

Dermatolojik Tanıda Immünoenzim Yöntemleri

Yrd.Doç.Dr.Ranâ (YAVUZER) ANADOLU, Doç.Dr.Cengizhan ERDEM

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji ABD

Dermatopatolojide yeni bir aşamayı oluşturan immünoenzim yöntemleri dünyada bugün pek çok dermatozun tanısında rutin olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle dokulardaki çeşitli antijenik determinantlar, peroksidaz, alkalen fosfataz altın ve gümüş ile işaretlenmiş antikorlar aracılığıyla görünür hale getirilmektedir. Böylece dokulardaki hücrelere, immün komplekslere, bakteriyel, viral ajanlara ve tümörlere özgü antijenik determinantların gösterilmesi ile otoimmün hastalıklar, immün kompleks hastalıkları, kollagen doku hastalıkları, tümörler, allerjik hastalıklar, infeksiyöz hastalıklar ve vaskülitlerin kesin tanısında büyük kolaylıklar sağlanmaktadır.

Immünoenzim yöntemlerinde kullanılan primer antikor temel olarak IgG, daha az oranda da diğer immünooglobulinlerden oluşur. Serum gama glubulin fraksiyonunda olan antikorlar iki ana protein zinciri içerirler ve yapılarındaki ağır zincirlere göre beş ana gruba ayrılırlar. Gama ağır zinciri taşıyanlar IgG, alfa ağır zinciri taşıyanlar IgA, epsilon ağır zinciri taşıyanlar IgE, delta ağır zinciri taşıyanlar IgD, ve mü ağır zinciri taşıyanlar da IgM olarak adlandırılmaktadır.

Bir antijen molekülü değişik yapıda birçok antijenik determinanttan oluşur. Her B hücre klonu antijenin değişik determinantlarına karşı antikor üretmektedir. Günümüz teknolojisi istenen antijenik determinanta özgü antikorlar üreten B hücre klonlarını ayırabilmektedir. Bu klonların fare myeloma hücreleri ile hibridizasyonu sonucu sürekli bölünüp çoğalan ve tek bir antijenik determinanta özgü antikorlar üreten hücreler elde edilmektedir. Dokudaki spesifik determinanta ile birleşen bu monoklonal antikorların peroksidaz, alkalen fosfataz, yada altın ve gümüş ile işaretlenerek görünür hale getirilmesi ilkesine dayanan immünoenzim yöntemleri, kimyasal konjugasyonlar kullanılan immünofloresan

yöntemlerden çok daha duyarlı ve spesifiklerdir (1,2,3,4).

Bugüne değin kullanılan immünoenzim yöntemleri direkt immünoenzim peroksidaz, indirekt immünoenzim peroksidaz, peroksidaz-anti peroksidaz (PAP), avidinbiotin peroksidaz kompleksi (ABC), alkalen fosfataz anti-alkalen fosfataz (APAAP) ve immünoaltın gümüş boyama (IGSS) yöntemidir. Bu yöntemler içinde direkt ve indirekt immünoenzim peroksidaz ve PAP yöntemi giderek güncelliğini yitirmekte ve yerlerini daha yeni ve etkin yöntemler olan ABC, APAAP ve IGSS'e bırakmaktadır.

Avidin-biotin peroksidaz kompleksi (ABC) yönteminin temeli dokudaki antijenik determinantlara özgü biotinize antikorların peroksidaz enzimi taşıyan avidin-biotin kompleksine bağlanması ilkesine dayanır. Yumurta akından elde edilen bir glikoprotein olan avidin, düşük molekül ağırlıklı bir vitamin olan biotin bağlanmaktadır. Yöntemde kullanılan avidin biotin kompleksinde avidinin bir molekül ucu serbesttir, biotin molekülü üzerinde ise peroksidaz enzimi konumlandırılmıştır. Biotinize antikor bu kompleks ile birleşip dokuya yerleşir. Substrat kromojen madde ise peroksidaz enzimi ile kimyasal reaksiyona girerek renkli bir son ürün oluşturur. Böylece oluşan ve kontrast boyama ile belirgin hale getirilen kahverengi bölgeler dokulardaki aranılan spesifik determinantları gösterir (1,2,5).

