

УДК 616.5-006.81-091]-037

ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ В МЕЛАНОМЕ КОЖИ ПО ДАННЫМ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

В.С. Алексинский; В.А. Басинский, д.м.н. профессор; А.К. Гриб, к.м.н.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

По данным иммуногистохимического исследования проанализирован клеточный пролиферативный индекс при меланоме кожи. Показано отсутствие его зависимости от стадии инвазивного роста по Кларку, толщины опухоли по Breslow, распространённости (pT) и гистологического типа новообразования.

Ключевые слова: меланома, клеточная пролиферация.

Based on the immunohistochemical study the cell proliferation index in skin melanoma has been analyzed. No relationship between the index and the stage of invasive growth by Clark, the thickness of the tumor by Breslow, the spread (pT) and histological type of the growth has been demonstrated.

Key words: melanoma, cellular proliferation.

Введение

Помимо верификации новообразования, одним из важнейших вопросов, стоящих перед патоморфологами и онкологами, стоит определение достоверного клинического прогноза меланомы кожи с оценкой её метастатического потенциала. При гистологическом исследовании меланом основное внимание уделяется факторам прогноза, рекомендованным Всемирной организацией здравоохранения (WHO): гистологический тип опухоли, стадия инвазивного роста по Кларку, толщина новообразования по Breslow, наличие либо отсутствие его изъязвления, митотический индекс, лимфоидная инфильтрация стромы, лимфоваскулярная инвазия, наличие микроателитов и феномена регрессии меланомы, а также полularity и локализация поражения [1]. Однако не все упомянутые критерии достаточно изучены и имеют однозначное прогностическое значение и потому по-прежнему являются объектами пристального внимания. Особый интерес представляет роль клеточной пролиферации в оценке метастатического потенциала и клинического прогноза меланомы кожи. Считается, что в опухолевой ткани достоверно выше пролиферативная активность клеток по сравнению с нормальной тканью. Это объясняется угнетением генов-супрессоров, активацией генов промоторов, отвечающих за регуляцию транскрипции генов, ответственных за деление клетки.

Одним из наиболее оптимальных маркеров клеточной пролиферации считается маркер Ki67 (MIB-1). Это антитело реагирует с ядерным антигеном, представленным во всех пролиферирующих клетках, которые находятся в активных фазах цикла клетки, то есть G₁, S, G₂, и митоз, но который отсутствует в клетках фазы G₀ [2].

Однако прогностическая ценность экспрессии Ki67 (MIB-1) в меланоме кожи до сих пор не оценена однозначно. В исследовании, проведенном Imoen S. et al [3], экспрессия Ki-67 не являлась прогностическим фактором в первичной меланоме. Имеются данные, что экспрессия маркеров пролиферации клетки не помогает предсказать прогноз в меланоме только на ранних стадиях [4]. В то же время для меланомы аноректальной и синоназальной локализаций показано, что пациенты с низкими уровнями экспрессии Ki67 имеют лучшие показатели выживаемости [5, 6]. Реактивность маркерного гена пролиферации Ki-67 в увеальных меланомах также является надежным индикатором метастатического потенциала и наиболее выражена в pT₃ стадии. В связи с этим, а также с учётом того, что есть хорошо отработанная техника для выявления экспрессии Ki-67, последний предла-

гается как лучший маркерный ген для определения пролиферации клеток увеальной меланомы во всех фазах цикла [7]. В экспериментах на животных было показано, что высокий пролиферативный индекс клеток меланомы кожи, определённый по экспрессии Ki-67, ассоциирован с худшим клиническим прогнозом, причём прогнозирующая ценность пролиферативного индекса Ki-67 была более высокой, чем прогнозирующая ценность классической гистологии [8]. Кроме того, для первичной злокачественной меланомы была найдена значительная корреляция между гистологическими параметрами, связанными с прогнозом (индекс Breslow и митотическая активность) и экспрессией Ki-67 [9]. Moretti S. et al [10] указывают, что оцениваемая антителом Ki-67 пролиферативная активность является возможным показателем метастаза в первичных меланомах кожи, а также индикатором плохого прогноза в поражениих толщиной менее 1,5 мм. Однако в узловых меланомах уровень пролиферации не связан с толщиной опухоли и не оказывает влияния на развитие рецидивов или выживание в целом [11]. Считается, что повышенный уровень экспрессии антигена Ki67 (MIB-1) является важным диагностическим критерием злокачественности меланоцитарных образований кожи [12]. В доброкачественных меланоцитарных поражениях индекс Ki-67 составляет менее 5% (диапазон 0%-4%) и окрашивание присутствует вблизи дермо-эпидермального соединения, тогда как в меланомах средний индекс составляет 27% (диапазон 5%-50%), а структура окрашивания носит гетерогенный характер. Определение экспрессии Ki-67 может быть полезным дополнением к гистопатологии при необходимости от дифференцировать злокачественную меланому от доброкачественных невусов [13]. Korabiowska M. et al. [14] нашли не только значительную корреляцию между экспрессией маркерного гена Ki67 в меланомах кожи со сроками выживания и наличием метастазов, но и продемонстрировали важную роль антигена Ki-67 для дифференциального диагноза между родимыми пятнами и меланомами.

