

НЕКОТОРЫЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕЛАНОЦИТАРНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ КОЖИ

Новикова И.А.¹, Максимова Н.А.¹, Позднякова В.В.¹, Максимова М.И.¹,
Ильченко М.Г.¹, Ульянова Е.П.¹, Гранкина А.О.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: rniioi@list.ru

В последние годы в разных странах мира отмечается значительный рост заболеваемости меланомой кожи (МК). Она варьирует от 5 до 30 случаев и более на 100 000 населения в год, а частота ее составляет 1-4% всех злокачественных опухолей. Изучение белков, определяющих инвазивный потенциал клеток, может способствовать разработке новых стратегий диагностики, прогнозирования и лечения меланоцитарных образований кожи (МОК). Мы изучили экспрессию некоторых молекулярно-биологических маркеров, контролирующих апоптоз (p53), пролиферацию (ki-67), ангиогенез (CD31, VEGF) в ткани МОК у 15 больных с пигментными доброкачественными образованиями (из них 5 больных с диспластическими невусами) и у 11 больных с МК. При оценке пролиферативного потенциала МОК выявлено наличие умеренной пролиферативной активности ki-67 у 11 больных (100%) МК и у 5 (33,3%) с невусами, которые были определены как диспластические. Положительная экспрессия p53 (>25%) наблюдалась у 54,5% (6) пациентов с МК, тогда как в группе с невусами данная экспрессия не была отмечена. Нами выявлены достоверно значимые различия в экспрессии VEGF среди исследуемых групп, где среднее содержание клеток VEGF+ составило $32,5 \pm 2,9\%$, тогда как в невусах $23,8 \pm 2,1\%$ ($p < 0,05$). При количественной оценке внутриопухолевой микрососудистой плотности выявлено, что среднее количество сосудов микроциркуляторного русла в поле зрения при меланоме и невусах составило $10,0 \pm 0,9$ и $4,1 \pm 0,4$ соответственно, результаты экспрессии CD31 статистически достоверны ($p < 0,05$). Хотя и прослеживается достоверная разница в экспрессии ki-67, p53, VEGF и CD31 между меланомами и невусами, но достаточно высокая чувствительность данных иммуногистохимических маркеров не всегда сопровождается необходимой специфичностью, что не позволяет, в частности, дифференцировать различные виды невусов.

Ключевые слова: меланоцитарные образования кожи, меланома кожи, невус, молекулярно-биологические маркеры.

SOME IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES OF CUTANEOUS MELANOCYTIC LESIONS

Novikova I.A.¹, Maksimova N.A.¹, Pozdniakova V.V.¹, Maksimova M.I.¹,
Ilchenko M.G.¹, Ulianova E.P.¹, Grankina A.O.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: rniioi@list.ru

In recent years, the incidence of cutaneous melanoma (CM) has grown significantly in different countries of the world. The incidence rate varies from 5 to 30 and more per 100 000 population annually; melanoma accounts for 1-4% of all malignant tumors. Study of proteins determining invasive potential of cells can contribute to the development of new strategies of diagnosis, prognosis and treatment of cutaneous melanocytic lesions (CML). We studied the expression of some molecular and biological markers controlling apoptosis (p53), proliferation (ki-67) and angiogenesis (CD31, VEGF) in CML tissues of 15 patients with benign pigmented lesions (including 5 patients with dysplastic nevi) and 11 patients with CM. The assessment of CML proliferative potential showed moderate proliferative activity of ki-67 in 11 (100%) patients with CM and in 5 (33.3%) patients with nevi determined as dysplastic. Positive p53 expression (>25%) was observed in 54.5% (6) patients with CM, while it was not registered in patients with nevi. We found significant differences in VEGF expression in the two groups of patients: the average amount of VEGF+ cells was $32.5 \pm 2.9\%$ in CM vs. $23.8 \pm 2.1\%$ in nevi ($p < 0.05$). Quantitative assessment of intratumoral microvessel density showed that the average amount of microvasculature vessels in sight in melanoma and nevi was 10.0 ± 0.9 and 4.1 ± 0.4 respectively; the results for CD31 expression were statistically significant ($p < 0.05$). Significant differences were observed in ki-67, p53, VEGF and CD31 expression in melanoma and nevi; however, high enough sensitivity of immunohistochemical markers was not always accompanied by the appropriate specificity, which did not allow, in particular, differentiation of various types of nevi.

