

Využití fluorescenční in situ hybridizace v diagnostice melanocytárních lézí

Jana Dvořáčková^{1,2,3}, Jana Žmolíková^{1,2}, Jan Mužík⁴, Magdalena Uvírová^{1,2}

¹Lékařská fakulta Ostravské univerzity v Ostravě

²CGB laboratoř a.s., Ostrava

³Ústav patologie FN Ostrava

⁴Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno

Melanocytární léze vykazují značnou morfologickou heterogenitu. Jejich diagnostika je náročná i přes současné využití moderních histopatologických a imunohistochemických metod. Významným přínosem v diagnostice melanocytárních lézí je zavedení molekulárně genetické metody fluorescenční in situ hybridizace s použitím čtyřbarevné sondy značící geny *CCND1*, *RREB1*, *MYB* a centromeru chromozomu 6. V letech 2008–2012 bylo v naší laboratoři úspěšně metodou fluorescenční in situ hybridizace vyšetřeno 160 vzorků různých typů melanocytárních lézí, 44 névů a 116 melanomů. Změny asociované s diagnózou melanomu byly prokázány u 116 vzorků (72,5 %), normální nález u 41 vzorků (25,6 %), ve dvou případech bylo rozhodnutí na hranici hodnotitelnosti metody (1,2 %) a v jednom případě se jednalo o vyšetření recidivy melanomu v jizvě, který byl svým nálezem atypický (monozomie chromozomu 6) (0,6 %). Na základě dosažených výsledků byla stanovena senzitivita metody 96,6 % a specifita metody 91 %. Tyto výsledky ukazují, že fluorescenční in situ hybridizace je vhodnou metodou pro zajištění přesné a rychlé diagnostiky nejednoznačných melanocytárních lézí. Právě rychlost a správnost diagnózy je u vysoce maligních melanomů zásadní a má neoddiskutovatelný vliv na prognózu a úspěšnost léčby pacienta.

Klíčová slova: melanom, névus, fluorescenční in situ hybridizace, FISH, gen.

Fluorescence in situ hybridization in diagnostics melanocytic lesions

Melanocytic lesions exhibit significant morphological heterogeneity, making their diagnosis difficult, although both sophisticated histopathological and immunohistochemical methods are used. The introduction of molecular genetic method fluorescence in situ hybridization (FISH) has contributed significantly to the diagnosing of melanocytic lesions. Between 2008 and 2012, we studied a total of 160 samples of different types of melanocytic lesions, including 44 nevi and 116 melanomas, using a four-color probe mix for *CCND1*, *RREB1* and *MYB* genes and for the centromere of chromosome 6. A positive result was found in 116 melanoma samples (72.5 %) and a negative result in 41 samples (25.6 %). A borderline value was found in two samples (1.2 %), and an atypical finding (monosomy of chromosome 6) was seen in a melanoma recurrence in one case (0.6 %). Sensitivity and specificity were 96.6 % and 91 %, respectively. These results show that FISH is a suitable and relatively low-cost method for accurate, rapid diagnosis of ambiguous melanocytic lesions. The speed and accuracy of diagnosis of highly malignant melanomas are crucial and have great impact on the prognosis and success of a patient's treatment.

Key words: melanoma, naevus, fluorescence in situ hybridization, FISH, gene.

Onkologie 2013; 7 (2): 74–77

Úvod

Maligní melanom je jedním z nejagresivnějších a v současné době velice intenzivně studovaných nádorových onemocnění. Jeho výskyt celosvětově roste každým rokem o více než 4 % a často postihuje i pacienty mladšího a středního věku (1–2). Určení biologické povahy melanocytárních lézí je jednou ze základních podmínek správné léčby. I když mnoho případů může být spolehlivě klasifikováno podle současných histopatologických kritérií, existuje určitá skupina případů, kdy nedochází ke shodě ani mezi experty. Stanovit diagnózu plně vyvinutého melanomu není pro zkušeného patologa obvykle obtížné. Přesto je podle řady literárních zdrojů diagnóza melanomu stanovena správně pouze v 75–80 % případů (3). Rozdíly mezi benig-

ními a maligními melanocytárními lézemi nejsou v některých případech jednoznačné a histopatologická diagnóza je tak problematická i pro zkušené dermatopatolog. Mezi takové léze patří například névus Spitzové, jehož odlišení od spitzové melanomu může být velmi obtížné (4–5).

