

Ольга Александровна Малихова¹, Ирина Владимировна Поддубная²,
Борис Константинович Поддубный³

КОМПЛЕКСНАЯ ЭНДОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ НЕХОДЖКИНСКОЙ ЛИМФОМЫ ЖЕЛУДКА

¹ К. м. н., ведущий научный сотрудник, отделение эндоскопии НИИ клинической онкологии
РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН (115448, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

² Член-корреспондент РАМН, профессор, д. м. н., заведующая, кафедра онкологии ГОУ ДПО РМАПО
(115448, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

³ Профессор, д. м. н., главный научный сотрудник, отделение эндоскопии НИИ клинической онкологии
РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН (115448, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

Адрес для переписки: 115448, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, НИИ клинической онкологии
РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, отделение эндоскопии, Малихова Ольга Александровна;
e-mail: malikhova@inbox.ru

Проведена комплексная эндоскопическая оценка эффективности лекарственной терапии неходжкинской лимфомы желудка, сформулированы ее эндоскопические и эндосонографические критерии, впервые сформулированы алгоритмы диагностического и динамического контроля. Разработанные алгоритмы диагностического и динамического эндоскопического обследования будут способствовать повышению своевременного выявления опухолевой патологии желудка и правильной интерпретации визуальных изменений в процессе лекарственного лечения. В исследование по оценке лекарственной терапии включены 46 пациентов, которым диагноз лимфомы желудка был поставлен при первичном обращении в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН в период с 2007 по 2009 г. Динамическое комплексное эндоскопическое исследование на этапе диагностики, в процессе лекарственной терапии и для динамического контроля включало стандартное эндоскопическое исследование видеогастроскопами, оснащенными функциями увеличения и осмотра в узком спектре света, а также эндоскопическое ультразвуковое исследование.

Ключевые слова: неходжкинские лимфомы (НХЛ) желудка, эндоскопия, эндосонография, онкогематология.

В предыдущее десятилетие достигнуты значительные успехи в уточнении многих характеристик неходжкинских лимфом (НХЛ). Это в большей степени коснулось аспектов морфоиммунологической диагностики опухолей, что привело к позитивному влиянию на выбор лечебной тактики [1; 2]. Одним из основных методов лечения НХЛ желудка является лекарственная терапия, предусматривающая использование различных схем, а методом выбора при оценке эффективности лекарственной терапии — эндоскопическое исследование. Согласно результатам сравнительного анализа методов контроля (рентгенография желудка, ультразвуковое исследование, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография), информативность эндоскопического исследования с использованием всех уточняющих методик выгодно отличается не только в выявлении данного поражения, но и в определении динамики опухолевого про-

цесса [3—9]. Это, в свою очередь, обуславливает необходимость знания закономерности регрессии лимфоидной опухоли желудка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование по оценке эффективности лекарственной терапии включены 46 пациентов, которым диагноз лимфомы желудка был поставлен при первичном обращении в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН в период с 2007 по 2009 г. Динамическое комплексное эндоскопическое исследование на этапе диагностики, в процессе лекарственной терапии и с целью динамического контроля включало стандартное эндоскопическое исследование видеогастроскопами, оснащенными функциями увеличения и осмотра в узком спектре света, а также эндоскопическое ультразвуковое исследование, позволяющее на основании таких объективных данных, как толщина стенки желудка, глубина инвазии опухоли и площадь опухоли, проводить объективную оценку эффективности лекарственной терапии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определена последовательность эндоскопических признаков регрессии НХЛ желудка в процессе лечения.

1. Уменьшение массы опухолевого компонента, включая специфическую инфильтрацию.
2. Заживление язвенных дефектов.
3. Восстановление калибра и общего рисунка складок слизистой оболочки.
4. Исчезновение деформации стенок желудка, восстановление его просвета.
5. Восстановление эластичности стенок желудка и их перистальтики.
6. Исчезновение гиперемии, отека, рыхлости, шероховатости слизистой оболочки.
7. Исчезновение повышенной ранимости и кровоточивости слизистой оболочки желудка.

Выявленная закономерность последовательности регрессии опухолевых проявлений не зависела от характера поражения (первичный или вторичный) и от морфоиммунологического варианта НХЛ.

Учитывая морфофункциональные особенности различных отделов желудка, мы поставили перед собой задачу найти различия в последовательности изменений опухоли в процессе лекарственной терапии в зависимости от локализации специфического язвенного дефекта. В данный анализ вошли пациенты с язвенной и инфильтративно-язвенной формой поражения желудка (108 больных).

При расположении опухоли в своде желудка у 28 (25,9%) больных выявлена полная реституция язвенных дефектов; при локализации опухолевой язвы в теле желудка в 56 (51,9%) случаях рубцы визуализировались в виде белесоватых площадок с выраженной конвергенцией складок неизмененной слизистой оболочки к ее центру; в выходном отделе желудка, включая угол желудка, у 24 (22,2%) больных при рубцевании специфического язвенного дефекта выявлена выраженная деформация просвета вплоть до сужения выходного отдела желудка.

На основании этих данных мы констатировали наличие 3 различных типов рубцевания специфических язвенных дефектов НХЛ желудка в зависимости от их локализации.

1. Свод желудка — полная реституция язвенных дефектов.
2. Тело желудка — рубцовые площадки с конвергенцией складок слизистой оболочки.
3. «Грубые» рубцы с последующей деформацией и сужением выходного отдела желудка.

Мы также определили общие эндоскопические признаки регрессии опухолевого поражения желудка:

- 1) изменение площади опухолевого поражения желудка;
- 2) уменьшение толщины стенки желудка;
- 3) восстановление дифференцировки слоев стенки желудка;
- 4) уменьшение или исчезновение метастатически измененных парагастральных лимфатических узлов.

Оценку результатов лекарственной терапии проводили в соответствии с макроскопическими проявлениями противоопухолевого эффекта непосредственно в желуд-

ке (И. В. Поддубная). При этом использованы следующие обозначения.

1. Полная ремиссия (ПР) — отсутствие клинической симптоматики, исчезновение всех эндоскопических и эндосонографических признаков опухолевого процесса в желудке, определяемое всеми теми же методами, которые использовались до начала лечения, при отрицательных результатах морфологического и иммуногистохимического исследования гастробиоптатов.
2. Частичная ремиссия (ЧР) — уменьшение всех измеряемых опухолевых проявлений на 50% и более.
3. Стабилизация — отсутствие выраженных изменений (уменьшение опухолевых проявлений менее чем на 50%, увеличение — менее чем на 25%).
4. Прогрессирование — отсутствие эффекта от терапии. Увеличение размеров опухоли на 25% и более, появление новых опухолевых очагов в желудке.

Оценка лекарственной терапии проведена у 46 больных, которым выполнено комплексное эндоскопическое исследование. Одному пациенту в процессе лекарственной терапии вследствие возникших urgentных осложнений была выполнена гастрэктомия, поэтому оценка эффекта в конечном счете произведена у 45 больных. У 33 из 45 (73,3%) пациентов отмечена ПР, у 6 (13,3%) больных констатирована ЧР, у 3 (6,7%) — стабилизация, у 3 (6,7%) — прогрессирование. ПР обязательно подтверждалась морфоиммунологическим исследованием гастробиоптатов, полученных при множественных гастробиопсиях различных отделов желудка. Таким образом, нами сформулирован алгоритм комплексной эндоскопической диагностики НХЛ желудка (рис. 1).