Keywords: cutaneous melanocytic lesions, skin melanoma, nevus, immunohistochemical markers.

Меланома кожи (МК) - злокачественная опухоль из клеток меланоцитарной системы и одно из наиболее агрессивно протекающих злокачественных новообразований человека, обладающих высоким метастатическим потенциалом [2]. Около 75% больных к моменту начала специального лечения уже имеют распространенный процесс [1; 9]. Развитие меланомы – сложный процесс, в который вовлечены различные факторы. В 75% случаев МК возникает из отдельных кожных меланоцитов, а в 25% – из предсуществующих невусов [6-8]. Некоторые исследователи рассматривают всю совокупность меланоцитов организма как своеобразную эндокринную или цитокринную меланогенную систему, ответственную за выработку пигмента. Степень функционирования этой системы организма во многом зависит от факторов внешней среды (прежде всего уровня инсоляции) и регулируется продукцией меланостимулирующего гормона, вырабатываемого передней долей гипофиза. В клинической практике внимание уделяется признакам активизации невусов, которые свидетельствуют об усилении пролиферативной активности клеток невуса или даже его малигнизации [3; 5]. Считается, что диспластический невус является недостающим звеном между доброкачественным и злокачественным меланоцитарным поражением. С другой стороны, диспластические невусы десятилетиями остаются без изменений, и для их малигнизации нужны дополнительные генетические нарушения [10]. За последнее десятилетие, начиная с 2002 г., когда была открыта мутация BRAF, достигнут значительный прогресс в изучении молекулярных механизмов канцерогенеза меланомы. Так, мутации NRAS обнаруживают в 94,7% случаев врожденных меланоцитарных невусов, которые характеризуются повышенным риском трансформации в меланому [3]. Способность опухолевых клеток к инвазии в ткань дермы является критическим событием в развитии меланомы кожи и в итоге индикатором плохого прогноза для пациентов. Изучение некоторых молекулярно-биологических параметров меланоцитарных образований кожи и молекулярных процессов, связанных с приобретением инвазивного фенотипа, может способствовать раскрытию новых звеньев патогенеза меланомы и поиску дополнительных диагностических критериев.

Цель исследования

Изучить экспрессию некоторых молекулярно-биологических маркеров, контролирующих апоптоз (p53), пролиферацию (ki-67), ангиогенез (CD31, VEGF) в ткани меланоцитарных образований кожи.

Материал и методы исследования

В исследование были включены 15 больных в возрасте от 21 до 49 лет с пигментными доброкачественными образованиями, включая 5 больных с диспластическими невусами. Невусы, взятые для исследования, располагались на коже туловища, конечностей, лица и

шеи. Их размеры по длине колебались от 5 до 25 мм, по ширине – от 2 до 18 мм, по толщине – от 2 до 8 мм. И 11 больных с меланомой кожи. Меланомы, взятые для исследования, располагались на коже спины и нижних конечностей. Их размеры по длине колебались от 1,3 до 8,5 мм, по ширине – от 1,0 до 2,5 мм, при поверхностно-распространяющейся меланоме, толщина по Бреслоу составила от 1,3 до 7,0 мм, при узловой меланоме кожи толщина по Бреслоу – от 1,0 до 3,5 мм, уровень инвазии по Кларку составил от II до IV.

Иммуногистохимическое исследование проводили на срезах с парафиновых блоков, предназначенных для стандартного морфологического исследования, с помощью моноклональных антител ki-67, p53, CD31, VEGF. Используемые в работе первичные антитела и их разведения представлены в таблице.

Панель использованных в исследовании антител

Специфичность	Клон	Фирма	Разведение	Буфер для «демаскировки антигенов»
Антиген ki-67, пролиферативная активность (ядерное окрашивание)	SP6	Thermo scientific	1:200	10 мМTris, 1 мМEDTA (pH 6,0)
Нормальный и мутантный тип p53 (ядерное окрашивание)	DO-7	CELLMARQUE	1:150	10 мМTris, 1 мМEDTA (pH 8,0)
CD31/PECAM-1 Ab-6 (мембранное окрашивание эндотелиальных клеток)	1A10	Thermo scientific	1:100	10 мМTris, 1 мМEDTA (pH 6,0)
VEGF Ab-7 (стимулятор ангиогенеза)	VG1	Thermo scientific	1:150	10 мМTris, 1 мМEDTA (pH 8,0)

Депарафинизацию и регидратацию проводили по стандартной методике, «демаскировку» антигенов в PT-Link Thermo. Протокол включал в себя предварительный нагрев до 65 °С, восстановление антигена в течение 20 минут при температуре 97 °С и дальнейшее охлаждение до 65 °С. Затем стёкла промывали в течение 1–3 минут TBSIHCWashBuffer (CELLMARQUE) и помещали в иммуноавтостейнер Thermo Scientific для окрашивания в автоматическом режиме. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали систему детекции Ultra Vision Quanto Detection System HRPDAB.