При попытках зонального исследования экспрессии Ki67 в меланомах было показано, что средний индекс, посчитанный во всей опухоли, обладал большей дифференциально-диагностической ценностью, чем тот же показатель, определённый в индивидуальных зонах. Таким образом, иммунореактивность Ki67 хорошо коррелирует с доброкачественностью или злокачественностью меланоцитарных поражений, и может помочь в дифференциальной диагностике доброкачественных невусов от меланом [15].

Цель исследования: целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение клеточной пролиферации в меланоме кожи при разных стадиях инвазивного роста опухоли по Кларку, различной толщине новообразования по Breslow, его распространённости (pT) и гистологического варианта строения путём определения экспрессии маркера Ki67(MIB-1) и сопоставление этого параметра с клиническим течением и исходом заболевания.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 60 меланом кожи, полученные путём тотальной эксцизии. Всем больным было проведено хирургическое лечение без применения лучевой и химиотерапии. Среди заболевших было 19 мужчин и 41 женщина в возрасте от 29 до 80 лет. Чаще опухоль выявлялась в возрастном интервале от 60 до 79 лет. Среди заболевших преобладали жители городов – 71,43%. При гистологическом исследовании во всех случаях выявлена меланома на различных стадиях инвазивного роста, при этом не было ни одного наблюдения меланомы кожи, находящейся на первой стадии, определяемой по Кларку, тогда как меланомы на 2-й стадии по Кларку составили 3,51%, на 3-й – 17,54%, на 4-й – 54,39%, а на 5-й – 24,56%. Меланомы толщиной менее либо равной 1 мм (pT₁) составили 7,27% от общего количества случаев, толщиной более 1 мм., но не более 2 мм (pT₂) – 12,73%, более 2 мм, но не более 4 мм (pT₃) – 41,82%, более 4 мм (pT₄) – 38,18%, соответственно. При определении гистологического типа опухоли 65,38% составили узловые меланомы, 25,0% – злокачественная лентигозная меланома в фазе вертикального роста, и 9,62% опухолей было представлено поверхностно распространяющейся меланомой в фазе вертикального роста. Опухоль локализовалась на туловище в 28,07% случаев, на конечностях – в 56,14%, в области головы и шеи – в 14,04% и в 1,75% наблюдений – в области вульвы.

Группа больных, проживших менее 3-х лет, составила 43,48% от общего числа больных. В данной группе больные со стадией заболевания pT₁ отсутствовали, больные со стадией pT₂ составили 14,29%, pT₃ – 47,62%, pT₄ – 38,0%.

В группе больных с 5-летней выживаемостью 19,05% страдали меланомой, находившейся на стадии pT₁, 9,52% – на стадии pT₂, 47,62% – на стадии pT₃ и 23,81% – на стадии pT₄. Таким образом, показатель pT далеко не всегда отражает биологический потенциал меланомы, что требует поиска других прогностических маркеров новообразования. Одним из таких маркеров может быть пролиферативная активность клеток новообразования.

Для определения пролиферативного индекса клеток опухоли использовали иммуногистохимическое окрашивание гистологических срезов с применением моноклональных мышьяных антител фирмы «Дакко» к протейну Ki67(MIB-1), который экспрессируется ядрами клеток, находящихся в процессе деления.

Из парафиновых блоков готовились срезы толщиной 5 микрон, переносились на предметные стекла, имеющие положительный заряд; срезы в вертикальном положении высушивали 18 часов при комнатной температуре, далее помещали в термостат на 30 мин. при температуре 60°C. После этого проводилась депарафинация в ксилоле (в батарее из 3 емкостей по 3 минуты в каждой) и дегидратация в этиловом спирте (в батарее из 3 емкостей в спиртах восходящей крепости по 3 мин. в каждой). Предметные стекла со срезами переносились в цитратный буфер pH 6,0, и помещались в водяную баню при температуре 98°C на 30 мин. Для блокирования эндогенной

