

UDK: 616.5-006.8-076.5 616-097:57.083

IMUNOHISTOHEMIJSKI PROFIL MALIGNOG MELANOMA

Dr med. Milena Perović, Spec. dr med. Bratislav Vasiljević

Opšta bolnica "Dr Aleksa Savić", Prokuplje

Melanom poseduje širok spektar histoloških osobina kojima imitira epitelijalne, hematološke, neuralne i mezenhimalne tumore. Imunohistohemija predstavlja ultimativni mehanizam za razlikovanje i jasnu diferencijaciju melanoma od ovih tumora kao i za diferencijaciju malignih od benignih melanocitnih lezija. Nešto teži zadatak predstavlja potraga za markerom koji će, pored jasne dijagnoze dati i prognostičke informacije u pogledu preživljavanja, relapsa i drugih kliničkih entiteta vezanih za rast i razvoj ovih neoplazmi. Marker diferencijacije melanocita, faktori proliferacije ćelija, imunomodulacioni markeri, signalni molekuli samo su delić istraživanja koji nam omogućuju kvalitetnije imunohistohemijsko ispitivanje. Uprkos težnji da se nađe idealan marker koji bi se koristio u dijagnozi, diferencijaciji i prognozi najčešće je, pak, kombinovanje više njih u upotpunjivanju imunohistohemijskog profila i mozaika ove bolesti. U velikoj grupi istraženih markera, S100 i dalje ostaje najsenzitivniji pokazatelj melanocitnih lezija, dok tirozinaza, HMB45, MART-1, Melan-A, MITF i mnogi drugi pokazuju zadovoljavajući stepen specifičnosti ali uz nedostatak osetljivosti. Ki67 nam omogućava distinkciju benignih i malignih melanocitnih lezija ali ni jedan ispitivani marker ne može se uzeti kao siguran u prognozi toka bolesti.

Cljučne reči: Melanom, imunohistohemija, marker

IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILE OF MALIGNANT MELANOMA

Melanoma has a wide range of histological features that mimic epithelial, hematological, neural and mesenchymal tumors. Immunohistochemistry is the ultimate mechanism for distinguishing and clearly differentiating melanoma from these tumors as well as for differentiating malignant from benign melanocyte lesions. A somewhat more difficult task is the search for a marker that will, in addition to a clear diagnosis, also provide prognostic information regarding survival, relapse and other clinical entities related to the growth and development of these neoplasms. Melanocyte differentiation markers, cell proliferation factors, immunomodulatory markers, signaling molecules are just a part of the research that enables us to perform better immunohistochemical examination. Despite the tendency to find an ideal marker that would be used in the diagnosis, differentiation and prognosis, it is most common to combine several of them in completing the immunohistochemical profile and mosaic of this disease. In a large group of studied markers, S100 still remains the most sensitive indicator of melanocyte lesions, while tyrosinase, HMB45, MART-1, Melan-A, MITF and many others show a satisfactory degree of specificity but with a lack of sensitivity. Ki67 allows us to differentiate benign and malignant melanocyte lesions, but none of the examined markers can be taken as certain in the prognosis of the course of the disease.

Key words: Melanoma, immunohistochemistry, marker

Uvod

Melanom poseduje veliku moć mimikrije, velikog broja tumora uključujući pre svega limfome, neuroendokrine tumore, loše diferentovane karcinome, sarkome pa i tumore germinativnih ćelija (1). Ćelije melanoma obuhvataju širok spektar od epitelioidnih do *spindle* ćelija a po pitanju citoplazmatske morfologije mogu biti kao *clear cell*, balonirane, rabdoidne (1). U pogledu organizacije i grupisanja ćelija, takođe postoji veliki diverzitet koji uključuje: nodule, gnezda, vitla, trabekule, rozete, žlezdaste i papilarne formacije. Po tipu dalje diferencijacije od njih nastaju fibroblasne, miofibroblastne, rabdoidne, osteoidne, Švanove, kartilaginozne, ganglijske i glatkomišićne strukture i ćelije. Imunohistohe-mijska bojenja su široko rasprostranjena u što boljem i preciznijem diferentovanju melanoma upravo od tumora koje oni imitiraju (1). Zapravo je imunohistohemija glavno oruđe u razlikovanju mimikrije i pravog tumora pomenutih ćelija.

