

Stručný prehľad imunohistochemie najčastejších nádorov kože

A Brief Overview of Immunohistochemistry of the most Common Skin Tumors

Adamicová, K.

Ústav patologickej anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave
a Univerzitná nemocnica Martin
Konzultačné centrum biopтической diagnostiky kožných ochorení ÚPA, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Martin
korešpondencia: katarina.adamicova@uniba.sk

Súhrn

Imunohistochemické (IHCH) vyšetrenia kože, podobne ako pri histologickej diagnostike patologických stavov iných tkanív a orgánov, v posledných desaťročiach výrazne pokročili. Táto práca by mala ponúknuť empirický pohľad na použitie IHCH metód v rutinej práci biopických laboratórií pri diagnostike kožných ochorení, špeciálne pri diagnostike niektorých malígnych nádorov kože.

Kľúčové slová: imunohistochemia kožných nádorov

Abstract

Immunohistochemical (IHCH) examinations of the skin, similar to the histological diagnosis of pathological conditions of other tissues and organs, have advanced significantly over the past decades. This work should offer an empirical view of the use of IHCH methods in the routine work of biopsy laboratories, in the diagnosis of skin diseases, especially in the diagnosis of some malignant skin tumors.

Key words: immunohistochemistry of skin tumors

Úvod

Koža je najväčším orgánom tela. Ide o komplexný orgán s rozličnými nezastupiteľnými funkciami. Histopatológia kože je rozsiahly odbor predstavujúci samostatnú biopickú špecializáciu. V bežnej biopickej praxi prichádzajú do úvahy najmä tieto chorobné jednotky: melanómy, spinocelulárny karcinóm, bazalióm, Pagetova choroba, vretenobunkové lézie a nádory, fibrózne a fibrohistiocytárne nádory, vaskulárne neoplazmy a neuroendokrinné nádory. V koži sa môže vyskytnúť aj niekoľko typov kožných lymfómov. Navyše napr. kožné prejavy HIV sa bežne spájajú s komorbiditami plesňových, vírusových i bakteriálnych infekcií kože. V príspevku sa budeme venovať iba tým najčastejšie diagnostikovaným nádorom z našej praxe.

Imunohistochemia má v posledných desaťročiach zásadnú úlohu pri rutinej biopickej diagnostike, vyjadrovaní sa k prognóze ochorenia, resp. pri riešení výskumných úloh. Táto časť histopatologickej diagnostiky je obsahom stále sa dopĺňujúcich informácií v monografiách a vedeckých článkoch. Naš text je iba stručným prehľadom najčastejšie používaných IHCH metód využívaných v modernom dermatopatologickom laboratóriu.

Bežne používané protilátky

Pan-cytokeratín

Pan-cytokeratínové protilátky sa používajú pri rozlišovaní buniek epitelu a mezotelu od mezenchýmových buniek v normálnom a nádorovom tkanive. AE1/AE31 alebo Lu-5 protilátky slúžia ako pan-cytokeratín prvého rádu. Sú to protilátky pre kyslé (typ 1) a bázické skupiny (typ 2). Cytokeratín s vysokou molekulovou hmotnosťou (HMW CK), HMW CK [34βE12] rozpoznáva cytokeratíny 1, 5, 10 a 14. Tieto protilátky reagujú so skvamóznymi karcinómami a adenoskvamóznymi karcinómami, kým adenokarcinómy sú pri použití HMW CK negatívne (Tabuľka 1).

V normálnom epiteli 34βE12 pozitívne reaguje s vrstevnatým epitelom a myoepitelovými bunkami. 34βE12 je užitočný ako marker rozlíšenia skvamózných karcinómov a adenokarcinómov a pre benígne a zhubné nádory prostaty.

Cytokeratín s nízkou molekulovou hmotnosťou (LMW CK) Klon 5D3 rozpoznáva medziprodukt CK 8/18 intermediátne filamentové proteíny. V normálnych tkanivách 5D3 rozpoznáva všetky jednoduché a žľazové epitelié. V neoplastických tkanivách sa 5D3 využíva

ako užitočný marker na identifikáciu adenokarcinómov. Pozitívne reakcie 5D3 v spojení s HMW CK vylučujú skvamocelulárny karcinóm. Najmä keratinizujúce skvamózne karcinómy sú všeobecne negatívne pri použití tejto kombinácie [1].

