

# URČENÍ BIOLOGICKÉ POVAHY U MELANOCYTÁRNÍCH LÉZÍ S VYUŽITÍM FISH

P. Buzrla<sup>1</sup>, M. Uvírová<sup>2</sup>, J. Dvořáčková<sup>1,2</sup>, T. Waloschek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav patologie FN Ostrava, <sup>2</sup> CGB lab. Ostrava



## Souhrn:

K určení biologické povahy s využitím FISH bylo vybráno 42 melanocytárních lézí, které zahrnovaly získané névy, maligní melanomy a diagnosticky obtížné melanocytární léze, např. dysplastický névus, névus Spitzové a modrý névus. Hlavními cíli vyšetření byly geny RREB1, MYB a CCND, jejichž proteiny hrají zásadní roli při kontrole proliferace, diferenciace a buněčného cyklu. S použitím kombinované sondy LSI RREB1/LSI MYB/LSI CCND1/CEP6 (firma Abbott, USA) byly vyšetřeny FISH zjištěny patologické nálezy, např. numerické a strukturální aberace. Výsledky našich vyšetření jsou v souladu s literárními údaji.



## Úvod:

Správné stanovení biologické povahy melanocytárních lézí je jednou ze základních podmínek správné a úspěšné léčby. Na druhé straně existují melanocytární léze, jejichž biologická povaha není jistá, proto nejen mezi dermatopatologem, ale i kliniky, např. dermatology, onkology, panuje neshoda v léčebné strategii. Mezi tyto neobvyklé léze patří dysplastický névus, névus Spitzové a jeho atypická varianta, melanom s minimální deviací, modrý névus, u kterých je histopatologické kritérium obtížné, dokonce nemožné.

## Metoda a materiál:

K vyšetření biologické povahy s využitím FISH bylo vybráno melanocytárních lézí s 42 diagnózou dle doporučené WHO klasifikace: 10 maligních melanomů, z nichž 4x povrchové se šířící melanom, 2x lentigo maligna, 1x lentigo maligna melanom a 3x nodulární melanom, dále 12 névů (intradermálních a smíšených) a 20 diagnosticky obtížných lézí, z nichž 5x névus Spitzové, 2x atypický névus Spitzové, 9x dysplastický névus, 4x modrý névus.

Dle pokynu výrobce Abbott, USA byla u genu RREB1 spočítána jádra s více nebo méně než 2 signály, pak se to vydělilo celkovým počtem hodnocených jader a vynásobilo 100. Tím jsme získali % abnormálních jader pro RREB1. U genu MYB a CCND1 byly sečteny všechny signály a jejich součet se vydělil počtem hodnocených jader, tím jsme získali průměrný počet signálů MYB a CCND1 na jádro. Pak byla spočítána všechna jádra, kde počet signálů MYB je nižší než počet signálů CEP6 a tímto pádem jsme získali počet jader s delecí MYB, který se poté vydělil počtem hodnocených jader a pak bylo vynásobeno 100 (výsledek v %). Jako pozitivní je vzorek označen, pokud je průměrný počet signálů CCND1 nebo MYB na jádro je  $\geq 2,5$ , nebo delecce MYB v % je vyšší  $\geq 31$  nebo % abnormálních jader pro RREB1  $\geq 63\%$ .

## Výsledky:

V 10 benigních melanocytárních lézích (névech) (83,3%) byl zjištěn normální nález (100%). Zbývající 2 vzorky (16,7%) byly vyřazeny pro nedostatečný počet hodnotitelných buněčných elementů.

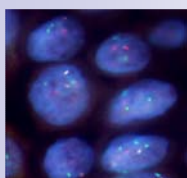
Z 10 vzorků s dg. maligní melanom bylo vyšetřeno 6 (60%), kde byl prokázán patologický nález u všech typů maligního melanomu (100%). Zbývající 3 vzorky (30%) musely být vyřazeny pro ztrátu materiálu v průběhu provádění metody a 1 vzorek (10%) byl vyřazen z důvodu nekvalitní hybridizace.

Ve 14 vzorcích s neobvykle obtížnou diagnózou (70%) byl nález normální v 13 případech (92,86%). V jednom z nich – benigní modrý névus – byla detekována amplifikace genu CCND1, jehož lokus je 11q13. 5 vzorků (25%) bylo vyřazeno z důvodu nekvalitní hybridizace a 1 vzorek (5%) pro nedostatečný počet hodnotitelných buněčných elementů.