Выявлены наиболее благоприятные сроки проведения динамического обследования в процессе лекарственной терапии и при динамическом контроле.

В процессе химиотерапии при осмотрах после каждого курса мы не выявили значимых изменений как в визуальной, так и в эндосонографической картине. Это дало основание рекомендовать осуществление оценки эффекта лечения больных НХЛ желудка после каждых 2 курсов полихимиотерапии.

В целях динамического наблюдения при достижении полной ремиссии мы рекомендуем реализовывать следующий алгоритм эндоскопических осмотров желудка: в течение первого года — каждые 3 мес, в течение 2-го и 3-го годов наблюдения — каждые 6 мес; в последующем — 1 раз в год.

Алгоритм контрольных и динамических комплексных эндоскопических осмотров больных НХЛ желудка в процессе лекарственной терапии и при достижении полной ремиссии представлен на рис. 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование таких методов уточняющей эндоскопической диагностики, как эндоскопия с увеличением и эндосонография, позволяет не только своевременно устанавливать диагноз лимфопрлиферативного заболевания желудка, решить вопрос дифференциальной диагностики, но и проводить оценку эффективности лекарственной терапии и осуществлять динамический контроль.

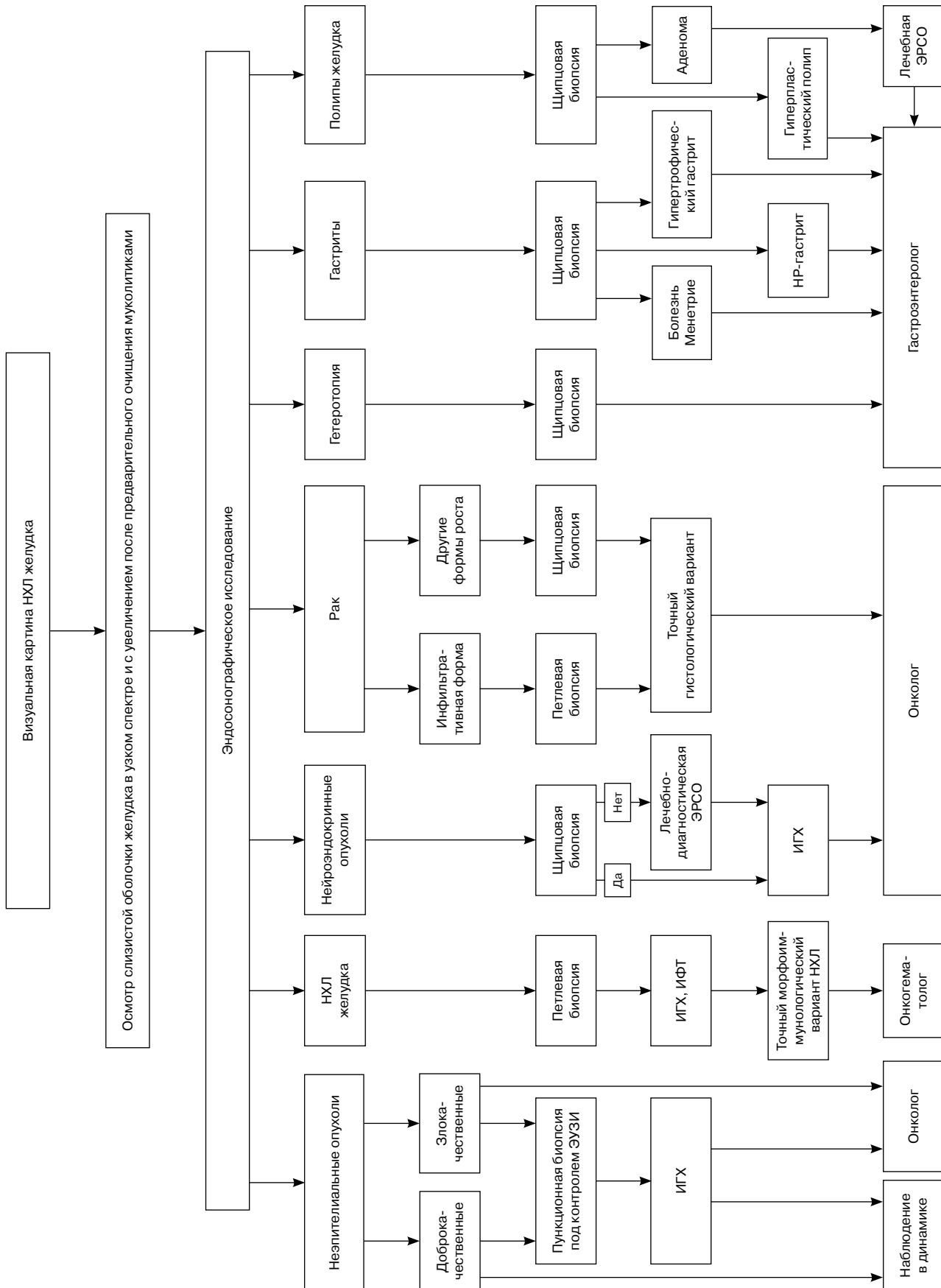


Рисунок 1. Алгоритм комплексной эндоскопической диагностики НХЛ желудка. ИГХ — иммуногистохимическое исследование; ИФТ — иммунофенотипирование; ЭРСО — эндоскопическая резекция слизистой оболочки; ЭУЗИ — эндоскопическое ультразвуковое исследование; НР-гастрит — гастрит, вызванный *Helicobacter pylori*.