Alkalen fosfataz anti-alkalen fosfataz tekniği PAP tekniğinin geliştirilmesi ile uygulamaya konmuş işaretli bir antikor köprüleme tekniğidir. Birinci ve üçüncü antikor aynı hayvandan elde edilmiş monoklonal antikorlardır. Poliklonal ikinci antikor ise birinci ve üçüncü antikor arasında bir köprü oluşturur. Antikor inkübasyonlarından sonra ortama naftol tuzu içeren bir alkalen fosfataz substratı ve boya olarak da yeni fuksin eklenir. Deaksiyonun son ürünü olan parlak kırmızı renk ışık mikroskopisinde dokuda kolayca saptanabilmektedir. APAAP tekniği kriostat kesitler üzerinde uygulanabilmekte ve soliter hücre işaretlemesinde hemen hiç arka plan boyanması olmaması nedeniyle başarı ile kullanılmaktadır (1,3,5,6).

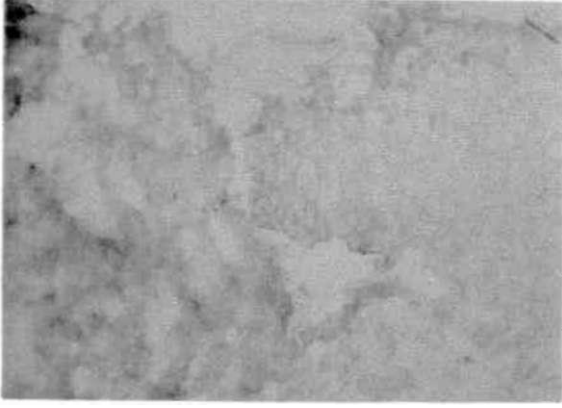
Immünoaltın gümüş boyama yöntemi monoklonal ve poliklonal antikorlar ile hem parafin hem de kriostat

Geliş Tarihi: 9.3.1992

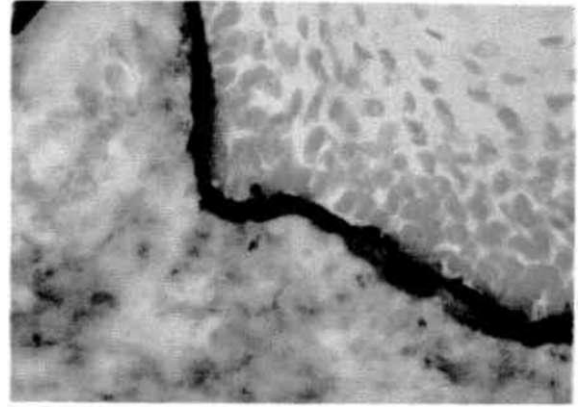
Kabul Tarihi: 16.4.1992

Yazışma Adresi: Yard.Doç.Dr.Ranâ (YAVUZER) ANADOLU
A.Ü. Tıp Fak. Dermatoloji ABD, ANKARA

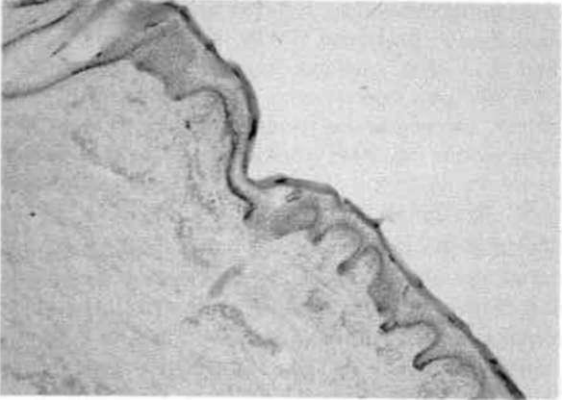
Not: Fotoğraflar A.Ü.T.F.dermatoloji ABD dermatoimmüno-patoloji laboratuvarı preparat arşivinden derlenmiştir.



