

Куницына Анастасия Владимировна

научный сотрудник, ассистент

Красникова Ксения Алексеевна

лаборант-исследователь, бакалавр

Ачилов Атабег Батырович

магистрант, младший научный сотрудник

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Балацук Елена Валерьевна

канд. мед. наук, врач-патологоанатом

Фирсова Наталья Викторовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-107125

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПИГМЕНТНЫХ НЕВУСОВ КОЖИ С МУТАЦИЕЙ ГЕНА BRAF

Аннотация: полученные результаты иммуногистохимических исследований образований кожи (пигментный невус) с мутацией гена BRAF говорят в пользу концепции более пристального изучения пигментных образований кожи, как образований с неопределенным биологическим потенциалом, в аспекте прогноза трансформации в меланому.

Ключевые слова: меланома кожи, пигментный невус, иммуногистохимия, меланома.

Меланома кожи является самым агрессивным заболеванием, с высоким метастатическим потенциалом и высокой частотой рецидивов [3]. Кожные злокачественные меланомы подразделяются на три подтипа в зависимости от анатомической локализации и степени воздействия ультрафиолетового излучения: меланома, возникающая из хронически поврежденной солнцем кожи (*chronic solar insolation, HSI*), меланома, возникающая из нехронически поврежденной солнцем кожи (*not chronic solar insolation – nHSI*), и акральная меланома [9; 19]. Одна из попыток борьбы с ростом заболеваемости злокачественной меланомой сосредоточена на раннем выявлении меланоцитарных невусов с определением потенциальной риска трансформации в меланому [22]. Известно, что один из путей развития меланомы невус-ассоциированный путь [13], невусы являются наиболее распространенными имитациями меланомы. В связи с этим неудивительно, что между генами, ассоциированными с невусом и меланомой, а также между фенотипическими и клеточными особенностями невусов и меланомы существует сильное генетическое сходство, включая активирующие мутации в онкогенах и повышенную скорость пролиферации [15], также отмечено наличие ряда мутаций, способствующих, но недостаточных для злокачественной трансформации, что может в будущем помочь диагностировать образования требующих наблюдения. Примерно 33% меланом происходят непосредственно из доброкачественных меланоцитарных невусов. Несмотря на это, подавляющее большинство меланоцитарных невусов, которые обычно образуются в результате мутаций, активирующих $BRAF^{V600E}$, никогда не прогрессируют до меланомы. В тоже время отмечаются $BRAF^{V600E}$ негативные меланомы [4] и в 30% случаев отмечаются пан-негативные (*pan-negative*) типы меланом по драйверным генам $BRAF$, $NRAS$, $c-Kit$ [1; 8; 12; 14]. Которые проявляют различный ответ на действие таргетной терапии [9]. Пациенты с $BRAF^{V600E}$ -положительной меланомой, так и пациенты с гетерогенной $BRAF^{V600E}$ имели значительно более короткую меланому-специфическую выживаемость, чем пациенты с $BRAF^{V600E}$ -отрицательной меланомой [10]. В целом мутация гена $BRAF$ действует как драйверная мутация на

ранней стадии развития меланомы, в то время как последующие генные aberrации, такие как TERT, CDKN2A и TP53, способствуют прогрессированию опухоли на более поздних стадиях [19]. Следовательно, большинство меланом кожи имеют гомогенный статус мутации *BRAF* в пределах одной опухоли, однако некоторые исследования, показали определенную внутриопухолевую гетерогенность *BRAF*^{V600E}, *NRAS*, которые проявляют более агрессивный характер в случае первичной и метастатической меланомы [11; 17].