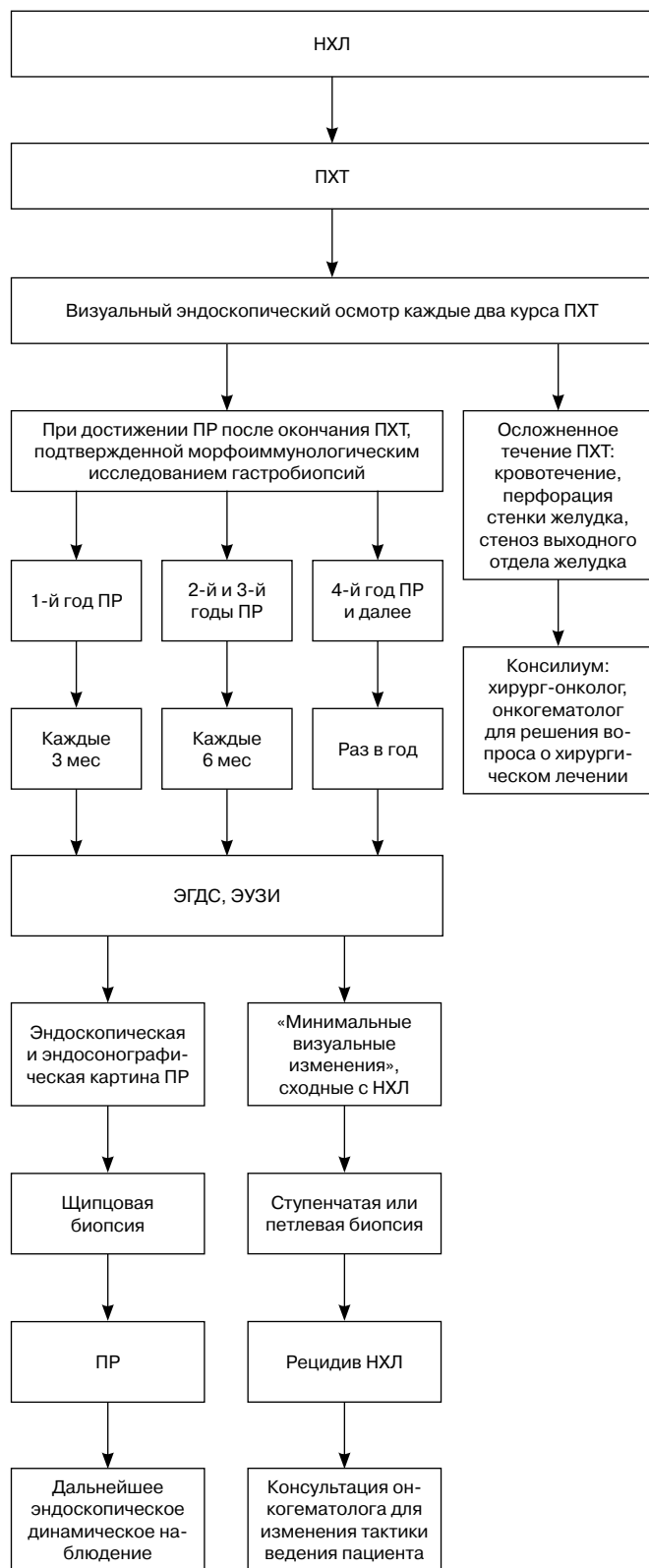


Рисунок 2. Алгоритм контрольных и динамических комплексных эндоскопических осмотров больных НХЛ желудка в процессе лекарственной терапии и при достижении ПР. ПХТ — полихимиотерапия; ЭГДС — эзофагогастродуоденоскопия; ЭУЗИ — эндоскопическое ультразвуковое исследование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Поддубная И. В. Неходжкинские лимфомы // Клиническая онкогематология / Под ред. М. А. Волковой — М.: Медицина, 2006. — С. 734—770.
2. Al-Sayes F. M. Gastrointestinal Non-Hodgkin's lymphoma: a clinico-pathological study // Saudi J. Gastroenterol. — 2006. — Vol. 12, N 3. — P. 118—122.
3. Al-Shehaby Z. A., Zezafon H. B., Saleh R. S. Clinicopathological study of primary gastric lymphoma // Saudi Med. J. — 2007. — Vol. 28, N 10. — P. 1506—1510.
4. Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: treatment outcome / Al-Shemmari S. H., Sajjani K. P., Ameen R. M., Ragheb A. M. // Clin. Lymphoma. — 2003. — Vol. 4, N 2. — P. 99—103.
5. Role of endoscopic ultrasound in gastrointestinal lymphomas / Al-Taie O. H., Dietrich C. F., Dietrich C. G., Fischbach W. // Z. Gastroenterol. — 2008. — Vol. 46, N 6. — P. 618—624.
6. Diagnostic role of 18F-FDG PET in gastric MALT lymphoma / Ambrosini V., Rubello D., Castellucci P., Nanni C., Farsad M., Zinzani P., Alavi A., Tehranipour N., Al-Nahhas A., Fanti S. // Nucl. Med. Rev. Cent. East. Eur. — 2006. — Vol. 9, N 1. — P. 37—40.
7. Primary gastric lymphoma / Barreda B. F., Gómez P. R., Quispe L. D., Sánchez L. J., Combe G. J., Casanova M. L., Celis Z. J. // Rev. Gastroenterol. Peru. — 2004. — Vol. 24, N 3. — P. 238—262.
8. Endosonography in gastric lymphoma and large gastric folds / Caletti G., Fusaroli P., Togliani T., Bocus P., Roda E. // Eur. J. Ultrasound. — 2000. — Vol. 11, N 1. — P. 31—40.
9. Caletti G., Fusaroli P., Togliani T. EUS in MALT lymphoma // Gastrointest. Endosc. — 2002. — Vol. 56. — P. 21—26.

Поступила 09.06.2010

*Olga Alexandrovna Malikhova¹, Irina Vladimirovna Poddubnaya²,
Boris Konstantinovich Poddubny³*

COMPLEX ENDOSCOPIC ASSESSMENT OF DRUG THERAPY EFFICACY IN PATIENTS WITH GASTRIC NON-HODGKIN'S LYMPHOMA

¹ MD, PhD, Leading Researcher, Endoscopy Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin RCRC RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115448)

² MD, PhD, Associate Member of RAMS, Professor, Head, Chair of Oncology, RMAPE
(24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115448)

³ MD, PhD, Professor, Chief Researcher, Endoscopy Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin RCRC RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115448)

Address for correspondence: Malikhova Olga Alexandrovna, Endoscopy Department,
Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115448;
e-mail: malikhova@inbox.ru

We carried out a complex endoscopic assessment of drug therapy efficacy in patients with gastric non-Hodgkin's lymphoma, developed appropriate endoscopic and endosonographic criteria, and were the first to develop algorithms for diagnostic and treatment monitoring. The developed algorithms for diagnostic and treatment endoscopic monitoring will facilitate timely detection of gastric tumors and correct interpretation of visual changes on therapy. The drug therapy efficacy study was made in 46 patients with the diagnosis of gastric lymphoma at first presentation at the N. N. Blokhin RCRC RAMS during 2007 through 2009. Complex endoscopic evaluation of changes during the diagnosis, therapy and follow-up periods involved standard magnifying endoscopy with narrow band imaging and endosonography.

Key words: gastric non-Hodgkin's lymphoma (NHL), endoscopy, endosonography, oncohematology.

Анастасия Ильинична Сендерович¹, Анна Михайловна Строганова²,
Михаил Алексеевич Пятницкий³, Яна Владимировна Вишневская⁴,
Аполлон Иродионович Карселадзе⁵

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ FISH-РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МЕЛАНОЦИТАРНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

¹ Младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной патологии, отделение патологической анатомии опухолей человека НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

² Научный сотрудник, лаборатория молекулярной патологии, отделение патологической анатомии опухолей человека НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

³ К. б. н., младший научный сотрудник, НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН (119121, РФ, г. Москва, Погодинская ул., д. 10)

⁴ К. м. н., старший научный сотрудник, отделение патологической анатомии опухолей человека НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁵ Профессор, д. м. н., заведующий, отделение патологической анатомии опухолей человека НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

Адрес для переписки: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, лаборатория молекулярной патологии, отделение патологической анатомии опухолей человека, Сендерович Анастасия Ильинична; e-mail: a.senderovich@mail.ru

Цель данной работы заключалась во внедрении в практику метода, позволяющего диагностировать меланому на молекулярно-генетическом уровне, а также производить дифференциальную диагностику между невусом и меланомой, оценивать прогноз заболевания. Для выполнения поставленных задач изучены 20 невусов, 40 меланом, из них 20, для которых существуют результаты отдаленных наблюдений, и 80 случаев, не ясных в диагностическом плане. Основным методом исследования является реакция флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). В работе использована флуоресцентная проба *Vysis LSI RREB1/LSI MYB/ LSI CCND1/CEP6*, позволяющая оценить количество копий генов *RREB1(6p25)*, *MYB(6q23)*, *CCND1(11q13)* и центромеры хромосомы 6. Выявлено, что при меланоцитарных поражениях преобладают сочетанные нарушения генов, при этом в наибольшей степени выявляются нарушения в области гена *RREB1*. Кроме того, обнаружена связь между копийностью генов *MYB* и *CCND1* и выживаемостью пациента. Для некоторых типов меланоцитарных новообразований выявлены гены, копийность которых наиболее статистически значима, а также установлена связь с возрастом больного. Таким образом, FISH-реакция в сочетании с гистологическим исследованием позволит в значительной степени улучшить диагностику меланоцитарных новообразований кожи, а также скорректировать лечение и оценить дальнейшее течение заболевания.