пероксидазы срезы обрабатывались 3% перекисью водорода. С целью обесцвечивания меланина, содержащегося в гистологических срезах меланомы, время экспозиции в перекиси водорода было увеличено до 30 минут. Первичные антитела наносились в стандартном разведении. Срезы инкубировались в течение 30 минут при комнатной температуре. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы «ДАКО» с диаминобензидином. Затем срезы промывали проточной водой, докрашивали гематоксилином и заключали в канадский бальзам. Для подсчёта количества ядер, экспрессирующих иммуногистохимический маркер Ki67, микропрепараты фотографировали в случайных полях зрения (объектив 40) с разрешением 1600 на 1200 пикселей при помощи микроскопа AxioStar и цифровой камеры Canon A620. Для более тонкой визуализации иммуногистохимической реакции в фоторедакторе Adobe Photoshop 10 CS 3 при помощи инструмента «color range» выделяли характерную коричневую окраску, которую дают продукты реакции диаминобензидина, и далее проводился подсчёт количества ядер при помощи функции «analysis», инструмент «count tool».

Определение клеточного пролиферативного индекса по экспрессии Ki67(MIB-1) проводилось путём определения процентного соотношения Ki67-позитивных клеточных ядер меланомы к общему количеству ядер клеток опухоли, подсчитанных при 400-кратном увеличении. Подсчёт производился для клеточной популяции, насчитывающей не менее тысячи клеток и не менее чем в двух случайных полях зрения.

Полученные данные обработаны при помощи компьютерной программы статистической обработки Statistica 6.0 с использованием корреляционного анализа Спирмена и метода множественных сравнений Крускала-Уолиса.

Результаты проведенного исследования

Определение клеточного пролиферативного индекса с использованием иммуногистохимического маркера Ki67 показало, что пролиферативная активность клеток меланомы кожи варьирует в крайне широких пределах – от полного отсутствия экспрессии маркера пролиферации Ki67 в представленных гистологических срезах до 49,7%. В подавляющем большинстве исследованных случаев распределение Ki67-позитивных ядер носило либо достаточно равномерный характер, либо характеризовалось гетерогенностью с наличием пролиферативно-активных зон, расположенных случайно. Особый интерес представляют 4 случая, в которых прослеживалась значительная разница в показателях индекса пролиферации, определяемого в зоне дермоэпидермального стыка и в интрадермальных частях опухоли: индекс пролиферации в зоне дермо-эпидермального соединения оказался достоверно выше, чем тот же показатель, определённый в интрадермальной части. Отношение пролиферативного индекса дермальной части опухоли к аналогичному показателю, определённому в зоне дермо-эпидермального соединения, в этих случаях составило 0,19, 0,125, 0,16 и 0,003. Указанная особенность позволяет предположить, что существует определённая группа меланом, в которых пролиферативная активность клеток значительно убывает по мере погружения последних в дерму (рис. 1, 2).

При корреляционном статистическом анализе полученных данных с использованием непараметрического критерия Спирмена было показано, что достоверной корреляции между клеточным пролиферативным индексом

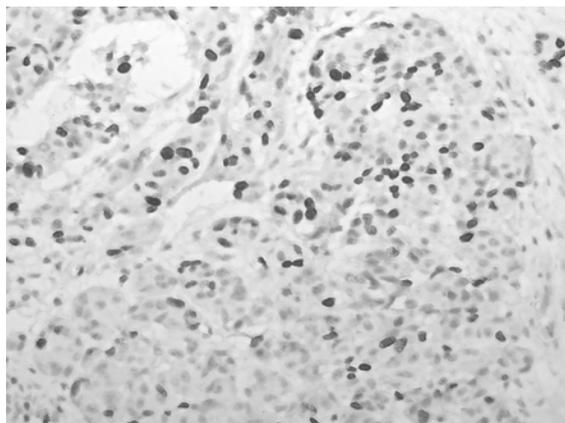


Рисунок 1 – Высокий уровень экспрессии ядерного антигена Ki67 клетками меланомы. Иммуногистохимическая окраска Ki67. Увеличение 400

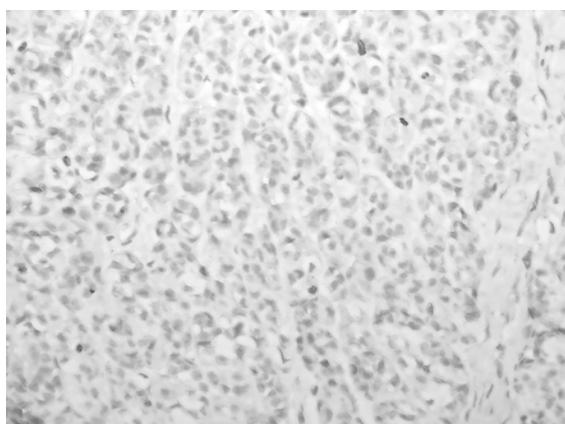


Рисунок 2 – Низкий уровень экспрессии антигена Ki67 клетками меланомы. Иммуногистохимическая окраска Ki67. Увеличение 400

и стадией инвазивного роста меланомы, определяемой по Кларку, не имеется ($r_s=0,017465$, $p=0,909341$). Аналогичные результаты были получены при поиске корреляционной связи между уровнем клеточного пролиферативного индекса и толщиной опухоли, измеряемой по Breslow ($r_s=0,012904$, $p=0,932954$).

