

КОМПЛЕКСНАЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ДИСПЛАСТИЧЕСКИХ НЕВУСОВ

Д. В. Прохоров

ГУ «Крымский государственный медицинский университет,
имени С. И. Георгиевского»

Резюме. Развитие молекулярной биологии и генетики способствовало более глубокому пониманию механизмов малигнизации клетки и возникновения неоплазий. Механизмы малигнизации диспластических невусов (ДН) до сих пор недостаточно ясны, что определяет необходимость исследования молекулярно - генетических механизмов трансформации доброкачественных невусов. Цель исследования – изучить особенности экспрессии белков-регуляторов апоптоза (p53 и Bcl-2) и пролиферации (Ki-67) в ДН, оценить их взаимосвязь с клинико-морфологическими характеристиками. Результаты проведенного нами иммуногистохимического (ИГХ) исследования показали, что рост степени дисплазии ДН сопровождается увеличением количества атипических меланоцитов экспрессирующих bcl-2 и p53. Пролиферативная активность меланоцитов (уровень Ki-67) также прямо пропорционально увеличивается в зависимости от степени дисплазии ДН. Одновременное определение гистологической степени дисплазии ДН и ИГХ исследование (bcl-2, p53, Ki-67) позволит повысить диагностику, дифференциальную диагностику ДН, а также послужит дополнительным критерием прогноза и дальнейшей тактики у пациентов с ДН.

Ключевые слова: диспластический невус, степень дисплазии, иммуногистохимическое исследование.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие молекулярной биологии и генетики способствовало более глубокому пониманию механизмов малигнизации клетки и возникновения неоплазий [1, 2]. 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 [4,8,18]. Белок p53 имеет

молекулярную массу 53 кДа состоит из 392 аминокислот. Основная его функция осуществляется в ядре, однако, он быстро подвергается деградации в протеосомах, поэтому в клетках большинства нормальных тканей уровень p53 чрезвычайно низок и практически находится на уровне детекции [4,10,19]. Высокая экспрессия p53 выявляется практически во всех типах опухолей различной локализации и, как правило, ассоциирована с плохим прогнозом, поскольку в этом случае белок p53 имеет «мутантную» конформацию и не способен к выполнению функций опухолевого супрессора [6,20].

BC1-2 (белок из семейства регуляторов апоптоза BC1-2) обладает сильным антиапоптотическим действием, поскольку обладает способностью связывать по крайней мере пять других белков этого рода, которые выполняют проапоптотические функции. Запуск этого механизма приводит к нарушению формирования митохондриальных пор и блокирует выход из митохондрий цитохрома С и АРАF-1, которые активируют каспазу-9 и запускают процессы собственно апоптоза [5,13,15,17]. Такая активность BC1-2 приводит к выживанию опухолевых клеток при применении противоопухолевых препаратов, действие которых направлено на активацию апоптоза [20], а также других условий, обуславливающих такие процессы (оксидативный стресс, вирусные инфекции, активация p53 и др.) [9].

Белок Ki-67 является маркером клеточной пролиферации и присутствует в клетках в поздней G1, S, G2 и M фазах, но не в клетках в состоянии покоя (G0 фаза и ранняя G1). Известно, что количество клеток, которые экспрессируют ядерный белок Ki-67, достоверно отображает пролиферативную активность опухоли, а индекс пролиферации – один из важных показателей при верификации клинического прогноза новообразования различных локализаций [12,14,16,21].

Несмотря на имеющиеся научные данные в литературе, механизмы малигнизации диспластических невусов (ДН) до сих пор недостаточно ясны, что определяет необходимость исследования молекулярно - генетических механизмов трансформации доброкачественных невусов.

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании был проведен анализ гистологического материала, взятого у больных с диагнозами диспластический невус (n=62).