Ключевые слова: меланома, меланоцитарные поражения кожи, хромосомные aberrации, флуоресцентная *in situ* гибридизация.

Во всем мире число случаев меланомы увеличивается ежегодно более чем на 4%. Это самый быстрый темп прироста, который был отмечен среди основных форм злокачественных новообразований. Гистологическое исследование на настоящий момент является «золотым стандартом» для диагностической классификации меланом.

ноцитарных новообразований, однако диагноз многих биопсий кожи остается неясным. Например, в исследовании К. С. Veenhuizen и соавт. было показано, что из 1069 образцов 8% не могут быть точно диагностированы патологоанатомом. Среди 158 поставленных злокачественных диагнозов 22 (14%) были оспорены экспертами и 16,6% доброкачественных диагнозов были расценены как меланома. Ошибочный диагноз меланоцитарных новообразований достаточно распространен и приводит к неправильному выбору терапии больного [1].

Кроме проблемы разделения меланоцитарных поражений на доброкачественные и злокачественные в литературе обсуждается гипотеза, является ли меланома гомогенной болезнью или состоит из различных биологических и гистологических подтипов [2; 3]. Так, для меланомы глаза характерны стереотипная модель метастазирования в печень и частые аберрации хромосомы 3, что отличает ее от меланомы кожи. Среди меланом, поражающих кожу в зависимости от анатомической области поражения и степени воздействия солнца, отмечены вариации гистологических и клинических характеристик. Поэтому было предложено деление меланомы на несколько гистогенетических типов [3]. Однако до настоящего времени является спорным, отражают ли клиничко-патологические варианты меланомы кожи истинные биологические различия, или это разнообразие зависит от строения кожи в различных анатомических областях [4].

С помощью метода сравнительной геномной гибридизации в группе меланом, включающей все злокачественные формы данного заболевания, были установлены наиболее часто встречающиеся генетические поломки. Так, исследователями отмечены потери 6q, 8p, 9p, 10q, а также увеличение копийности 1q, 6p, хромосомы 7, 8q, 17q и 20q [2]. Кроме того, обнаружено, что подтипы меланомы достоверно отличаются друг от друга по набору аберраций. Например, при акральной меланоме чаще встречаются нарушения в областях 5p, 11q и 12q, а при злокачественном лентиго — потери 17p и 13q участков [5].

Наиболее достоверные различия установлены между меланомой и невусом. При меланоме хромосомные аберрации присутствовали в 96,2% случаев. В группе невусов нарушения были отмечены лишь в 13% случаев в подгруппе невуса Шпица. При этом было обнаружено изолированное увеличение копийности генов на участке 11p [6]. Примечательно, что подобного рода аберрация в меланоме не присутствует.

Оценить степень генетических поломок в конкретном меланоцитарном новообразовании можно с помощью реакции флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). В качестве флуоресцентной пробы используется смесь зондов *LSI RREB1/LSI MYB/LSI CCND1/CEP6* (Vysis, Downers Grove, США), в которой флуорофором мечены гены, роль которых доказана в развитии меланоцитарной неоплазии, а также гены, ответственные за злокачественную трансформацию клеток: *RREB1* (6p25), *MYB* (6q23), *CCND1* (11q13) [7].

Ген *RREB1* (Ras Responsive Element Binding Protein 1) расположен в локусе 6p25, на коротком плече хромосомы 6. Белок RREB1 является транскрипционным фактором, который вовлечен в RAS/RAF-опосредованную клеточную дифференцировку. Участвует в регуляции транскрипции p53 в ответ на повреждение ДНК. Показано, что «молчание» гена *RREB1* снижает экспрессию p53 на уровне как мРНК, так и белка [8].

Протоонкоген *Myb* расположен в локусе 6q22—23, на длинном плече хромосомы 6, кодирует ядерный белок, вовлеченный в регуляцию транскрипции, и играет важную роль в пролиферации гемопоэтических клеток.

Ген *CCND1* расположен в локусе 11q13 и кодирует циклин D1, который в комплексе с циклинзависимыми

киназами 4, 6 (Cdk 4, 6) регулирует переход из фазы G1 клеточного цикла в фазу S. Нарушение регуляции данного перехода является одним из основных, если не существенным, факторов в патогенезе меланомы кожи, что позволяет рассматривать *CCND1* в качестве маркера [9].

Помимо этого для оценки количества хромосом в одном ядре была окрашена альфа-сателлитная ДНК, локализованная на центромере хромосомы 6, CEP6 (6p11.1—q11.1).

Данная проба обладает высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет не только диагностировать меланому на молекулярно-генетическом уровне, но и производить дифференциальную диагностику между невусом и меланомой, судить о прогнозе заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выполнения поставленных нами задач изучены 20 невусов, 20 меланом. В группе меланом выделяли 11 узловых меланом, 5 поверхностно распространяющихся, 2 акральные, 2 комбинированные (узловая и поверхностная). Кроме того, рассмотрены 80 случаев, не ясных в диагностическом плане, среди них 32 сложных невуса, 28 диспластических невусов, 5 невусов Шпица, 7 невусов Рида, 5 простых голубых невусов, 3 клеточных голубых невуса. Материал был получен от больных, лечившихся в РОНЦ им. Н. Н. Блохина за период 2000—2008 гг. Кроме того, изучены 20 меланом, для которых существуют результаты отдаленных наблюдений. Данный материал также был получен от больных, лечившихся в РОНЦ им. Н. Н. Блохина в 1995 г. Весь операционный материал был фиксирован в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч, дальнейшую его обработку проводили по традиционной гистологической методике. После этого были приготовлены парафиновые срезы толщиной 4 мкм. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином, на железо. В отдельных случаях (10 препаратов) проводили иммуногистохимическую окраску.

Для выявления генетических нарушений указанных генов материал был исследован с помощью FISH-реакции. Парафиновые срезы обрабатывали согласно инструкции фирмы Vysis. Препараты окрашивали флуоресцентной пробой *LSI RREB1/LSI MYB/LSI CCND1/CEP6*. Оценку результатов реакции проводили на интерфазных ядрах опухолевых клеток с использованием флуоресцентного микроскопа «Axioscop 2 Plus» («Zeiss»). Проводили подсчет количества красного, желтого, зеленого и голубого сигналов, соответствующих генам *RREB1*, *MYB*, *CCND1* и центромере хромосомы 6 (CEP6) в 30 ядрах каждого образца. Следуя инструкциям производителя пробы, произвели расчет четырех параметров.

