

Д.В. Прохоров

ГУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського»,
Сімферополь

Роль маркеров клеточного обновления (Bcl-2, p-53) и пролиферации (Ki-67) в диагностике злокачественных меланоцитарных новообразований кожи

Цель работы – изучить особенности экспрессии белков-регуляторов апоптоза (p53 и Bcl-2) и пролиферации (Ki-67) в диспластических невусах (ДН) и меланомах кожи (МК), оценить их взаимосвязь с клинико-морфологическими характеристиками.

Материалы и методы. Проведен анализ гистологического материала, взятого у больных с диагнозами диспластического невуса ($n = 25$) и поверхностно распространяющейся меланомы кожи T1a, уровни Clark II–III, без изъязвления ($n = 22$).

Результаты и обсуждение. Результаты проведенного нами иммуногистохимического (ИГХ) исследования показали, что при ДН достоверно увеличивается количество атипичных меланоцитов, экспрессирующих Bcl-2, p53 и Ki-67. При ИГХ-исследовании в препаратах с диагностированной поверхностно распространяющейся меланомой кожи с уровнями Clark II–III экспрессия p53 определялась в $(43,8 \pm 0,8)$ % опухолевых клеток, экспрессия Bcl-2 – $(37,3 \pm 0,6)$ % и экспрессия Ki-67 – $13,56 \pm 0,2$, что в 2–3 раза превышает аналогичные показатели при ДН.

Выводы. Одновременное ИГХ-исследование (Bcl-2, p53, Ki-67) позволит повысить диагностику, дифференциальную диагностику ДН и МК, а также послужит дополнительным критерием прогноза и дальнейшей тактики у пациентов с ДН и МК.

Ключевые слова

Диспластический невус, меланома кожи, иммуногистохимическое исследование.

Меланома относится к наиболее злокачественным и агрессивным новообразованиям кожи. В Украине актуальной проблемой является обеспечение качественной и адекватной помощи больным меланомой кожи. Настало время начать изменения в этой области и снизить уровень смертности от меланомы в Украине (95 %) до среднеевропейских показателей (5–10 %). Сделать это следует в первую очередь за счет своевременного выявления патологии и применения комплекса диагностических и лечебных мероприятий, осуществлять который качественно могут только специалисты, знающие особенности кожи и ее заболевания профессионально, – дерматологи [9, 11].

Морфологическая диагностика новообразований кожи относится к сложным сферам патоморфологии в связи с полиморфизмом добро-

качественного и злокачественного генеза заболевания. В большинстве случаев световая микроскопия является недостаточным диагностическим методом, однако существует много вариантов диспластических процессов, требующих дифференциальной диагностики. Четкая своевременная идентификация этих заболеваний приводит к оптимальному выбору лечебных вмешательств. В последнее время появилось множество иммуногистохимических (ИГХ) маркеров, которые способствуют достоверной диагностике, однако накопленные данные о значимости каждого из них относительно форм заболевания не стандартизированы и относятся к рекомендованным исследованиям. Разнообразие морфологической структуры новообразований кожи может приводить к ошибочной интерпретации микроскопической картины заболевания, что

обуславливает необходимость определения ИГХ-маркеров, позволяющих установить корректный диагноз и соответственно сформировать адекватный объем лечебных мероприятий [2, 4, 5, 10].

Необходимо сконцентрировать максимальные возможные материально-технические и человеческие ресурсы на стратегическом направлении – ранней диагностике и адекватном лечении пациентов с новообразованиями кожи, что позволит выйти на европейские стандарты предоставления дерматоонкологической помощи, поднять престиж дерматовенерологической службы и добиться значительного экономического эффекта [7, 9].

Развитие молекулярной биологии и генетики способствовало более глубокому пониманию механизмов малигнизации клетки и возникновения неоплазий [1, 6]. В последние годы достигнут значительный прогресс в идентификации генов, нарушения которых приводят к развитию новообразований. Важную роль в возникновении и дальнейшем росте опухолей играют нарушения контроля клеточного цикла, регуляции процессов апоптоза и активация путей внутриклеточной передачи митогенного сигнала [4, 8, 12, 13].

Несмотря на имеющиеся научные данные в литературе, механизмы малигнизации диспластического невуса (ДН) в меланому кожи (МК) недостаточно ясны, что определяет необходимость исследования молекулярно-генетических механизмов трансформации доброкачественных невусов, в частности роли маркеров клеточного обновления (Bcl-2, p-53) и пролиферации (Ki-67) в диагностике злокачественных меланоцитарных новообразований кожи.