Studium biologické povahy různých typů melanocytárních lézí s využitím molekulárně genetických analýz, převážně metodami komparativní genomové hybridizace (CGH) a fluorescenční in situ hybridizace (FISH), prokázalo u melanomů řadu klonálních chromozomových aberací, jako jsou delece a amplifikace specifických lokusů chromozomů. Zde jsou nejčastěji lokalizovány geny kódující proteiny důležité v procesu regulace buněčného cyklu. Identifikovány byly ztráty v chromozomových oblastech 6q, 8p, 9p

a 10p a zmnožení v oblastech 1q, 6p, 7, 8q, 17q a 20q (6). U benigních névů nebyly zjištěny žádné chromozomové změny s jedinou výjimkou – zmnožení oblasti 11p u névů Spitzové, tento nález však nebyl pozorován u melanomů (7–10).

Na základě těchto studií byla vyvinuta sonda pro fluorescenční hybridizaci in situ, která identifikuje změny v počtu kopií onkogenu *CCND1* (onkogen – cyklin D1 dependentní kináza) a transkripčních faktorů *RREB1* (Ras responsive element binding protein), *MYB* (v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog) a dále počet centromer chromozomu 6. Kombinací těchto diagnostických markerů bylo firmou Abbott ve studii přijatelnosti metody dosaženo největší možné specifity (92 %) a senzitivity (94 %) této sondy pro diagnostiku melanomu.

Tabulka 1. Charakteristika souboru podle pohlaví a věku

Pohlaví	N	%
muž	85	53 %
žena	75	47 %
celkem	160	
Věk při diagnóze		
průměr	52,2	
medián	54,5	
minimum - maximum	3–92	

Tabulka 2. Základní charakteristika souboru podle typu melanocytární léze

Benigní melanocytární léze	N = 44
dysplastický névus	N = 15
dermoepidermální névus	N = 7
névus Spitzové	N = 7
intradermální névus	N = 5
névus modrý benigní	N = 4
névus epiteloidně větvenovitý	N = 3
junkční névus	N = 2
lentigo maligna	N = 1
Melanomy	N = 116
nodulární melanom	N = 46
povrchově se šířící melanom	N = 41
melanoma in situ	N = 9
povrchově se šířící melanom s vertikalizací	N = 8
akrolentiginózní melanom	N = 3
Spitzové melanom	N = 3
animal-type melanom	N = 2
lentigo maligna melanoma	N = 2
metastatický melanom	N = 2

Soubor nemocných

Retrospektivně bylo vyšetřeno 160 pacientů s melanocytárními lézemi nejisté biologické povahy, kteří byli diagnostikováni v letech 2008–2012 v CGB laboratoři a.s. a v Ústavu patologie Fakultní nemocnice Ostrava a Lékařské fakulty Ostravské univerzity. Muži tvořili 53 % a ženy 47 % souboru, střední věk je 54 let (tabulka 1).

K molekulárně genetickému vyšetření byly vybrány melanocytární léze s nejednoznačným histologickým nálezem nebo s nejistou biologickou povahou. Spektrum diagnóz shrnuje tabulka 2. Rozdělení na maligní a benigní léze bylo provedeno podle kódu biologického chování MKN-O-3 klasifikace, melanoma in situ byl vzhledem ke svému malignímu potenciálu zařazen mezi maligní nádory.

Použité metody

Fixace

Doba mezi odběrem a vložením do fixačního činidla by měla být co nejkratší, nejlépe méně

než 1 hodina. Fixace v 4% formaldehydu (pH 6,9) nesmí přesáhnout 48 hodin (nejlépe 6–24 hod). Pokud nejsou dodrženy podmínky správné fixace, může dojít k poškození DNA a FISH analýzu pak není možno provést, materiál nehybridizuje.