CD1a

CD1a je proteín s hmotnosťou 43 až 49 kD exprimovaný v koži na dendritických bunkách. CD1a farbenie deteguje najmä Langerhansove bunky a odlišuje ich od interdigitujúcich buniek. Osvedčil sa aj pri fenotypizácii histiocytózy z Langerhansových buniek.

CD4

CD4 je exprimovaný v podskupine T-buniek (pomocník/induktor) a nachádza sa v približne 80 % tymocytov a 45 % lymfocytov periférnej krvi. CD4 je exprimovaný vo väčšine T-bunkových lymfómov vrátane mycosis fungoides.

CD7

Molekula CD7 je viazaná na membránu glykoproteín 40 kD a je najvčasnejší T-bunkový špecifický antigén, ktorý sa exprimuje v lymfocytoch. CD7 je exprimovaný vo väčšine tymocytov, v T-bunkách periférnej krvi a „prirodzenými zabíjačmi buniek“ (natural killer /NK/ cells). Použitie v kombinácii s CD4, CD7 a CD8 sa využívajú na odlíšenie mycosis fungoides a pamäťových T-buniek.

CD34

Antigén CD34 je selektívne prítomný v ľudských lymfoidných a v myeloidných hematopoetických progenitorových bunkách. Protilátka proti CD34 tiež reaguje s vaskulárnymi endotelovými bunkami v normálnych tkanivách a pri benígnych a malígnych proliferáciách. Užitočnosť CD34 sa ukazuje pri hodnotení benígnych a malígnych vaskulárnych nádorov (Obr. 1), charakterizuje akútnu leukémiu v kostnej dreni. Používa sa aj na odlíšenie dermatofibrosarkómu protuberans (+) od „spindle cell“ histiocytómu (-).

CD56

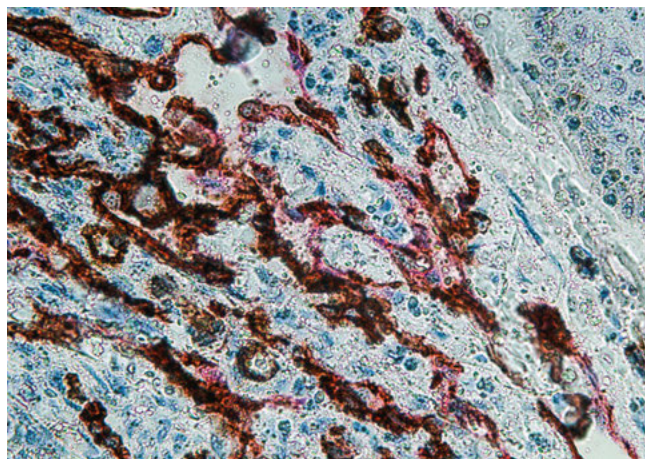
CD56 (adhézná molekula nervových buniek, prirodzený marker „killer“ buniek) je súčasťou rodiny bunkových povrchových glykoproteínov. CD56 má úlohu v embryogenéze a označuje elementy sprostredkovaných interakcií medzi nervovými bunkami. CD56 je exprimovaný rozličnými bunkami, normálnymi aj abnormálnymi tkanivami, napr. koža, malobunkový karcinóm, neuroblastóm, neuróny, astrocyty, Schwannove bunky, NK bunky a podskupina aktivovaných T-bunkových lymfómov.

