

РОЛЬ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ МЕТАСТАЗОВ МЕЛАНОМЫ. КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

М.В. Савостикова, Л.В. Мехеда

ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Среди всех злокачественных опухолей кожи меланома занимает особое место. При том, что структурно меланома составляет не более 10% всех злокачественных форм опухолей кожи, на ее долю приходится около 80% смертей от этой патологии, приходящихся на группу злокачественных опухолей кожи. Многообразие клинических проявлений и морфологических форм меланомы, иногда малое, а порой и полное отсутствие пигмента в опухоли диктует необходимость применять дополнительные методы диагностики. В частности, ИЦХ-метод при злокачественных недифференцированных новообразованиях позволяет диагностировать рак, меланому и лимфому с точностью до 90,3%, 100% и 87,5% соответственно.

Ключевые слова: метастаз, меланома, цитология, иммуноцитохимия.

IMMUNOCYTOCHEMICAL RESEARCH IN CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF MELANOMA METASTASES. CLINICAL OBSERVATIONS

M.V. Savostikova, L.V. Mekheda

Federal Budgetary State Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Centre» of the Russian Academy of Medical Sciences

Among all malignant lesions of the skin melanoma occupies a special place. Although anatomically melanoma accounts for not more than 10% of all malignant lesions of the skin, 80% of deaths from skin cancer cases are associated with this pathology. Because of the variety of clinical manifestations and morphological forms of melanoma, and in some cases minimal amounts of pigment or its complete absence in tumor applying of additional diagnostic options may be needed. In particular, immunocytochemical method of malignant undifferentiated tumors enables to diagnose cancer, melanoma and lymphoma with up to 90.3%, 100% and 87.5% accuracy respectively.

Key words: metastasis, melanoma, cytology, immunocytochemistry.

Меланома (*сином.*: злокачественная меланома, меланокарцинома, меланобластома, меланоцитомма, невокарцинома, меланомалигнома). Среди всех злокачественных опухолей кожи меланома занимает особое место: так, составляя структурно не более 10% от всех форм онкозаболеваний кожи, меланома приводит к летальному исходу 80% пациентов [5, 7, 8]. Кожная форма меланомы — наиболее частая, на долю внекожных форм заболевания, возникающих на слизистых прямой кишки и половых органов, полости рта и придаточных пазух носа, а также на оболочках головного и спинного мозга, приходится лишь 1–3%. По данным Valch С.М., Houghton A.N., гематогенное распространение меланом возможно в любые органы и ткани: метастазы в легкие и головной мозг — наиболее частая причина смерти, и встречаются в 48–59% наблюдений [10]. Первая зона метастазирования

опухоли в 50% наблюдений меланом — регионарные лимфатические узлы. Локализация отдаленных метастазирований чаще встречается в легкие (18–36%), печень (14–29%), головной мозг (12–20%), кости (11–17%) и кишечник (1–7%) [4, 11]. Изредка (в 1–6% наблюдений) выявляются метастазы меланомы без их невыявленного первичного очага [3, 14].

Разнообразие морфологических вариантов злокачественной меланомы, характеризующееся выраженным клеточным и ядерным полиморфизмом, осложняет цитологическую диагностику опухолей меланоцитарной системы. Ведущий признак меланом — наличие в цитоплазме опухолевых клеток пигмента — меланина [1, 2, 9, 11]. В панхромной окраске он имеет вид от крупных гранул до пылевидной зернистости, от серого до черного цвета. В зависимости от преобладания клеток той или иной

