

І.С.Шпонька
О.В.Пославська
П.О.Гриценко
Л.І.Лимар
В.І.Шпонька

ДЗ «Дніпропетровська
медична академія МОЗ
України»

Ключові слова: мелано-
ма, імуногістохімія, вімен-
тин, S100, HMB45.

Надійшла: 23.11.2013
Прийнята: 20.12.2013

УДК: 616-006.81-097.3-076

ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ МЕЛАНОЦИТАРНИХ НОВОУТВОРЕНЬ

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Патоморфологічна діагностика та прогноз перебігу новоутворень різних локалізацій з урахуванням маркерів біологічних властивостей» (номер державної реєстрації 0112U006965).

Реферат. Індекс проліферації невусів показав статистично вірогідну різницю відносно злоякісних меланом. Всі зразки експресували S100, 98,30% із них мали експресію HMB-45 хоча б в частині клітин і 83,89% – були негативні на Cytokeratin, Pan Ab1. При диференціальній діагностиці меланом та невусів треба враховувати цитологічні особливості, зміни будови епідермісу і/або дерми та індекс проліферації. Фенотип меланоцитарних новоутворень відповідає Cytokeratin, Pan–, Vimentin+, S100+, HMB-45+, що передбачає використання цих маркерів разом.

Morphologia. – 2013. – Т. 7, № 4. – С. 91-96.

© І.С.Шпонька, О.В.Пославська, П.О.Гриценко, Л.І.Лимар, В.І.Шпонька, 2013
✉ alexandra.poslavskaya@gmail.com

Shpon'ka I.S., Poslavs'ka O.V., Gritsenko P.O., Lyamar L.I., Shpon'ka V.I. Features of immunohistochemical diagnostic of melanocytic tumours.

ABSTRACT. Background. The malignant melanomas are the most important group of skin cancers. Although less common than the familiar basal and squamous cell tumours of the skin, they are much more frequently fatal, due to their intrinsic tendency to lymphatic and haematogenic metastasis. **Objective.** The article is devoted to parsing cases melanocytic tumours that were established through immunohistochemical study. **Methods.** In the study analyzed 236 patient material (150 women and 86 men) aged 28 to 77 years during 2010-2013 turned out to clarify the histological diagnosis of skin tumors or metastases to lymph nodes (rare at other sites). The primary monoclonal antibodies used Cytokeratin, Pan Ab1 (clone AE1/AE3), S100 (clone 4C4.9), Ki-67 (clone SP6), Vimentin (clone V9), Melanoma gp100 (clone HMB-45). **Results.** Naevus proliferation rate showed a statistically significant difference with respect to proliferation rate of malignant melanomas ($p < 0,05$). All samples (100%) showed positive expression of high-intensity staining (+++) or moderate (++) intensity on the marker S100; 98,30% of samples (232 of 236) showed positive expression of marker HMB-45 at least in terms of tumor cells with intensity color from the high (+++) to weak (+) and 83.89% of the samples (198 of 236) were negative (–) Cytokeratin, Pan Ab1 (other 38 cases showed weakly positive expression (+/-) of tumor cells). **Conclusions.** 1. In the differential diagnosis of melanoma and naevus, we must bear in mind the uniformity immunophenotype of these tumors and consider only the cytological features of the tumor, changes in the structure of the epidermis and dermis (contour, symmetry, depth, inflammatory infiltration) and proliferation rate. 2. Patients whose lymph nodes were the first clinical signs of cancer are always in need for additional immunohistochemical studies to avoid diagnostic errors. 3. The most common phenotype of melanocytic tumours responsible Cytokeratin, Pan–, Vimentin+, S100+, HMB-45+, which involves the use of these markers together. 4. Some options melanomas (especially amelanotic) can significantly alter their immunophenotypes, making it difficult to verify these tumors and needs to be extended diagnostic panel of antibodies.