Кроме молекулярно-генетических методов диагностики широко применяются альтернативные методы, такие как иммуногистохимия [21]. Хотя гистологическое исследование остается «золотым стандартом» диагностики меланомы кожи, каждый день выявляется постоянно растущее число иммуногистохимических маркеров, которые могут помочь в диагностике, прогностической характеристике и выборе подходящего терапевтического средства [3]. Сегодня ИГХ является фундаментальным диагностическим инструментом при диагностике кожных патологий и имеет ряд преимуществ перед другими методами (RIA, Вестерн-блоттинг, ELISA), гарантирует сохранение связей между различными анализируемыми компонентами ткани, что позволяет идентифицировать клетки [18], ИГХ можно применять к тканям с низким содержанием опухоли, которые не подходят для молекулярного анализа. Еще одним достоинством ИГХ является то, что она дает четкую визуализацию состояния всей опухоли. Подобно многим другим опухолям, злокачественная меланома обладает, как уже говорилось выше, молекулярной гетерогенностью. Гетерогенность опухоли относится к наличию субклонов опухолевых клеток с отчетливой молекулярной изменчивостью в отдельных опухолях (внутриопухолевая гетерогенность) или среди опухолей разных локализаций у пациента (межопухолевая гетерогенность). Однако не существует антитела или набора антител, которые позволяли бы однозначно диагностировать различия между меланомой и невусом. Поэтому необходимо тщательно проанализировать характер экспрессии антител и локализацию поражения, используя стандартные морфологические характеристики.

В связи с этим *целью* исследования является определение иммуногистохимических особенностей пигментных невусов кожи пациентов с мутацией гена *BRAF*.

Материалы и методы исследования. Для гистологических исследований, использовали хирургически иссеченный клинический материал образований кожи, зафиксированный в 10%-забуференном формалине, который заливали в парафиновые блоки (FFPE-блоки) с дальнейшим изготовлением срезов и окраской гематоксилин-эозин. Иммуногистохимическое исследование выполнено с использованием антител, маркеров меланоцитарного генеза и пролиферативного потенциала опухоли: S100 (клон 4C4.9, 1:100, Diagnostic BioSystems, США), Melanoma cocktail HMD45/ MART-1 (клон HMD45+A103+T311, 1:100, Diagnostic BioSystems, США), Ki67 (клон MIB-1, 1:100, Dako, США), согласно инструкций производителя. Детекцию проводили непрямой методом АВС (авидин-биотин-вый комплекс) с использованием набора двухстадийной системы детекции PrimeVision (ПраймБиоМед, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию анализировали с использованием раствора (DAB-H₂O₂) в PBS в течение 5–10 минут.

Количество клеток, экспрессирующих антиген, оценивали полуколичественно: 0 – нет окрашивания, 1+ – окрашивание < 5% клеток, 2+ – окрашивание 5–25% опухолевых клеток, 3+ – окрашивание 26–50% клеток, 4+ – окрашивание > 50% клеток. Уровень окрашивания оценивали по иммунореактивному показателю (IRS), который рассчитывают путем умножения показателей интенсивности окрашивания на процент положительных клеток. На основании IRS картина окрашивания была определена как: 0 – отрицательная, 1 – слабая (IRS 1–4), 2 – умеренная (IRS 6–9) и 3 – сильная (IRS 12).

Микроописание препаратов проводилось с использованием исследовательского моторизованного микроскопа Axio Imager M2 (Carl Zeiss, Германия) с системой визуализации: цветная цифровая камера – AxioCam 105 (Carl Zeiss, Гер-

мания). Оцифровка гистологических препаратов проводилась с помощью цифрового сканирующего микроскопа Panoramic Desk (3DHISTECH, Венгрия). С использованием технологии Whole slide imaging (WSI, полнослайдовые изображения) [2; 16].

Результаты и их обсуждение. В статье рассматривается два образования кожи – интрадермальный невус с пигментным компонентом (*intradermal naevus cutis*).

Первый пациент – женского пола, в возрасте 37 лет. Локализация образования – на теле (*nHSI*). Код по МКБ D 23.5.

Макроскопически иссеченное образование: темно-серого цвета, округлой формы, неровной поверхности, размер: 0,6 * 0,4 см.

Молекулярно-генетическое исследование выявило мутацию гена *BRAF^{V600E}*.