Markeri melanocitne diferencijacije

S100 predstavlja kiseli kalcijum-vezujući protein težine 21kDa čije je prisustvo prvo pronađeno u glialnim ćelijama. Nomenklatura ovog markera potiče od njegove solubilnosti u 100% rastvoru amonijum sulfata (2). Predstavlja često korišćeni marker melanoma a koristi se i za otkrivanje mioepitelioma (2). Kod melanoma, S100 je prisutan i u citoplazmi i u jedru a njegova senzitivnost varira između 97 i 100% (3). S druge strane, potrebno je naglasiti da je njegova specifičnost za melanocite ograničena jer se može naći u mioepitelnim ćelijama, adipocitima, hondrocitima, Langerhansovim ćelijama kao i u svim tumorskim formacijama koje sadrže i ove ćelije (4). Čak i *spindle* ćelije koje se mogu naći u dermalnim ožiljcima mogu ispoljiti S100 (10). Ovo može predstavljati dijagnostičku zamku u evaluaciji ponovnih ekscizija melanoma sa posebnim oprezom kod dezmozoplastičnih melanoma. Specifičnost ovog markera varira između 75 i 87 procenata (11). Ipak, u kombinaciji sa specifičnijim markerima se može koristiti u uspešnoj diferencijaciji melanoma od drugih lezija koje ispoljavaju S100.

HMB45 je citoplazmatski premelanozomalni glikoprotein (gp100) visoke specifičnosti za melanom (8). Njegova senzitivnost nije na nivou S100 markera ali je potentniji u pogledu specifičnosti (3). U melanocitnim lezijama HMB45 se ispoljava u citoplazmi (6). Senzitivnost je na nivou od 69 do 93% dok je maksimalna ekspresija u primarnim uzorcima melanoma a manja u metastazama gde varira od 58 do 83% (11). Postoji rasprava o tome da li je ovaj marker manje

senzitivan za amelanotične melanome (5). *Wick et al.* su utvrdili njegovu visoku specifičnost za melanom ali i njegovo odsustvo kod nemelanocitnih tumora (11). Ipak utvrđeno je njegova ekspresija kod angiomiolipoma, *clear cell* sarkoma tetiva i aponeuroza, nekih ovarijalnih tumora, karcinoma dojki, kao i kod karcinoma bubrega sa specifičnom genetskom translokacijom (8). S druge strane, ovi tumori su morfološki veoma različiti od melanoma te je i pored ekspresije ovog markera njih lako diferentovati. Kao i kod prethodno opisanog markera S100, tako se i HMB45 veoma često koristi u diferencijaciji zajedno sa ispitivanjem drugih markera.

Melanoma antigen prepoznat od strane T ćelija-1 (**MART-1**) i **Melan A** predstavljaju isti naziv za citoplazmatski protein melanozomalne diferencijacije prepoznat od strane T ćelija (3). Postoje dva klona ovog antitela I to: **M2-7C10** koji se najčešće označava kao MART1 I **A103** koji se označava kao Melan-a. Iako postoji skoro 100% korelacije između ova dva klona u imunohisto-hemijskoj determinaciji melanoma treba napomenuti da A103 takođe markira i adrenalne kortikalne tumore kao i gonadalne steroidne neoplazme, dok se pomenuti M2-7C10 ne može naći u njima (7).

Ovi markeri imaju 75-92% senzitivnosti dok im je specifičnost za melanom 95-100%. Rezultatima se mogu poistovetiti sa prethodno opisanim HMB45 (16). Slično im je bojenje i u primarnim i sekundarnim melanomima u smislu opadanja ekspresije od primarnog tumora ka metastatskim lezijama. S druge strane ova antitela pokazuju jasnije bojenje u dermalnim komponentama melanoma te se njima lakše mogu diferentovati metastatski melanomi (8).