Key words: melanoma, immunohistochemistry, vimentin, S100, HMB-45.

Citation:

Shpon'ka IS, Poslavs'ka OV, Gritsenko PO, Lyamar LI, Shpon'ka VI. [Features of immunohistochemical diagnostic of melanocytic tumours]. Morphologia. 2013;7(4):91-6. Ukrainian.

Вступ

За визначенням ВООЗ, меланоцитарні пухлини (МП) включають в себе велику кількість різноманітних доброякісних і злоякісних новоутворень з особливими клінічними, морфологічними і генетичними проявами. З точки зору здоров'я суспільства, із них саме меланоми є найбільш важливою групою злоякісних новоутворень шкіри. Хоча вони і зустрічаються рідше,

ніж базальноклітинні і плоскоклітинні раки, злоякісні меланоми набагато частіше призводять до летальних випадків, у зв'язку з їх внутрішньої схильністю до раннього лімфогенного та гематогенного метастазування [1; 2].

Аналіз стану ураження населення України за 2012 р. в розрізі областей показує, що найбільші, ніж в середньому по Україні (6,8 на 100 000), рівні захворюваності на меланому шкіри відзна-

чилися в м. Севастополь (14,5), Дніпропетровській (8,6) та Херсонській (8,6) областях. Особливо насторожує, що згідно TNM класифікації в I-II стадії в середньому по Україні діагностовано лише 63,4% нових випадків, не дивлячись на доступність локалізації, це говорить про низьку ефективність профілактичних оглядів (виявлено лише 50% випадків захворювання) та низький рівень інформованості населення. Це призводить до того, що при охопленні специфічним лікуванням 91,6% випадків все одно 12,6% пацієнтів не проживає і 1 року з моменту встановлення діагнозу (в Дніпропетровській області цей показник досяг 13,7% при 100% морфологічній верифікації пухлин) [3].

Періодичний вплив високих доз УФ-випромінювання, часто в поєднанні з ендогенними факторами, в тому числі і генетичною схильністю, вважаються основними факторами ризику розвитку меланоми [4; 5; 6]. Різке збільшення захворюваності відображає небережне ставлення до інсоляції та особливості активного способу сучасного життя. Стабілізувати цю тенденцію можливо покращенням первинної профілактики і скринінгу ранніх уражень шкіри. Таким чином, високоточні діагностичні заходи це багатообіцяючий підхід до зниження смертності від меланоми.

Мета даної роботи полягала в аналізі випадків меланоцитарних пухлин, що були встановлені після імуногістохімічного дослідження, порівнянні діагнозів до та після проведення відповідного дослідження та визначенні підстав для діагностичних помилок.

Матеріали та методи

В дослідження було проаналізовано матеріал 236 пацієнтів (150 жінок та 86 чоловіків) віком від 28 до 77 років, що впродовж 2010-2013 рр. зверталися з метою уточнення гістологічного діагнозу пухлини шкіри або метастазу в лімфатичні вузли (рідко іншої локалізації) і після проведення імуногістохімічного дослідження (ІГХ) отримали діагноз меланоцитарної пухлини: вузлова меланома шкіри (n=104), поверхнево-розповсюджена меланома шкіри (n=11), атипична меланоцитарна дисплазія «педжетоїдного типу» (n=7), меланома мозкових оболонок (n=1), безпігментна меланома (n=27), метастаз безпігментної меланоми (n=35), метастаз пігментної меланоми (n=23), змішаний невус (n=8), голубий невус (n=3), внутрішньодермальний невус (n=6), диспластичний невус (n=9), Шпіц (Spitz) невус (n=1), нейронеvus Масона (меланонейрофіброма) (n=1). Дослідження проводили на базі морфологічного відділу лабораторії діагностичного центру медичної академії м. Дніпропетровськ.

Біопсійний матеріал занурювався в 10% розчин нейтрального забуференого формаліну на 24 годин з метою фіксації клітинних структур.