Фрагменты кожи размерами 1,0 см x 1,0 см x 0,5 см фиксировали в нейтральном забуференном формалине с обычной стандартной проводкой и заливкой в парафин согласно стандартной методике [7]. Из парафиновых блоков готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм. С целью обзорной окраски, гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование кожи проводили по стандартизированной методике [11] с использованием серийных парафиновых срезов, помещенных на адгезивные стекла, покрытые полизином («Menzel-Glaser», Германия) и реактивов компании DAKO с моноклональными антителами (MкАТ) на автостейнере DAKO. В иммуногистохимической оценке экспрессии mtp53 использовали мышинные MкАТ 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 MкАТ к Bcl-2, клон Bcl-2/124 (M0887«DakoCytomation»), в разведении 1:80 при инкубации 60 мин. Положительной считалась реакция при цитоплазматической и мембранной окраске более 10% опухолевых клеток. Ki-67 – маркер пролиферации, Clone MIB-1 (F7268 «DakoCytomation»), который экспрессируется в ядрах митотически активных клеток. Идентификация реакций проводилась с помощью системы визуализации EnVision™ FLEX+ и дополнительной окраски гематоксилином Майера для воспроизведения структурной организации ткани. Оценку уровня внутриядерной экспрессии p53 и Ki-67, мембранной экспрессии Bcl-2 проводили с учетом интенсивности окраски и распределения в опухолевой ткани в процентном эквиваленте на 100 клеток в 10 случайно выбранных полях зрения микроскопа (увеличение x40) гистологических срезов. В случае, где процент позитивных не превышал 20%, реакция расценивается как слабая. Если процент позитивных кле-

ток был больше 20%, реакция считается выраженной.

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 «MedStat» (серийный №MS0011) ДНПП ООО «Альфа», г.Донецк. При анализе проверки распределения на нормальность использовали 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 использовали ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса и критерий Дана [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При гистологическом исследовании микропрепаратов с установленным диагнозом диспластический невус определялась лентигиозная меланоцитарная дисплазия с различной степенью выраженности. В 31 случае отмечалась слабовыраженная дисплазия (ДН 1 степени дисплазии), проявляющаяся пролиферацией меланоцитов, которые располагались в виде цепочки в базальном слое эпидермиса, в акантотических тяжах в виде «гнезд» и в наружных слоях эпидермиса волосяных 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).

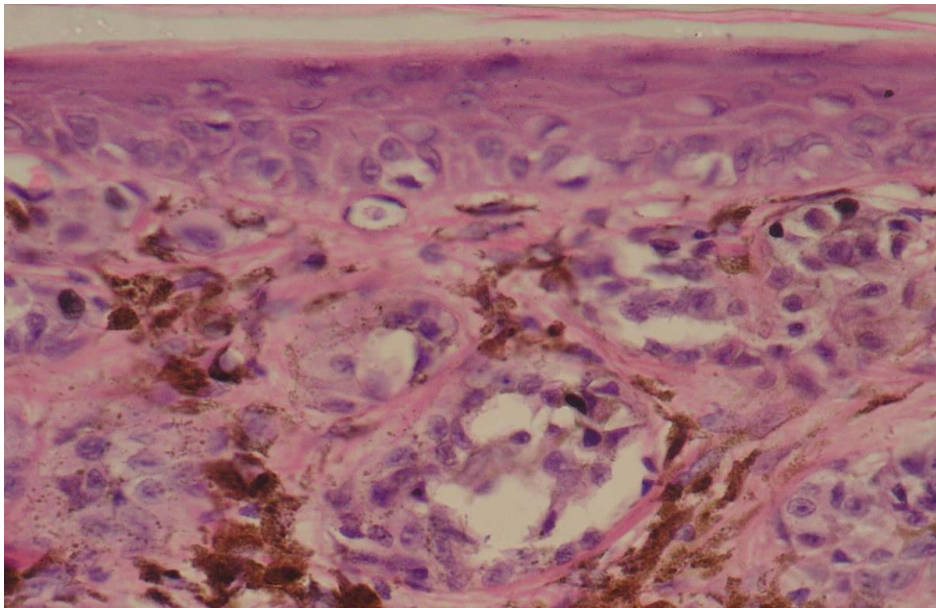


Рис.1. Диспластический невус с дисплазией 1 степени. Гнезда меланоцитов в эпидермо-дермальном соединении. Окраска гематоксилин и эозин. 40^x.