Faktor XIIIa

Ide o polyklonálnu protilátku proti A-podjednotke ľudského koagulačného faktora XIII. Rozpoznáva ľudský faktor XIII A-reťazec v redukovanej aj neredukovanej forme. Faktor XIIIa je dermálny dendrocytový marker a má variabilné reakcie s týmito

Tabuľka 1 • Mollova klasifikácia najpoužívanějších cytokeratínov

Typ	Klon	Moll
Pan-cytokeratín	AE1/AE3	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 15, 16, 17 a 19
Pan-cytokeratín	Lu-5	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
Pan-cytokeratín	MAK-6	8, 14, 15, 18, 19
Pan-cytokeratín (LMW)	AE1	10, 14/15, 16/17, 19
Pan-cytokeratín (HMW)	AE3	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
LMW cytokeratín	5D3	8/18
HMW cytokeratín	34bE12 (903)	1, 2, 5, 10, 14/15
HMW cytokeratín	DE-SQ	13, 14, 15, 16



Obr. 1 • CD34 prevažne endoteliálny marker vizualizuje štrbinovité cievne priestory Kaposiho sarkómu kože (obj. 20x)

histogenetickými typmi nádorov. Možno ho použiť aj na histiocytovú fenotypizáciu a je známe, že je diagnostickým znakom pre kapilárne hemangiómy a nádory centrálnej nervovej sústavy. Faktor XIII sa používa s protilátkou CD34 na odlíšenie medzi dermatofibrómom a dermatofibrosarkómom protuberans, v ktorom je výrazne pozitívny.

S100

S100A sa skladá z alfa a beta reťazcov, kým S100B sa skladá z beta reťazcov. S100 je pozitívny v melanocytoch, schwannónoch, periférnych astrocytoch nervového tkaniva a benígnych névoch, v malígnych melanómoch a ich metastázach. S100 proteín je tiež exprimovaný v bunkách prezentujúcich antigén, ako sú Langerhansove bunky v koži a interdigitujúce bunky retikula v parakortexe lymfatických uzlín. Proteín S100 je vysoko rozpustný a môže sa z buniek eluovať, najmä pri zmrazení tkaniva počas spracovania.

HMB45

HMB45, neuraminidáza – senzitivná, s oligosacharidovým bočným reťazcom glykokonjugátu, je prítomný v nezrelých melanozómoch. HMB45 – reaktívny antigén je prítomný v kožných melanocytoch, prenatálnom a infantilnom retinálnom pigmentovom epiteli (RPE). Ukázalo sa, že táto protilátka označuje väčšinu melanómov (Obr. 2).

MART-1

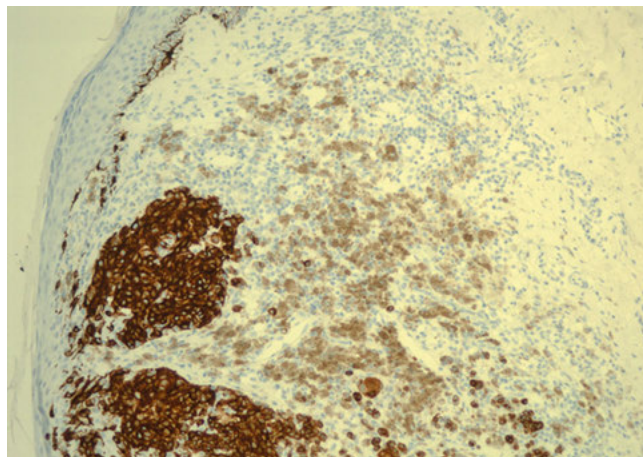
MART-1/Melan A je proteín s veľkosťou 18 kDa. Ide o MART-1 (melanómový antigén rozpoznávaný T-bunkami 1) alebo Melan A. MART-1 rozpoznáva špecifickú subcelulárnu frakciu nachádzajúcu sa v melanozómoch. Protilátky sa používajú na detekciu melanómov a nádorov melanocytovej diferenciácie. Je negatívny pri novotvaroch epitelového pôvodu, lymfómoch alebo mezenchýmových nádoroch. Melan A je užitočným doplnkom k panelu melanómovej diagnostiky. Tak HMB45, ako aj MART-1 sú zväčša koexprimované. Štúdie ukázali, že MART-1 je citlivejší ako HMB45, najmä pri označovaní metastatických melanómov (Obr. 3).