Після фіксації і проводки в спиртах за стандартною методикою, матеріал заливався у парафін. Парафінові зрізи товщиною 4-5 мкм, отримані на мікромомі Microm HM-340, були депарафіновані і забарвленні гематоксиліном-еозином. Мікроскопія проводилася за допомогою світлового мікроскопу Leica DMLS з використанням об'єктивів $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$ для оцінки наявності достатньої кількості матеріалу та його якості для проведення подальшого ІГХ дослідження. Інкубація зрізів з первинними антитілами проводилась у вологих камерах при температурі 23-25°C біля 30 хвилин. В якості первинних використовувалися моноклональні антитіла Cytokeratin, Pan Ab1 (клон AE1/AE3), S100 (клон 4C4.9), Ki-67 (клон SP6), Vimentin (клон V9), Melanoma gp100 (клон HMB-45). Титр антитіл підбирався індивідуально для кожного маркера з використанням у якості розчинника спеціального розчину Antibody Diluent (LabVision). Подальша інкубація зрізів з вторинними антитілами (надчутлива система візуалізації UltraVision Quanto, LabVision) відбувалася також у вологих камерах біля 30 хвилин при кімнатній температурі. Після кожного етапу зрізи промивалися у ТРИС буфері з pH 7,4 протягом 10 хвилин. Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (DAB) (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопу протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді коричневого забарвлення специфічних структур.

Індекс проліферації (ІП) обчислювався як відсоток клітин з інтрануклеарною реакцією на 1000 клітин МП з маркером Ki-67. При оцінці ІГХ реакції з маркером S100 була виявлена змішана ядерно-цитоплазматична реакція, що оцінювалася за інтенсивністю (+), (++) , (+++) як позитивна тільки в клітинах МП. З маркерами Cytokeratin, Pan Ab1, Vimentin та HMB-45 позитивним вважалося цитоплазматичне забарвлення різної інтенсивності (+), (++) , (+++) тільки в клітинах МП [7].

Статистична обробка даних проводилася в програмі SPSS Statistica 17.0. Порівняння середніх значень здійснювалося критерієм Ст'юдента. Значущим вважався зв'язок при $p < 0,05$ [8].

Результати та їх обговорення. При аналізі вхідних даних розподіл первинних локалізацій МП виявився таким: 154 випадків уражень шкіри, 63 випадки уражень лімфатичних вузлів, 8 випадків уражень м'яких тканин кінцівок та тулубу, 4 випадки ураження додаткових пазух носу, 3 випадки уражень слизових оболонок статевих органів, 2 випадки уражень головного мозку, 1 випадок ураження прямої кишки, 1 випадок ураження ділянки фатового соска. Розподіл первинних діагнозів можна представити у вигляді таблиці (табл. 1).

Розподіл первинних діагнозів

| Первинний діагноз | Кількість n (%) | Співпадіння діагнозів після ІГХ |
|-------------------------------------|-----------------|---------------------------------|
| 1. Меланома | 87 (36,9%) | 65 із 87 (74,7%) |
| 2. Невус | 23 (9,7%) | 11 із 23 (47,8%) |
| 3. Меланоцитарна дисплазія | 3 (1,3%) | 1 із 3 (33,3%) |
| 4. Карцинома | 27 (11,4%) | - |
| 5. Саркома | 15 (6,4%) | - |
| 6. Лімфопроліферативне захворювання | 10 (4,2%) | - |
| 7. ? | 71 (30,1%) | - |

В першу чергу треба виділити випадки, що стосуються диференціальної діагностики злоякісних меланом та невусів. Згідно літератури [1; 2; 7], фенотипи цих новоутворень мають багато спільного (Cytokeratin, pan -, Vimintin +, S100 +, НМВ-45 +, Melan-A +) і навіть маркер проліферації не завжди допомагає вирішити це питання.