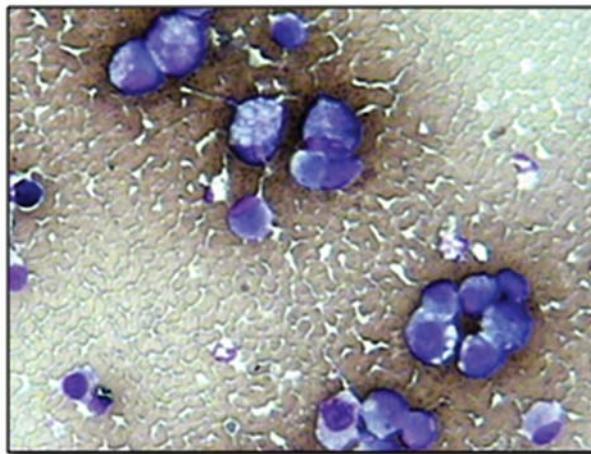
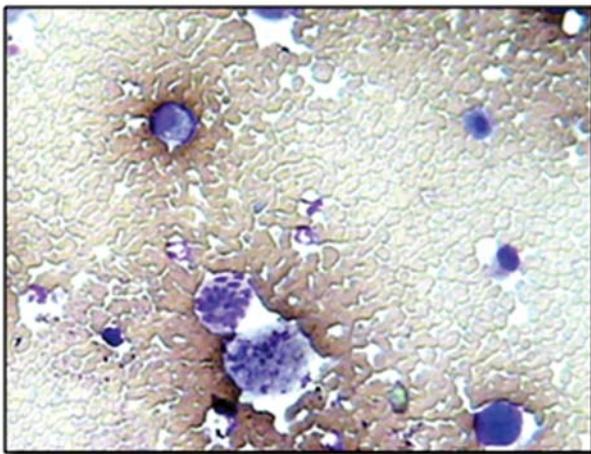
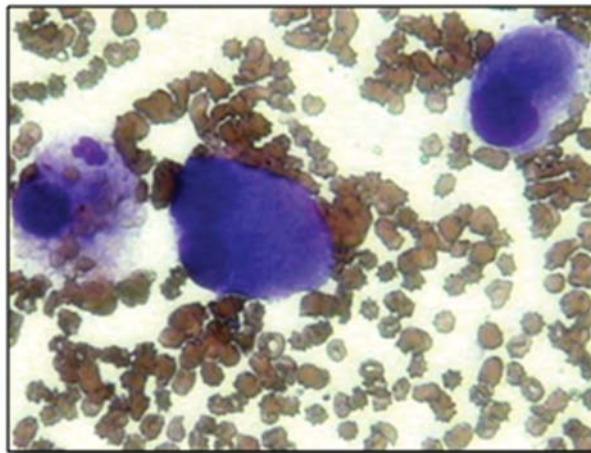
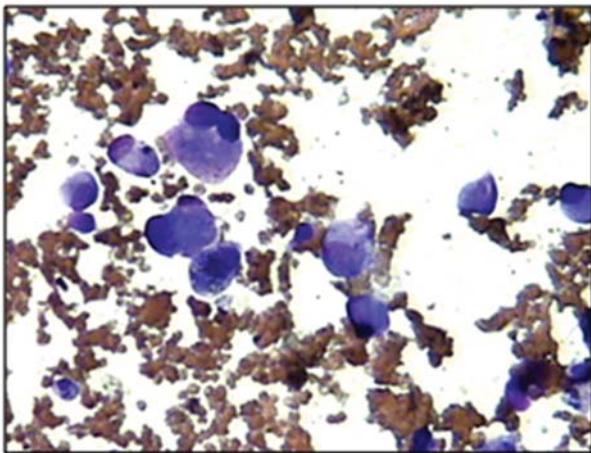


Рис. 1–4. Цитопрепарат злокачественного новообразования правой и левой молочных желез (Окраска по Лейшману (X100; 400))

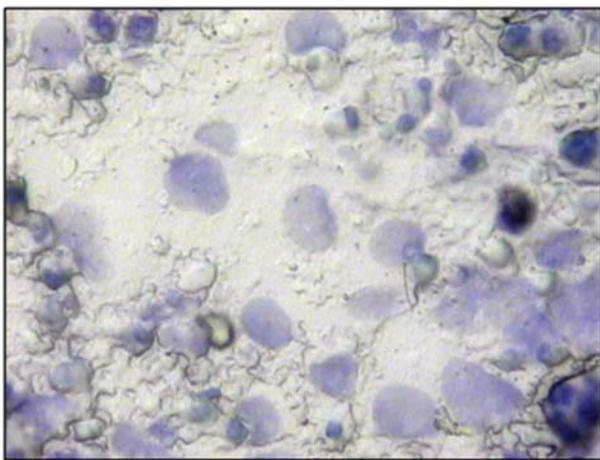


Рис. 5. Цитопрепарат злокачественного новообразования правой и левой молочных желез. Отрицательная экспрессия ЭМА в клетках опухоли (X200)

формы, разницы размеров и характера образуемых ими структур, выделяют четыре основных типа цитогрaмм: эпителиоподобный, веретенноклеточный, невусоподобный, смешанноклеточный.

Многообразие клинических проявлений и морфологических форм меланомы, часто малое, а иногда и полное отсутствие пигмента (беспигментный вариант) в опухоли диктует необходимость использовать иммуноцитохимический (ИЦХ) ИЦХ метод. Иммуноцитохимические исследования при злокачественных недифференцированных новообразованиях позволяют диагностировать рак, меланому и лимфому с точностью до 90,3%, 100% и 87,5% соответственно [7].