Микроскопическое описание препарата, окрашенного гематоксилин-эозином (Г-Э) – покровный эпителий – многослойный плоский с большим количеством кератогиалиновых кист. Образование симметрично как в области эпидермального, так и в области дермального компонента (рис. 1). Воспалительного инфильтрата не выявлено (TILs0). Невоидные клетки располагаются в виде диффузного распределения глубоко в дерме и в виде гнезд разного размера и формы в юнкциональной зоне и дерме. Отмечены сливающиеся гнезда. Локализация невоидных клеток отмечена в области расширенных и полнокровных сосудов различного калибра, а также в области придатков кожи. В глубь дермы гнезда небольшого размера. Вокруг гнезд отмечены четко очерченные коллагеновые волокна. Меланомакрофаги отмечены только в юнкциональной зоне и распределены неравномерно. Отмечены признаки созревания уменьшение размера гнезд невоидных клеток и самих невоцитов по направлению от поверхностных отделов образования к глубоким слоям дермы. В пределах эпидермиса гнезд не выявлено, соответственно и педжетоидного распространения. Гнезда лежат плотно друг к другу с минимальным просветом, ориентированных параллельно поверхности эпидермиса. В пределах гнезд признаков дискогезии меланоцитов, то есть дискретное

расположение клеток в пределах ядра в результате потери межклеточной адгезии, не отмечено. Невойдные клетки с ярко розовой цитоплазмой. Ядра полиморфны, разного размера (анизокариоз), ядрышки плохо визуализируются. Форма клеток эпителиоидная и веретеновидная. Степень клеточной атипичности легкая.

Иммуногистохимически отмечено (рис. 2А) не более 5% Ki67- позитивных клеток (1+++), клетки распределены диффузно в юнкциональной зоне, что указывает на низкий пролиферативный потенциал опухоли. Клетки позитивные по melanoma cocktail (рис. 3 А, В) отмечены в интервале от 26–50% (3+++). Отмечено более 50% (рис. 2В) S100-позитивных клеток (4+++).

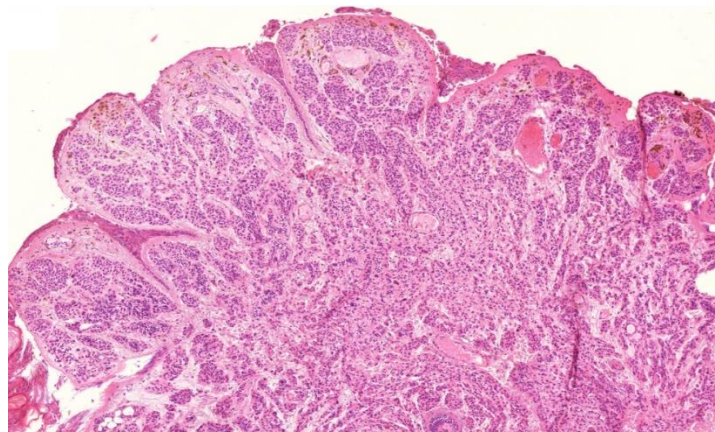
Второй пациент – женского пола, в возрасте 31 года. Локализация образования – на теле (*nHSI*). Код по МКБ D 23.5.

Макроскопически иссеченное образование: темно-серого цвета, округлой формы, неровной поверхности, размер: 0,6 * 0,4 см.

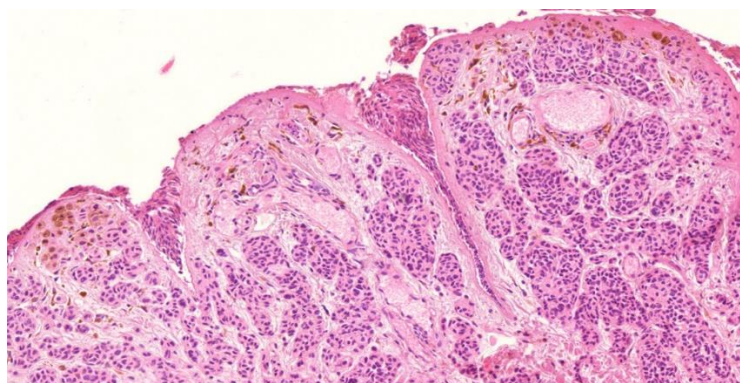
Молекулярно-генетическое исследование выявило мутацию гена *BRAF^{V600E}*.