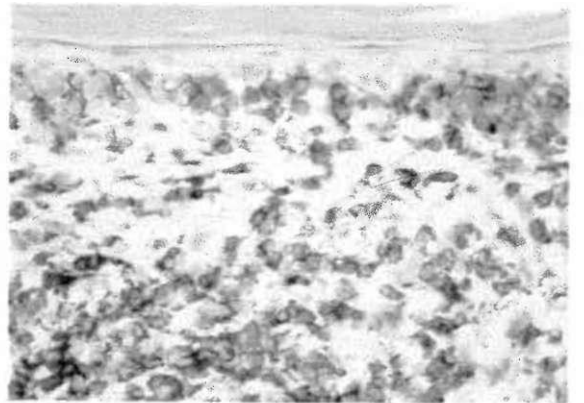
Şekil 1. Pemfigus vulgaris'de keratinositler çevresinde Ig G depolanması ABC tekniği (Biotinize anti-human IgG 1:250) x100



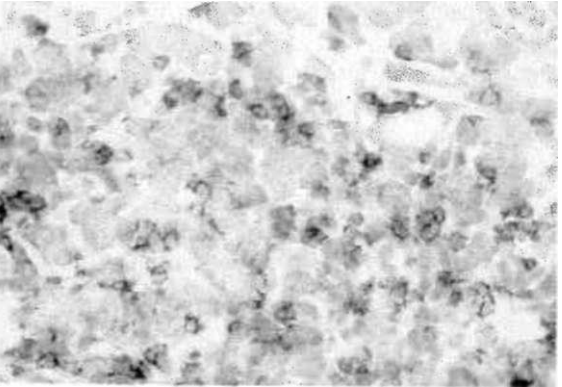
Şekil 2. Bullöz pemfigoid'de bazal membran zonunda lineer Ig G depolanması ABC tekniği (Biotinize anti-human IgG 1:100) x400



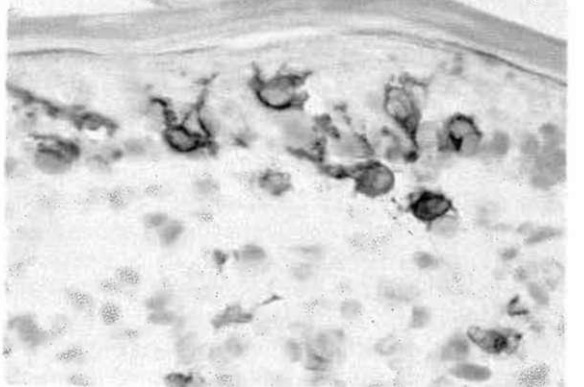
Şekil 3. Dermatitis herpetiformis'de dermal papilla tepelerinde granüler Ig A depolanması. ABC tekniği (Biotinize anti-human IGA1:200) x40



Şekil 4. Mikozis fungoidesde yardımcı T hücreleri. APAAP tekniği (Leu 3a Ab 1:300) x 100



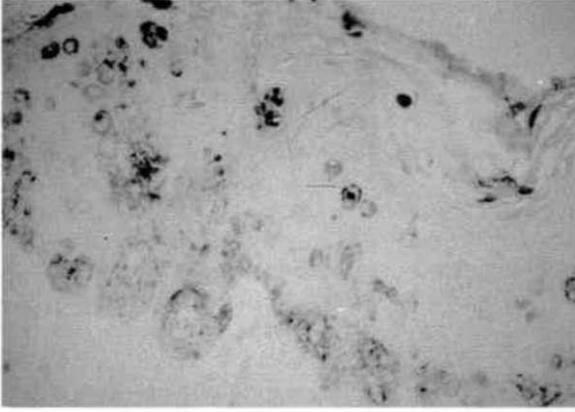
Şekil 5. Mikozis fungoides'de baskılayıcı T hücreleri. APAAP tekniği (Leu 2a Ab 1:100) x100