Наявність мітозів в дермальній порції ушкодження не свідчить про діагноз меланоми. Як правило, мітотичні фігури в доброякісних невусах зустрічаються в меланоцитах сосочкового або поверхневого ретикулярного шарів дерми. Але якщо ушкодження тільки поширюється на цій глибині, кількість мітозів стає важливим, також як і важливими є мітози в кластерах (так звані «гарячі точки») або патологічні мітози. У нашому дослідженні ІП зразків злоякісних меланом варіював від 11% до 67% і в середньому склав 29,12%. ІП невусів коливався від 1% до

17%, в середньому склав 6,87%, що показало статистично вірогідну різницю відносно ІІІ злоякісних меланом ($p < 0,05$).

У випадку меланоми з великою масою пухлинних клітин в дермі, з'являється феномен «споживання епідермісу»: епідерміс тоншає, і замість невеликих кубовидних кератиноцитів базального шару видно великі, плоскі клітини з вакуолізацією (рис. 1А).

Найбільш важливим аспектом симетрії дермального компоненту МП є його контур або силует. Розміри і форми гнізд, пігментація, цитологічні особливості меланоцитів та інфільтратів лімфоцитів і макрофагів повинні бути ідеально однакові на обох боках ураження з розташуванням на тому ж рівні дерми. Непропорційне велике гніздо клітин з наявністю «гарячих точок» може бути ключем до верифікації меланоми (рис. 1Б).

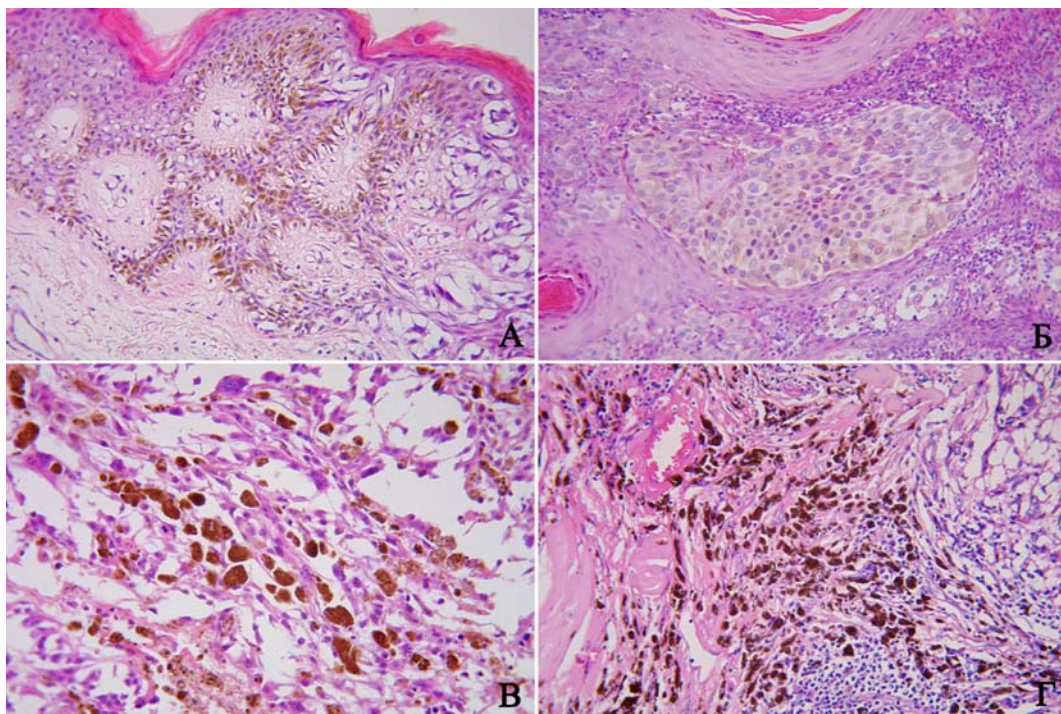


Рис. 1. А. Поверхнево-розповсюджена меланома на тлі невуса, феномен «споживання епідермісу», в базальному шарі епідермісу великі, плоскі клітини з вакуолізацією. Б. Поверхнево-розповсюджена меланома, радіальна фаза зростання, асиметричні кластери клітин присутні в дермі. В. Вузлова форма пігментної меланоми. Г. Веретеноподібноклітинна пігментна меланома. Забарвлення гематоксилином-еозином. $\times 400$.