Tyrozínáza

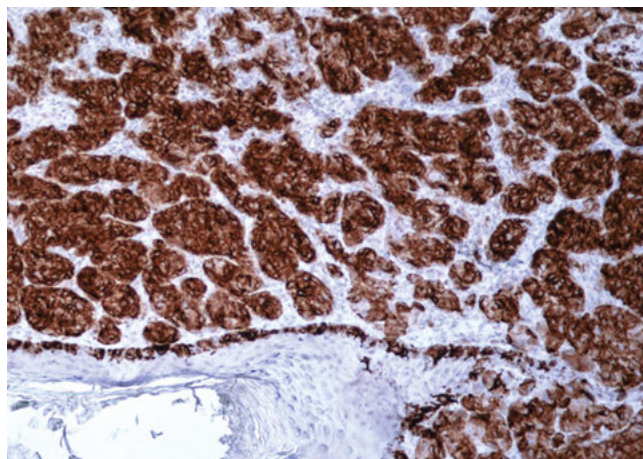
Tyrozín je kľúčovým enzýmom prítomným v začiatkových štádiách biosyntézy melanínu. Štúdie ukázali, že tyrozínáza je citlivejší marker v porovnaní s citlivosťou na HMB45 a MART-1. Je tiež prítomný vo vyššom percente prípadov desmoplastických melanómov ako HMB45. Na rozdiel od HMB45 ani tyrozínáza, ani MART-1 nerozlišujú aktivované alebo pokojové melanocyty. Iné štúdie ukázali, že tyrozínáza je veľmi špecifický marker pre melanómy, pretože skrížene nereaguje s nijakými inými nádormi alebo normálnymi tkanivami. Možno konštatovať, že tyrozínáza je najpresnejší melanómový marker. Nie je známy ani jeden prípad s HMB45 pozitivitou a s MART-1 a tyrozínázovou negativitou. Tyrozínáza a MART-1 sú koexprimované pri väčšine melanómov. Teda tyrozínáza a koktail MART-1 sú citlivejšie ako sám HMB45. Kombinácia MART-1 a tyrozínázy je vynikajúci skrínery melanómu a môže odhaliť aj minimetastázy melanómu v sentinelových lymfatických uzlinách.

SOX10

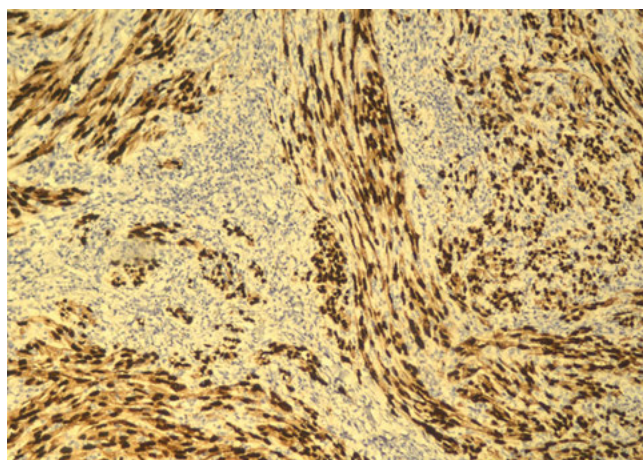
Gény Sry-related HMG box (SOX) kódujú skupinu kľúčových transkripčných faktorov. Jedným z nich je SOX10. Tento gén má dôležitú úlohu v neskorom štádiu tvorby buniek neurálnej lišty, v udržiavaní a multipotencii diferenciácie buniek neurálnej lišty. Pozitívne sú tiež ako kmeňové bunky. Sú prítomné aj pri diferenciácii derivovaných kmeňových buniek na schwannovú a melanocytovú líniu. V normálnom tkanive je SOX10 exprimovaný vo Schwannových bunkách, melanocytoch a myoepitelových bunkách slinných a prsných žliaz. SOX10 je tiež exprimovaný v nádoroch odvodených od neurálnej lišty vrátane



Obr. 2 • HMB45 v malígnom melanóme kože (obj. 10x)



Obr. 3 • Melan A v malígnom melanóme kože (obj. 20x)



Obr. 4 • SOX10 v desmoplastickom malígnom melanóme (obj. 20x)

rozličných typov malígneho melanómu. V porovnaní s inými melanocytovými markermi je SOX10 osobitne citlivý na detekciu desmoplastického a vretenobunkového malígneho melanómu (Obr. 5).