Образцы, в которых все четыре параметра оказались ниже указанных пограничных значений, расценивали как нормальные/доброкачественные, или FISH-отрицательные (FISH—).

Для статистической обработки данных использовали следующие методы: корреляция по Спирмену и по Кэндаллу, непараметрический тест Манна—Уитни, сравнительный анализ выживаемости по Каплану—Майеру, регрессия Кокса, построение деревьев принятия решений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В группе невусов при анализе полученных данных значимые изменения, характерные для меланомы, не выявлены, т. е. установленные количественные изменения в геноме ниже пороговых величин.

Как известно, выделяют 2 фазы развития меланомы: первая фаза, или стадия радиального роста, которая включает меланому *in situ*, и вторая фаза, или стадия вертикального роста, которая статистически значимо ассоциируется с высоким риском развития метастазов [10].

В результате проведенной FISH-реакции во всех исследуемых случаях флуоресцентные сигналы были четко видны и легко поддавались интерпретации, морфология ткани была сохранена.

Нами установлены генетические нарушения как на ранней (фаза радиального роста; рис. 1), так и на более поздней (фаза вертикального роста; рис. 2) стадии формирования опухоли. При этом степень выраженности этих нарушений не зависит от фазы развития опухоли. Из этого можно сделать вывод, что данные аберрации, характерные для меланомы, не являются следствием прогрессирования опухоли.

Помимо этого нами отмечено существование меланом как с амплификацией исследуемых генов (рис. 3 А, Б), так и с делецией (рис. 3 В, Г).

Кроме того, мы изучили зависимость между копийностью генов и уровнем инвазии и толщиной опухоли. Статистически значимой корреляции между указанными параметрами не выявлено. Вероятно, это связано с тем, что исследуемые нами аберрации возникают на ранних этапах формирования опухоли.

После этого мы ранжировали гены по степени отклонения от нормы. Для каждого гена просуммировали абсолютное значение разности между фактической копийностью и копийностью в норме (двумя). Получили следующие значения: *CEP6* (411), *CCND1* (492), *RREB1* (647), *MYB* (425).

Таким образом, можно установить следующий порядок генов по мере увеличения степени отклонения копийности от нормы: *CEP6*, *MYB*, *CCND1*, *RREB1*.

Если же не учитывать абсолютные значения копийности, а рассматривать только число клеток с нормальной копийностью, то порядок генов по мере увеличения степени отклонения от нормы будет следующим: *MYB* (309 клеток), *CCND1* (300 клеток), *CEP6* (299 клеток), *RREB1* (206 клеток).

Таким образом, по двум указанным критериям по сравнению с нормой чаще выявляются нарушения в области гена *RREB1*.

Сведения о копийности были доступны для 630 клеток. Нами установлено, что в 11% (67/630) не отмечается никаких генетических нарушений, одиночные нарушения встречаются в 20% (126/630) случаев. Остальные 69% (437/630) составляют сочетанные нарушения, из них уменьшение копийности всех генов — 7,1% (31/437), уменьшение копийности всех генов, кроме *CCND1*, — 7,1% (31/437), а также увеличение копийности всех генов — 6,4% (28/437) и увеличение копийности всех генов, кроме *MYB*, — 5,7% (25/437). Остальные типы сочетанных нарушений встречаются приблизительно в 2 раза реже.

Следует отметить, что из 20 изученных нами меланом 3 (15%) оказались FISH-отрицательными. При сравнении двух групп с отрицательной и положительной FISH-реакцией выявлено, что копийность генов *CCND1* ($p = 0,009$) и *RREB1* ($p < 0,001$) статистически значимо различается у обеих групп (копийность генов в случае отрицательной FISH-реакции в среднем ниже). Кроме того, уровень инвазии и толщина слоя в среднем меньше для отрицательной FISH-реакции ($p < 0,001$).

Установлено, что две подгруппы меланом больше всего различаются по копийности гена *RREB1*. Для FISH + одиночное нарушение в виде увеличения его копийности встречается в 10,7% случаев, а для FISH — аналогичное нарушение встречается всего в 1,1% случаев.

В группе FISH — одиночное уменьшение *CCND1* (6,7%) и одиночное уменьшение *MYB* (6,7%) встречаются также чаще, чем в группе FISH + (4,8 и 3,2% соответственно).

При сравнении увеличения/уменьшения копийности для каждого гена в отдельности было установлено,

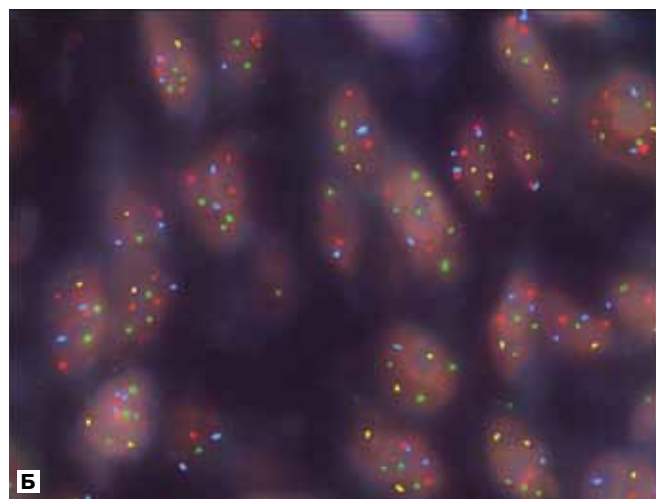
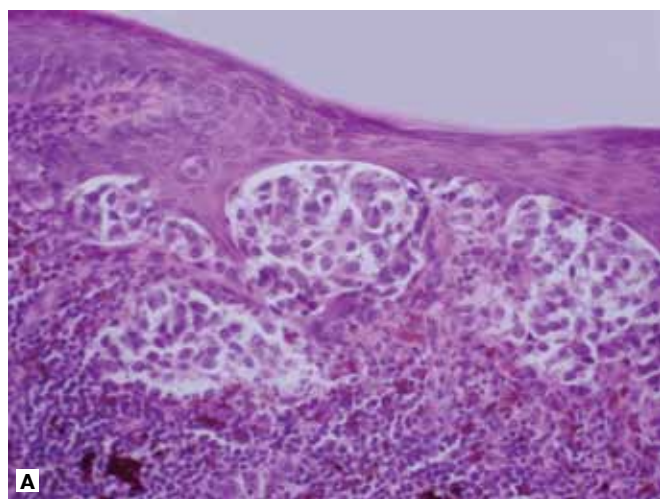


Рисунок 1. Фаза радиального роста меланомы.

А. Окраска гематоксилином и эозином (×400). **Б.** FISH-реакция (×1000).