В нашому дослідженні серед 23 «невусів», що були представлені для уточнення діагнозу, 4 випадки було визначено як поверхнево-розповсюджену меланому і 8 випадків – як вузлову форму меланому (рис. 1В), 2 з яких було видалено не в межах здорових тканин і не дало змогу поставити ступінь інвазії за Кларком. Навпаки, 16 випадків невусів та 6 випадків атипової меланоцитарної дисплазії «педжетоїдного типу» серед представлених 87 «меланом» говорить про гіпердіагностику.

Іншим складним розділом онкоморфології є диференційна діагностика метастазів меланому, особливо безпігментної, в лімфатичні вузли з низькодиференційованими карциномами, саркомами, лімфопроліферативними захворюваннями [5; 7]. Звичайно більшість віддалених метастазів від меланому клінічно передбачувані та виявляються під час наступних відвідувань протягом декількох років після видалення первинної пухлини. До того ж метастаз пігментної меланому, навіть у складних діагностичних випадках, таких як веретеноподібна або десмопластична меланома, може визначитися завдяки наявності меланіну (рис. 1Г). Крім лімфатичних вузлів, найбільш поширеним місцем для метастазування меланому є шкіра. Вісцеральні метастази частіше роз-

ташовані в легенях, печінці, центральній нервовій системі і кістках [1]. Але пацієнти, у яких ураження лімфатичних вузлів стало першими клінічними проявами онкозахворювання, можливо з редуцією первинного ураження шкіри, завжди потребують проведення додаткового ІГХ дослідження для уникнення діагностичних помилок. Найбільше питання викликає безпігментна меланома, яка демонструє безліч різних гістологічних варіантів (рис. 2 А-Г, рис. 3 А).

Із протеїнів проміжних філаментів в усіх досліджених МП був знайдений білок віментин, що підтверджено цитоплазматичною реакцією високої інтенсивності однойменного маркеру (рис. 3Б). В літературі також описані випадки часткової експресії α -актину гладеньких м'язів, кальдесмону, цитокератинів простих епітеліїв, але в нашому дослідженні такі випадки зафіксовані не були. У широкій практиці найбільше використання для імунотипуювання меланом, на відміну від карцином та сарком, найшли антитіла до ізоформи α білку S100 (первинний скринінг пухлин нейроектодермального походження) (рис. 3В) та премеланосом НМВ-45 (маркер меланоцитарного диференціювання).