Microphthalmia transcription factor (Mitf)

Ide o jadrový proteín prítomný pri vývine melanocytov a pri regulácii melanínovej syntézy. Recentné štúdie dokázali, že Mitf je senzitívnejší a špecifickejší melanómový marker ako iné, už spomínané markery melanómu. Mitf sa vyskytuje aj v benígnych névoch, Spitzovej névus a neurotizovaný névus však mávajú klesajúcu intenzitu exprimácie. Pozitívne nálezy Mitf sú však aj v niektorých iných bunkách, napr. v makrofágoch, fibroblastoch, Schwannových bunkách, hladkých svalových bunkách, mastocytoch. Vyskytujú sa, pochopiteľne, aj v nádoroch derivujúcich z týchto buniek. Ako samostatný marker má teda Mitf limitovanú diagnostickú hodnotu.

Faktor rastu nervov – nerve growth factor (p75)

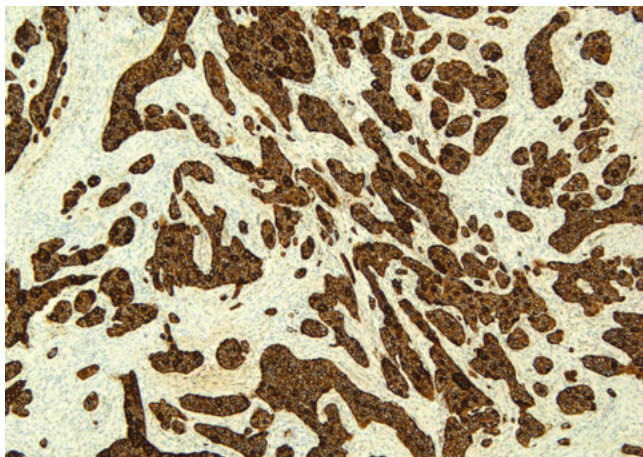
Monoklonálna protilátka NGFR, p75 je 75 kD NGF receptor. Receptorový proteín p75 je člen nervového rastového faktora (NGF), nadrodina receptora pre faktor nádorovej nekrózy. NGFR reaguje s periférnymi nádormi nervového puzdra a s bunkami feochromocytómu. Štúdie tiež ukázali, že NGFR je reaktívny s okrúhlymi (round cells) bunkami, desmoplastickými a neurotrofnými melanómami.

CD44

CD44 je polymorfná rodina buniek membránových glykoproteínov, ktoré sprostredkujú bunkovú reakciu a interakcie bunka – bunka zapojené do mechanizmov nádorovej invázie či metastáz; buniek, ktoré podliehajú diferenciacným reguláciám počas normálneho, ale aj malígneho rastu buniek. Rozličné nádory vrátane melanómu, karcinómu z Merkelových buniek aj zo skvamózných buniek exprimujú CD44 pozitívitu. Za pozornosť stojí, že karcinómy bazálnych buniek kože CD44 neexprimujú, na rozdiel od skvamocelulárnych karcinómov [1, 2, 3].

Cytokeratíny a proteíny intermediárnych filamentov

Moll [4] reklasifikoval cytokeratíny do tabuľky podľa čísel. Tento systém zjednodušuje ich pochopenie. Cytokeratíny sú klasifikované ako intermediárne filamentové proteíny (IFP). Expresia IFP je kontrolovaná podľa jednotlivých génov a sleduje presne regulovaný vzor bunkovej diferenciácie. Proteíny IF majú rozličnú molekulovú hmotnosť, ktorá sa mení od 40 do 68 kD. Nachádzajú sa vo väčšine normálnych epitelov aj karcinómov. Cytokeratíny sú exprimované v pároch, pozostávajú z typu I (9–20) a typu II (1–8), a zahŕňajúce kyslé a zásadité (bázické) typy 1–6 (pH 7,3 až 7,8) a 7–20 (pH 4,9 až 6,0); (Tabuľka 2a, 2b).