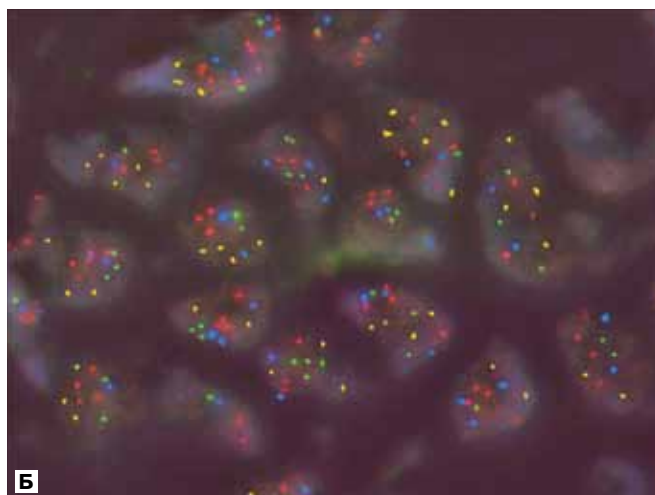
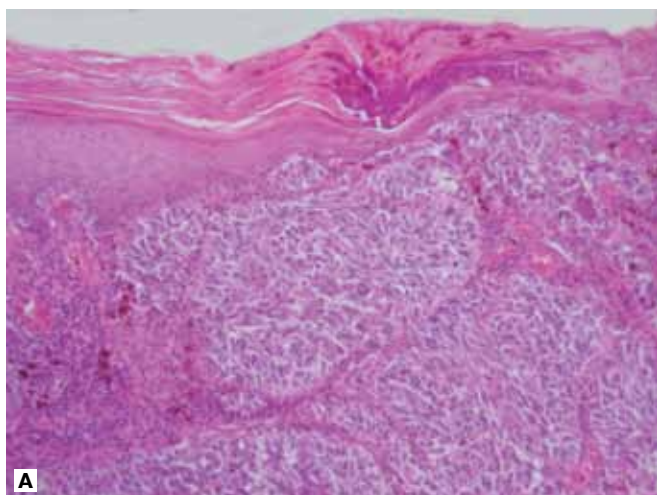


Рисунок 2. Фаза вертикального роста меланомы.
А. Окраска гематоксилином и эозином (×100). **Б.** FISH-реакция (×1000).

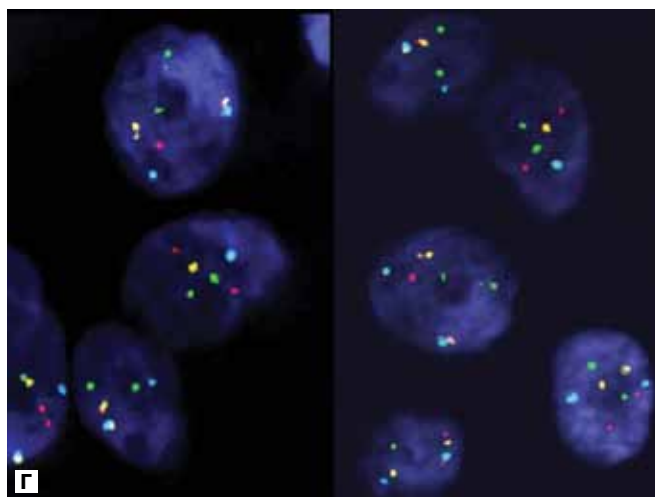
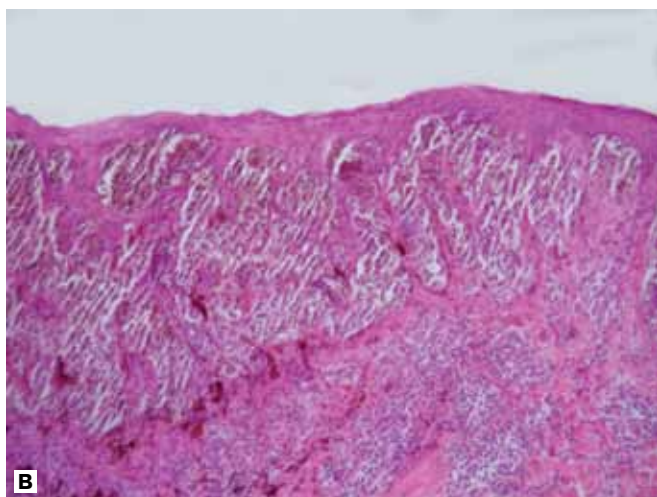
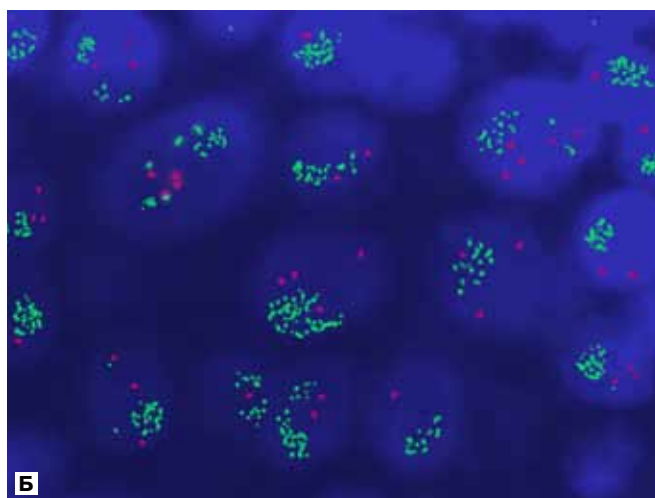
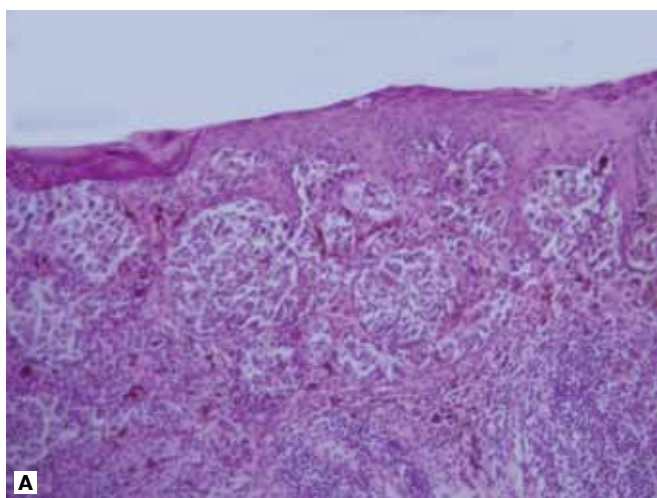


Рисунок 3. Различные генетические нарушения при меланоме.
А. Окраска гематоксилином и эозином (×100). **Б.** Амплификация гена *CCND1*, FISH-реакция (×1000). **В.** Окраска гематоксилином и эозином (×100). **Г.** Делеция всех исследуемых генов, FISH-реакция (×1000).

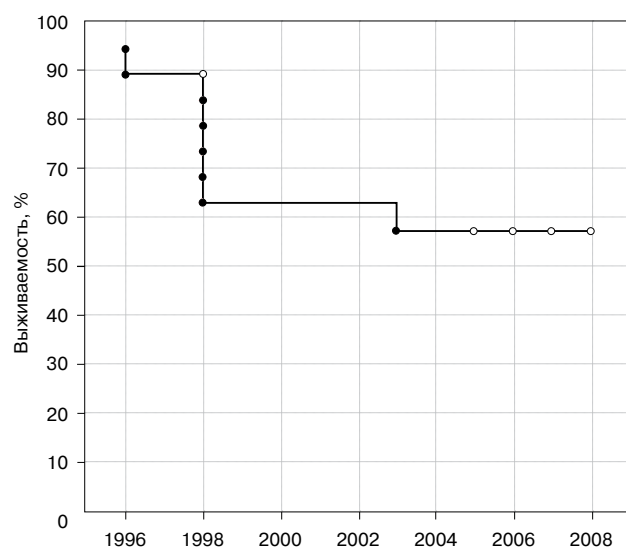


Рисунок 4. Выживаемость больных. Черными значками обозначены завершённые наблюдения, светлыми — цензурированные.

