

Malign Melanomalarda HMB-45 ve S-100 Proteini Ekspresyonu ile Masson-Fontana Boyanma Yoğunluklarının Karşılaştırılması

Comparison of HMB-45 and S-100 Protein Expression and Masson's Fontana Staining in Malignant Melanomas

Ayşe Polat¹, Figen Doran², Derya Gümürdülü²

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Akdeniz-Mersin

² Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Balcalı-Adana

Özet: Çalışmamızda malign melanoma olgularının tanısında en sık kullanılan üç boyama yönteminin duyarlılıkları karşılaştırılmış, boyanma yoğunluğu ile pigment içeriği ve hücre türü arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu amaçla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan farklı türlerdeki 46 malign melanoma olgusuna HMB-45, S-100 proteini ve Masson-Fontana boyaları uygulandı. HMB-45 ile olguların % 97.8'i, S-100 proteini ile % 91.3'ü ve Masson-Fontana ile % 72.0'ı değişen yoğunluklarda pozitif olarak boyandı. Tümörde hücre türü ve pigment içeriği ile boyanma yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Malign melanomaların tanısında HMB-45'in diğer iki yöntemle göre daha duyarlı olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Malign melanoma, HMB-45, S-100 proteini

Summary: In this study sensitivity of the most used staining methods in the diagnosis of malignant melanoma were investigated and staining intensity were compared with pigment content and cell type in cases. Forth six cases diagnosed as malignant melanoma from Pathology department of Çukurova University Medical Faculty were reviewed. Masson's Fontana, HMB-45 and S-100 protein staining method were studied in formaline fixed and paraffin embedded samples. Ninety-eight percent of cases were stained with HMB-45, 91.3 percent of cases were stained with S-100 protein and 72.0 percent of cases were stained with Masson's Fontana. No correlation was found between staining intensity, cell type and pigment content. We conclude that HMB-45 is more sensitive in diagnosis of malignant melanoma than the other two methods.

Key Words: Malignant melanoma, HMB-45, S-100 protein

Malign melanomalar(MM) hızlı klinik seyri, erken ve yaygın metastazları ve görülme sıklığındaki kontrol edilemeyen artışından dolayı her dönemde araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Günümüze kadar MM'ların histopatolojik tanısına yönelik üzerinde çalışılan çok sayıda dokümantasyon ve immün dokümantasyon yöntemine rağmen, henüz MM'lara % 100 spesifik bir belirleyici ortaya konulamamıştır (1-3).

Çalışmamızın amacı HMB-45, S-100 proteini ve Masson-Fontana (MF) boyama yöntemlerinin malign melanoma tanısındaki duyarlılıklarını karşılaştırıp, boyanma yoğunluğu ile pigment içeriği ve hücre türü arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda MM tanısı alan toplam 46 olguya ait hema-

toksilen eosin boyalı preparatlar ışık mikroskopunda yeniden değerlendirildi ve seçilen bloklardan hazırlanan kesitlere dokukimyasal yöntemle MF yanı sıra avidin-biotin kompleks immün peroksidaz yöntemiyle monoklonal mouse anti-melanoma antikoru, HMB-45 (Zymed, 08-0050) ve poliklonal rabbit S-100 proteini (1:50 dilüsyon, Zymed, 18-0046) uygulandı. İleri derecede pigmente olgulara, immün dokukimyasal boyama yöntemine geçmeden önce, tümör hücrelerindeki melanin pigmentini uzaklaştırmak için melanin ağartma (melanin-bleaching) yöntemi kullanıldı. İmmün dokukimyasal boyama yoğunlukları melanin pigment rengi ile karıştırma olasılığı ortadan kalktığı için daha iyi değerlendirilebildi. Kontrollü olarak uygulanan bu teknikte pigment uzaklaştırma işleminin immün dokukimyasal boyanmayı etkilemediği görüldü (4). Her üç boyanın boyanma yoğunlukları negatif, (+) pozitif, (++) pozitif, (+++) pozitif olarak değerlendirildi. Sonuçlar karşılaştırıldı.