При второй степени дисплазии (n=18) отмечались более выраженная атипия и пролиферация меланоцитов, образующих неравномерные гнезда на верхушке удлиненных акантотических тяжей (рис.2).

В 13 случаях диагностировали 3-ю сте-

пень дисплазии при которой была отмечена наиболее существенная атипия меланоцитов с выраженным ядерным полиморфизмом. При этом «гнезда» имели тенденцию к слиянию, занимая акантотические тяжи и нижние отделы эпидермо-дермального соединения (рис.3).

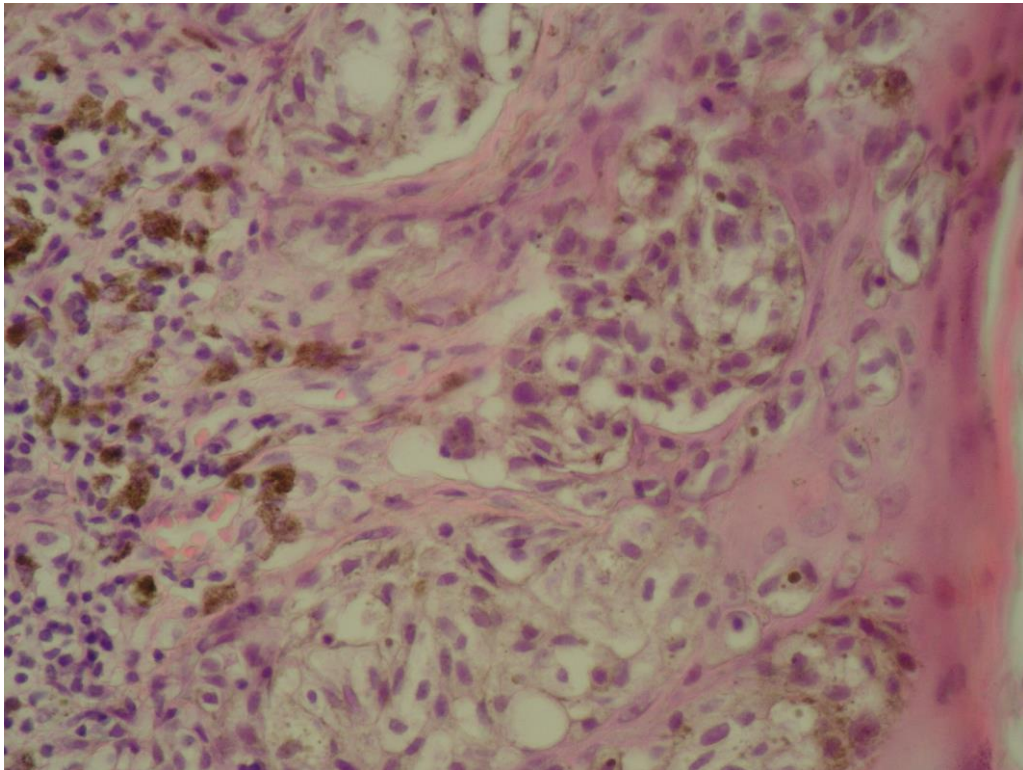


Рис.2. Диспластический невус с дисплазией 2 степени. Клеточный полиморфизм меланоцитов. Очаговая лимфоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилин и эозин. 40^х.