что все гены различаются для групп FISH+ и FISH–, но *RREB1* и *CCND1* — намного больше, чем *MYB*.

Рассмотрим группу меланом, для которых существуют результаты отдаленных наблюдений.

Оценить выживаемость можно, построив кривую Каплана—Майера (рис. 4). В результате анализа зависимости выживаемости от типа генетических нарушений мы установили, что гены *MYB* и *CCND1* связаны с выживаемостью: чем больше число копий указанных генов, тем меньше риск смерти в первые годы после заболевания. Напротив, ген *RREB1* с выживаемостью пациента статистически значимо не коррелирует (рис. 5). Следовательно, установив тип aberrаций, можно прогнозировать дальнейшее течение заболевания.

В группе неясных в диагностическом плане новообразований в 23,1% случаев обнаружены поломки в области одного гена. Из них чаще всего наблюдалась потеря гена *MYB* (5,7%) и гена *CCND1* (6,3%). В 46,6% случаев выявлены сочетанные нарушения, среди которых следует отметить уменьшение копийности (5,6%), а также увеличение копийности (5,9%) всех генов.

Мы проследили, существует ли связь между числом копий генов и возрастом пациента. В группе сложного и диспластического невусов (для остальных групп такие данные были недоступны) было установлено, что чем старше пациент, тем сильнее выражены генетические aberrации. Полученные данные можно использовать как один из факторов при оценке дальнейшего течения заболевания.

Для изучения зависимости между генетическими нарушениями и результатом FISH использовали деревья решений (рис. 6). Как видно из рис. 6 А, для диспластического невуса наибольшее значение имеют гены *RREB1* и *CCND1*. Чем ниже копийность *CCND1*, тем больше образец генетически соответствует невусу, и наоборот, копийность *RREB1* определяет FISH-положительный результат, что соответствует меланоме. В группе невуса Шпица наиболее статистически значим ген *MYB* ($p < 0,001$) (см. рис. 6, Б), для невуса Рида главную роль играет ген *RREB1* ($p < 0,001$) (см. рис. 6, В).

При рассмотрении 8 случаев голубого невуса 3 из них оказались FISH-положительными. Примечательно, что все они принадлежали к подгруппе клеточного голубого невуса, который иногда клинически протекает агрессивно. Следовательно, в данном случае FISH-реакция подтверждает гистологический диагноз.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования обнаружено, что в группе меланом, диагноз которых был подтвержден гистологически, существуют так называемые FISH-отрицательные образцы (3/20). Все эти ложноотри-

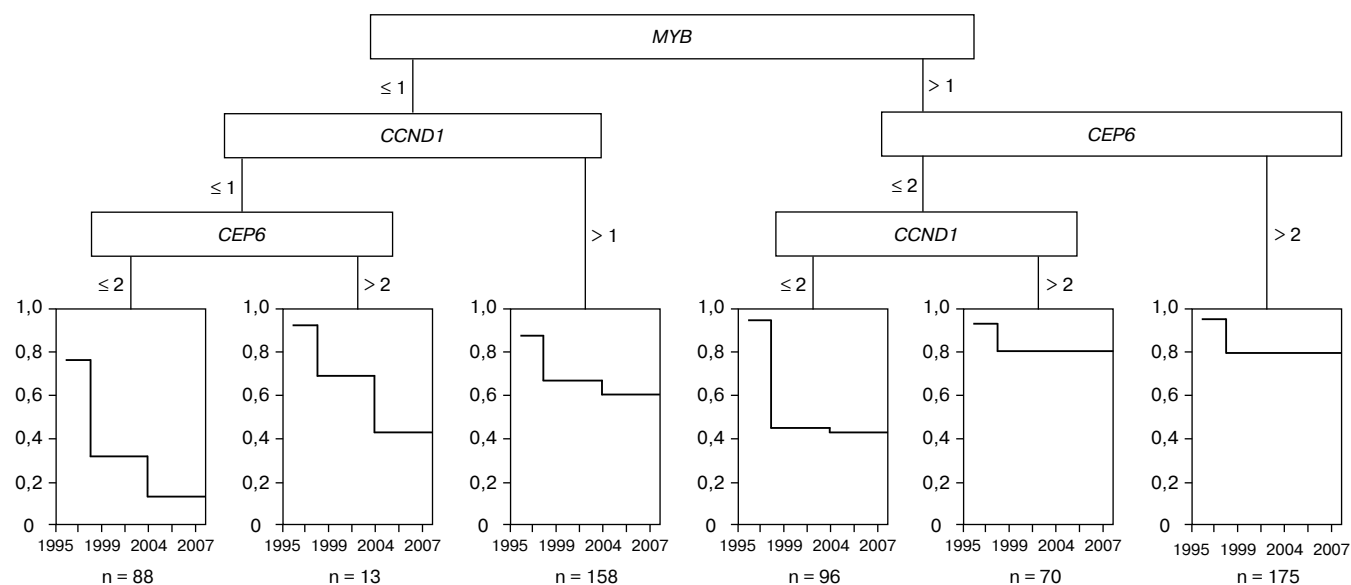


Рисунок 5. Дерево решений для группы меланом, для которых существуют результаты отдаленных наблюдений.