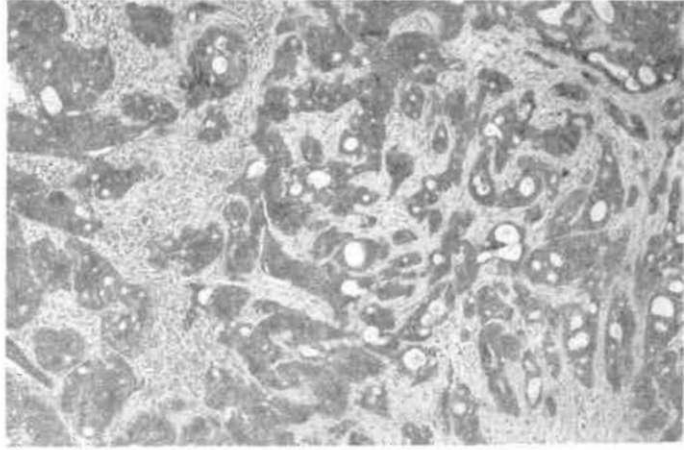
Şekil 6. Epidermal Langerhans hücreleri. APAAP tekniği (Leu 6 Ab1:100)x200

kesitlerde çalışılabilen bir yöntemdir. Burada dokuya önce işaretli bir monoklonal veya poliklonal antikor, sonra da bir altın konjugatı uygulanır. Yöntemde dokuya iyi penetrasyon sağlamak amacı ile 5 nm büyü-

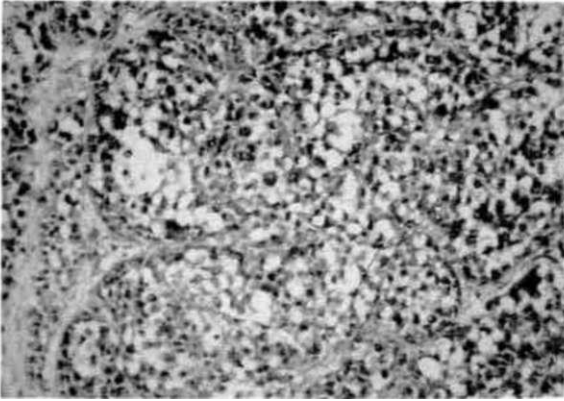
klüğünde altın partikülleri kullanılmaktadır. Bu büyüklükteki altın partikülleri ışık mikroskopunda görülmeyeceği için, ortama sitrat tampon, gümüş laktat ve hidrokino içerikli solüsyonlarda gümüş eklenir. Altın, gümüş



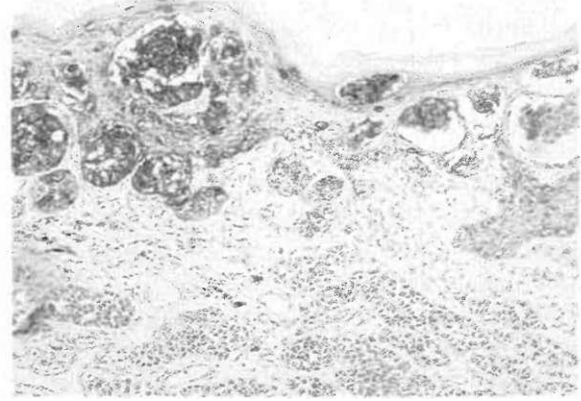
Şekil 7. Paget'de tümör hücreleri. IGSS tekniği (anti-CEA 1:85) x100



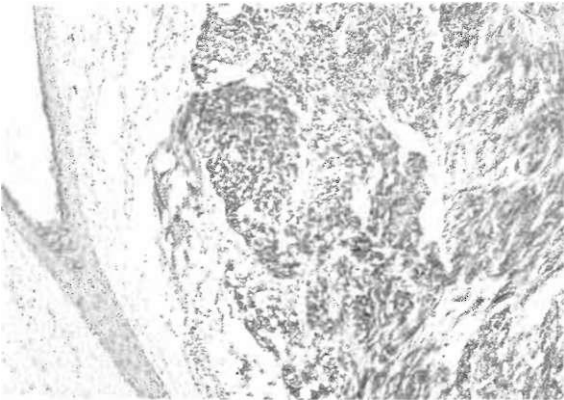
Şekil 8. Ekrin karsinoma'da tümör hücreleri. ABC tekniği (Anti-human Cytokeratin 1:100) x40