Ayrıca olgularda boyanma yoğunluğu ve boyanma paterni ile pigment içeriği, hücre türü karşılaştırıldı. İstatistiksel analizler SpSS-X program paketi kullanılarak bağımsal örneklerde t-testi, bağımlı örneklerde ki-kare testi ve Fisher kesin ki-kare testi kullanılarak yapıldı.

Bulgular

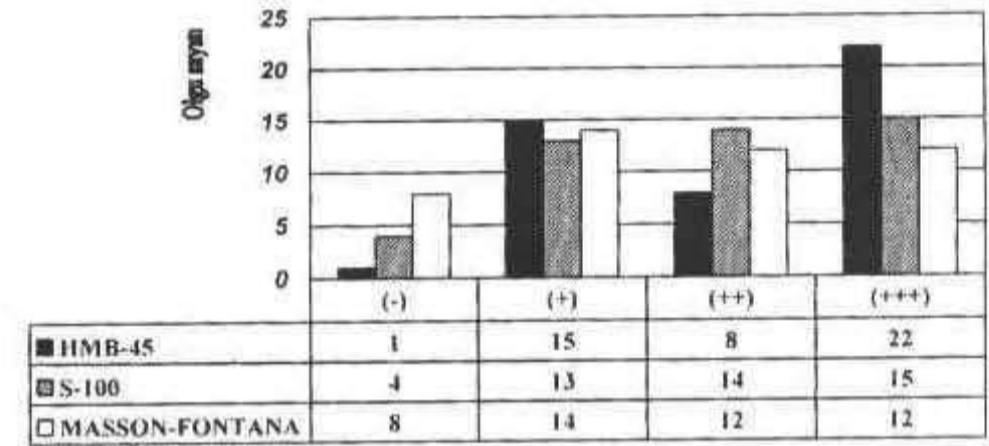
Çalışma grubumuzdaki 46 olgunun 22'si kadın (%47.8), 24'ü erkek (%52.2) olup tümörün her iki cinsteki dağılımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Yaş ortalaması her iki cins için 52.7 ± 15.8 olarak bulundu. Kadında en küçük yaş 24 en büyük yaş 87 olup, yaş ortalaması 54.2 ± 17.4 iken, erkekte en küçük yaş 29 en büyük yaş 80 olup, yaş ortalaması 51.4 ± 14.4 olarak bulundu. MM olgularında yaş ile cins arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo I).

Tablo I. Malign melanoma olgularının yaş ve cinsi dağılımı.

	Olgu sayısı (n)	%	Yaş ortalaması
Kadın	22	47.8	54.2 ± 17.4
Erkek	24	52.2	51.4 ± 14.4
Toplam (n)	46	100.0	52.7 ± 15.8

Değerlendirilmeye alınan 46 olgunun HMB-45 ile 45'i (%97.8), S-100 ile 42'si (% 91.3) ve MF ile 38'i (% 72)

pozitif olarak boyandı. Her üç yöntemin boyanma yoğunlukları değerlendirildiğinde HMB-45 1 olguda negatif (%2) , 15 olguda (+) pozitif (%33) , 8 olguda (++) pozitif (%17) ve 22 olguda (+++) pozitif (%48) bulunurken, S-100 proteini 4 olguda negatif (%9), 13 olguda (+) pozitif (%28), 14 olguda (++) pozitif (%30) ve 15 olguda (+++) pozitif (%33) olarak değerlendirildi. MF ile 8 olgu negatif (%18), 14 olgu (+) pozitif (%30), 12 olgu (++) pozitif (%26) ve 12 olgu (+++) pozitif (%26) boyanma gösterdi (Grafik I). Her üç boyama yönteminin tümör hücresindeki boyanma yoğunlukları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Resim 1, 2).



Grafik I. HMB-45, S-100 proteini ve MF ile malign melanoma olgularında yoğunluklarının dağılımı.

Olguların 43'ünde HMB-45 ve S-100 proteininin boyanma yoğunlukları arasında pozitif korelasyon izlendi. 42 olgu her ikisinde pozitif, bir olgu her ikisinde de negatif olarak boyandı. Üç olguda ise HMB-45 ile S-100 proteini boyanma yoğunlukları arasında uyumsuzluk izlendi. Bu olgular S-100 proteini ile negatif boyanma gösterirken, HMB-45 ile 1 olgu (+) pozitif, 2 olgu (+++) pozitif boyanma gösterdi (Tablo II).