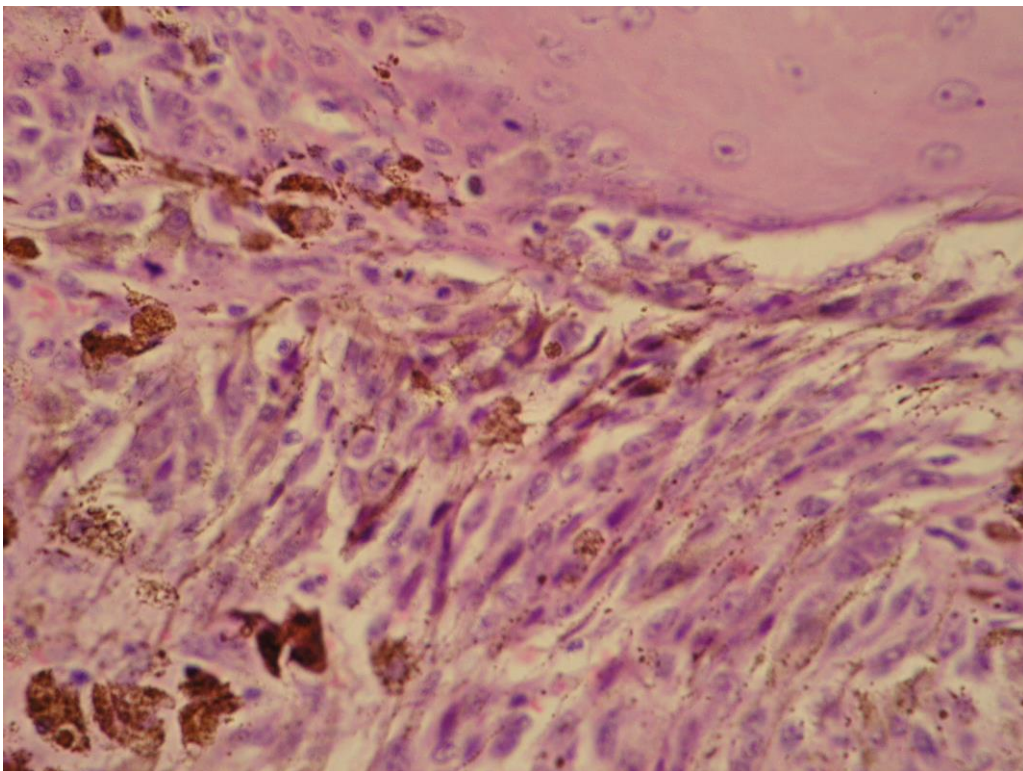


Рис.3. Диспластический невус с дисплазией 3 степени. Клеточный полиморфизм меланоцитов. Окраска гематоксилин и эозин. 40^х

Результаты проведенного нами ИГХ исследования при прогрессировании клеточной атипии ДН представлены в табл.1. Установлено, что при усилении степени дис-

пластических проявлений увеличивается количество атипических меланоцитов, экспрессирующих p53, bcl-2 и Ki-67.

Таблица 1

Уровень экспрессии маркеров апоптоза и пролиферации при диспластических невусах в зависимости от степени дисплазии

Группы исследования	p53 (%)	bcl-2 (%)	Ki-67
ДН 1 степени дисплазии (n=31)	11,6±0,7*	9,4 ±0,4*	1,1 ±0,6*
ДН 2 степени дисплазии (n=18)	21,7±0,4*	10,2±0,7*	4,87±0,8*
ДН 3 степени дисплазии (n=13)	37,3±0,8*	23,4±0,7%*	7,63±2,7*

Примечание: * - достоверность различия между показателями $p < 0,001$.

Наименьший уровень апоптотического белка p53 в ядрах меланоцитов наблюдался при ДН 1 степени и составил 11,6±0,7%. Наи-

больший – при ДН 3 степени - 37,3±0,8%. При этом достоверность различий между группами статистически значимая ($P < 0,001$) (рис. 4).