Цель исследования – изучить особенности экспрессии белков-регуляторов апоптоза (p53 и Bcl-2) и пролиферации (Ki-67) в диспластических невусах и меланомах кожи, оценить их взаимосвязь с клинико-морфологическими характеристиками.

Материалы и методы

В исследовании был проведен анализ гистологического материала, взятого у пациентов с диспластическим невусом ($n = 25$) и поверхностно распространяющейся меланомой кожи Т1а, уровень Clark II–III, без изъязвления ($n = 22$).

Фрагменты кожи размерами $1,0 \times 1,0 \times 0,5$ см фиксировали в нейтральном «забуференном» формалине с обычной стандартной проводкой и заливкой в парафин согласно стандартной методике [13]. Из парафиновых блоков готовили серийные срезы толщиной 4–5 мкм. С целью обзорной окраски гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое исследование кожи проводили по стандартизованной методике с использованием серийных парафиновых срезов, помещенных на адгезивные стекла, покрытые полизином (Menzel-Glaser, Германия), и реактивов компании DAKO с моноклональными антителами (МкАТ) на автостейнере DAKO.

В иммуногистохимической оценке экспрессии mtp53 использовали мышиные МкАТ к p53, клон DO-7, IgG2b (M7001 DakoCytomation) в разведении 1 : 100 при времени экспозиции 60 мин. Критерием положительной реакции считалась окраска 10 % и более ядер опухолевых клеток.

Bcl-2 выявляли с помощью МкАТ к Bcl-2, клон Bcl-2/124 (M0887 DakoCytomation), в разведении 1 : 80 при инкубации 60 мин. Положительной считалась реакция при цитоплазматической и мембранный окраске более 10 % опухолевых клеток.

Ki-67 – маркер пролиферации, Clone MIB-1 (F7268 DakoCytomation), который экспрессируется в ядрах митотически активных клеток.

Реакции идентифицированы с помощью системы визуализации EnVision™ FLEX+ и дополнительной окраски гематоксилином Майера для воспроизведения структурной организации ткани.

Уровень внутриядерной экспрессии p53 и Ki-67, мембранный экспрессии Bcl-2 оценивали с учетом интенсивности окраски и распределения в опухолевой ткани в процентном эквиваленте на 100 клеток в 10 случайно выбранных полях зрения микроскопа ($\times 40$) гистологических срезов. Если процент позитивных клеток не превышал 20 %, реакцию расценивали как слабую, больше 20 % – как выраженную.

Просмотр и цифровые фотографии микропрепаратов осуществляли цифровой камерой OLYMPUS C 5050Z, установленной на микроскопе Olympus CX-41.

Все полученные результаты подвергнуты статистической обработке для параметрических и непараметрических критериев с использованием программы MedSta» (серийный № MS0011) ДНПП ООО «Альфа» (Донецк). При анализе проверки распределения на нормальность использованы Хи-квадрат и критерий W Шапиро–Уилка, сравнение центральных тенденций двух независимых выборок с использованием W-критерия Вилкоксона и сравнение средних двух независимых выборок по критерию Стьюдента. Для множественного сравнения непараметрических данных проведен ранговый однофакторный анализ Крускала–Уоллиса и использован критерий Дана [3].

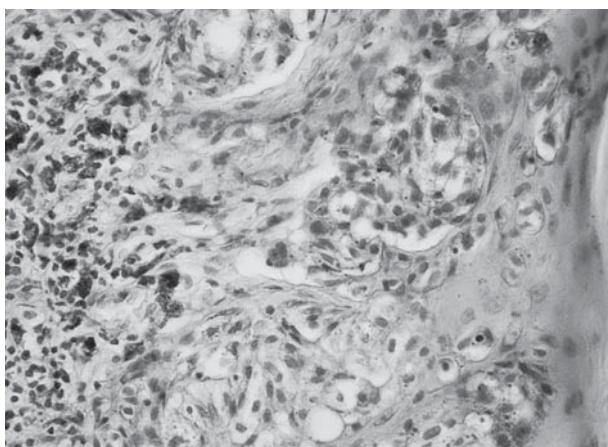


Рис. 1. Дисплазичний невус з дисплазією 2-ї ступені. Клеточний поліморфізм меланоцитів. Очагова лімфоцитарна інфільтрація
Окраска гематоксиліном і эозином. $\times 40$