FISH na parafínových řezech

Z tkání zalitých v parafínu byly zhotoveny 4 µm tenké řezy, které byly deparafinizovány oplachem v řadě roztoků při laboratorní teplotě: xylen 3 × 10 min, 96 % etanol 2 × 5 min, 0,2N HCl 1 × 20 min a na závěr inkubace při 82 °C 35 min v 1M NaSCN. Mezi jednotlivými kroky byly preparáty oplachovány pufrém 2 × SSC (LK-104B, Kretech) laboratorní teploty. Následně proběhla digesce v pepsinu (Pepsin Solution LK-101B, Kretech) při 37 °C, 15–30 min dle velikosti řezu. Působení pepsinu bylo zastaveno oplachem v roztoku 2 × SSC laboratorní teploty po dobu 5 min. Na takto připravené preparáty byla nanesena sonda Vysis LSI *RREB1*/LSI *MYB*/LSI *CCND1*/CEP6 Probes (Abbott Molecular Inc.), která je přímo značená a připravena k použití. V zařízení ThermoBrite proběhla denaturace při 85 °C po dobu 2 min a následovala hybridizace při 37 °C přes noc. Po odmytí nadbytečné sondy byly detekovány a následně vyhodnoceny chromozomové abnormality v oblasti 11q13 (*CCND1*) značené Spectrum Green, 6p25 (*RREB1*) značené Spectrum Red, 6q23 (*MYB*) značené Spectrum Gold a centromery chromozomu 6 značené Spectrum Aqua. Pro lokalizaci nádorových buněk byl před hodnocením metodou FISH použit preparát barvený hematoxylin-eosinem. Hodnoceno bylo celkem třicet nepřekrývajících se jader ze tří oblastí nádorové tkáně mikroskopem Olympus BX 51.

Hodnocení FISH preparátů

Jako pozitivní na melanom byly vyhodnoceny preparáty přesně podle pokynů výrobce, pokud:

- průměrný počet signálů pro gen *CCND1* na jádro nebo průměrný počet signálů pro gen *MYB* na jádro byl $\geq 2,5$ nebo,
- delece *MYB* byla ≥ 31 % nebo,
- % abnormálních jader pro gen *RREB1* bylo ≥ 63 %.

Tyto změny mohou být pozorovány každá samostatně, častěji však byla zjištěna změna dvou či všech tří genů. Jako negativní na melanom byly označeny léze nesplňující ani jednu z výše uvedených podmínek.

Preparáty byly hodnoceny mikroskopem Olympus BX51 při 1 250 × zvětšení, obraz byl digitalizován pomocí software Lucia Cytogenetics 2 1998–2012 Laboratory Imaging.

Hodnocení senzitivity

Senzitivita byla stanovena jako procento jednoznačných melanomů vyhodnocených metodou FISH jako pozitivní na melanom, dělená počtem všech jednoznačných melanomů včetně FISH negativních z uvedeného souboru.

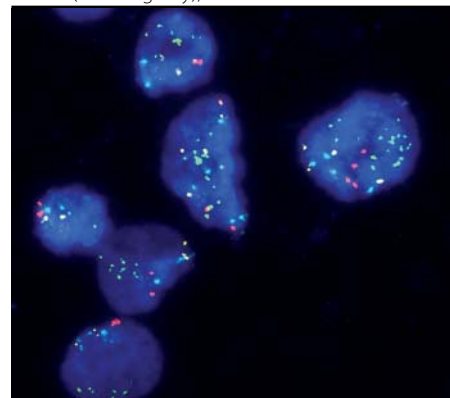
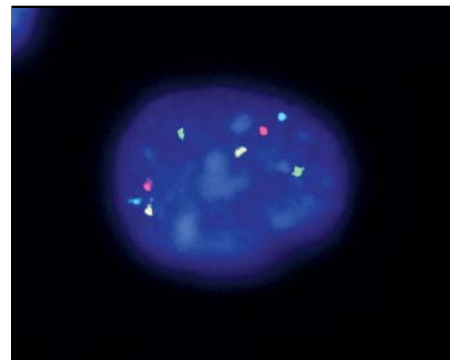
Hodnocení specifity

Specifita byla stanovena ze skupiny benigních névů, které FISH metodou byly určeny jako negativní na melanom, dělená počtem všech benigních névů včetně FISH pozitivních na melanom z uvedeného souboru.

Výsledky

Pozitivní nález na melanom byl metodou FISH prokázán u 116 vzorků (72,5 %) (obrázek 1), negativní nález na melanom u 41 (25,6 %) vzorků (obrázek 2). Na základě dosažených výsledků byla stanovena senzitivita metody 96,6 % a specifita 91 %.