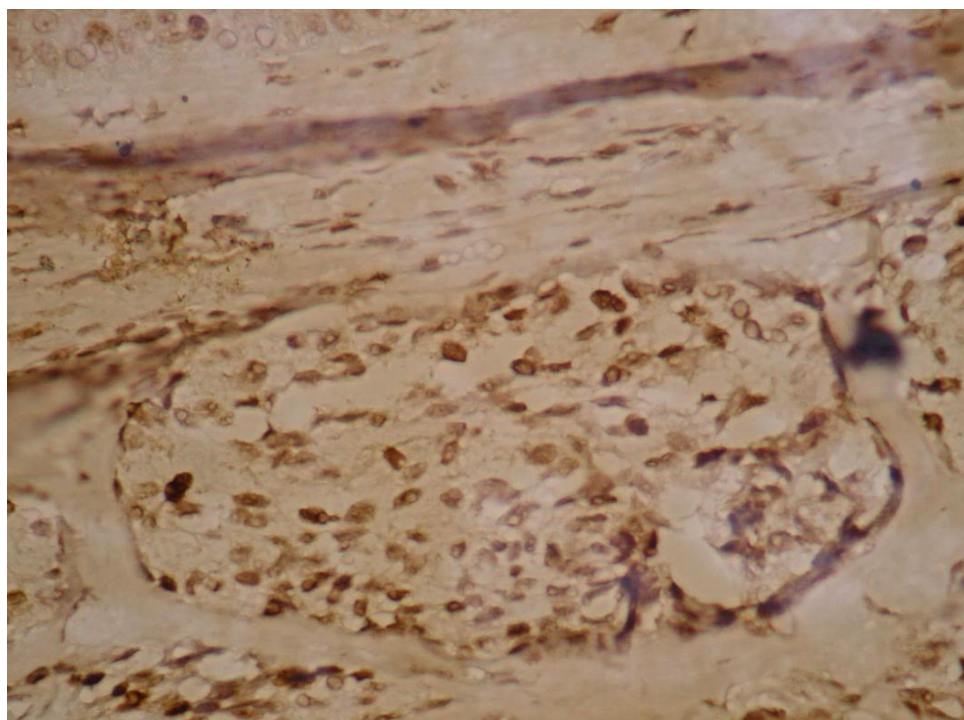


Рис.4. Диспластический невус с дисплазией 3 степени. Экспрессия P53. ИГХИ. 40x

Цитоплазматическая и мембранная экспрессия bcl-2 также усиливалась в зависимости от степени дисплазии меланоцитов. При 1 степени позитивная реакция отмечалась, в основном в гнездах меланоцитов и имела слабую интенсивность окраски, уровень экспрессии Bcl-2 составил 9,4 ±0,4 %. При ДН 2 сте-

пени экспрессия определялась также в гнездах меланоцитов с более интенсивной окраской и составила 10,2±0,7%. Наиболее выраженная позитивная реакция к bcl-2 обнаруживалась в 23,4±0,7% среди меланоцитов ДН 3 степени, которая локализовалась диффузно рассеянно в патологическом очаге (рис.5).