Микроскопическое описание препарата, окрашенного Г-Э – покровный эпителий – многослойный плоский. Отмечены единичные кератогаилиновые кисты. Образование симметрично как в области эпидермального, так и в области дермального компонента (рис. 4А). Меланомакрофаги дермы распределены неравномерно юнкциональной зоне, а также отмечены меланоциты в области базального слоя эпидермы. Воспалительного инфильтрата не выявлено (TILs0). Невойдные клетки располагаются в виде диффузного распределения глубоко в дерме и в виде гнезд небольшого размера в юнкциональной зоне без созревания. Локализация невоидных клеток глубоко в дерме отмечена в области расширенных и полнокровных сосудов различного калибра, а также в области придатков кожи. Вокруг гнезд отмечены тонкие коллагеновые волокна. В пределах эпидермиса не выявлено педжетоидного распространения меланоцитов. Гнезда лежат плотно друг к другу с минимальным просветом, ориентированных параллельно поверхности эпидермиса. В пределах гнезд признаков дискогезии меланоцитов, то есть дискретное расположение клеток в пределах ядра в результате потери

межклеточной адгезии, не отмечено. Невоидные клетки с ярко розовой цитоплазмой. Ядра полиморфны, разного размера (анизокариоз), ядрышки плохо визуализируются. Форма клеток эпителиоидная и веретеновидная. Степень клеточной атипичности легкая. Иммуногистохимически отмечено (рис. 4В) не более 5% Ki67-позитивных клеток (+2), клетки распределены диффузно в юнкциональной зоне, так и в области базального слоя эпидермы, в одном поле зрения Ki67-позитивные клетки лежат в несколько слоев в области эпидермиса. Что указывает на более высокий пролиферативный потенциал опухоли в сравнении с первым случаем. Клетки позитивные по melanoma cocktail (рис. 5А) отмечены в интервале от 26–50% (3+++), локализируются в юнкциональной зоне. Отмечено более 50% (рис. 5В) S100-позитивных клеток (4+++).