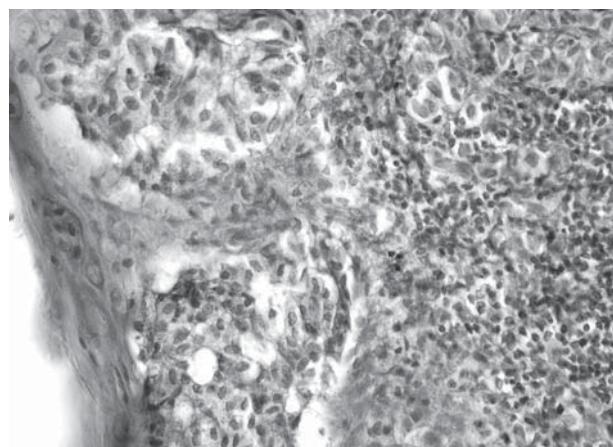


Рис. 2. Поверхностно розпространяючася меланома, рівень Clark II. Внутріепідермальні гнезда педжетоїдних меланоцитів
Окраска гематоксиліном і эозином. $\times 40$

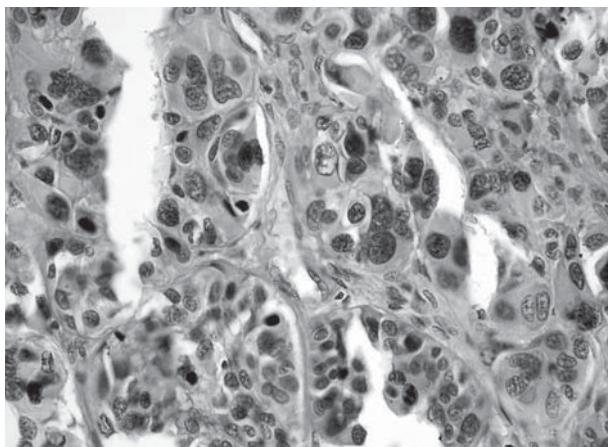


Рис. 3. Поверхностно розпространяючася меланома, рівень Clark II з мікроінвазією в сосочковому шарі. Клеточний поліморфізм меланоцитів
Окраска гематоксиліном і эозином. $\times 40$

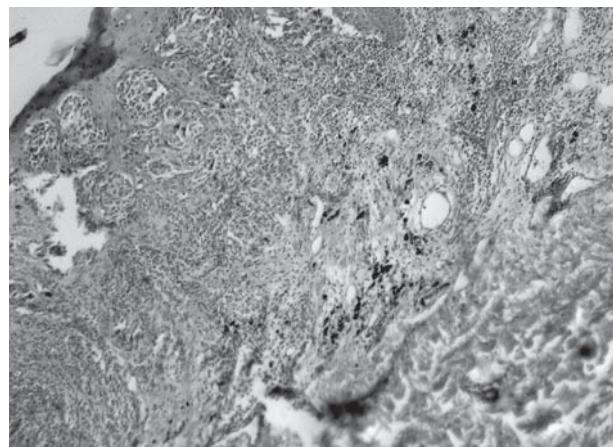


Рис. 4. Поверхностно розпространяючася меланома, рівень Clark II з мікроінвазією в сосочковому шарі
Окраска гематоксиліном і эозином. $\times 10$

Результати и обсуждение

При гистологическом исследовании микропрепарата с установленным диагнозом диспластического невуса определялась лентигиозная меланоцитарная дисплазия различной степени выраженности. Дисплазия проявлялась пролиферацией меланоцитов, которые располагались в виде цепочки в базальном слое эпидермиса, в акантотических тяжах в виде «гнезд» и в наружных слоях эпидермиса волоссяных фолликулов. Атипичные меланоциты были увеличены в размерах с крупными и гиперхромными ядрами. Во всех случаях «гнезда» меланоцитов и основания эпидермальных гребней были окружены прослойками коллагена и пигмента меланина. По краю пораженного участка определялась умеренная лимфоцитарная инфильтрация (рис. 1).

Гистологическая картина в 22 случаях поверхностно распространяющейся меланомы кожи характеризовалась фазой радиального роста и микроинвазией атипичных меланоцитов в сосочковый слой дермы. Меланоцитарные клетки нечетко ограничены, располагались выше базальной мембранны, распространялись в роговой слой и имели вид педжетоидных клеток. Гнезда из педжетоидных меланоцитов значительно отличались размерами и формой, иногда сливались и распространялись вдоль придатков кожи (рис. 2).