Среди большого числа «специфических» для меланомы моноклональных антител (МКАТ) основные: НМВ-45 — антитела, выявляющие онкофетальный премеланомосомальный антиген gp100, экспрессирующийся в 80–100% меланом; Melan A — трансмембранный белок, экспрессируется в 80–100% меланом и Белок S-100, являющийся

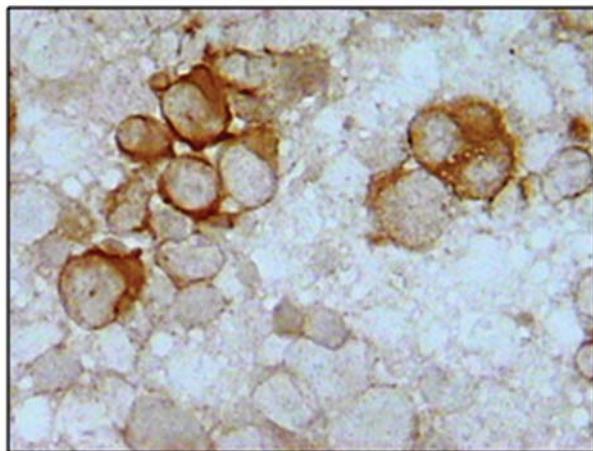
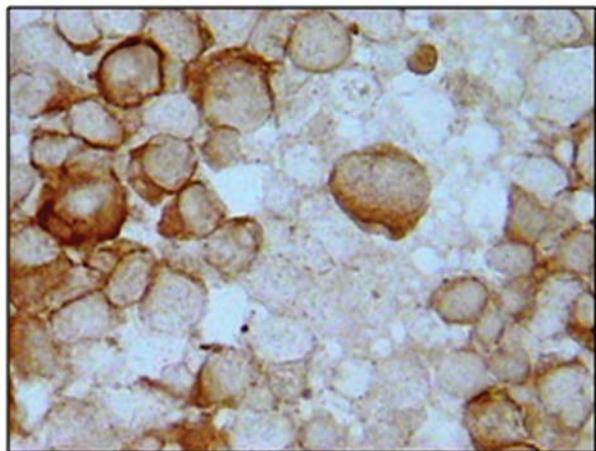


Рис. 6, 7. Цитопрепарат злокачественного новообразования правой и левой молочных желез. Положительная экспрессия меланосомного антигена HMB-45, melan A в клетках опухоли (X 400)

чувствительным маркером меланом (экспрессируется в 98%); однако он менее специфичен, поскольку выявляется и в ряде других клеток: глиальных, клетках Лангерганса, гистиоцитах, лимфоцитах, хондроцитах, адипоцитах, клетках гипофиза, миоэпителиальных клетках и т.д. При положительной ИЦХ реакции выявляется в цитоплазме и ядрах, причем в беспигментных меланомах экспрессия более яркая [1, 2, 6, 9, 10, 12, 13, 15], но эти антитела не позволяют отличить меланоцитарную дисплазию от меланомы.

В настоящей работе представлены три клинических наблюдения метастазов меланомы: в молочные железы, головной мозг и надпочечники. ИЦХ анализ проводился на цитологических монослойных мазках, полученных методом жидкостной цитологии: накопление материала в специальной питательной среде с последующим центрифугированием на системе Cytospin-3 (Shandon, UK), в режиме 1000 об./мин.

в течение пяти минут и аппарате Prap Stain (фирмы BD). Для визуализации иммунной реакции использовали систему LSAB+ Detection System («ДАКО»), выявление пероксидазной активности проводили с помощью 3,3 — диаминобензидина (ДАБ), цитопрепараты докрасивали гематоксилином Майера. В работе использованы моноклональные кроличьи и мышьиные антитела (фирма «ДАКО», Дания): к меланомному антигену HMB-45 (разведение 1:50, клон HMB-45) и Melan A (разведение 1:25-1:50, клон A103), белку S-100 (разведение 1:100, NP 020), к эпителиальному антигену — BerEp4 (разведение 1:200-1:400, клон BerEp4), ЭМА (разведение 1:50-1:100, клон E29), общему лейкоцитарному антигену-CD45 (разведение 1:50-1:100, клон 2B11+PD7/26).

Клинические наблюдения

1. Клиническое наблюдение: женщина, 36 лет, клинический диагноз: множественные шарообразные