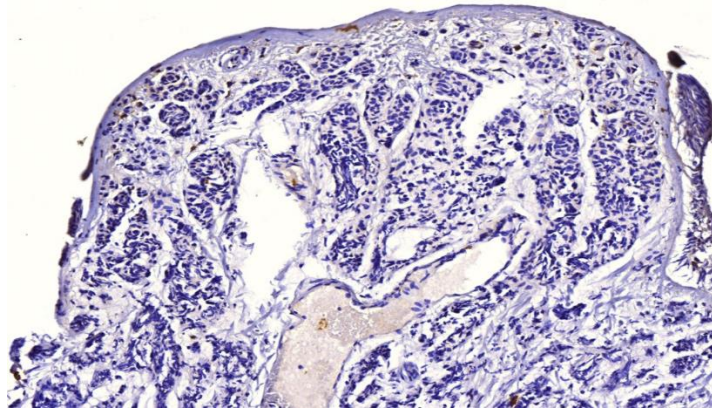
А



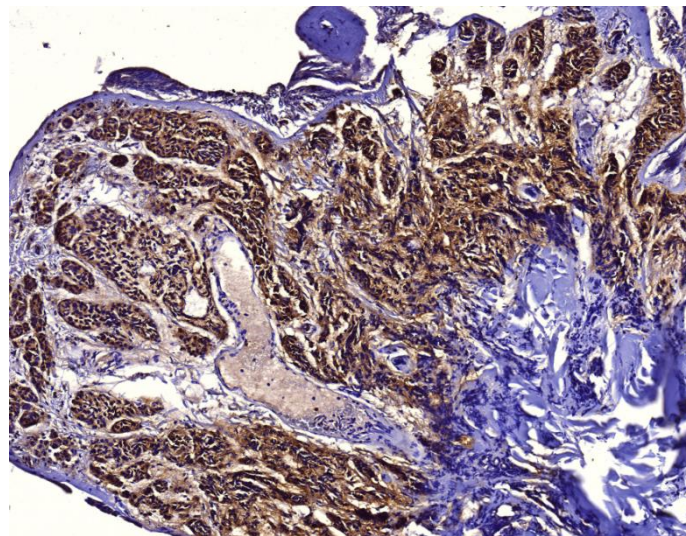
В

Рис. 1. Внутридермальный невус (*intradermal naevus cutis*). Первый случай.

Окраска Г-Э, Ув. (А *20. В *40)



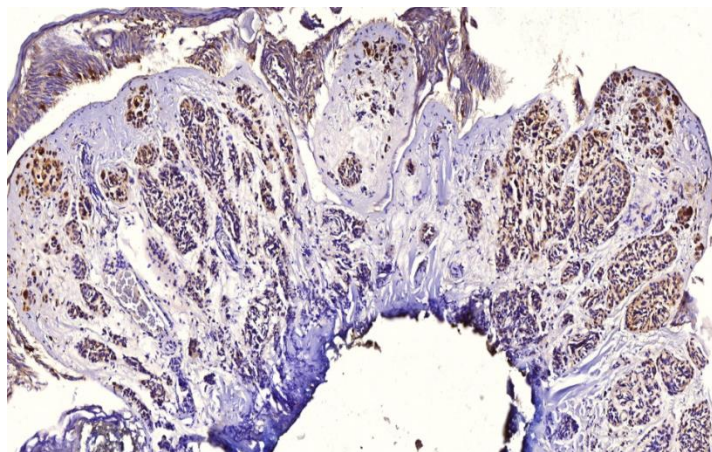
A



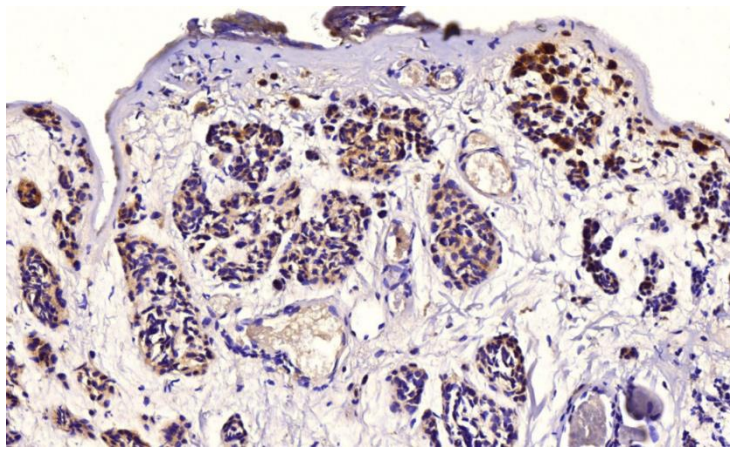
B

Рис. 2. Внутридермальный невус (*intradermal naevus cutis*). Первый случай.