Tablo II. S-100 proteini ve HMB-45'in boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması .

HMB-45	S-100		Toplam (n)
	Negatif (-)	Pozitif (+)	
Negatif (-)	1	-	1
Pozitif (+)	3	42	45
Toplam (n)	4	42	46

Toplam 46 olgunun 30'u (%65.2) primer, 16'sı (%34.8) ise metastatik melanom olup primer olguların 21'i deri, 4'ü göz, 1'i dış kulak yolu, ve 1'i ise nazal kavite, meta-

statik olguların 5'i beyin, 6'sı subkutan doku, 4'ü lenf düğümü, 1'i akciğer yerleşimli idi. Primer ve metastatik MM olgularındaki HMB-45, S-100 proteini ve MF boyanma yoğunlukları araştırıldığında her üç boyanma tekniğinin de primer melanoma olgularında daha güçlü bir boyanma gösterdiği görüldü. Ancak her üç boyanma yönteminin primer ve metastatik olgulardaki yoğunluk farkları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo III, IV).

Tablo III. Malign melanoma olgularının yerleşim yerlerine göre dağılımı.

Primer olgular			Metastatik olgular		
Yerleşim	Sayı (n)	%	Yerleşim	Sayı (n)	%
Deri	21	70.0	Beyin	5	31.3
Göz	4	13.4	SD	6	36.5
Rektum	3	10.0	LD	4	25.0
DKY	1	3.3	Akciğer	1	6.2
NK	1	3.3	-	-	-
Toplam (n)	30	100.0	Toplam (n)	16	100.0

DKY: Dış kulak yolu, NK: Nazal kavite, SD: Subkutan doku, LD: lenf düğümü

Tablo IV. HMB-45 ve S-100 proteini ve MF'nin boyanma yoğunluklarının primer ve metastatik melanomalardaki dağılımı.

Boyanma Yoğunluğu	HMB-45		S-100 proteini		M-Fontana	
	Primer	Metastatik	Primer	Metastatik	Primer	Metastatik
-	-	1	2	2	6	2
+	8	7	7	6	5	9
++	4	4	10	4	9	3
+++	18	4	11	4	10	2
Toplam (n)	30	16	30	16	30	16

HMB-45, S-100 proteini ve MF boyalarının boyanma yoğunlukları ile tümörde hücre türü arasında anlamlı bir dağılım paterni izlenmedi ($p>0.05$) (Tablo V) Buna karşın tümörde izlenen bizar hücrelerde daha güçlü boyanma görüldü (Resim 3).

Tablo V. HMB-45 ve S-100 proteini ve MF'nin boyanma yoğunluklarının hücre türüne göre dağılımı.