Срезы докрашивали гематоксилином Майера, для заключения использовали бальзам Bio-Mount. Оценку экспрессии маркеров изучали как минимум на 10 случайно выбранных полях зрения с применением светового микроскопа Zeiss Primo Star под увеличением x10, x40.

В исследовании применяли следующие критерии оценки маркеров:

1) опухоль считали отрицательной по p53, если в ткани опухоли отсутствовала ядерная реакция с антителами или количество окрашенных клеток было менее 25%, и положительной по p53, если было окрашено более 25% ядер опухолевых клеток;

2) для оценки пролиферативной активности (ПА) подсчитывали количество ki-67-положительных клеток, приходящихся на 200–300 опухолевых клеток. Индекс ki-67 определяли по формуле:

$ПА = \frac{\text{число ki-67 положительных клеток} \times 100}{\text{общее количество клеток}}$

Маркеры пролиферативной активности расценивали на основе наиболее часто употребляющегося способа оценки пролиферативной активности: 0–20% – низкая пролиферативная активность, 21–50% – умеренная пролиферативная активность, 51–100% – высокая пролиферативная активность;

3) опухоль считали положительной по VEGF (VEGFопухоль+), если окрашено более 25% опухолевых клеток. Мы также в каждом конкретном случае количественно подсчитывали долю клеток (в%), окрашенных антителами к VEGF;

4) для оценки ангиогенеза использовали индекс внутриопухолевой микрососудистой плотности (intratumormicrovesseldensity – MVD). Микрососуды окрашивали антителом CD31. Количество сосудов определяли в каждом поле зрения препарата при использовании объектива x40 с использованием программы AxioVs40 v-4.8.1.0. Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoftInc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0).

Результаты исследования и их обсуждение

Наиболее ранними событиями в процессах канцерогенеза и прогрессирования опухолей являются нарушение механизмов пролиферации и апоптоза в опухолевых клетках. На этой стадии теряются нормальные механизмы контроля клеточного деления и апоптоза. Способность к неограниченному размножению является одной из главных особенностей опухолевых клеток. Одним из методов определения пролиферативной активности (ПА) опухоли служит индекс ki-67-положительных клеток. При оценке пролиферативного потенциала меланоцитарных образований выявлено наличие умеренной пролиферативной активности ki-67 у 11 больных (100%) меланомой кожи и у 5 (33,3%) с невусами, которые были определены как диспластические. Низкая пролиферативная активность отмечалась у 66,7% (10) больных с доброкачественными образованиями и отсутствовала у больных

меланомой. Высокая пролиферативная активность в нашем исследовании не встречалась ни в одной из исследуемых групп. Доля пролиферирующих ki-67-положительных клеток в группе больных меланомой находилась в пределах от 30 до 45% клеток, в среднем составив $38,3 \pm 3,6\%$. В группе доброкачественных образований доля ki-67-позитивных клеток находилась в пределах от 4 до 25%, где их среднее содержание составило $14,9 \pm 1,2\%$, причем доля пролиферирующих клеток в диспластических невусах была максимальной и составляла 20-25% (рис. 1).