A. Окраска антителами к Ki67. *20. B. Окраска антителами к S100. *20

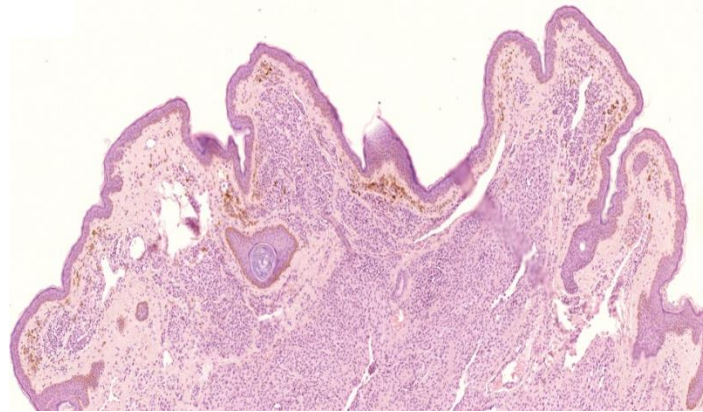


A

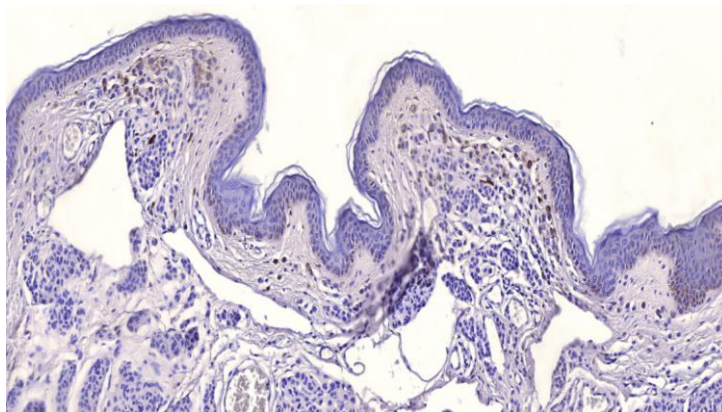


В

Рис. 3. Внутридермальный невус (*intradermal naevus cutis*). Первый случай. Окраска меланома коктейль (HMB-45/ MART-1). А. ок10x20. В. Ок10x40