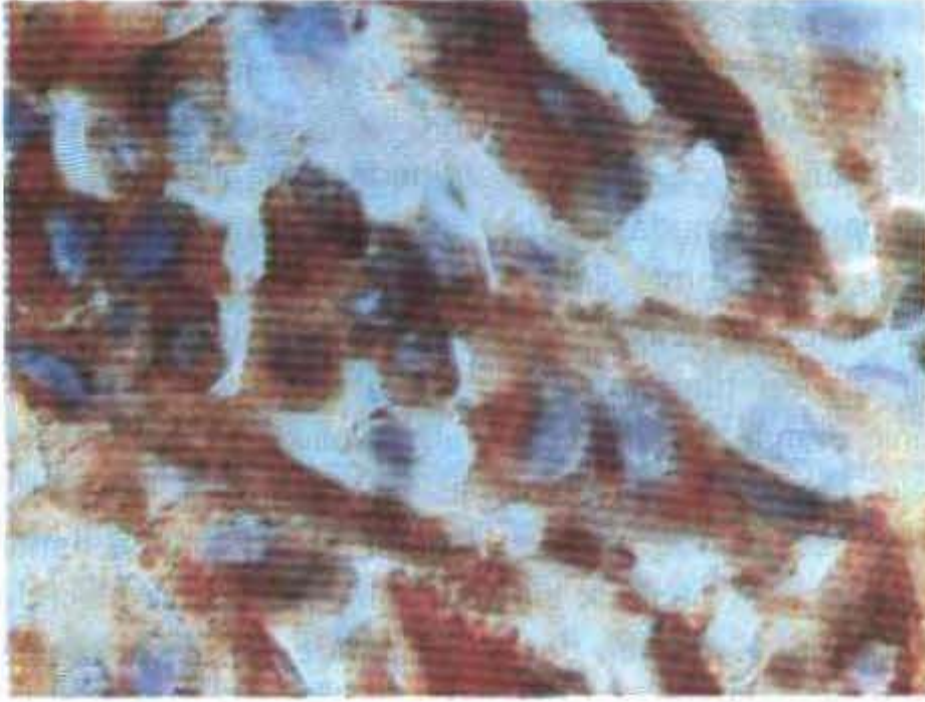
Boyanma Yoğunluğu	İğsi	HMB-45		İğsi	S-100 proteini		İğsi	M-Fontana	
		Epitelial	Karma		Epitelial	Karma		Epitelial	Karma
-	-	1	-	2	2	-	2	3	3
+	2	10	3	1	9	3	4	8	2
++	3	2	3	6	4	4	2	8	2
+++	7	13	2	3	11	1	4	7	1
Toplam (n)	12	26	8	12	26	8	12	26	8

Çevresinde normal deri dokusu izlenen 19 olgunun 7' sinde dermiste ter bezlerinin duktuslarını döşeyen epitelde S-100 proteini ve HMB-45 ile fokal pozitif boyanma görüldü. Tümör dokusu kenarında normal parotis bezi izlenen bir olguda ise, bez içerisindeki duktus epitellerinde S-100 proteini ve HMB-45 ile pozitiflik saptandı. Asinilerde boyanma izlenmedi. Bu 19 olgu dışındaki hiç bir olguda tümör çevresi normal dokularda (periferik sinir, damar duvarı ve endotel, kıl follikülleri, barsak epitel, fibröz doku vs.) HMB-45 ile pozitif boyanma izlenmedi. S-100 proteini ise hemen her olguda tümör çevresindeki periferik sinirler, Langerhans hücrelerinde fokal olarak da ter bez epitellerinde pozitif boyanma gösterdi.