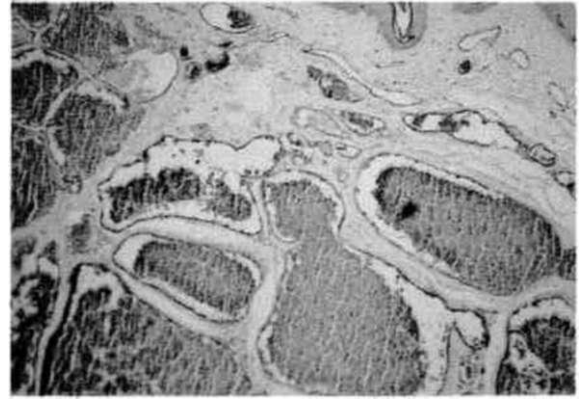
Şekil 9. Nodüler malign melanomada tümör hücreleri. ABC tekniği(anti-S-100ptt 1:50) x40



Şekil 10. Yüzeysel yayılan malign melanoma ve altındaki dermiste melanositik nevüs. ABC tekniği (HMB-45 Ab 1:100) x40



Şekil 11. İğ hücreli malign melanoma. ABC tekniği (HMB-45 Ab 1:100)x40



Şekil 12. Kapiller hemanjiom'da endotel hücreleri. PAP tekniği [Julex europaeus agg. I) x40

iyonlarını metalik gümüşe indirgemekte ve altın partikülleri etrafında metalik gümüşten oluşan bir kabuk meydana gelmektedir. Dokuda IGSS yöntemi ile işaretlenen antijenik determinantlar siyah granüler bir boyanma şeklinde görünürler (6,7,8).

IGSS ve APAAP veya IGSS ve ABC yöntemleri iki ayrı monoklonal primer antikor kullanılarak birlikte de uygulanabilmekte ve bu yeni yöntem "çift işaretleme" adı verilmektedir. Tek bir hücrenin iki ayrı antijenik determinantına yönelik iki ayrı monoklonal antikorun

birlikte kullanılmasına olanak sağlayan bu işlemle çapraz reaksiyonlar ortadan kaldırılarak spesifikliğı ve duyarlılığı son derece artırılmış dermatoimmünopatolojik sonuçlar elde edilmektedir (1,7).

Dermatolojik tanıda immünoenzim yöntemleri artık ipekçok dermatoloji kliniğinde büllöz dermatozların tanısında rutin olarak kullanılmaktadır. Pemfigusta epidermisin intersellüler aralıklarında IgG depolanması yalnızca oral kavite ile sınırlı çok erken lezyonlarda bile kesin tanı konmasını sağlamaktadır (Şekil 1). Pemfigus vulgariste alt epidermiste daha kuvvetli reaksiyon görülürken, pemfigus foliaseusta reaksiyon üst stratum Malpighii'de daha yoğundur. Pemfigus eritematozusda ise intersellüler IgG depositlerinin yanısıra dermoepidermal birleşim bölgesinde de IgG depolanması saptanır.

Büllöz pemfigoidde immünoenzim yöntemleri ile bazal membran zonunda lineer IgG depolanması diagnostiktir (Şekil 2). Dermal papilla tepelerinde granüler IgA depositleri ise dermatitis herpetiformis tanısının konmasını sağlar (Şekil 3). Lineer IgA dermatozu ve çocukluk dönemi kronik büllöz dermatozu ancak dermatoimmünopatolojik yöntemlerle tanısı konabilen hastalıklardır ve bazal membran zonunda lineer IgA depolanması ile karakterlidirler.