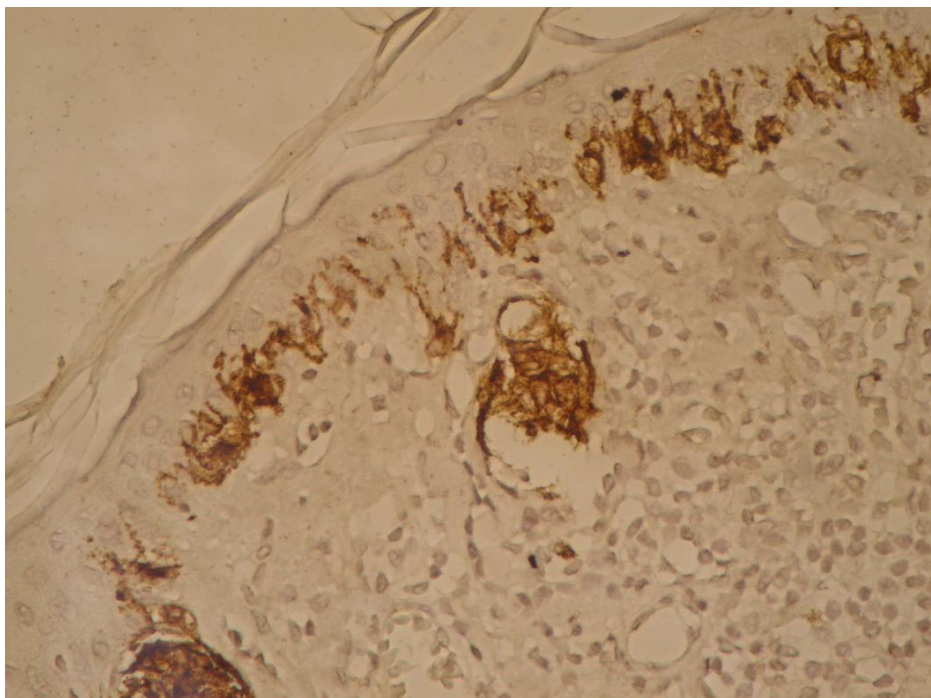


Рис.5. Диспластический невус с дисплазией 3 степени. Экспрессия bcl 2. ИГХИ. 10^x

Пролиферативная активность меланоцитов также увеличивалась в зависимости от степени диспластического невуса. При ДН 1 степени пролиферативная активность меланоцитов раченивалась как очень слабая, так

как экспрессия внутриядерного белка Ki-67 обнаруживалась только в единичных клетках ($1,1 \pm 0,6\%$), $4,87 \pm 0,8\%$ при 2 степени и $7,63 \pm 2,7\%$ при 3 степени (рис.6).

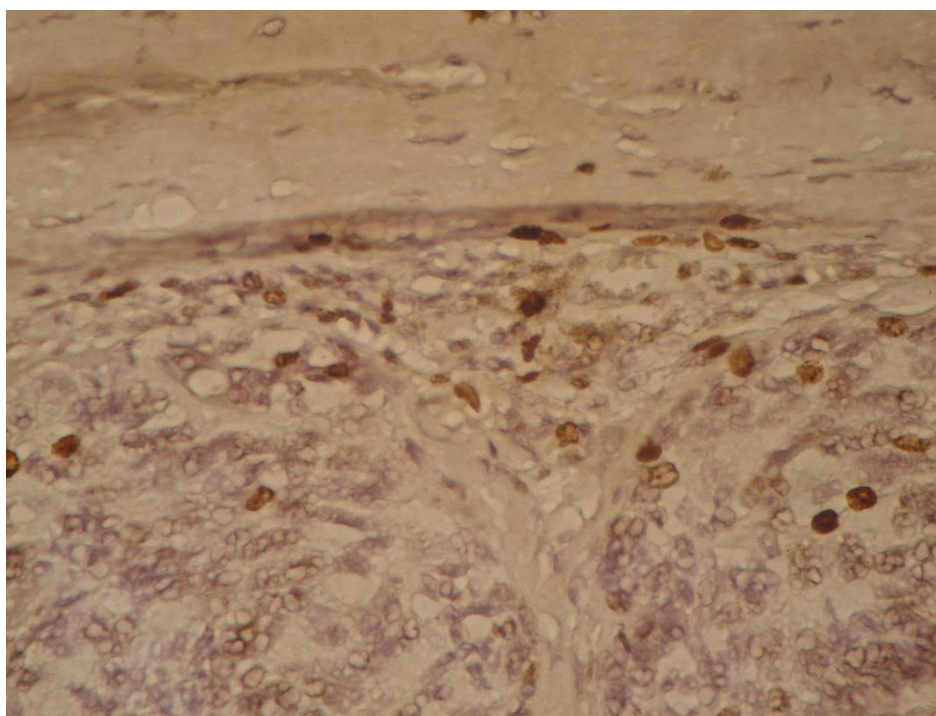


Рис.6. Диспластический невус с дисплазией 3 степени. Экспрессия Ki67. ИГХИ. 40^x

ВЫВОДЫ

1. Результаты проведенного нами ИГХ исследования показали, что рост степени дисплазии ДН сопровождается увеличением количества атипических меланоцитов экспрессирующих bcl-2 и p53.