При использовании метода множественных сравнений Крускала-Уоллиса в качестве независимых группирующих признаков брались такие морфологические критерии меланомы, как толщина опухоли по Breslow, стадия инвазивного роста по Кларку и гистологический тип опухоли. Достоверные различия уровней экспрессии маркера Ki67 (MIB-1) в меланомах толщиной до 1 мм. (pT_1), более 1 мм, но менее 2 мм (pT_2), более 2 мм, но менее 4 мм. (pT_3) и более 4 мм (pT_4) отсутствовали ($p=0,1240$). Группы меланом, находящихся на 3-й, 4-й и 5-й стадиях инвазивного роста по Кларку, также не показали достоверных различий в уровнях экспрессии маркера пролиферации Ki67 (MIB-1) ($p=0,6151$). Аналогично не было найдено достоверных различий значений клеточного пролиферативного индекса в группах опухолей различного гистологического типа, представленных поверхностно распространяющимися меланомами и меланомами типа злокачественного лентиги в фазе вертикального роста, а также узловыми меланомами ($p=0,5101$).

Выводы

Меланома кожи характеризуется широким диапазоном значений индекса клеточной пролиферации со значительной разницей в зональном распределении показателей. Уровень клеточной пролиферации, определяемый по уровню экспрессии маркера Ki67 (MIB-1), не зависит от таких гистологических параметров опухоли, как стадия инвазивного роста по Кларку, толщина новообразования по Breslow, распространенность первичной опухоли (pT) и гистологический тип, и не может служить достоверным прогностическим признаком новообразования.

Литература

1. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics Skin Tumours / Ph.E. LeBoit [et al.] – Lyon: IARC press, 2006. – P. 64-65.
2. Gerdes, J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies / J. Gerdes // Semin. Cancer Biol. – 1990. – Vol. 1(3). – P. 199-206.
3. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in primary and metastatic melanoma / S. Ilmonen [et al.] // Melanoma Res. – 2005. – Vol. 15(5). – P. 81-375.
4. Cell proliferation markers in predicting metastases in malignant melanoma / V.B. Reddy [et al.] // J. Cutan. Pathol. – 1995. – Vol. 22(3). – P. 51-248.
5. Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma / O. Ben-Izhak [et al.] // Histopathology. – 2002. – Vol. 41(6). – P. 25-519.
6. Ki67 antigen as a predictive factor for prognosis of sinonasal mucosal melanoma / D.K. Kim [et al.] // Clin. Exp. Otorhinolaryngol. – 2008. – Vol. 1(4) – P. 10-206.
7. Krvavica, A. Expression of bcl-2, Ki-67 and p-53 in uveal melanomas / A. Krvavica, J. Talan-Hranilovic, M. Belicza // Acta Med. Croatica. – 2008. – Vol. 62(3) – P. 71-267.
8. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma / C. Laprie [et al.] // Vet. Dermatol. – 2001. – Vol. 12(3) – P. 47-139.
9. Comparison of proliferative activity as assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions. A quantitative immunohistochemical study / S. Moretti [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 1990. – Vol. 95(3) – P. 4-320.
10. Ki67 antigen expression correlates with tumor progression and HLA-DR antigen expression in melanocytic lesions / S. Moretti [et al.] // J. Am. Acad. Dermatol. – 2001. – Vol. 44(2) – P. 92-188.
11. Cyclin A expression in superficial spreading malignant melanomas correlates with clinical outcome / V.A. Florenes [et al.] // J. Pathol. – 2001. – Vol. 195(5) – P. 6-530.
12. McNutt, N.S. «Triggered trap»: nevoid malignant melanoma / N.S. McNutt // Semin. Diagn. Pathol. – 1998. – Vol. 15(3) – P. 9-203
13. Nasr, M.R. Comparison of pNH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions / M.R. Nasr, O. El-Zammar // Am. J. Dermatopathol. – 2008. – Vol. 30(2) – P. 22-117
14. Antigen Ki-67 and c-myc oncogene as related to histoclinical parameters in pigmented skin lesions / M. Korabiowska [et al.] // In Vivo. – 1995 – Vol. 9(5) – P. 8-433.
15. A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions / L.X. Li [et al.] // Am. J. Dermatopathol. – 2000. – Vol. 22(6) – P. 489-95.

Поступила 18.05.10