Obr. 5 • CKAE1/AE3 v nerohovatejúcom skvamocelulárnom karcinóme dermy (obj. 10x)

Tabuľka 2a • Cytokeratíny podľa skupiny. Acidické cytokeratíny (typ I)

Moll	Molekulová hmotnosť (kD) ³
9	64
10	56,5
11	56
12	55
13	51
14	50
15	50
16	48
17	46
18	45
19	40
20	46

Tabuľka 2b • Cytokeratíny podľa skupiny. Bázické cytokeratíny (typ II)

Moll	Molekulová hmotnosť (kD) ³
1	67
2	65
3	64
4	59
5	58
6	56
7	54
8	52

Bežné panely v dermatopatológii

Malígny melanóm

Malígny melanóm je zhubný nádor melanocytových (névocytových) buniek. Dnes je už isté, že slnečné svetlo je jedným zo silných predisponujúcich faktorov pre vznik tohto nádoru. Primárne, ale najmä metastatické melanómy môžu vyvolávať rozpaky pri určení správnej diagnózy. Diferenciálnodiagnostické problémy môžu spôsobovať najmä tak primárne lézie, ako aj vzdialené metastázy, rhabdoidné a sarkomatoidné typy nádorov vrátane desmoplastických, neurotrofných a myxoidných podtypov. Historické poznanie histopatologického obrazu, ktoré pokladalo malígny melanóm za jeden z najväčších „mimikry“ v patológii, je dodnes platné. V minulosti protilátky S100 a HMB45 boli dva hlavné markery, ktoré sa používali na potvrdenie melanómov. Nedávno sa objavilo niekoľko ďalších protilátok; boli vyvinuté tak, aby mali správny a jednoznačný fenotyp pre malígny melanóm. V Tabuľke 3 je zoznam protilátok, ktoré znázorňujú a rozlišujú väčšinu zo všetkých typov melanómov.

Bazalióm

Bazaliómy sa skladajú z buniek pripomínajúcich bazálnu časť epidermis. Bazalióm sa spravidla vyskytuje pri chronickej iritácii kože svetelným žiarením. Ide o najbežnejší druh karcinómu kože. Má tendenciu rásť veľmi pomaly. Karcinóm môže byť v typických prípadoch diagnostikovaný už na základe makromorfologie. Klasické formy bazaliómov možno určiť na základe najbežnejšieho histologického farbenia hematoxylínom a eozínom. Existujú však iné typy nádorov, ako sú adnexové nádory, trichoepiteliómy, mazové epitheliómy a spinocelulárne karcinómy, ktoré môžu pripomínať bazalióm. Bazálne bunky, z ktorých vzniká bazalióm, prejavujú difúziu pozitívitu s Bcl-2, kým pri trichoepiteliónoch má táto protilátka iba neúplnú pozitivitu na periférii nádorových ložísk. V bazaliónoch je stróma nádoru CD34 negatívna a pri trichoepiteliónoch je pri tejto protilátke ložiskovo pozitívna (Tabuľka 4).

Tabuľka 3 • Panel malígneho melanómu. Pozitívne reakcie protilátok pri diagnostike malígneho melanómu

S100	P75
HMB45	CD56
Tyrozínáza	MAGE-1
MART-1	CD44
Mikroftalmia	SOX10 (prevažne desmoplastický MM)
Pan-Melanoma (tyrozínáza + MART-1)	

Tabuľka 4 • Rozdiel medzi bazocelulárnym a skvamocelulárnym karcinómom

BCC	SCC
AE1/AE3+	AE1/AE3+
34βE12+	34βE12+
BerEP4+	BerEP4-
LMW CK(8/18)+ od 50 % do 60 %	LMW CK(8/18)+ od 80 % do 90 %
Androgénny receptor+ (AR+) cca 60 %	Androgénny receptor- (AR-)
CK15+/- cca 25 %	CK15-
CEA-	CEA+
CD44-	CD44+

Skvamocelulárny karcinóm

Skvamocelulárne karcinómy vznikajú na koži a najčastejšie sa vyskytujú u starších pacientov na miestach vystavených slnku. Skvamocelulárny karcinóm sa typicky silno farbí s vysokomolekulovými protilátkami proti keratínom (Obr. 5). Na rozdiel od bazaliómu skvamocelulárny karcinóm nie je pozitívny pri použití BerEP4, LMW CK, androgénneho receptora, CK15, CK20, CEA a CD44 protilátok (Tabuľka 5).