Ve třech případech (1,8 %) nebylo možné jednoznačně rozhodnout, zda je nález pozitivní nebo negativní na melanom (tabulka 3). Podle výrobce má být hodnoceno 30 buněk ze tří oblastí nádoru, v těchto netypických případech však byly nádorové buňky rozmístěny soliterně v celé lézi a pokud byl striktně dodržen postup doporučený výrobcem, byl nález nega-

Obrázek 1. Nález pozitivní na melanom – amplifikace *CCND1* (zelené signály), *RREB1* (červené signály) a *MYB* (žluté signály), zvětšeno 1 250 ×**Obrázek 2.** Nález negativní na melanom – *CCND1* (zelené signály), *RREB1* (červené signály), *MYB* (žluté signály), centromery chromozomu 6 (modré signály), zvětšeno 1 250 ×

Tabulka 3. Výsledky metodou FISH – celkové shrnutí

	benigní	maligní	celkem
	N = 44	N = 116	N = 160
negativní na melanom	40 (91 %)	1 (0,8 %)	41 (25,6 %)
pozitivní na melanom	4 (9 %)	112 (96,6 %)	116 (72,5 %)
hraniční nález, atypický nález		3 (2,6 %)	3 (1,9 %)

Tabulka 4. Výsledky metodou FISH – celkové shrnutí

		Změny genů: CCND1, RREB1, MYB			
		průměr	medián	min	max
melanomy	N = 116	2,0	2,0	0	3
nodulární melanom	N = 46	2,0	2,0	0	3
povrchově se šířící melanom	N = 41	2,0	2,0	1	3
melanoma in situ	N = 9	1,3	1,0	0	3
povrchově se šířící melanom s vertikalizací	N = 8	2,6	3,0	1	3
akrolentiginózní melanom	N = 3	3,0	3,0	3	3
Spitzové melanom	N = 3	2,7	3,0	2	3
animal-type melanom	N = 2	0,0	0,0	0	0
lentigo maligna melanoma	N = 2	2,5	2,5	2	3
metastatický melanom	N = 2	2,0	2,0	1	3

p = 0,008; (Kruskal Wallis Test)

Tabulka 5. Nálezy

Změny genů	N = 116
CCND1+ RREB1+ MYB	45 (38,8 %)
CCND1	19 (16,4 %)
CCND1+ MYB	12 (10,3 %)
RREB1+ MYB	10 (8,6 %)
RREB1	9 (7,8 %)
MYB	8 (6,9 %)
žádná změna	4 (3,4 %)

ktivní na melanom. Pokud však byly hodnoceny přednostně buňky vykazující změny v počtu sledovaných chromozomů, byl nález pozitivní na melanom. Tyto léze byly tedy popsány jako hraniční a indikující lékaři byli vyrozuměni o možném maligním potenciálu těchto lézí. V jednom případě (0,6 %) se jednalo o vyšetření recidivy melanomu v jizvě, který byl svým nálezem atypický a nebylo možno jej zařadit ani jako pozitivní ani negativní na melanom (monozomie chromozomu 6 – byl pozorován jeden signál pro geny *RREB1*, *MYB* i centromeru chromozomu 6).

U pacientů s melanomy byly ve 40 % nalezeny změny všech tří sledovaných genů, ve 29 % změny dvou genů a ve 28 % jedna změna. V počtu těchto změn je mezi jednotlivými typy maligních melanomů statisticky významný rozdíl ($p = 0,025$). Z tabulky 4 je patrné, že největší průměrný počet změn byl zjištěn u akrolentiginózních melanomů (3,0), Spitzové melanomů (2,7) a povrchově se šířících melanomů s vertikalizací (2,6).

Nejčastější změnou byla amplifikace všech tří genů, následovala amplifikace samotného genu *CCND1* a dále amplifikace genu *CCND1* spolu s delecí nebo amplifikací genu *MYB*. Nálezy jsou shrnuty v tabulce 5.

Diskuze

V případě diagnostiky nejednoznačných melanocytárních lézí je FISH efektivní metoda s vysokou specifikou a senzitivitou, kdy je možné v krátké době díky mezooborové spolupráci lékařů praktických či kožních, patologů a molekulárních cytogenetiků včas zajistit přesnou diagnostiku a pacientům následně adekvátní péči.

V literatuře je uváděn různý stupeň senzitivity sondy Vysis LSI *RREB1*/LSI *MYB*/LSI *CCND1*/CEP6 Probes (Abbott Molecular Inc) – někteří autoři uvádí senzitivitu dokonce významně nižší, než uvádí výrobce (nejmenší hodnota 68 %) (11), přičemž specifita je srovnatelná. Tyto rozdíly mohou být způsobeny jednak velikostí hodnocených souborů, jednak způsobem odečítání preparátů FISH. Například při použití automatické analýzy obrazu byla hodnota senzitivity nižší (12). V našem testovaném souboru byla prokázána senzitivita naopak vyšší, než uvádí výrobce (96,6 %/92 %), specifita byla o něco nižší (91 %/94 %).