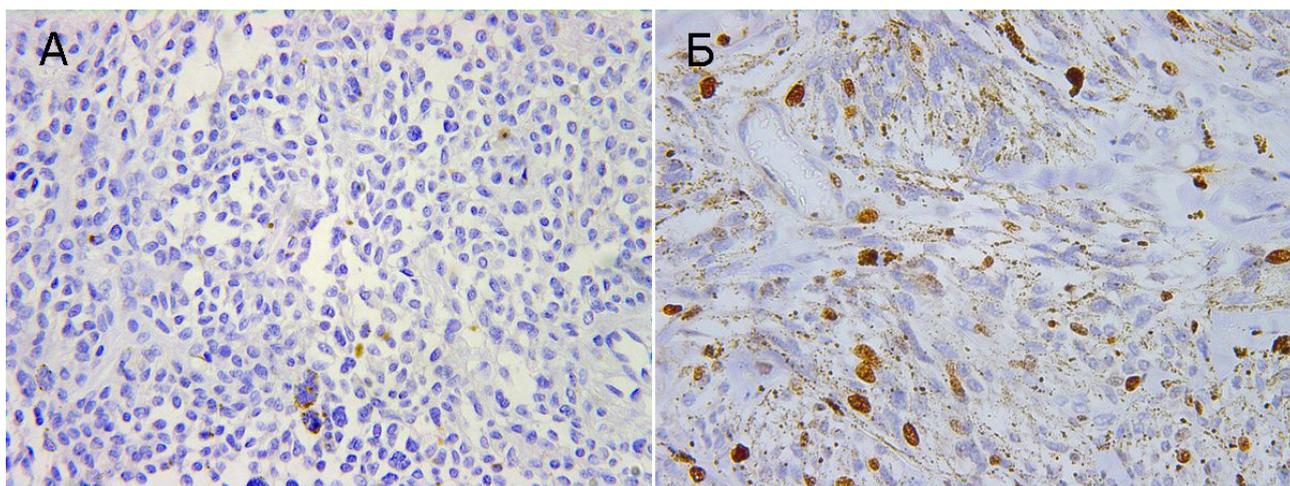


Рис. 1. Экспрессия ki-67. Ув. $\times 400$. А – внутридермальный невус, Б – узловая меланома, веретенноклеточный вариант

Полученные нами данные, так же как и литературные, подтверждают, что иммунореактивность ki-67 хорошо коррелирует с доброкачественностью или злокачественностью меланоцитарных поражений и может помочь в дифференциальной диагностике доброкачественных невусов от меланом [9].

Другим не менее важным маркером биологического потенциала клеток является белок p53, который выполняет три основные функции: регуляцию клеточного цикла, индукцию апоптоза (в случаях, когда повреждения ДНК клетки не могут быть репарированы), стабилизацию генома. Нарушение регуляции клеточного цикла, связанное с изменением активности p53, ведет к развитию и прогрессированию злокачественного процесса. Мутации гена p53 ведут к «сверхэкспрессии» этого белка, которые иммуногистохимическим методом выявляются с помощью анти-p53 антител. Считается, что иммуногистохимическая положительная реакция полностью зависит от наличия мутантного типа p53 [4]. Экспрессия p53 в ядрах опухолевых клеток меланомы составила $22,0 \pm 2,1\%$, тогда как в клетках невусов $2,1 \pm 0,2\%$ (различия статистически достоверны, $p < 0,05$). Положительная экспрессия p53 ($>25\%$) наблюдалась у 54,5% (6) пациентов с меланомой кожи, тогда как в группе с невусами данная экспрессия не была отмечена. В основном

преобладала единичная экспрессия p53 в клетках невусов - 66,7% (10). У пациентов с меланомой разброс количества окрашенных клеток находился в пределах от единичного окрашивания до 35% клеток, и в 18,2% (2 из 11) достиг точки разделения cut-off в 25% ядер опухолевых клеток (рис. 2).