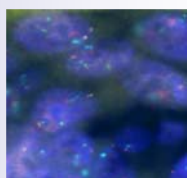
## Diskuze:

Dle dostupných literárních údajů byly uskutečněny četné studie biologické povahy melanocytárních lézí a jejich určení s využitím molekulárně genetických vyšetření, převážně metodami CGH a FISH, které prokázaly u maligních melanomů genetické aberace: delecce a amplifikace specifických lokusů chromozomu, které kódují proteiny, ovlivňující signální dráhy MAPK, p16INK4a, p14ARF, MITF, PI3K. Pomocí CGH byly zjištěny nejčastěji delecce v oblastech 6q, 8p, 9p, 10q, dále amplifikace oblastí 1q, 6p, 8q, 17q, 20q a celého chromozomu 7. Na základě těchto studií vyvinula firma Abbott, USA pro FISH maligních melanomů kombinovanou sondu Vysis LSI RREB1/LSI MYB/LSI CCND1/CEP6, pomocí ní lze detekovat počty kopií genů RREB1 (Ras - responsive element - binding protein 1, lokus 6p25), MYB (avian myeloblastosis viral oncogene homolog, lokus 6q22-23), CCND (cyclin D1, synonymum PRAD1, lokus 11q13) a centromery 6. Proteiny, které jsou kódovány geny RREB1 a MYB, jsou transkripční faktory a cyklin D, kódovaný genem CCND1 (synonym PRAD1) je stimulační faktor buněčného cyklu v přechodu z fáze G1 do fáze S.

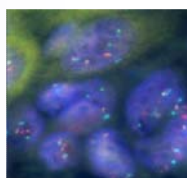
V práci jsme zjistili, že pomocí FISH nebyly u benigních melanocytárních lézí (100%) detekovány patologické nálezy, resp. změny počtu kopií výše popsaných genů, zatímco u lézí s diagnózou maligní melanom byly potvrzeny abnormální počty kopií těchto genů ve všech 6 vyšetřovaných vzorcích (100%). Dále v jednom ze 13 vzorků (7,7%) diagnosticky obtížných melanocytárních lézí byla zastižena amplifikace genu CCND1, což může předvídat (predikovat) nepříznivou biologickou povahu tumoru. Šlo však o benigní modrý névus.



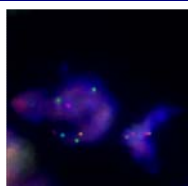
Intradermální névus



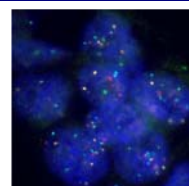
Névus Spitzové



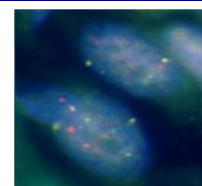
Névus Spitzové



Benigní modrý névus



Nodulární melanom



Nodulární melanom

## Závěr:

Závěry naší práce jsou v souladu s literárními údaji. Kombinovaná sonda LSI RREB1/MYB/CCND1/CEP6 se jeví jako přínosný a spolehlivý nástroj pro detekci numerických a strukturálních aberací chromozomů u diagnosticky obtížných melanocytárních lézí. Na základě jejich detekce lze u těchto lézí s předpokladem určit biologickou povahu, což je jednou ze zásad správné léčebné strategie.

Během zpracování metodou FISH nastaly problémy s hybridizací materiálů. Příčiny spočívaly s největší pravděpodobností v preanalytické fázi vyšetření, což zahrnuje termické artefakty při odběru vzorku od pacienta (vaporizace) a neadekvátní fixaci vzorků. Pro zvýšení kvality vyšetřování je zapotřebí standardizovat dobu fixace a dodržet adekvátní koncentraci formalinu, na druhé straně použít jiná fixační média, která jsou vůči DNA vzorku šetrná.

Vzhledem k tomu, že soubor vzorků v této práci je malý, je nutno příště rozšířit soubor k vyloučení chyby malých čísel.

- Literatura:
1. FISH evaluation of chromosomes 6, 7, 9 and 10 throughout human melanocytic tumorigenesis L. Casorzo, C. Luzzi, Melanoma Research 15(3), 155-160, June 2005
  2. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer B. C. Bastian, Oncogene 22, 3051-3066 (2003)
  3. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes B. Bastian, A. Oshen, American Journal of Pathology, Vol. 163, No.5, November 2003
  4. WHO Classification: Skin Tumours, IARC, 2006