Цитоплазма их обильна с пылевидным пигментом, ядерная атипия от умеренной до сильной с гиперхроматозом, анизокариозом, отчетливыми ядрышками и митозами. Иногда встречаются некрозы отдельных клеток (рис. 3).

По краю пораженной ткани полосовидная диффузная лимфоцитарная инфильтрация, от-



Рис. 5. Дисплазтический невус с дисплазией 3-й степени. Экспрессия p53. ИГХИ. $\times 40$

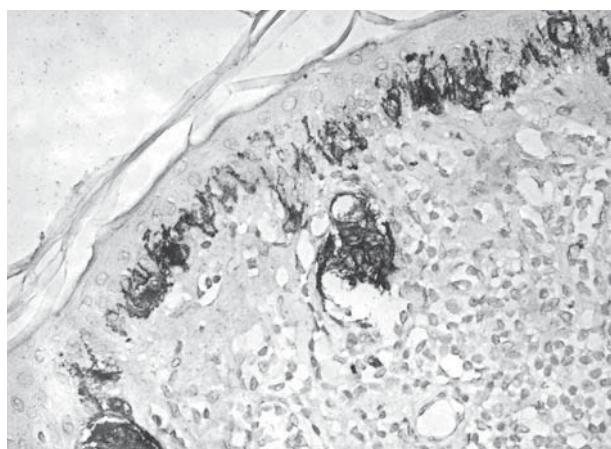


Рис. 6. Дисплазтический невус с дисплазией 3-й степени. Экспрессия Bcl-2. ИГХИ. $\times 10$

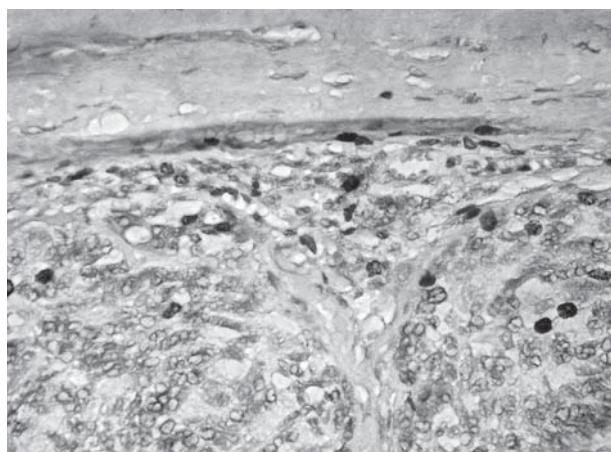


Рис. 7. Дисплазтический невус с дисплазией 3-й степени. Экспрессия Ki-67. ИГХИ. $\times 40$

граничивающая опухолевую ткань от окружающей (рис. 4).

Результаты ИГХ-исследования представлены в таблице. Установлено, что при ДН достоверно увеличивается количество атипичных меланоцитов, экспрессирующих p53, Bcl-2 и

Таблица. Уровень экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации при дисплазических невусах и меланоме кожи

Группа исследования	p53, %	Bcl-2, %	Ki-67
Дисплазтический невус степени дисплазии (n = 25)	$21,7 \pm 0,4^*$	$10,2 \pm 0,7^*$	$4,87 \pm 0,8^*$
Меланома кожи (n = 22)	$43,8 \pm 0,8^*$	$37,3 \pm 0,6^*$	$13,56 \pm 0,2^*$

Примечание. *Достоверность различия между показателями $p < 0,001$

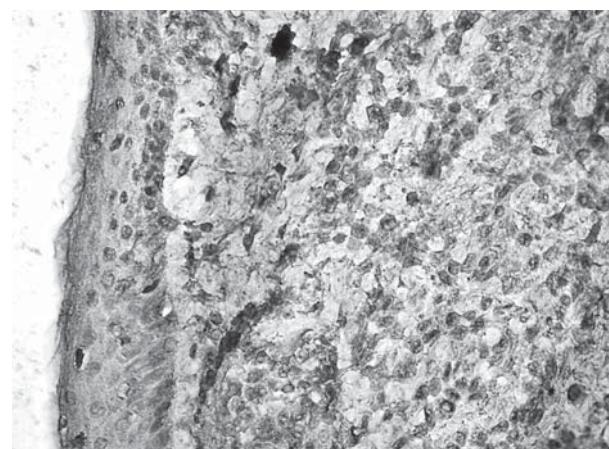


Рис. 8. Поверхностно распространяющаяся меланома, уровень Clark II. Экспрессия p53. ИГХИ. $\times 40$