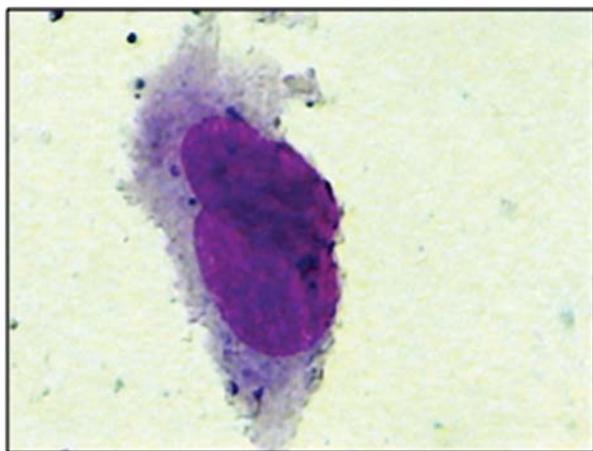
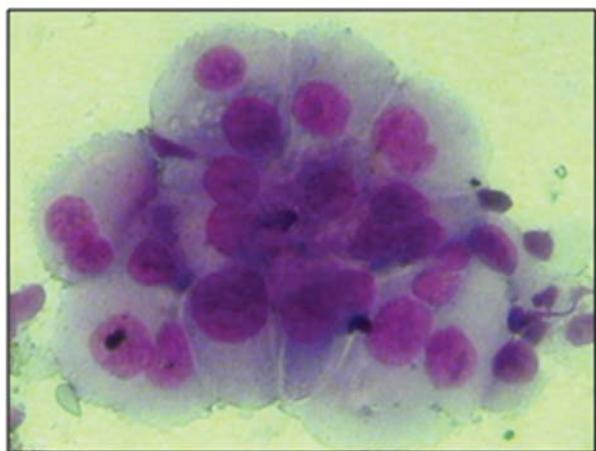


Рис. 8, 9. Цитопрепарат новообразования правого надпочечника (Окраска по Папленгейму (X400; 1000)

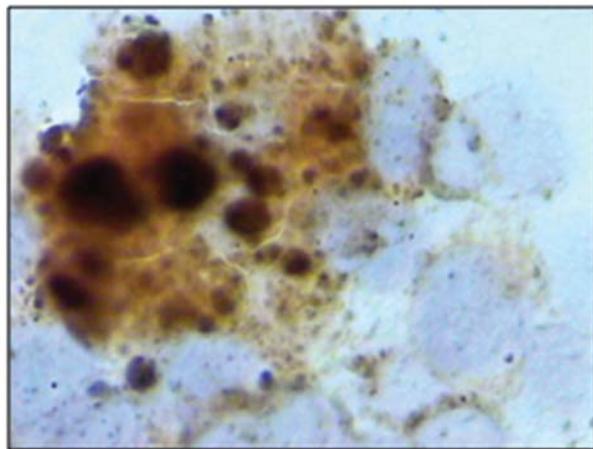
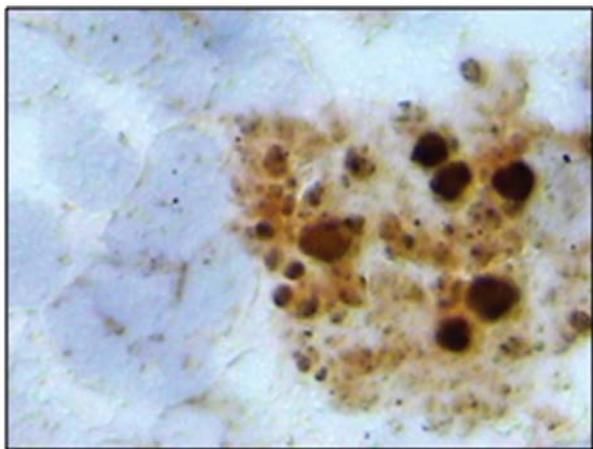


Рис. 10, 11. Цитопрепарат новообразования правого надпочечника. Положительная экспрессия меланосомного антигена HMB-45 (X1000)

новообразования опухоли обеих молочных желез на фоне нормально протекающей беременности (24 недели). Рак? В 2010 году иссечение невуса кожи подлопаточной области спины (гистологически — пигментный невус с признаками тяжелой дисплазии).

Цитологическое заключение (пунктат образования правой и левой молочных желез): клеточный состав пунктата новообразований в обеих молочных железах идентичен и представлен опухолевыми клетками полиморфноклеточного строения с наличием крупных гиперхромных одного, реже двух ядер, содержащих одно-два ядрышка, определялись единичные митозы. В цитоплазме отдельных клеток отмечалась «запыленность» серого оттенка. Цитограмма подозрительна по наличию метастаза злокачественной эпителиоклеточной пигментной меланомы.

В ИЦХ исследовании использовались следующие МКАТ: к эпителиальному антигену — ЭМА, маркерам меланина — HMB-45 и melan A (рис. 1–7).

ИЦХ исследование показало положительную экспрессию меланосомного антигена HMB-45, melan A в клетках опухоли и отрицательную ЭМА.

ИЦХ заключение: метастаз злокачественной эпителиоклеточной пигментной меланомы в молочные железы.