Tirozinaza predstavlja enzim koji hidrolizuje tirozin u prvom koraku sinteze melanina (3). Kod melanoma, tirozinaza se može detektovati kao jasno bojeno fino granulirano područje citoplazme (14). Pozitivno bojenje je jako i difuzno kroz citoplazmu. Senzitivnost tirozinaze je nešto iznad HMB45 I iznosi 84 do 94% (14). Senzitivnost opada napredovanjem kliničkog stadijuma i naravno u metastatskim lezijama. S druge strane, specifičnost tirozinaze je 97-100% (6). Ona se takođe može retko naći u pojedinim angiomiolipomima i *clear cell* sarkomima ometača tetiva (14).

Transkripcioni faktor specifičan za mikroftalmiju (MITF) predstavlja transkripcioni protein potreban za razvoj melanocita za vreme enbriogeneze (3). Boji se u jedru i zato se lakše može interpretirati obzirom da se veliki broj imunohistohe-mijskih markera boje u citoplazmi i povremeno ih je teško identifikovati obzirom na postojanje pigmenta citoplazme (3). Senzitivnost za melanom je od 81 do 100% a karakteristično

je njegovo prisustvo u S100 negativnim melanomima. S druge strane, specifičnost koja je na početku izveštavana u maksimalnom procentu od 100%, u novijim studijama je pala na 88% pa čak i niže za *spindle cell* neoplazme. Lažno pozitivni rezultati se mogu javiti u raznim neoplazmama uključujući limfoidne tumore, neke tumore dojke i tumore bubrežnih ćelija. Karakteristika mu je da je kao i ostali melanocitni markeri pozitivan u angiomiolipomima. Težinu u interpretaciji uvećava mogućnost da MITF bojenje može biti pronađeno u histiocitima, limfocitima, *Schwannovim* ćelijama i glatko mišićnim ćelijama. Zbog toga, njegovo prisustvo u jedru nam koristi u kombinaciji sa drugim markerima.

NKI C3 predstavlja antitelo na 25-110 kDa glikoprotein lociran na unutrašnjoj membrani citoplazmatskih vezikula u melanocitima. Ovo imunohistohemijsko bojenje se najviše koristilo 80ih godina prošlog veka, dok je sada manje popularno usled prisustva praktičnijih reagenasa (14). Njegova senzitivnost od 86-100% iako veoma impozantna nije dovoljna da nadomesti slabu specifičnost usled ekspresije u mnogim neoplastičnim procesima: medularnih karcinoma tiroidee, tumora dojke, prostate, *clear cell*, kolorektalnih i ovarijalnih karcinoma kao i limfoma (16). Takođe, boji histiocite, dendritične ćelije, mastocite, ćelije pankreasa i prostate. Slaba specifičnost i visoka cena su ga udaljile od kliničke prakse.

Noviji marker

Multipli mijelom-1 (MUM-1) predstavlja protein bitan u regulaciji genske ekspresije citokinskog odgovora (16). Njegova potentnost se posebno ogleda u dijagnozi melanoma kada su kao patologija isključene limfoidne i lezije plazma ćelija. *Sundram* je otkrio pozitivno nuklearno bojenje kod 33 od 36 melanoma a od 944 ispitivanih neoplazmi samo su se melanomi i hematološke lezije pozitivno bojili (16).

Melanokortin-1 je receptor alfa melanocitnog stimulišućeg hormona prisutnog na melanocitima i pojedinim keratocitima i monocitima. *Salazar* je prikazao 100% specifičnosti na 26 od 26 melanoma u svojoj studiji. Ipak njegova ekspresija, iako slabija pronađena je kod cerebelarnih neurona, hepatocita, renalnih tubula kao i kod ćelija medule nadbubrega, mukoze apendiksa, u miokardu i miometriju (16).