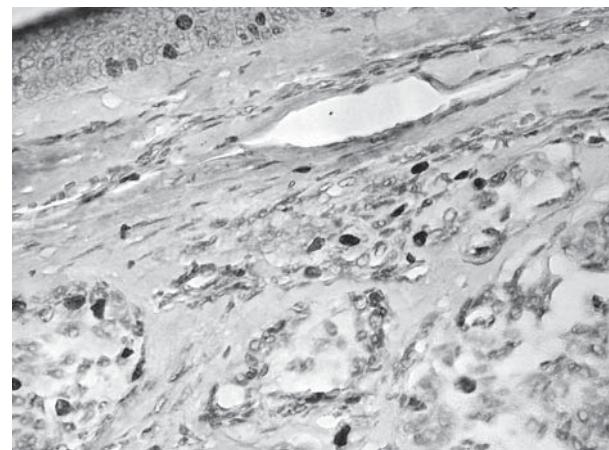


Рис. 9. Поверхностно распространяющаяся меланома, уровень Clark II. Экспрессия Ki-67. ИГХИ. $\times 40$

Ki-67. Уровень апоптотического белка p53 составил ($21,7 \pm 0,4$) %. Цитоплазматическая и мембранныя экспрессия Bcl-2 усиливалась до $10,2 \pm 0,7$ (рис. 6). Экспрессия внутриядерного белка Ki-67 обнаруживалась в ($4,87 \pm 0,8$) (рис. 7).

При ІГХ-исследовании в препаратах пациентов с диагностированной поверхностно распространяющейся меланомой кожи с уровнями Clark II–III экспрессия p53 определялась в $(43,8 \pm 0,8)$ % опухолевых клеток, экспрессия Bcl-2 – $(37,3 \pm 0,6)$ % и экспрессия Ki-67 – $(13,56 \pm 0,2)$ (рис. 8, 9).

Выводы

Результаты ИГХ-исследования показали, что при ДН достоверно увеличивается количество атипичных меланоцитов, экспрессирующих Bcl-2, p53 и Ki-67.

В препаратах пациентов с диагностированной поверхностно распространяющейся меланомой кожи с уровнями Clark II–III экспрессия p53 определялась в $(43,8 \pm 0,8)$ % опухолевых клеток, экспрессия Bcl-2 – $(37,3 \pm 0,6)$ %, экспрессия Ki-67 – $(13,56 \pm 0,2)$, что в 2–3 раза превышает аналогичные показатели при ДН.

Одновременное ИГХ-исследование (Bcl-2, p53, Ki-67) позволит повысить диагностику, дифференциальную диагностику ДН и МК, а также послужит дополнительным критерием прогноза и дальнейшей тактики у пациентов с ДН и МК.

Список литературы

- Копнин Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены // Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе.– М.: Медицина, 2004.– С. 125–158.
- Коршунов А.Г., Шишкина Л.В., Голанова А.В. Пролиферативные маркеры в менингомах: иммуногистохимическое исследование и анализ прогностической значимости // Архив патологии.– 2002.– № 64.– С. 5–33.
- Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях.– К.: Морион, 2000.– 319 с.
- Морозов В.А. Генная терапия на основе вирусных векторов. Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе.– М.: Медицина, 2004.– С. 539–557.
- Пожариский К.М., Леенман Е.Е. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний // Арх. пат.– 2000.– Вып. 5.– С. 3–11.
- Прохоренко В.И., Рукша Т.Г., Петрова Л.Л., Салмина А.Б. Запограммированная клеточная гибель кератиноцитов и ее роль в патогенезе некоторых заболеваний кожи // Вестн. дерматол.– 2005.– № 4.– С. 4–7.
- Решетов И.В., Потекаев Н.Н., Арутюнян Л.С., Залетаев Д.В., Маторин О.В., Кудрин К.Г. Диспластический невус как предшественник меланомы кожи // Рос. онкол. журнал.– 2009.– № 5.– С. 54–56.
- Сапожников А.Г., Дорошевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника: руководство.– Смоленск: САУ, 2000.– 476 с.
- Туркевич О.Ю., Сизон О.О., Коляденко К.В. Меланома шкіри: що потрібно знати дерматологам для якісної діагностики та лікування // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.– 2009.– № 4 (35).– С. 36–39.
- Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry.– London: Churchill Livingstone, 2006.– 828 p.
- Nagore E., Oliver V., Botella-Estrada R. et al. Prognostic factors in localized invasive cutaneous melanoma: high value of mitotic rate, vascular invasion and microscopic satellitism // Melanoma Res.– 2005.– Vol. 15.– P. 169–177.
- Straume O., Jackson D.G., Akslen L.A. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma // Clin. Cancer. Res.– 2003.– Vol. 9.– P. 250–256.
- Zettersten E., Sagebiel R.W., Miller J.R. et al. Prognostic factors in patients with thick cutaneobs melanoma ($>4\text{mm}$) // Cancer.– 2002.– Vol. 94.– P. 1049–1056.