Результат. После пересмотра гистологических препаратов удаленного невуса кожи спины **гистологическое заключение следующее:** на фоне диспластического невуса отмечается микроочаг злокачественной эпителиоклеточной пигментной меланомы. При гистологическом исследовании удаленных опухолей молочных желез был поставлен диагноз

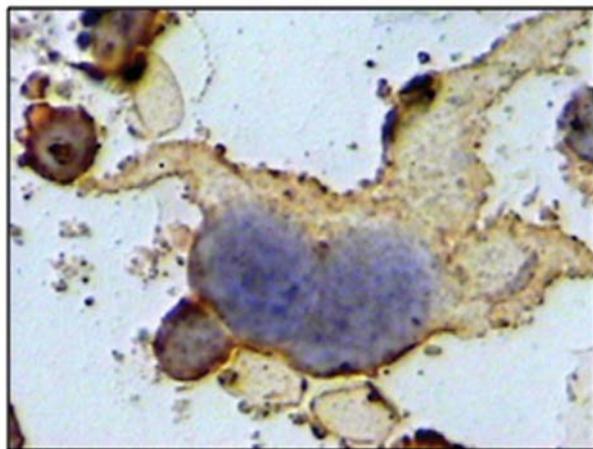
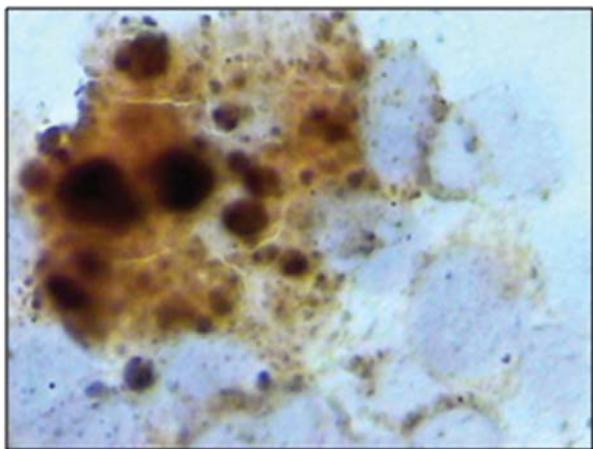


Рис. 12, 13. Цитопрепарат новообразования правого надпочечника. Положительная экспрессия белка S-100 (X1000)

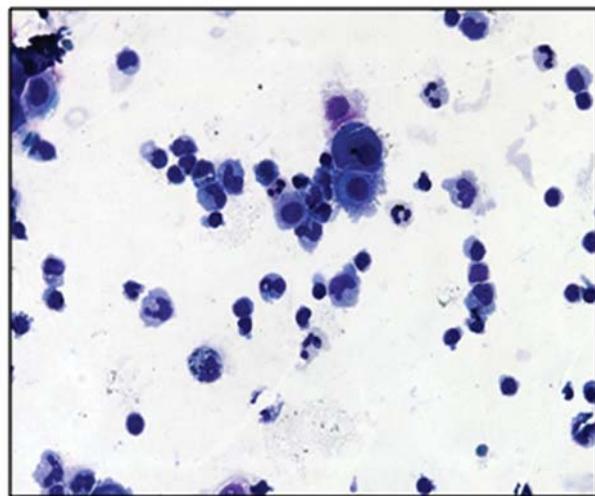
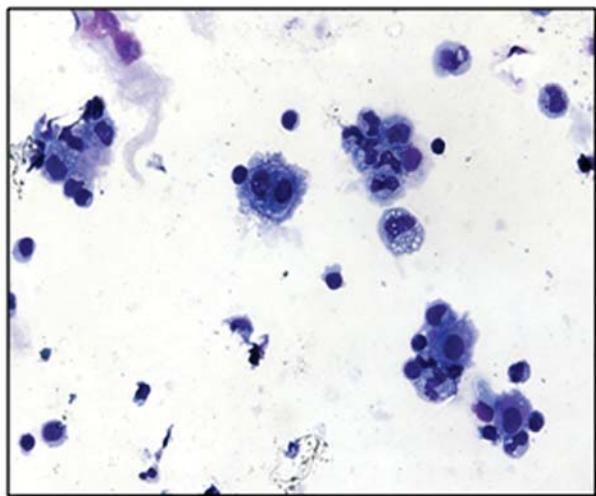


Рис. 14, 15. Спинномозговая жидкость. Метастаз эпителиоцелочной меланомы (Окраска по Лейшману (X200))

метастазов меланомы кожи спины; молочные железы также были верифицированы.

2. Клиническое наблюдение: мужчина, 46 лет, клинический диагноз — опухоль правого надпочечника.