SM5-1 predstavlja mononuklearno antitelo razvijeno od miševa imuniziranih melanomskom ćelijskom linijom SMMU. *Trefzer* je prikazao pozitivnu interakciju sa 98% od ukupno 401 testiranih melanoma i negativnu reakciju na 84 nemelanomske lezije. Ipak, postoji i pozitivno bojenje na dendritične ćelije, miofibroblaste,

ćelije bubrežnih tubula, plazma ćelije, sekretorni epitel tiroidee, larinksa i prostate.¹²

TRP-1 i TRP-2 predstavljaju nešto novija antitela na tirozinazu i njihova ekspresija u melanomima se istražuje.

Markeri tumorske proliferacije

Ispitivanje tumorske proliferacije u genezi melanoma, danas predstavlja pozeban izazov. U kliničkoj praksi su veoma važni: diferencijacija benignih nevusa od malignih melanoma kao i klinička prognoza pacijenata sa malignim melanomom (16).

Najčešće korišćeni marker proliferacije je Ki-67, nuklearni antigen. Njegovo prisustvo kod benignih nevusa je manje od 5%. Pozitivno bojenje kod malignih melanoma prisutno je od 13-30% dok kod nekih individualnih slučajeva čak i do 100%. Kao prognostički marker, dao je mešovita iskustva. Neke studije pokazuju pozitivnu korelaciju sa povećanim metastatskim potencijalom i mortalitetom samo kod "debelih" melanoma (17). Mnoge studije su, pak, pokazale vezu između stepena recidiva i povećane ekspresije Ki-67. S druge strane, postoje studije koje opovrgavaju vezu između Breslow indeksa i intenziteta bojenja Ki-67.

Nuklearni proliferativni ćelijski antigen (PCNA) je kofaktor DNK polimeraze. Postoji povećana ekspresija ovog markera u malignim melanomima u odnosu na benigne nevuse. *Niezabitowski et al.* su pokazali da on predstavlja nezavistan faktor prognoze povećanog mortaliteta i smanjenog preživljavanja bez bolesti (17).

Ciklini

Predstavljaju proteine koji se sastoje od približno 100 aminokiselina. Oni vezuju i aktiviraju ciklin zavisne kinaze prouzrokujući ćelijsku progresiju kroz različite faze njenog ciklusa. Ciklin A je retko ispoljen kod benignih nevusa ali je njegovo prisustvo uočeno u 42-99% melanoma. U pogledu *disease free* preživljavanja postoji reciprocitet u korelaciji ekspresije ciklina A i *disease free* preživljavanja kod superficijalnih ali ne i nodularnih melanoma (18). Ciklin B se takođe veoma retko ispoljava kod benignih nevusa dok se kod melanoma može naći u više od polovine (50%). Prognostički potencijal ciklina B je za sada još uvek u istraživanju. Ciklini D1 i D3 su retki kod benignih nevusa a često ispoljavani kod melanoma. Ciklin D1 nema prognostički značaj dok D3 ekspresija predviđa rani relaps bolesti i skraćeno preživljavanje kod superficijalnih melanoma ali ne i nodularnih melanoma. Ciklin E ima inverznu korelaciju u ekspresiji i preživljavanju (18).

Ki-67 predstavlja najpotentniji (po broju podataka) marker u diferencijaciji benignih ne-

vusa i melanoma. Ono što je bitno napomenuti da ni jedan marker ponaosob nema dovoljno "moći" u samostalnom odlučivanju toka bolesti u smislu prognoze, kliničkog toka i smjera kretanja ćelijske proliferacije.