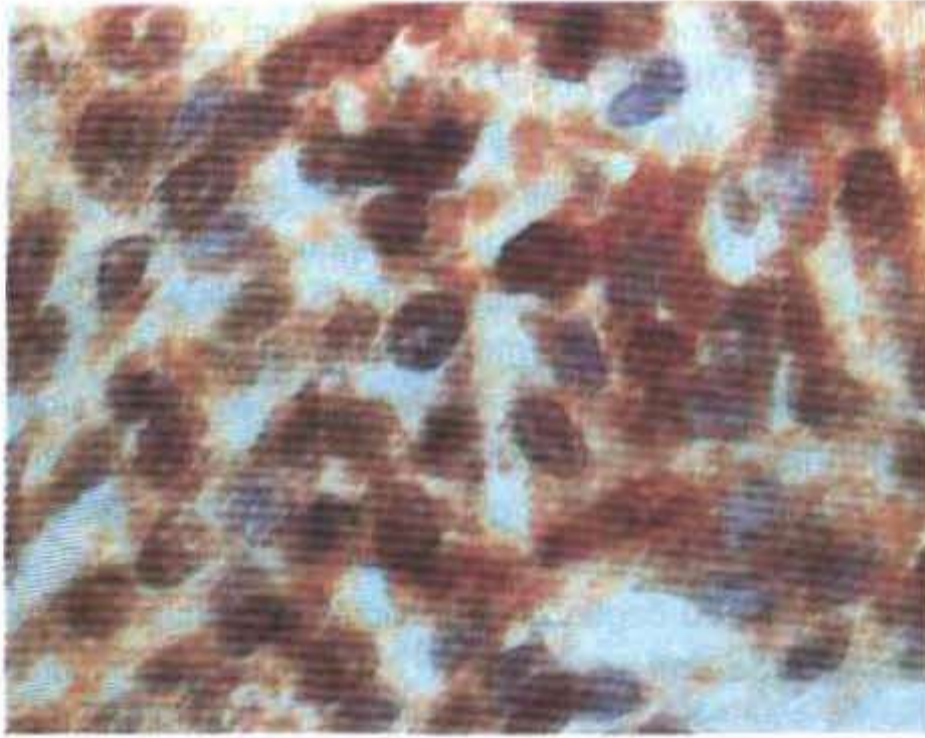
Tartışma

Histolojik görünümü çok sayıda karsinom ve sarkom ile karışabilen MM'lar, çoğu zaman tanı zorluğu yaratan tümörlerdir. MM'ların histopatolojik tanısına yönelik yapılan çok sayıda araştırmaya karşın henüz MM'lara % 100 özgün bir belirleyici bulanamamakla birlikte, ümit verici gelişmeler de sağlanmıştır (5,6). İlk kez Gown tarafından tanımlanan, monoklonal mouse antihuman melanoma antikoru HMB-45 MM'nin özgün tanısında araştırmacıları cesaretlendirmiştir (7). Değişik yayınlarda HMB-45'in MM'lara duyarlılığı % 69 ile % 100 arasında değişen oranlarda bildirilmektedir. Başlangıçta ta MM'lara % 100 özgün olduğu bildirilirken, daha sonraki çalışmalarda kimi neoplastik ve nonneoplastik dokularda (meme, karaciğer, böbrek ve tükrük bezi tümörlerinin bir kısmı) pozitif boyanma gösterilmiştir (8-12).

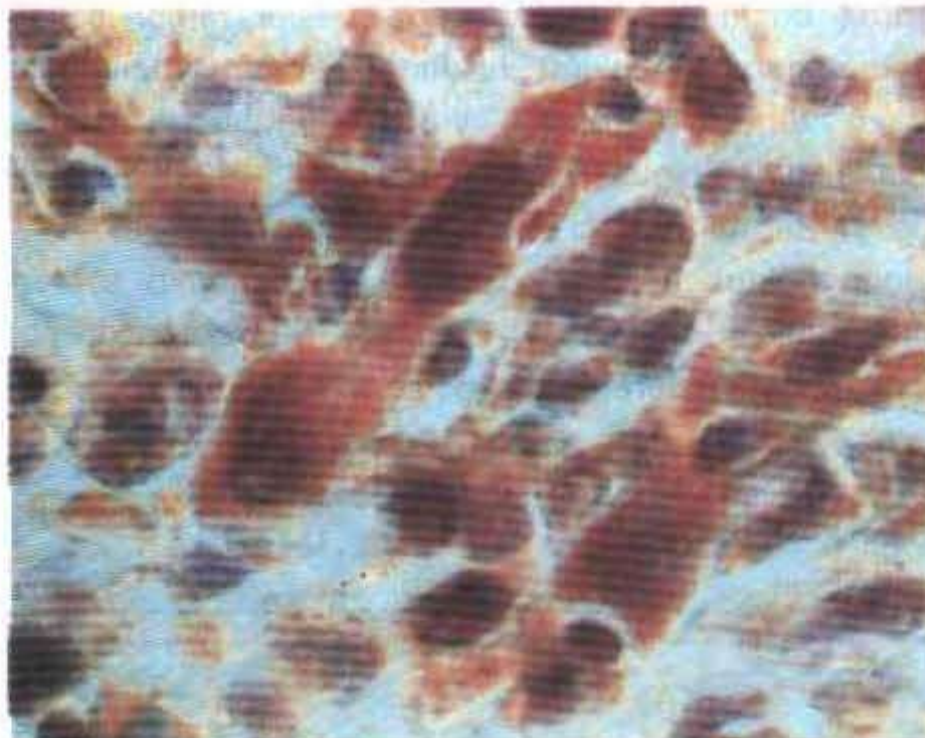
Çalışmamızda MM'larda HMB-45 duyarlılığı % 97.8 olarak bulunurken MM dışında başka tümör çalışılmadığından özgünlüğü hakkında yorum yapılamadı. Ancak tümör çevresinde yeterli normal cilt dokusu izlenebilen 19 olgunun % 36.8'sinde ter bezlerinde ve bir olguda da, tümör yanı sıra izlenen normal parotis dokusunun duktus epitellerinde fokal boyanmanın saptanması HMB-45 in kimi non-neoplastik dokularda da pozitif boyanma gösterebildiğini göstermiştir.