Цитологическое заключение (пунктат образования правого надпочечника): цитограмма представлена опухолевыми клетками округлой, полигональной и веретеночелочной формы, различными по величине, располагающимися большей частью разрозненно. Ядра крупные, округлые, часто встречаются двуядерные клетки с «зеркальным» расположением. Структура хроматина в большинстве своем относительно равномерная или мелкоточечная. Во всех ядрах присутствуют по одному-два ядрышка. В цитоплазме отдельных клеток и по всему фону мазка определяется в виде черных неболь-

ших гранул меланин. Был заподозрен метастаз злокачественной смешанноцелочной пигментной меланомы.

Для ИЦХ применяли следующие МКАТ: к эпителиальному антигену — ЭМА, маркер меланина — НМВ-45 и белок S100 (Рис. 8–13).

ИЦХ исследование подтвердило диагноз меланомы, выявив в клетках опухоли коэкспрессию меланосомного антигена НМВ-45 и белка S100. Экспрессия ЭМА — отсутствовала.

ИЦХ заключение: метастаз злокачественной смешанноцелочной пигментной меланомы в правый надпочечник, что было подтверждено при гистологическом исследовании удаленной опухоли.

Гистологическое заключение: в правом надпочечнике метастаз злокачественной смешанноцелочной пигментной меланомы.

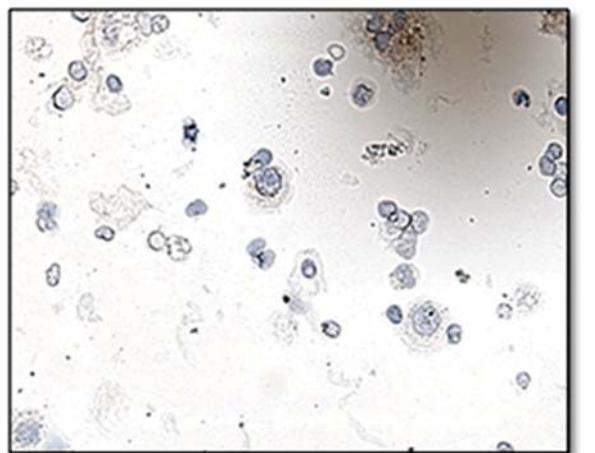
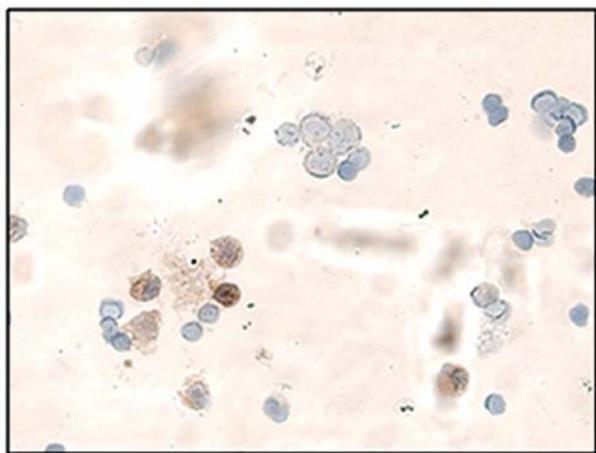


Рис. 16, 17. Спинномозговая жидкость. Отрицательная экспрессия эпителиальных маркеров ЭМА и BerEp4 в клетках, подозрительных по принадлежности к меланоме (X200)

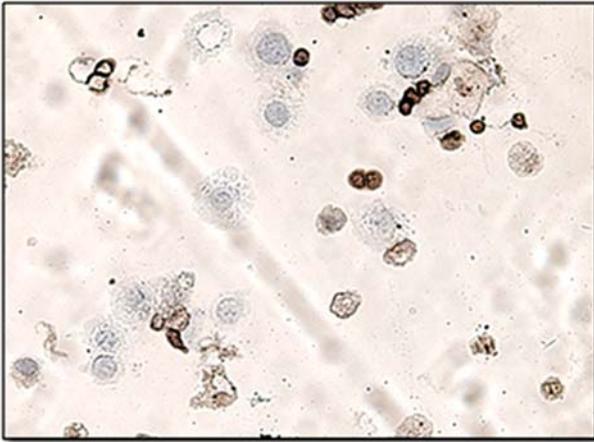


Рис. 18. Спинномозговая жидкость. Отрицательная экспрессия CD45 в клетках, подозрительных по принадлежности к опухоли. Отмечается положительная реакция в зрелых лимфоцитах (X400)

3. Клиническое наблюдение: женщина, 36 лет. Клинический диагноз: меланома кожи левого предплечья T2N0M0 после хирургического лечения в 2010 году. В октябре 2012 г. выявлены множественные объемные образования головного мозга (возможно, специфической природы? Рецидив?). Кровоизлияние в вещество объемного образования головного мозга от 30.10.12. Генерализованный судорожный припадок от 30.10.12. В лабораторию доставлено 8 мл спинномозговой жидкости.