Д.В. Прохоров

ДУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського», Сімферополь

Роль маркерів клітинного оновлення (Bcl-2, p53) та проліферації (Ki-67) у діагностиці злоякісних меланоцитарних новоутворень шкіри

Мета роботи – вивчити особливості експресії білків-регуляторів апоптозу (p53 і Bcl-2) та проліферації (Ki-67) у диспластичних невусах (ДН) і меланомах шкіри (МШ), оцінити їх взаємозв'язок з клініко-морфологічними характеристиками.

Матеріали та методи. Проведено аналіз гістологічного матеріалу, взятого у хворих з діагнозами диспластичного невуса ($n = 25$) і поверхневої меланоми шкіри T1a, рівні Clark II–III, без виразки ($n = 22$).

Результати та обговорення. Результати проведеного нами імуногістохімічного (ІГХ) дослідження показали, що при ДН достовірно збільшується кількість атипічних меланоцитів, які експресують Bcl-2, p53 і Ki-67. При ІГХ-дослідженні у препаратах з діагностованою поверхневою меланомою шкіри з рівнями Clark II–III експресія p53 визначалася в $(43,8 \pm 0,8)$ % пухлинних клітин, експресія Bcl-2 – в $(37,3 \pm 0,6)$ %, експресія Ki-67 – $13,56 \pm 0,2$, що в 2–3 рази перевищує аналогічні показники при ДН.

Висновки. Одночасне ІГХ-дослідження (Bcl-2, p53, Ki-67) дасть змогу підвищити діагностику, диференційну діагностику ДН та МШ, а також послугує додатковим критерієм прогнозу і подальшої тактики у пацієнтів з ДН та МШ.

Ключові слова: диспластичний невус, меланома шкіри, імуногістохімічне дослідження.

D.V. Prokhorov

SE «Crimea State Medical University named after S.I. Georgievsky», Simferopol

The role of cell renewal markers (Bcl-2, p53) and proliferation (Ki-67) in the diagnosis of malignant melanocytic skin lesions

The purpose of the study — to examine the expression patterns of protein regulators of apoptosis (p53 and Bcl-2) and proliferation (Ki-67) in dysplastic nevi (DN) and melanomas of the skin (MS), to evaluate their relationship with clinical and morphological characteristics.

Materials and methods. We analyzed the histological material taken from patients with diagnoses of dysplastic nevi ($n = 25$), superficial spreading melanoma of skin T1a, the level of Clark II–III without ulceration ($n = 22$).

Results and discussion. Immunohistochemical (IHC) results of our studies have shown that the amount of atypical melanocytes expressing Bcl-2, p53 and Ki-67 significantly increases in case of DN. IHC study of surfactant formulations with diagnosed melanoma of Clark II–III level revealed p53 expression in $(43.8 \pm 0.8)\%$ tumor cells, Bcl-2 expression – in $(37.3 \pm 0.6)\%$ and Ki-67 expression – in $(13.56 \pm 0.2)\%$, which is 2–3 times higher than the corresponding indicators in case of DN.

Conclusions. Simultaneous IHC study (Bcl-2, p53, Ki-67) will improve diagnosis, differential diagnosis of DN and MS, as well as serve an additional criterion for prognosis and further management of patients with DN and MS.

Key words: dysplastic nevus, melanoma of skin, immunohistochemical study.

Дані про автора:

Прохоров Дмитро Валерійович, к. мед. н., доцент Кримського державного медичного університету імені С.І. Георгієвського
96006, м. Сімферополь, вул. Рози Люксембург, 25. Тел. (050) 696-08-76. E-mail. d_prokhorov@ukr.net