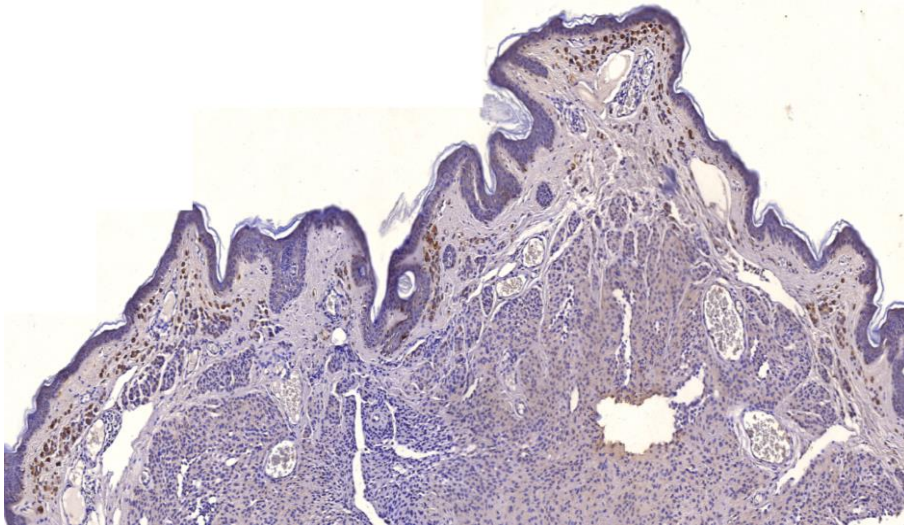
А



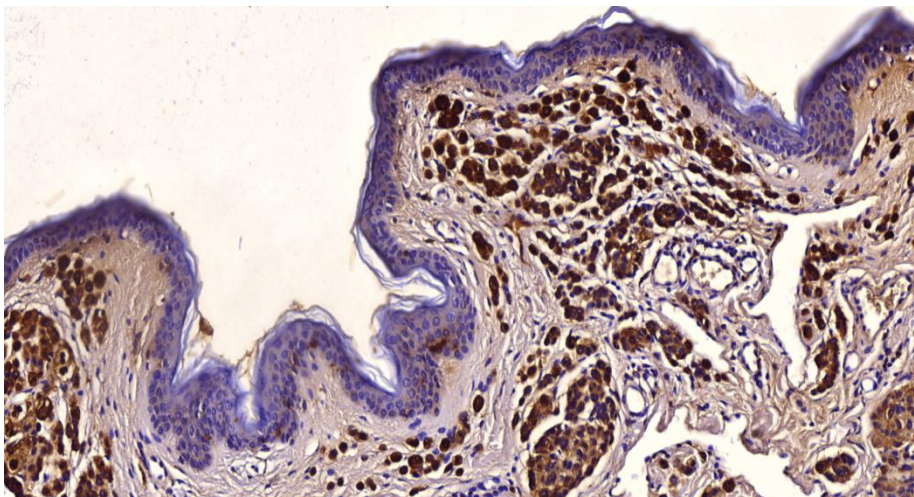
В

Рис. 4. Внутридермальный невус (*intradermal naevus cutis*). Второй случай.

А. Окраска Г-Э, *20. В Окраска антителами к Ki67. *40



А



В

Рис. 5. Внутридермальный невус (*intradermal naevus cutis*). Второй случай.

А. Окраска антителами melanoma cocktail (HMB-45/ MART-1). *20. В.

Окраска антителами к S100. *40

Таким образом в обоих случаях образований пигментный невус отмечена гиперэкспрессия по белку S100 который обладающий высокой чувствительностью (от 97% до 100%), но низкой специфичностью (от 75% до 87%), так как S-100 также является маркером меланоцитов, дендритных клеток, гистиоцитов, лимфоцитов, эпителиальных и миоэпителиальных клеток молочных, слюнных и

потовых желез [5; 18]. Данные по экспрессии белков к HMB-45/ MART-1 одинаков в обоих случаях: экспрессия ограничена эпидермальным и юнкциональным отделами образования. Белок HMB-45 представляет собой цитоплазматический пре-меланосомный маркер, который более специфичен, чем белок S-100, он гораздо менее чувствителен. MART-1 (Melan-A) представляет собой цитоплазматический белок меланосомной дифференцировки, считается, что белок MART-1 может быть специфическим антигеном меланоцитарной дифференцировки для клеточных линий меланомы и, следовательно, более полезными в диагностике патологий этого типа.

Отмечена разная морфологическая характеристика образований в части более выражены гнезда невусных клеток на всю толщу образования с признаками созревания, в отличии от второго образования [6]. В первом случае образование с более низким пролиферативным потенциалом опухоли в сравнении со вторым, согласно данных по окраске антителами к Ki67.

Полученные результаты исследований говорят в пользу концепции более пристального изучения пигментных образований кожи, как образований с неопределенным биологическим потенциалом [21].

Список литературы

1. Аксененко М.Б. Анализ частоты мутаций генов NRAS и с-KIT у больных BRAF-негативной меланомой кожи / М.Б. Аксененко, А.В. Комина, Т.Г. Рукша // Российский журнал кожных и венерических болезней (дерматоонкология). – 2016. – 19 (6). – С. 324–327.
2. Жакота Д.А. Возможности технологии Whole slide imaging в медицинском образовании / Д.А. Жакота, Е.Л. Туманова, Н.С. Корчагина // Медицинское образование и профессиональное развитие. – 2019. – Т. 10. №1. – С. 55–64. – DOI 10.24411/2220-8453-2019-11006. – EDN HKMTQO
3. Cutaneous Melanomas: A Single Center Experience on the Usage of Immunohistochemistry Applied for the Diagnosis (2022) Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(11), 5911.