Цитологическое заключение (спинномозговая жидкость): клеточный состав представлен лейкоцитами, лимфоцитами, клетками, напоминающими макрофаги: округлой и полигональной формы, больших размеров, с фестончатыми, ажурными краями цитоплазмы. Однако ядра в них крупные, округлые, большей частью гиперхромные, просматриваются нуклеолы. Встречаются двуядерные клетки как бы с «зеркальным» расположением ядер. Цитоплазма отдельных клеток слегка «запорошена» черной «пылевидностью», скорее всего меланина. Цитограмма подозрительна по наличию метастаза злокачественной эпителиоцелочной пигментной меланомы.

Для ИЦХ использовались следующие МКАТ: к эпителиальному антигену — BerEp4 и ЭМА, общему лейкоцитарному антигену — CD45, маркеры меланина — HMB-45 и melan A, нейромаркер — белок S100. (Рис. 14–22).

ЦХ исследование выявило положительную экспрессию меланосомного антигена HMB-45, melan A, нейромаркера белка S100 в клетках опухоли и отрицательную эпителиального — BerEp4 и ЭМА, лейкоцитарного — CD45.

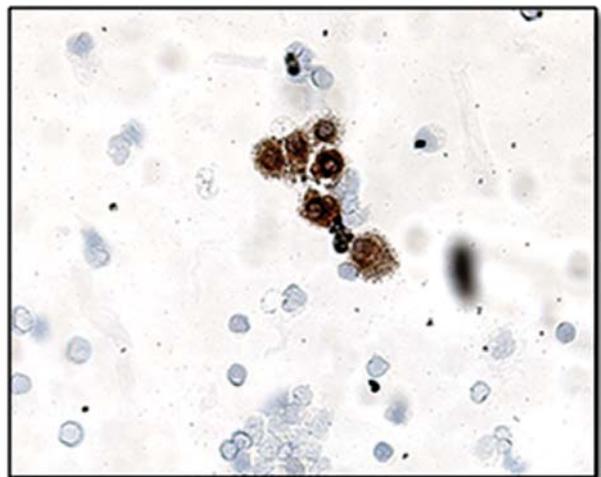
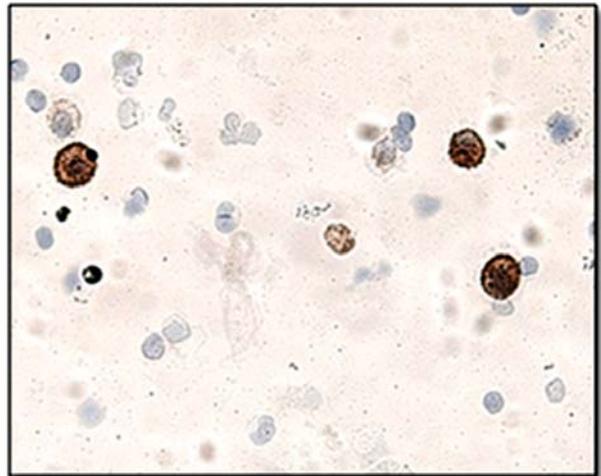
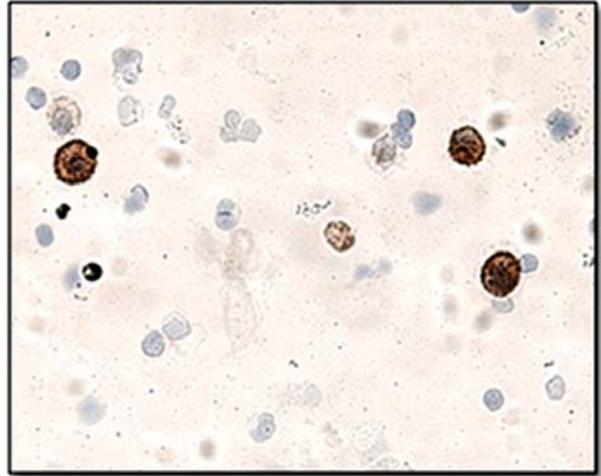


Рис. 19, 20. Спинномозговая жидкость. Положительная экспрессия меланосомного антигена HMB-45 и melan A в клетках опухоли (X 200)