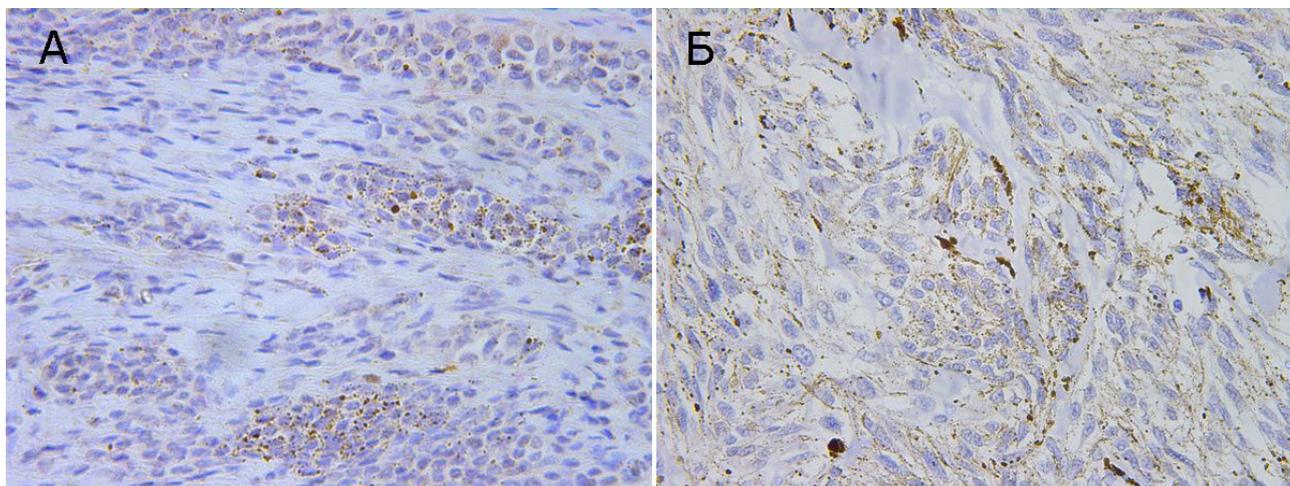


Рис. 2. Экспрессия p53. Ув. × 400. А – внутридермальный невус, Б – узловая меланома, веретенноклеточный вариант

Ангиогенез, как необходимая стадия в развитии новообразований, является сложным процессом, в который включено взаимодействие стромальных и опухолевых клеток. В индукцию ангиогенеза включены опухолеассоциированные макрофаги, которые имеют диагностическое и прогностическое значение при некоторых опухолях. VEGF занимает позицию главного митогена эндотелиальных клеток, и его присутствие требуется для образования незрелых сосудов при васкулогенезе или неоангиогенезе. Именно он и заставляет кровеносную систему организма закладывать новые сосуды, пронизывающие опухоль и образующие в ней разветвлённую сеть. Плотность микрососудов, которая отражает количество/объём образования новых сосудов, значительно больше в ткани, поражённой раком, чем в здоровой, и она находится в определённом соотношении с распространением опухоли. Важным показателем развития опухолевой прогрессии является микрососудистая инвазия опухоли, которую иммуногистохимически можно выявить с помощью антител к CD31. По уровню экспрессии CD31 производится подсчет плотности микрососудов в опухоли, которая является важным прогностическим признаком [4].

Экспрессия VEGF выявлена в цитоплазме клеток меланомы в 100% случаев (11), тогда как в доброкачественных образованиях – в 66,7% (10). Отсутствие экспрессии в клетках невусов отмечалось в 33,3% (5). Разброс окрашенных клеток антителами к VEGF и в меланомах, и в невусах очень неоднороден и составляет от менее 5% и до 50%. Нами выявлены достоверно значимые различия в экспрессии VEGF среди исследуемых групп, где

среднее содержание клеток VEGF+ составило $32,5 \pm 2,9\%$, тогда как в невусах $23,8 \pm 2,1\%$ ($p < 0,05$).

При количественной оценке внутриопухолевой микрососудистой плотности выявлено, что среднее количество сосудов микроциркуляторного русла в поле зрения при меланоме и невусах составило $10,0 \pm 0,9$ и $4,1 \pm 0,4$ соответственно, результаты экспрессии CD31 статистически достоверны ($p < 0,05$). Разброс количества сосудов, окрашенных CD31, в меланомах составил от 4 до 18 в одном поле зрения. В невусах в 12 случаях (80%) подсчитывалось не более 4, и только в гигантоклеточных невусах (3–20%) было отмечено до 15 сосудов в одном поле зрения (рис. 3).