2. Пролиферативная активность меланоцитов (уровень Ki-67) также прямо пропор-

ционально увеличивается в зависимости от степени дисплазии ДН.

3. Одновременное определение гистологической степени дисплазии ДН и их ИГХ исследование (bcl-2, p53, Ki-67) позволит повысить диагностику, дифференциальную диагностику ДН, а также послужит дополнительным критерием прогноза и дальнейшей тактики у пациентов с ДН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запрограммированная клеточная гибель кератиноцитов и ее роль в патогенезе некоторых заболеваний кожи. / В.И. Прохоренко, Т.Г. Рукша, Л.Л. Петрова, А.Б. Салмина // *Вестн. дерматол. и венерол.* – 2005. – № 4. – С. 4-7.

2. Копнин Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены. – В кн.: *Канцерогенез* / Под ред. Д. Г. Заридзе. – М.: Медицина, 2004. – С. 125-158.

3. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2000. – 319с.

4. Морозов В.А. Генная терапия на основе вирусных векторов. – В кн.: *Канцерогенез* / Под ред. Д. Г. Заридзе. – М.: Медицина, 2004. – С. 539-557.

5. Мэтт Р. *Геном.* – М.: Эксмо, 2008. – 314 с

6. Пожариский К.М. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний / К.М. Пожариский, Е.Е. Леенман // *Архив патологии.* – 2000. – Вып. 5. – С. 3-11.

7. Сапожников А.Г. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство. / А.Г. Сапожников, А.Е. Дорошевич. – Смоленск: САУ, 2000. – 476 с.

8. Сафроненкова И. А. Особенности и прогностическое значение экспрессии онкобелков p53, bcl-2 и антигенов CD95, IPO38 у больных злокачественными эпителиальными опухолями кожи век / И. А. Сафроненкова, В. А. Елагина // *Буковинський медичний вістник.* – 2012. – Том. 16. – № 3, ч. 1. – С. 230-233.

9. Abnormal p53 expression, proliferation markers & DNA ploidy in endometrial carcinoma: role in cancerogenesis, clinicopathological implications / A. Ayhan, S. Tuncer, S. Ruacan et al. // *Endometrial Cancer* – 2000. – Vol. 10. – P. 65-71.

10. Accumulation p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway / D.R. Chowdary, J.J. Dermody, K.K. Jha et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 1994. – Vol. 14. – P. 1997-2003.

11. Dabbs D.J. *Diagnostic immunohistochemistry* / D.J. Dabbs. – London: Churchill Livingstone, 2006. – 828 p.

12. Incidence Estimate of Nonmelanoma skin cancer in the United States / H. W. Rogers, M. A. Weinstock, A. R. Harris et al. // *Arch. Dermatol.* – 2010. – Vol. 146. – P. 283-287.

13. Isobe M. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13 / M. Isobe, B.S. Emmanuel, D. Givol // *Nature.* – 1986. – Vol. 320. – P. 84-85

14. Ki-67 predicts progression in early CIN: Validation of a multivariate progression-risk model / A. J. Kruse, J. P. Baak, E. A. Janssen et al. // *Cellular Oncol.* – 2004. – Vol. 26. – P. 13-20.

15. Laffargue F. The prognostic factors in endometrial cancers / F. Laffargue, J. Sobierajski, P. L. Giacalone. – In: *11 Int. Meeting Gynaecological Oncology*, 1999. – P. 15-18.