Resim 1. Tümör hücrelerinde güçlü intrasitoplazmik HMB-45 boyanması (6646/92, HMB-45 X 400).



Resim 2. Tümör hücrelerinde güçlü intrasitoplazmik S-100 proteini boyanması (12708/92, S-100 X 400).



Resim 3. Tümörde bizar görünümlü hücrelerde güçlü intrasitoplazmik HMB-45 boyanması (13602/93, HMB-45 X 400).

Moore tarafından siğir beyninden izole edilen ve daha sonra Gaynor tarafından MM'lardaki pozitifliği gösterilen S-100 proteini ile ilgili yapılan çalışmalarda duyarlılık % 82 ile % 100, özgünlük % 22 olarak bildirilmiştir (13-16). Biz MM'lardaki duyarlılığı % 91.3 gibi yüksek bir oranda bulduk. Ayrıca hemen her olguda tümör çevresinde izlenen periferik sinirler, ter bezleri ve Langerhans hücrelerinde pozitif boyanma saptandı. Olgularda genelde HMB-45 ile S-100 proteini boyanma yoğunlukları arasında genelde pozitif bir korelasyon izledik. Ancak üç olguda iki boya arasında uyumsuzluk saptadık. S-100 proteini ile negatif boyanan bu üç olgu HMB-45 ile değişen yoğunluklarda pozitif boyanma gösterdi. Bu sonuç da bize MM'larda HMB-45'in yüksek özgünlüğü yanı sıra duyarlılığı da daha yüksek olduğunu gösterdi (Tablo I).

Çalışmamızda HMB-45 ve S-100 proteinin MM'larda boyanma yoğunluğu ve boyanma paterni ile pigment içeriği ve yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulamadık ($p > 0.05$). Bu nedenle tümörde pigment içeriğinin boyanma yoğunluğunu etkilemediği sonucuna vardık. Ayrıca immün dokü kimyasal boyama işlemine geçmeden önce yoğun pigmente olgularda melanin ağartma (melanin bleaching) işlemi ile pigmentin uzaklaştırılması boyanmayı etkilemediği gibi immün dokü kimyasal boyanma yoğunluğu ve boyanma paterninin daha iyi değerlendirilmesini sağladı. Kontrollü olarak yapılan bu işlem pigment renginden dolayı yanlış pozitif değerlendirmeyi de ortadan kaldırdı (4,13).

Hücre türü ile her üç yöntemin boyanma yoğunlukları arasında istatistiksel bir anlamlılık bulamamak ta tümörde bizar görünümlü hücrelerde genelde daha güçlü boyanma izledik (Resim 3). Kaynaklarda da tümörde epiteloïd ve pleomorfik hücrelerde daha güçlü HMB-45 boyanma olduğunu bildiren çalışmalar bildirilmiştir (17). Bu da bizim bulgularımızı kısmen desteklemektedir. Biz çalışmamızda primer melanoma olgularında daha yüksek oranda pozitiflik bulduk. Ancak bunun anlamlılığını istatistiksel olarak destekleyemedik. Kaynaklarda metastatik melanoma olgularında boyanmanın genelde daha zayıf olması, tümörde ortaya çıkan ve metastaz gösteren yeni klonun melanomaya özgü antijeni kaybedip daha diferansiye forma dönüştüğü ve bunun da daha zayıf boyanmaya neden olduğu şeklinde izah edilmektedir (17).