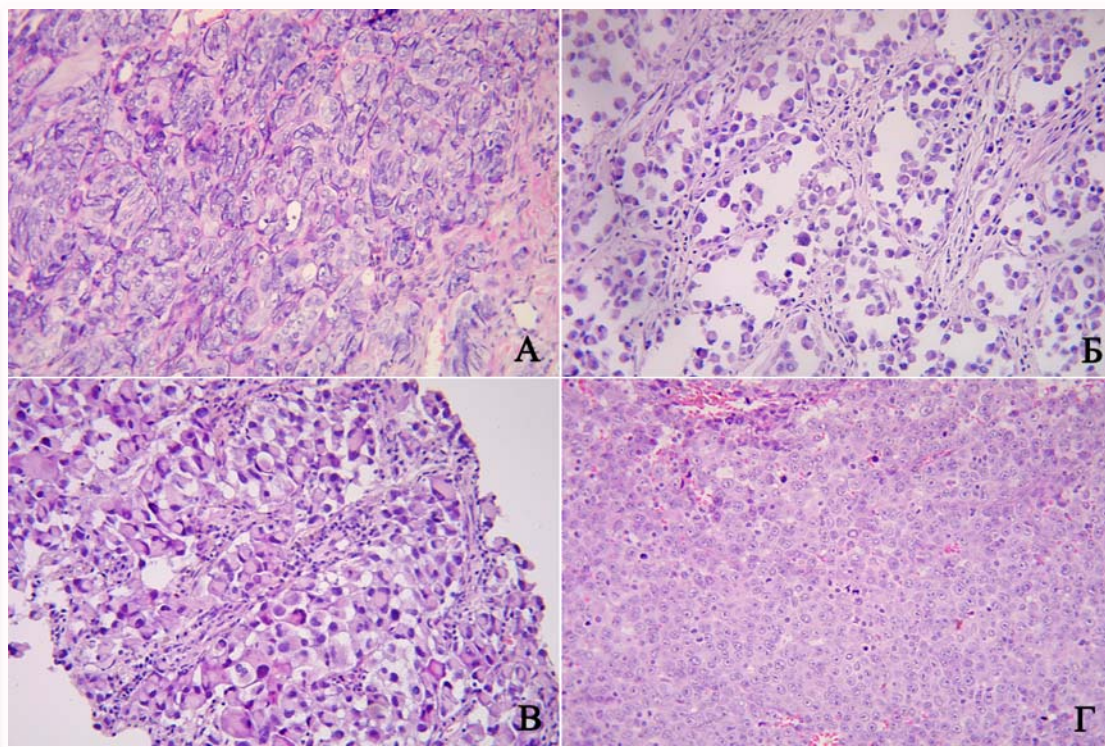


Рис. 2. Гістологічні варіанти безпігментних меланом. А. Плеоморфна меланома. Б. Перстнеподібноклітинна меланома з прошарками сполучної тканини. В. Перстнеподібноклітинна меланома. Г. Мілноклітинна меланома. Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 400$.

Але окремі варіанти злоякісних меланом можуть суттєво змінювати свій імунофенотип,

що ускладнює верифікацію цих пухлин. Так, міксоїдний, десмопластичний, рабдоїдний, сарко-

матойдний варіанти меланом можуть показувати негативну реакцію на меланоцитарний маркер НМВ-45 або на S100 [2; 4; 7], тому ці маркери використовують в парі разом з перевіркою пухлини на експресію високомолекулярних цитокератинів (АЕ1/АЕ3), що зазвичай негативні або слабко-позитивні (+/-) в МП. В нашому дослідженні всі зразки показали позитивну експресію з інтенсивністю забарвлення високої (+++) або

помірної (++) інтенсивності на маркер S100; 98,30% зразків (232 із 236) демонстрували позитивну експресію маркера НМВ-45 хоча б в частині клітин пухлини з інтенсивністю забарвлення від високої (+++) до слабкої (+) і 83,89% зразків (198 із 236) були негативні (-) на Cytokeratin, Pan Ab1 (інші 38 випадків показали слабко-позитивну (+/-) експресію в частині пухлинних клітин).