16. Low-and high-risk CIN1 and 2 lesions: prospective predictive value of grade, HPV, and Ki-67 immuno-quantitative variables / A. J. Kruse, J. P. Baak, E. A. Janssen. et al. // J. Pathol. – 2003. – Vol. 199. – P. 462-470.

17. Maltzman W UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells / W. Maltzman, L. Czyzyk // Mol Cell Biol. – 1984. – Vol. 4. – P. 1689-1694.

18. Molecular biomarkers and site of first recurrence / O. U. Ataman, S. M. Bentzen, G. D. Willson et al. // Eur. J. Cancer. – 2004. – Vol. 40. – P. 3734-2741.

19. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage / M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky et al. // Cancer Res. – 1991. – Vol. 51. – P. 6304-6307.

20. p53 overexpression and mutation in endometrial carcinoma: inverted relation with estrogen and progesterone receptor status / K. Niva, T. Murase, S. Morishita et al. // Cancer Detect. Prev. – 1999. – Vol. 23. – P. 147-154.

21. p16 (INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types / S. N. Agoff, P. Lin, J. Morihara et al. // Mod. Pathol. – 2003. – Vol. 16. – P. 665 – 673.

**КОМПЛЕКСНА
ІМУНОГІСТОХІМІЧНА
ДІАГНОСТИКА
ДИСПЛАСТИЧНИХ
НЕВУСІВ**

Прохоров Д. В.

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

Резюме. *Розвиток молекулярної біології і генетики сприяв більш глибокому розумінню механізмів малігнізації клітини і виникнення неоплазій. Механізми малігнізації диспластичних невусів (ДН) досі недостатньо ясні, що визначає необхідність дослідження молекулярно - генетичних механізмів трансформації доброякісних невусів. Мета дослідження - вивчити особливості експресії білків-регуляторів апоптозу (p53 і Bcl-2) та проліферації (Ki-67) у ДН, оцінити їх взаємозв'язок з клініко-морфологічними характеристиками. Результати проведеного нами імуногістохімічного (ІГХ) дослідження показали, що зростання ступеня дисплазії ДН супроводжується збільшенням кількості атипичних меланоцитів які експресують Bcl-2 і p53.*

**COMPREHENSIVE
IMMUNOHISTOCHEMICAL
DIAGNOSIS OF
DYSPLASTIC NEVI**

Prokhorov D. V.

*Crimean State Medical University
named after S. I. Georgievsky*

Abstract. *The development of molecular biology and genetics contributed to a better understanding of the mechanisms of malignant cells and the occurrence of neoplasia. The mechanisms of malignant transformation of dysplastic nevi (DN) is still not clear what determines the need for the study of molecular - genetic mechanisms of transformation of benign nevi. The purpose of the study - to examine expression patterns of protein regulators of apoptosis (p53 and Bcl-2) and proliferation (Ki-67) in the NAM, to assess their correlation with clinical and morphological characteristics. The results of our immunohistochemical (IHC) studies have shown that the increase in the degree of dysplasia NAM accompanied by an increase of atypical melanocytes expressing bcl-2 and p53. The proliferative activity of melanocytes*

Проліферативная активність меланоцитів (рівень Ki-67) також прямо пропорційно збільшується залежно від ступеня дисплазії ДН. Одночасне визначення гістологічного ступеня дисплазії ДН і ІГХ дослідження (BCL-2, p53, Ki-67) дозволить підвищити діагностику, диференційну діагностику ДН, а також послужить додатковим критерієм прогнозу і подальшої тактики у пацієнтів з ДН.

Ключові слова: диспластичний невус, ступінь дисплазії, імуногістохімічне дослідження.

(the level of Ki-67) is also directly proportional to increases depending on the degree of MD. Simultaneous determination of histologic grade dysplasia and NAM and IHC study (bcl-2, p53, Ki-67) will improve the diagnosis, differential diagnosis of MD, and also serve as an additional criterion for prognosis and further management of patients with DN.

Key words: dysplastic nevi, the degree of dysplasia, an immunohistochemical study.