Sistemik lupus eritematozuslu hastaların normal görünümlü derilerinde immünoenzim yöntemleri ile granüler yada lineer IgG ve IgM birikimlerinin saptanması pozitif lupus band testi olarak bilinir. Sistemik lupus eritematozuslu hastaların yaklaşık %70 inde elde edilen bu bandın karakteristik özelliğı dermişin en üst bölümüne irregüler uzantılar oluşturmasıdır (9).

immün yetenekli hücreler olan lenfositler başlıca T ve B hücrelerinden ve T ve B hücrelerinin subgruplarından oluşurlar. Bu hücrelerin yüzeylerindeki farklı antijenleri tanıyan monoklonal antikorlarla yapılan immünoenzim boyamaları derideki lenfositlerin subgrupları saptanabilmektedir. Böylece yardımcı veya baskılayıcı T hücrelerinden, B hücrelerinden, plazma hücrelerinden ve makrofajlardan köken alan lenfomalar ayrılabilir (10) (Şekil 4,5).

Langerhans hücrelerinin proliferasyonu ile karakterli bir hastalık olan histiositozis X de, parafin kesitlerde peanut agglutinin (PNA) ve S-100 protein ile, kriostat kesitlerde de CD 6 antijenlerini gösteren monoklonal antikorlar ile çalışılan immünoenzim yöntemleri kesin tanının konmasını sağlamaktadır (11,12) (Şekil 6).

Paget hücrelerinde, ektrin ve apokrin bezlerin sekretuar ve duktal hücrelerinde olduğu gibi, karsinoembriyonik antijen bulunur (13). Karsinoembriyonik antijene karşı geliştirilen poliklonal antikorlarla çalışılan immünoenzim yöntemleri ile epidermis içindeki Paget hücreleri kesin olarak saptanabilmektedir (Şekil 7). Epidermisteki keratinositler ve melanositler ise karsinoembriyonik antijen ile reaksiyon vermezler. Paget hastalığı-

nın yüzeysel yapılan melanoma in situ dan ayırımında S-100 protein de kullanılabilir. Melanoma hücreleri S-100 protein içerirlerken (14), Paget hücrelerinde bu antijen bulunmaz.

Keratinizasyonun ve intersellüler köprülerin tümüyle kaybolduğı indifferensiye skuamöz hücreli karsinomada bazen amelanotik melanomadan veya pleomorfik sarkomadan ayırım olanaksız olabilir. Böyle durumlarda da kesin tanı için immünoenzim yöntemlerine gereksinim vardır. Keratine karşı geliştirilen monoklonal antikor ile inkübe edilen kesitlerde saptanan pozitif reaksiyon tümörün epitel kökenli olduğunu gösterir (15) (Şekil 8). Buna karşılık pleomorfik sarkomlar mezankimal kökenli hücreleri boyayan vimentine karşı geliştirilen monoklonal antikorlarla (16), malign melanoma ise S-100 proteine karşı geliştirilen monoklonal antikorla (14) veya HMB-45 antikorları ile pozitif reaksiyon verir (17,18) (Şekil 9,10).

S-100 protein, sitoplazma ve nükleoplazmada bulunan ve Ca ve Zn bağlayan bir asidik proteindir. Nötral PH'de, amonyum sülfat içinde %100 oranında solübil olması nedeniyle S-100 protein adı verilmiştir (19). S-100 protein çeşitli karsinomalarda, özellikle adenokarsinomada da pozitifdir, ancak adenokarsinomanın sitokeratin ve epitelyal membran antijenine karşı geliştirilen antikorlarla reaksiyon vermesi, malign melanomadan ayrılmasını sağlar.

İğ hücreli nodüler melanoma bazen iğ hücreli skuamöz hücreli karsinomaya yada fibrosarkomaya ileri derecede benzerlik gösterebilmektedir. Böyle bir durumda melanin granülerinin gösterilmesi malign melanoma açısından tanı koydurucu olabilir. Ancak amelanotik malign melanomada melanin için yapılan boyamada negatif sonuç verecektir. Bu durumda S-100 proteine karşı geliştirilen monoklonal antikorlar yada HMB-45 antikorları ile yapılan immünoenzim çalışmasının pozitif olması tümörün amelanotik melanoma olduğunu kanıtlar, çünkü bu reaksiyon fibrosarkomada negatifdir (Şekil 11).