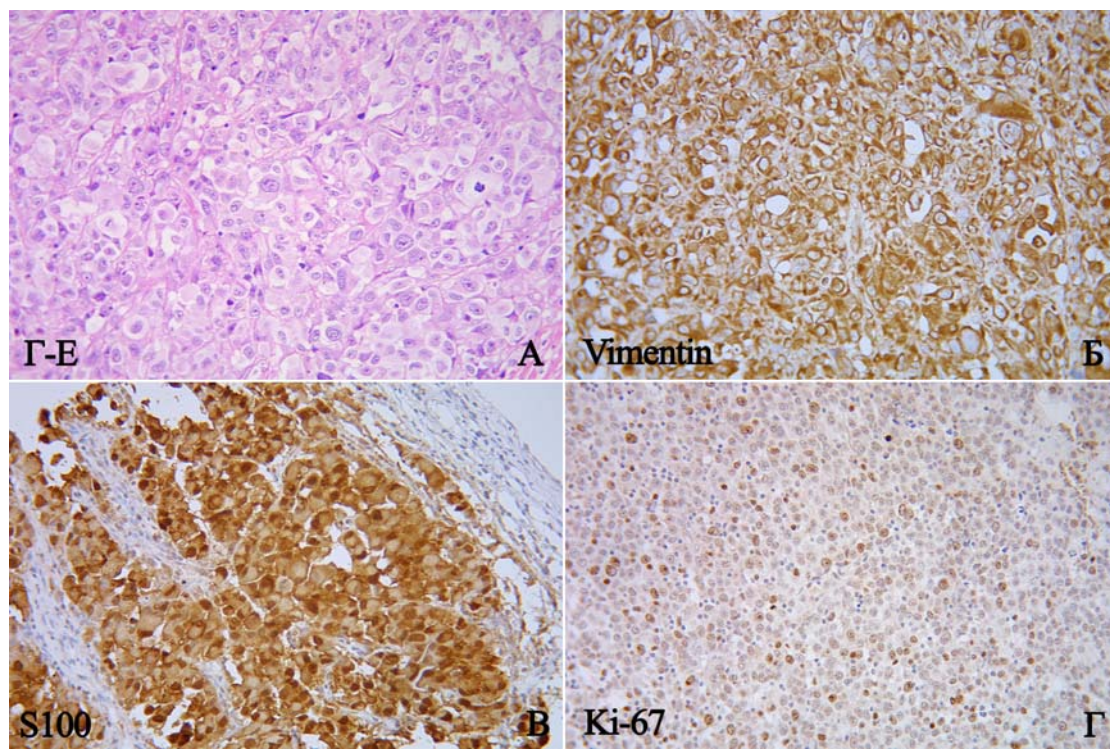


Рис. 3. А. Метастаз безпігментної меланоми в аксілярний лімфатичний вузол, забарвлення гематоксиліном-еозином. Б. Позитивна (+++) цитоплазматична експресія маркера Vimentin, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. В. Позитивна (+++) ядерно-цитоплазматична експресія маркера S100, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. Г. Позитивна інтрануклеарна експресія маркера Ki-67 на рівні 59%, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. $\times 400$.

Висновки

1. При диференціальній діагностиці меланом та невусів, треба мати на увазі однаковість імунофенотипів цих новоутворень і враховувати тільки цитологічні особливості пухлини, зміни будови епідермісу й дерми (контур, симетрія, глибина, запальна інфільтрація) та індекс проліферації.

2. Пацієнти, у яких ураження лімфатичних вузлів стало першими клінічними проявами онкозахворювання завжди потребують проведення додаткового ІГХ дослідження для уникнення діагностичних помилок.

3. Найбільш поширений фенотип МП відповідає Cytokeratin-, Pan-, Vimintin+, S100+, НМВ-45+, що передбачає використання цих маркерів разом.

4. Окремі варіанти меланом (особливо безпігментні) можуть суттєво змінювати свій імунофенотип, що ускладнює верифікацію цих пухлин і потребує розширення діагностичної панелі антитіл.

Перспективи подальших розробок

Діагноз злоякісної меланоми може бути складним завданням, враховуючи значні відмінності в морфологічних особливостях і ІГХ реакціях маркерів, які часто використовуються для підтвердження діагнозу. Перспективними для подальших досліджень є випадки меланом з втратою фарбування маркерами меланоцитарної диференціації S100, НМВ-45 і Melan-A з нереалізованою експресією ферменту тирозинази, а також порівняння фенотипів первинної пухлини та її регіональних метастазів.