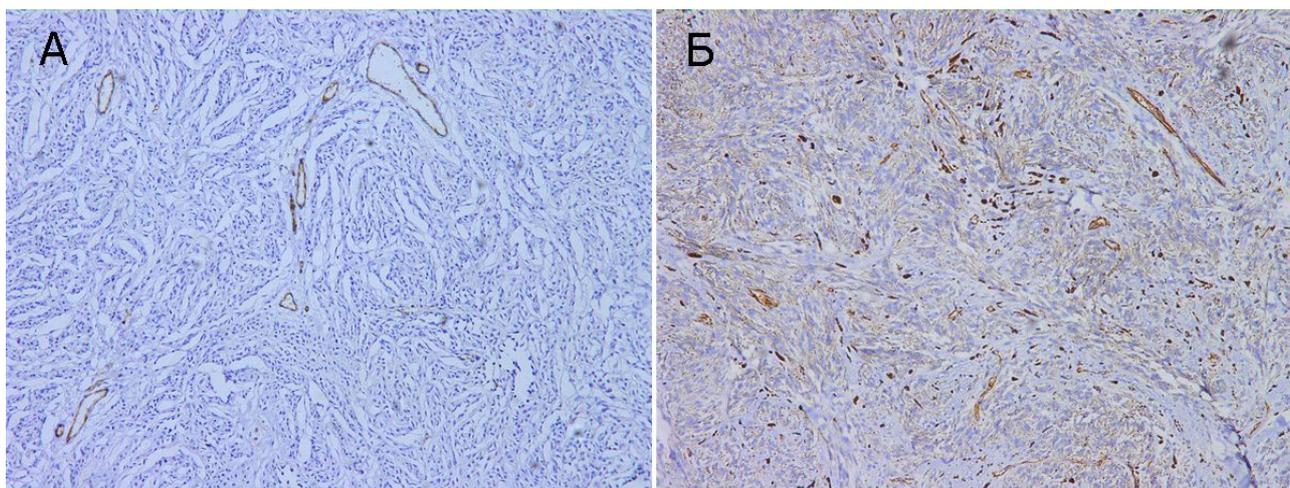


Рис. 3. Экспрессия p53. Ув. $\times 100$. А – внутридермальный невус, Б – узловая меланома, веретенноклеточный вариант

Заключение

Проведенное исследование выявило ряд достоверных различий в экспрессии маркеров, контролирующих апоптоз, пролиферацию и ангиогенез в тканях доброкачественных и злокачественных меланоцитарных образований кожи. При оценке пролиферативного потенциала МОК выявлено наличие умеренной пролиферативной активности ki-67 у 11 больных (100%) МК и у 5 (33,3%) с диспластическими невусами. Положительная экспрессия p53 ($>25\%$) наблюдалась у 6 (54,5%) пациентов с МК, тогда как в группе с невусами данная экспрессия не была отмечена. Нами выявлены достоверно значимые различия в экспрессии VEGF среди исследуемых групп, где среднее содержание клеток VEGF+ составило $32,5 \pm 2,9\%$, тогда как в невусах $23,8 \pm 2,1\%$ ($p < 0,05$). При оценке внутриопухолевой микрососудистой плотности выявлено, что среднее количество сосудов микроциркуляторного русла в поле зрения при меланоме и невусах составило $10,0 \pm 0,9$ и $4,1 \pm 0,4$ соответственно, результаты экспрессии CD31 статистически достоверны ($p < 0,05$). Таким образом, изучение некоторых иммуногистохимических особенностей меланоцитарных образований кожи, определяющих инвазивный потенциал клеток, может

способствовать разработке новых стратегий диагностики, прогнозирования и лечения меланоцитарных образований кожи.

Список литературы

1. Архипова О.Е., Черногубова Е.А., Лихтанская Н.В., Тарасов В.А., Кит О.И., Матишов Д.Г. Анализ встречаемости онкологических заболеваний в Ростовской области. Пространственная статистика // Фундаментальные исследования. - 2013. - № 7-3. – С. 504-510.
2. Константинова М.М. Ингибиторы внутриклеточной передачи сигнала при меланоме: перспективы и разочарования таргетной терапии // Современная онкология. - 2007. - Т. 9, № 3. - С. 46.
3. Мазуренко Н.Н. Генетические особенности и маркеры меланомы кожи // Успехи молекулярной онкологии. - 2014. - № 2. - С. 26-35.
4. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – Казань, 2012. – С. 84, 409.
5. Саламова И.В. и др. Роль иммуногистохимии в дифференциальной диагностике новообразований кожи меланоцитарного генеза // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. – 2015. – №. 1. – С. 77.
6. Франциянц Е.М., Позднякова В.В., Максимова Н.А., Курышова М.И., Ильченко М.Г. Некоторые молекулярно-биологические аспекты патогенеза меланомы кожи // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1-2. - URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=20062> (дата обращения: 05.08.2016).
7. Bandovkina V., Kit O., Frantsiyants E. et al. Activity of components of plasminogen activation system in dynamics of transplantable B16/F10 melanoma development // J. Clin. Oncol. – 2016. - 34 (suppl; abstr e21062).
8. Curtin J.A., Fridlyand J., Kageshita T. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma // N. Engl. J. Med. – 2005. – 353 (20):2135–47.
9. Li L.X. [et al.] A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions // Am. J. Dermatopathol. – 2000. – Vol. 22 (6). – P. 489-95.
10. Vredeveld L.C., Possik P.A., Smit M.A. et al. Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. Genes Dev. – 2012. – 26 (10):1055–69.