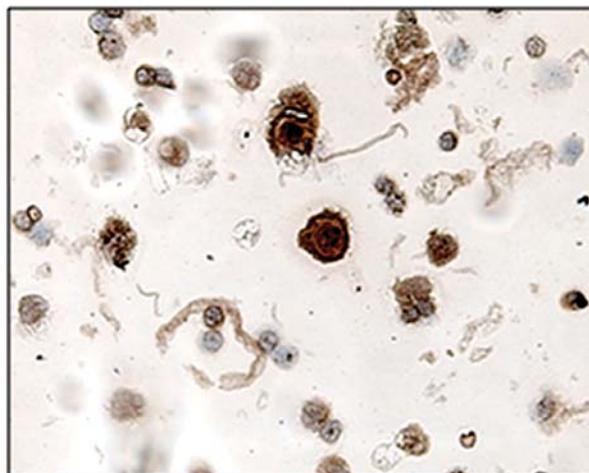
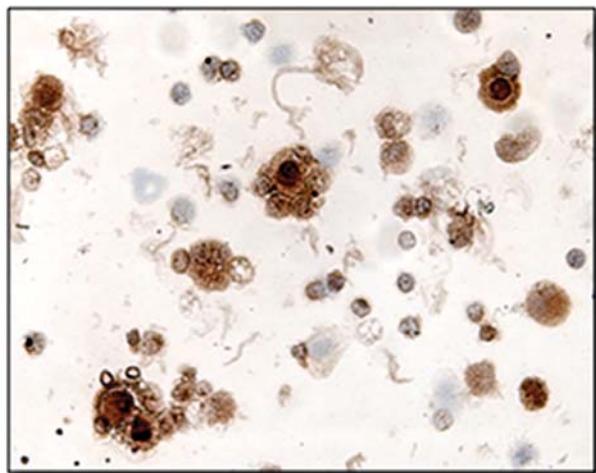


Рис. 21, 22. Спинномозговая жидкость. Положительная экспрессия белка S100 в клетках меланомы (X 200)

ИЦХ заключение: метастаз эпителиоцелочной пигментной меланомы в головном мозге.

Таким образом, использование дополнительного иммуноцитохимического метода в клинической цитологической практике позволяет с высокой степенью

вероятности диагностировать не только первичные опухоли, но и отдаленные метастазы меланомы, определять их при невыявленном первичном очаге и при множественных злокачественных процессах в диагностически сложных для цитолога исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глузман Д.Ф., Склярченко Л.М., Надгорная В.А., Крячок И.А. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. Киев: Морион, 2003. С. 28–41.
2. Волченко Н.Н., Савостикова М.В. Атлас цитологической и иммуноцитохимической диагностики опухоли. М., 2010.
3. Вулф К., Джонсон Р., Сюрмонд Д. ДЕРМАТОЛОГИЯ по Томасу Фицпатрику: Атлас-справочник. М.: Практика, 2007. С. 393.
4. Галл-Оглы Г.А., Молочков В.А., Сергеев Ю.В. Дерматоонкология. М.: Медицина для всех. 2005. С. 207.
5. Гилязутдинов И.А., Хасанов Р.Ш., Сафин И.Р., Мусеев В.Н. Злокачественные опухоли мягких тканей и меланома кожи: Практическое руководство для врачей. М.: Практическая медицина. 2010. С. 132–133.
6. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань, 2012. С. 450.
7. Савостикова М.В. Иммуноцитохимическое исследование в диагностике и оценке важнейших факторов прогноза злокачественных и доброкачественных образований: Дис. ... канд. мед. наук. М., 2006.
8. Хэбиф Т.П. Кожные болезни. Диагностика и лечение. М.: МЕДпресс-информ, 2007. С. 480–482.
9. Alexopoulou D., Tsiambas E., Lambropoulou S., Kompotis K., Papaspyrou S., Karameris G.A. // Morphometric and immunocytochemical study of a case of malignant melanoma in fine needle aspiration specimen // Cytopathology. 2004. V.15 (Suppl. 2). P. 48.
10. Balch C.M., Houghton A.N. //Diagnosis of metastatic melanoma at distant sites// Ibid. P. 439–467.
11. McCarthy W.H., Shaw H.M., Thompson J.F., Milton G.W. // Time and frequency of recurrence of cutaneous stage I melanoma with guidelines for follow-up study // Surg. Gynecol. Obstet. 1988. Vol. 166. P. 497–502.
12. Duray P.H., Palazzo J., Gown A.M. et al. // Melanoma cell heterogeneity; a study of two monoclonal antibodies compared with S-100 protein in paraffin sections // Cancer. 1988; 61: 2460.
13. Mooi W.J., Deenik W., Peterse Y.L. et al. // Keratin immunoreactivity in melanoma of soft parts (clear cell sarcoma) // Histopathology. 1995; 27; 61.
14. Patel J.K., Didolkar M.S., Pickren J.W., Moore R.H. // Metastatic pattern of malignant melanoma. A study of 216 autopsy cases // Am. J.Surg. 1978. Vol. 135. P. 807–810.