Sonuç olarak 46 olguluk çalışma grubumuzda malign melanomalarda duyarlılığının HMB-45 in S-100 proteini ve MF'ya göre daha yüksek olduğunu gördük ve pozitif

olgularda daha güçlü boyanma gösterdiğini gözledik. Primer olgularda daha yüksek oranda pozitif boyanma saptadık. Her üç yöntem için de boyanma yoğunluğu ile tümörde hücre türü ve pigment içeriği arasında istatistik bir anlamlılık saptayamadık. Biz MM'ların tanısında tek

bir belirleyici yerine, ayırıcı tanıda düşündüğümüz tümörlere de spesifik diğer belirleyicileri de içeren bir panel kullanmak, gerekirse elektron mikroskopik örnekler alıp premelanosom ve anormal melanosomları göstermek yerinde olacağı kanısındayız (7,16).

Kaynaklar

1. Duinen SG, Ruiter DJ, Hageman P, Pad CV, Dickersin GR. Immunohistochemical and histochemical tool in the diagnosis of amelanotic melanoma. *Cancer* 1984; 53: 1566-1573.
2. Jungbluth AA, Busam KJ, Gerald WL, Stckert E, Coplan KA. A103 an antimelan-a monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissue. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(5): 595-602.
3. Kılıçarslan B, Gelen M, Özbilim G, Aytan Ş, Büyükkeçeci A. Anorektal malign melanomalar, iki olgu sunumu. *Türk Patol Derg* 1998; 14(2): 72-74.
4. The effect of melanin bleaching on immunohistochemical staining in heavily pigmented melanocytic neoplasm. Orchard GE., Colonje E. *Am J Dermatopathol* 1998; 20(4): 357-61.
5. Cruz PO, Specht CS, Mclean AW. Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma. *Cancer* 1990; 65: 112-115
6. Doran F, Erkişi M, Kıvanç F, Şimşekli, Yurdakul H. Nazal kavitenin malign melanoması. *Türk J Neop* 1993; 2: 67-69.
7. Nakagava H, Hori Y, Sato S, Fitzpatrick T, Martuza R. The nature and origin of melanin macroglobule. *The J Invest Dermatol* 1983; 83: 134-139.
8. Bonetti F, Colombari R, Mntin E, Zamboni G, Martignoni G. Breast carcinoma with positive results for melanoma marker (HMB-45). *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 4,491-494.
9. Gown AM, Vagel AM, Hoak D. Monoclonal Antibodies specific for melanocytic tumours distinguish subpopulation of melanocytes. *Am J Pathol* 1986; 123: 195-203.
10. Colombari R, Bonetti F, Zamboni G, Scarpa A, Marino F, Tomezzoli A. Distribution of melanoma specific antibody (HMB-45) in benign and malignant melanocytic tumours. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1988; 413: 17-24.
11. Hancock C, Allen B, Herrere G. HMB-45 detection in adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115: 886-890.
12. Hoon V, Thung SN, Kaneko M. HMB-45 reactivity in renal angiomyolipoma and lymphangiomyomatosis. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118(7): 732-734.
13. Duinen SG, Ruiter DJ, Hageman P, Pad CV, Dickersin GR. Immunohistochemical and histochemical tool in the diagnosis of amelanotic melanoma. *Cancer* 1984;53:1566-1573.
14. Herrera GA, Turbat EA, Lott R. S-100 Protein by primary and metastatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 168-176
15. Fallowfield ME, Curley RK, Cook MG. Melanocytic lesions and melanocyte populations in human epidermis. *Br J of Dermatol* 1991; 124: 130-134.
16. Sujatha F, Stephan J, Bate J. Immunohistochemical analysis of cutaneous malignant melanoma: comparison of S-100 protein HMB-45 monoclonal antibody and NKI/C3 monoklonal antibody. *Pathol* 1994; 26, 16-19.
17. Schmitt FC, Bacchi CE: S-100 Protein. Is it useful as tumour marker in diagnostic immunocytochemistry? *Histopathol* 1989; 15: 281-288.
18. Bishop PW, Menasche LP, Yates AJ, Win NA, Banerjee SS. An immunophenotypic survey of malignant melanomas. *Histopathol* 1993; 23: 159-166

Yazışma Adresi:

Ayşe POLAT
Adonis yerleşim merkezi Orkide C-2 blok Kat:7 No:14
Mezitli / MERSİN
Tel: 0 324 3582395
E mail: aysepolat@aidata.com.tr
