52: 13-6.
- Lassam NJ, From L, Kahn HF. Overexpression of p53 is a late event in the development of malignant melanoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2235-8.
- Platz A, Ringborg U, Grafröm E, et al. Immunohistochemical analysis of the N-ras p21 and the p53 proteins in naevi, primary tumors and metastases of human cutaneous malignant melanoma: increased immunopositivity in hereditary melanoma. *Melanoma Res* 1995; 5:101-6.
- Korabiowska M, Brinck U, Hoenig JF, et al. Significance of p53 antigen in malignant melanomas and naevi of the head and neck area. *Anticancer Res* 1995; 15: 885-90.
- Vogt T, Zippener KH, Vogt A, et al. p53 protein and Ki-67 antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of skin. *Histopathology* 1997; 30: 57-63.
- Kanter L, Blegen H, Wejde J et al. Utility of proliferation marker in distinguishing between benign naevocellular naevi and naevocellular naevus like lesions with malignant properties. *Melanoma Res* 1995; 5: 345-50.
- Mc-Nutt NS, Urmacher C, Hakimian J, et al. Nevoid malignant melanoma: morphologic patterns and immunohistochemical reactivity. *J Cutan Pathol* 1995; 22: 502-17.