Z výsledků vyplývá, že nejmenší počet změn sledovaných lokusů je možné pozorovat u melanoma in situ (v průměru numerická změna jednoho sledovaného genu), největší průměrný počet změn byl zjištěn u akrolentiginózních me-

lanomů (3,0), Spitzové melanomů (2,7) a povrchově se šířících melanomů s vertikalizací (2,6). Kumulace genetických změn by tedy mohla svědčit pro progresi onemocnění a odpovídá vysokému malignímu potenciálu těchto lézí.

Nález pozitivní na melanom byl v našem souboru pozorován také u tří dysplastických névů a névu modrého benigního. Stejně výsledky jsou popisovány až u 10 % různých typů benigních névů s atypii, které jsou pak řazeny do skupiny névů s nejistou biologickou povahou (13–14). V těchto případech je vhodné zvážit reexcizi se širokým lemem a zařazení pacientů do skupiny s intenzivnějším sledováním, aby bylo možné včas zachytit případný maligní zvrat.

Přestože byly některé léze označeny jako hraniční a nebylo možné je metodou FISH jednoznačně určit jako pozitivní nebo negativní, přinesla tato metoda informaci o jejich možném maligním potenciálu. I tito pacienti by měli být zařazení do skupiny s častějším sledováním.

Závěr

Molekulárně cytogenetické metody spojují přednosti cytogenetického a molekulárně genetického vyšetření. Přestože zlatým standardem při vyšetření melanocytárních lézí zůstává histopatologická analýza včetně imunohistochemických vyšetření, moderní molekulárně cytogenetická vyšetření hrají stále důležitější roli v diagnostice kožních pigmentových lézí. Rychlost a správnost diagnostiky je u vysoce maligních melanomů esenciální a má neoddiskutovatelný vliv na prognózu a úspěšnost léčby pacienta. V případě histologicky diagnostikovaných benigních névů s FISH pozitivním nálezem na melanom je možné vytipovat vysoce rizikové léze s nejistou biologickou povahou a dispenzarizací takových pacientů zajistit časný záchyt případného maligního zvratu původně benigní léze.

Literatura

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2008; 58: 71–96.
2. American Cancer Society. A Cancer Journal for Clinicians, Global Cancer Statistic 02. Atlanta: American Cancer Society 2006.
3. Veenhuizen KCW, De Wit PEJD, Mooi WJ, Scheffer E, Verbeek ALM, Ruiter DJ. Quality assessment by expert opinion in melanoma pathology: experience of the Pathology Panel of the Dutch Melanoma Working Party, The Journal of Pathology 1997; 182: 266–272.
4. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying Melanocytic Tumours Based on DNA Copy Number Changes. The American Journal of Pathology. 2006; 163: 1765–1770.
5. Dahlstrom JE, Scolyer RA, Thompson JF, Jain S. Spitz naevus: diagnostic problems and their management implications. Pathology 2004; 36 (5): 452–457.

6. Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Brocker EB, and Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Research* 1998; 58: 2170–2175.
7. Bastien BC. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer. *Oncogene* 2003; 22: 3081–3086.
8. Su Luo, Alireza Sepehr, Hensin Tsao: Spitz nevi and other Spitzoid lesions: Part I. Background and diagnoses. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2011; 65: 1073–1084.
9. Bastien BC, Wesselmann U, Pinkel D and LeBoit PE. Molecular cytogenetic analysis of Spitz nevi with distinctive histopathologic features. *The American Journal of Pathology* 2000; 157: 967–972.
10. Bastien BC, Wasselmann U, Pinkel D, LeBoit PE. Molecular Cytogenetic Analysis of Spitz Nevi Shows Clear Differen-

ces to Melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology* 1999; 133 (6), 1065–1069

11. Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 2009; 33: 1146–1156.

12. Gaiser T, Kutzner H, Palmedo G., et al. Classifying ambiguous melanocytic lesions with FISH and correlation with long-term follow up. *Modern Pathology* 2010; 23, 413–419.

13. Moore MW and Gasparini R. FISH as an effective diagnostic tool for the management of challenging melanocytic lesions. *Diagnostic Pathology* 2011; 6: 76.

14. Gerami P, Zembowicz A: Update on Fluorescence In Situ Hybridization in Melanoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2011; 135: 830–837

Článek přijat redakcí: 5. 3. 2013
Článek přijat k publikaci: 5. 4. 2013

Mgr. Jana Žmolíková

Kořenského 10, 703 00 Ostrava-Vítkovice
zmolikova@pathology.cz