Imunomodulatorni marker

Sve je više interesovanja u imunohisto- loškim istraživanjima ovih markera. Studije HLA Class I i Class II markera su pokazale visoku ekspresiju bojenja u melanomima u odnosu na nevuse dok je mali broj studija pokazao pove- zanost smanjene ekspresije ovih markera kod melanoma sa smanjenim preživljavanjem (19). Paradoksalno, *Erricsson* erikson prikazuje da horoidalni melanomi sa smanjenom ekspresijom HLA klase I i II imaju veće preživljavanje. CD40, CD26 takođe pokazuju moć diferencijacije benignih nevusa i melanoma ali bez značaja u

prognozi. FAS I FAS-ligand nisu uspjeli da se nametnu kao pouzdani u prognozi. Čak i Kancer- testis antigeni imaju svoj stepen specifičnosti kada se koriste kombinovano međutim bez signi- fikantne prognostičke moći.

Zaključak

Najčešće korišćeni markeri u današnjij kliničkoj praksi su diferentujuć. Najčešće uspe- šan u dijagnostici je i najsenzitivniji S100 uz neki od uskospecifičnih kao što su Melan-a, tirozinaza ili HMB45. *Spindle cell* melanoma i dezmo- plastične lezije se boje samo sa S100. Ki-67 se najčešće koristi u diferencijaciji benignih nevusa i melanoma. Potrebno je naglasiti I njegovu pomoć u prognozi.

Imunoregulatorni, proliferativni ili signalni markeri nisu pokazali svoju dijagnostičku ili pak prognostičku vrednost.

Literatura

1. Banerjee SS, Harris M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology* 2000; 36: 387.
2. Schmitt FC, Bacchi CE. S-100 protein: is it useful as a tumour marker in diagnostic immunocytochemistry? *Histopathology* 1989; 15:281.
3. Dabbs DJ. *Diagnostic immunohistochemistry*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2002.
4. Cochran AJ, Wen DR. S-100 protein as a marker for melanocytic and other tumours. *Pathology* 1985;17:340.
5. Sujatha SEF, Johnson S, Bate J. Immunohistochemical analysis of cutaneous malignant melanoma: comparison of S-100 protein, HMB-45 monoclonal antibody and NKI/C3 monoclonal antibody. *Pathology* 1994;26:16.
6. Bishop PW, Menasce LP, Yates AJ, Win NA, Banerjee SS. An immunophenotypic survey of malignant melanomas. *Histopathology* 1993; 23:159.
7. Kaufmann O, Koch S, Burghardt J, Audring H, Dietel M. Tyrosinase, Melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. *Mod Pathol* 1998;11:740.
8. McKee PH, Calonje E, Granter SR. *Pathology of the skin with clinical correlations*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005.
9. Frisman DM. *Immunohistochemistry Literature Database Query System*. <http://www.immunoquery.com>, July15,2005.
10. Chorny JA, Barr RJ. S100-positive spindle cells in scars: a diagnostic pitfall in the re-excision of desmoplastic melanoma. *Am J Dermatopathol* 2002;24:309.
11. Ordonez NG, Xiaolong J, Hickey RC. Comparison of HMB-45 monoclonal antibody and S-100 protein in the immunohistochemical diagnosis of melanoma. *Am J Clin Pathol* 1988; 90:385.
12. Trefzer U, Rietz N, Chen Y, et al. SM5-1: a new monoclonal antibody which is highly sensitive and specific for melanocytic lesions. *Arch Dermatol Res* 2000;292:583.
13. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol* 1988;15:201.
14. Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labeling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J* 2000;32:475.
15. Clarkson KS, Sturdgess IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanoma. *Histochem J* 2000;32:475.
16. de Wit NJW, van Muijen GNP, Ruiter DJ. Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions. *Histopathology* 2004;44:517.
17. Kanik AB, Yaar M, Bhawan J. p75 nerve growth factor receptor staining helps identify desmoplastic and neurotropic melanoma. *J Cutan Pathol* 1996;23:205.
18. Florenes VA, Maelandsmo GM, Faye R, Nesland JM, Holm R. Cyclin A expression in superficial spreading malignant melanomas correlates with clinical outcome. *J Pathol* 2001; 195:530.
19. Kageshita T, Hirai S, Ono T, Hicklin DJ, Ferrone S. Downregulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am J Pathol* 1999;154:745.