Ulex europaeus agglutinin I adı verilen lektin, endotel hücrelerinin idantifikasyonunda kullanılan güvenilir bir endotel işaretleyicisidir (20) (Şekil 12). Meme karsinomu nedeniyle yapılan radikal mastektomi sonrasında lenfödem alanlarında gelişen anjiyosarkom, bazen primer meme karsinomunun kutanöz metastazları ile karışabilmektedir. Bu olgularda kesitlerin Ulex europaeus ile inkübasyonu anjiyosarkom tanısının kesin olarak konmasını sağlar.

Dermatolojik tanıda immünoenzim yöntemlerinin uygulandığı hastalıkların sayısı her geçen gün artmaktadır, immünoenzim yöntemleri, monoklonal antikorlarla hücre yada organizmaların spesifik antijenlerini tanıdığı için, kesin tanının konmasında dermatopatologlara yeni ve umut verici ufuklar açıyor.

KAYNAKLAR

1. Schaumburg-Lever G. Immunoenzyme techniques in dermatopathology. *Int J Dermatol* 1986; 25:217-23.
2. Bourne J. Handbook of immunoperoxidase staining methods. DAKO corp. Santa Barbara 1988.
3. Tur E, Vardinon N, Eylan E, Frich B, Brenner S. Alkaline phosphatase immuno-enzymatic technique in the diagnosis of pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 1983; 108:77-82.
4. Callen JP, Dahi M, Golitz L, Schachner L, Stegman S. Advances in Dermatology. Year Book Med Pub Inc, Chicago 1988; 123-39.
5. Doherty MJ, Russo GG, Jolly HW, Stewart KR. Immunoenzyme techniques in dermatopathology. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20:827-37.
6. Cordel JL, Falini B, Erber WN. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32:219-29.
7. Schaumburg-Lever G, Tronnier M. Combination of the APAAP and the IGGS techniques for double-labeling with two different monoclonal antibodies. *J Am Acad Dermatol* 1989; 11 (1):29-32.
8. Schaumburg-Lever G. The alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase technique in dermatopathology. *J Cutan Pathol* 1987; 14:6-9.
9. Anadolu yavuzer R, Erdem C, Ertan C, Taşpınar A. İmmüno-büllöz dermatozlarda ABC immünoenzim yönteminin tanını açısından değeri. X. Prof.Dr.A.Lütfü Tat Simpozyumu 23-26 Ekim 1991; Ankara.
10. Ueki H, Yaoita H. A color atlas of dermato-immunohistology. Wolfe Med Pub Ltd 1989;
11. Cocchia D, Michetti F, Donate R. Immunochemical and immunohistochemical localisation of S-100 antigen in normal human skin. *Nature* 1981; 294:85-8.
12. Fithian E, Kung P, Goldstein G. Reactivity of langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78:2341-5.
13. Nadji M, Morales AR, Girtfartrter RE. Paget's disease of the skin. A unifying concept of histogenesis. *Cancer* 1982; 50:2203-7.
14. Kahn HJ, Baumal R, Marks A. The value of immunohistochemical studies using antibody to S-100 protein in dermatopathology. *Int J Dermatol* 1984; 23:38-44.
15. Murphy GF. Cytokeratin typing of cutaneous tumors. A new immunochemical probe for cellular differentiation and malign transformation. *J Invest Dermatol* 1985; 84:1-2.
16. Leader M, Collins M, Patel J, Vimentin. An evaluation of its role as a tumor marker. *Histopathology* 1987; 11:63-72.
17. Wick MR. Monoclonal antibodies in diagnostic dermatopathology. *Am J Dermatopath* 1987; 9:185-88.
18. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol* 1988; 15:201-7.
19. Donato R. S-100 proteins. *Cell Calcium* 1986; 1:123-45.
20. Holthofer H, Virtanen J, Kariniemi AL. Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Invest* 1982; 47:60-6.