Літературні джерела References

1. World Health Organization of tumours: pathology and genetics of skin tumours / P. E. LeBoit, G. Burg, D. Weedon, A. Sarasin. – Lyon, France : IARC Press, 2006. – 357 p.
LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, editors. World Health Organization of tumours: pathology and genetics of skin tumours. Lyon, France: IARC Press; 2006. 357 p.
2. Weedon D. Skin Pathology / D. Weedon. – China : Churchill Livingstone, 2002. – 1158 p.
Weedon D, author. Skin Pathology. China: Churchill Livingstone; 2002. 1158 p.
3. Рак в Україні, 2011-2012. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби / під ред. проф. І. Б. Щепотіна // Бюлетень національного канцер-реєстру України. – № 14. – К., 2013. – 120 с.
Fedorenko ZP, Mikhailovich YuY, Gulak LO, Goroh EL, Ryzhov AU, Sumkina AV, Kutcenko LB, authors; Schepotin IB, editor. Rak v Ukraini, 2011-2012. Zakhvoryuvanist', smertnist', pokazniki diyal'nosti onkologichnoi sluzhbi [Cancer in Ukraine, 2011-2012. Morbidity, mortality, performance activities oncology service]. Kyiv; 2013. 120 p. Ukrainian.
4. Dermatopathology / W. Kempf, M. Hantschke, H. Kutzner, W. H. C. BurgdorfL. – Germany : Steinkopff Verlag, 2008. – 299 p.
Kempf W, Hantschke M, Kutzner H, Burgdorf WHC, authors. Dermatopathology. Germany: Steinkopff Verlag; 2008. 299 p.
5. Пальцев М. А. Атлас патологии опухолей человека / М. А. Пальцев, Н. М. Аничков. – М. : Медицина, 2005. – 454 с.
Palcev MA, Anytchkov NM, authors. Atlas patologii opukholey cheloveka [Atlas of human tumor pathology]. - Moscow: Medical; 2005. 454 p. Russian.
6. Патологоанатомическая диагностика опухолей человека : [руководство] / [под ред. Н. А. Краевского, А. В. Смольяникова, Д. С. Саркисова.]. – М. : Медицина, 1993 – Т. 1. – 560 с.
Krajewski NA, Smolyannikova AV, Sarkisov DS, editors. Patologoanatomicheskaya diagnostika opukholey cheloveka [Pathologic diagnosis of human tumors]. Moscow: Medical; 1993;1. 560 p. Russian.
7. Петров С. В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека : [3-е изд., доп.] / С. В. Петров, Н. Т. Райхлин. – Казань : Титул, 2004. – 456 с.
Petrov SV Raikhlin NT, editors. Rukovodstvo po immunogistokhimicheskoy diagnostike opukholey cheloveka [Manual of immunohistochemical diagnostics of human tumours]. Kazan: Titul; 2004. 456 p. Russian.
8. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 2002. – 240 с.
Avtandilov GG, author. Osnovy kolichestvennoy patologicheskoy anatomii [Fundamentals of quantitative pathological anatomy]. Moscow: Medical; 2002. 240 p. Russian.

Шпонька И.С., Пославская А.В., Гриценко П.А., Лымарь Л.И., Шпонька В.И. Особенности иммуногистохимической диагностики меланоцитарных новообразований.

Реферат. Индекс пролиферации невусов показал статистически достоверное снижение относительно злокачественных меланом. Все образцы экспрессировали белок S100, 98,30% из них показали экспрессию HMB-45 хотя бы в части клеток и 83,89% – были отрицательны на Cytokeratin, Pan Ab1. При дифференциальной диагностике меланом и невусов надо учитывать цитологические особенности, изменения строения эпидермиса и/или дермы и индекс пролиферации. Фенотип меланоцитарных новообразований соответствует Cytokeratin, Pan–, Vimintin+, S100+, HMB-45+, что предполагает использование этих маркеров вместе.

Ключевые слова: меланома, иммуногистохимия, виментин, S100, HMB45.