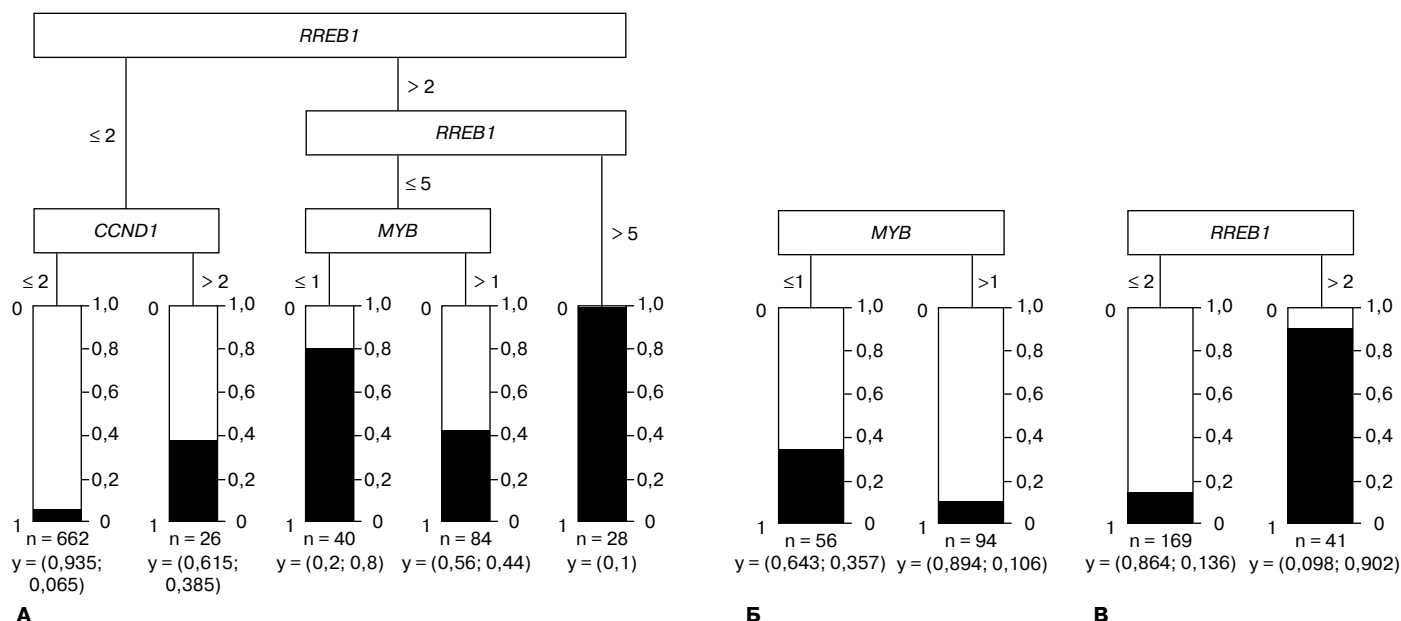


Рисунок 6. Дерево решений для различных типов меланоцитарных новообразований кожи.

А. Диспластический невус. **Б.** Невус Шпица. **В.** Невус Рида.

цательные случаи относятся к поверхностно распространяющейся меланоме. Статистически значимой связи с толщиной опухоли или уровнем инвазии мы не выявили. Основной проблемой, касающейся диагностики меланоцитарных поражений кожи, является установление определенного критерия злокачественности. Могут ли эти критерии быть исключительно гистологическими, или о злокачественности можно судить только после возникновения метастазов? Таким образом, клинический опыт доказывает необходимость сочетания гистологического исследования с более информативной FISH-реакцией для точной постановки диагноза.

Мы установили, что при меланоме наиболее часто генетическим поломкам подвергается ген *RREB1*. Это наблюдается как при FISH-отрицательном, так и при FISH-положительном результате. При этом статистически значимого влияния на выживаемость пациентов нарушения в области гена *RREB1* не оказывают.

Следует отметить, что у больных, которые прожили более 10 лет после операции, копийность генов *MYB* и *CCND1* оказалась больше, чем у тех, кто умер в первые 3 года заболевания. В данном случае можно предположить, что существуют генетические aberrации, которые уравновешивают другие поломки, тем самым стабилизируя геном человека.

При рассмотрении случаев, не ясных в диагностическом плане, обнаружили поломки генов, наиболее характерные для того или иного вида меланоцитарного поражения. Кроме того, выявлена связь между возрастом пациента и числом генетических aberrаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

FISH-реакция может быть весьма полезна при исследовании меланоцитарных новообразований, не ясных в диагностическом плане. Данный метод поможет врачу достаточно четко отличить злокачественное меланоци-

тарное поражение от доброкачественного. Это позволит в значительной степени улучшить диагностику подобного рода новообразований, а также скорректировать лечение и оценить дальнейшее течение заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Quality assessment by expert opinion in melanoma pathology: experience of the pathology panel of the Dutch Melanoma Working Party / Veenhuizen K. C., De Wit P. E., Mooi W. J., Scheffer E., Verbeek A. L., Ruiter D. J. // J. Pathol. — 1997. — Vol. 182. — P. 266—272.
2. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes / Bastian B. C., Olshen A. B., LeBoit P. E., Pinkel D. // Am. J. Pathol. — 2003. — Vol. 163. — P. 1765—1770.
3. Clark W. H. Jr, Elder D. E., Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma // Hum. Pathol. — 1986. — Vol. 17. — P. 443—450.
4. Ackerman A. B., David K. M. A unifying concept of malignant melanoma: biologic aspects // Hum. Pathol. — 1986. — Vol. 17. — P. 438—440.
5. Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin // Bastian B. C., Kashani-Sabet M., Hamm H., Godfrey T., Moore D. H., 2nd, Brockner E. B., LeBoit P. E., Pinkel D. // Cancer Res. — 2000. — Vol. 60. — P. 1968—1973.
6. Molecular cytogenetic analysis of Spitz nevi shows clear differences to melanoma // Bastian B. C., Wessellmann U., Pinkel D., Leboit P. E. // J. Invest. Dermatol. — 1999. — Vol. 113. — P. 1065—1069.
7. Gerami P., Jewell S. S., Morrison L. E. et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma // Am. J. Surg. Pathol. — 2009. — Vol. 33. — P. 1146—1156.
8. Liu H., Hew H. C., Lu Z. G. et al. DNA damage signalling recruits *RREB-1* to the p53 tumour suppressor promoter // Biochem. J. — 2009. — Vol. 422. — P. 543—551.
9. Sauter E. R., Yeo U. C., von Stemm A. et al. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma // Cancer Res. — 2002. — Vol. 62. — P. 3200—3206.
10. Галил-Оглы Г. А., Молочкова В. А., Сергеева Ю. В. Дермато-онкология. — М.: Медицина для всех, 2005. — С. 170—211.

Поступила 17.03.2010

*Anastasia Ilyinichna Senderovich¹, Anna Mikhailovna Stroganova²,
Mikhail Alexeyevich Pyatnitsky³, Yana Vladimirovna Vishnevskaya⁴,
Apollon Irodionovich Karseladze⁵*

FISH IN THE DIAGNOSIS OF MELANOCYTIC LESIONS

¹ Junior Researcher, Molecular Pathology Laboratory, Human Tumor Pathologic Anatomy Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

² Researcher, Molecular Pathology Laboratory, Human Tumor Pathologic Anatomy Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

³ PhD, Junior Researcher, V. N. Orekhovich Biomedical Chemistry Research Institute RAMS (10, ul. Pogodinskaya, Moscow, RF, 119121)

⁴ MD, PhD, Senior Researcher, Molecular Pathology Laboratory, Human Tumor Pathologic Anatomy Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁵ MD, PhD, Professor, Head, Human Tumor Pathologic Anatomy Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

Address for correspondence: Senderovich Anastasia Ilinichna, Molecular Pathology Laboratory, Human Tumor Pathologic Anatomy Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478; e-mail: a.senderovich@mail.ru

The purpose of this study was practical implementation of a diagnostic test that detects melanoma at a molecular genetic level, can differentiate nevus from melanoma and facilitates disease prognosis. We studied 20 nevi, 40 melanomas including 20 with follow-up results, and 80 cases with unclear diagnosis. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was the principal study approach. We used a *Vysis LSI RREB1/LSI MYB/LSI CCND1/CEP6* test able to count RREB1(6p25), MYB(6q23), CCND1(11q13) gene copy numbers and chromosome 6 centromeres. Melanocytic tumors were characterized by combinations of gene abnormalities, with gene RREB1 aberrations prevailing. There was a relationship between MYB and CCND1 copy number and survival. Genes whose copy numbers were of most statistical significance and demonstrated relationship with patient age were established for some melanocytic tumors. Therefore, FISH in combination with histologic study may improve the diagnosis of melanocytic skin tumors, help tailor treatment and assess further disease course.

Key words: melanoma, melanocytic skin tumors, chromosomal aberrations, fluorescent *in situ* hybridization.