4. Damsky W., Bosenberg M. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship // *Oncogene*, 36, 5771–5792 (2017). DOI 10.1038/onc.2017.189. EDN YKCYLL
5. Deng Y., Li Z., Zhang L. Clinical and immunohistochemical analysis of the verrucous and non-verrucous divided nevus of the eyelids // *BMC Ophthalmology*, 2022, v. 22, 358. DOI 10.1186/s12886-022-02582-w. EDN STYPQO
6. Frischhut N, Zelger B, Andre F, Zelger BG. The spectrum of melanocytic nevi and their clinical implications. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2022; 20 (4) :483–504.
7. Hannan Enda J., O’Leary Donal P., MacNally Stephen P., et.al. The significance of BRAF V600E mutation status discordance between primary cutaneous melanoma and brain metastases The implications for BRAF inhibitor therapy// *Medicine*, 2017, 96 (48): p e8404.
8. Hutchinson K.E., Johnson D.B., Johnson A.S. [et al.] ERBB activation modulates sensitivity to MEK1/2 inhibition in a subset of driver-negative melanoma // *Oncotarget*, 2015.
9. Ito T., Kaku-Ito Y., Murata M. [et al.] Immunohistochemical BRAF V600E expression and Intratumor BRAF V600E heterogeneity in acral melanoma: implication in melanoma-specific survival // *Clin. Med.*, 2020, 9(3), 690.
10. Ito T., Kaku-Ito Y., Murata M. [et al.] Intra- and Inter-Tumor BRAF heterogeneity in acral melanoma: an immunohistochemical analysis // *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20, 6191.
11. Jiang W., Jia P., Hutchinson K.E. [et al.] Clinically relevant genes and regulatory pathways associated with NRASQ61 mutations in melanoma through an integrative genomics approach // *Oncotarget*. 2015; 6 (4) : 2496–508. DOI 10.18632/oncotarget.2954. EDN UIIRAT
12. Lee K.J., Janda M., Stark M.S. [et al.] On Naevi and Melanomas: Two Sides of the Same Coin? // *Frontiers in Medicine*. – 2021. – 8:635316.
13. Mazurenko N.N. Genetic heterogeneity of melanoma: a new target for the selective exposure // *Malignant tumors (Zlokachestvennyye opukholi)*. 2015, 4 (2): 3–8.

14. McMeniman E.K., Duffy D.L., Jagirdar K. [et al.] The interplay of sun damage and genetic risk in Australian multiple and single primary melanoma cases and controls // *The British journal of dermatology*. – 2019. – 183:357–66.
15. Parwani A.V. *Whole Slide Imaging Current Applications and Future Directions*. 2022. Springer Nature Switzerland AG. 242 p.
16. Pellegrini C., Cardelli L., De Padova M. [et al.] Intra-patient heterogeneity of BRAF and NRAS molecular alterations in primary melanoma and metastases // *Acta Derm Venereol* 2020; 100: adv00040.0/
17. Quilaqueo N., Navarrete F., Sandoval C., Roa I. Immunohistochemical Markers in the Differential Diagnosis of Melanoma and Nevus in Humans // *International Journal of Morphology*, 2021, 39 (5): 1509–1515.
18. Quilaqueo N., Navarrete F., Sandoval C. [et al.] Immunohistochemical markers in the differential diagnosis of melanoma and nevus in humans // *Int. J. Morphol.*, 39 (5): 1509–1515, 2021.
19. Rabbie R., Ferguson P., Molina-Aguilar C. [et al.] Melanoma Subtypes: Genomic Profiles, Prognostic Molecular Markers and Therapeutic Possibilities // *Pathol*, 2019, 247, 539–551.
20. Ricci C., Dika E., Ambrosi F. [et al.] Cutaneous melanomas: a single center experience on the usage of immunohistochemistry applied for the diagnosis// *Int J Mol Sci*. 2022, 25; 23 (11): 5911.
21. Rusu S., Verocq C., Trepant A.L. [et al.] Immunohistochemistry as an accurate tool for the assessment of BRAF V600E and TP53 mutations in primary and metastatic melanoma // *Molecular and clinical oncology* 15: 270, 2021.
22. Shreberk-Hassidim R., Ostrowski S.M., Fisher D.E. The Complex interplay between nevi and melanoma: risk factors and precursors // *Int. J. Mol. Sci*. 2023. 10; 24 (4): 3541.