Tabuľka 5 • Expresia keratínov v kožných nádoroch

Typ nádoru	CK5/6	CK7	CK8/18	CK14	CK15	CK19	CK20
SCC	+	-	-	+	-	-	-
BCC	+	-	-/+	+	-	-	-
Trichogénne	f+	-	-	+	+	+	-
Sebaceózne	+	-	+	-/+	+	-	-
Ekrinné	d+	f+	d+	+	-	+	-
Merkel cell	-	-	/	/	/	/	+
Paget Ca	/	+	+	+	/	/	-

Legenda: SCC - skvamocelulárny karcinóm; BCC - bazocelulárny karcinóm; f - fokálna pozitivita; d - difúzna pozitivita

Karcinóm z Merkelových buniek

Merkelove bunky epidermis sú neuroendokrinné bunky odvodené z neurálnej lišty. Normálne Merkelove bunky sa tiež môžu transformovať na nádorové bunky. Nádor z takých buniek je známy pod názvom karcinóm z Merkelových buniek. Imunohistochemické štúdie potvrdili ich neuroendokrinný pôvod. Bunky sú pozitívne pri použití LMW cytokeratínov. Niektoré štúdie potvrdili, že pozitivita CD44 v Merkelových bunkách karcinómu kože môže korelovať s ich vyšším metastatickým rizikom (Tabuľka 6); (Obr. 6).

Dermatofibrosarkóm protuberans

Dermatofibrosarkóm protuberans (DFSP) je malígnou formou dermatofibrómu (DF). Dermatofibrosarkóm protuberans je komponovaný z proliferácie fibroblastov, ktoré môžu byť usporiadané do vzorov pripomínajúcich rohože (storiformný vzor). Dermatofibróm je bežný variant benígneho fibrózneho histiocytómu a skladá sa z vretenovitých fibroblastov. Dermatofibróm sa bežne nachádza v strednej dermis. Imunohistochemia môže byť nápomocná pri rozlíšení medzi včasnými formami DFSP z DF (Tabuľka 7); [1, 2, 3].

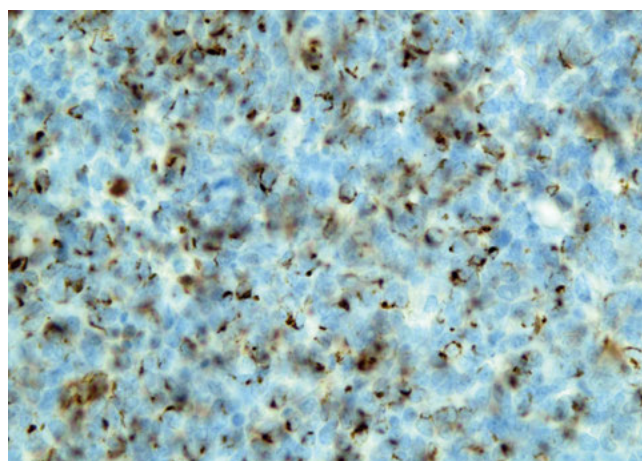
Záver

Užitočnosť imunohistochemie pre kožnú patológiu počas posledných niekoľkých desaťročí výrazne pokročila. Imunohistochemické farbenie poskytlo pomoc a potvrdenie pri identifikácii primárnych miest pôvodu nádorov, ako aj pri kožných metastázach s neznámym primárnym origom. Ako sa poznatky a skúsenosti postupne vyvíjali, zistilo sa, že väčšina markerov mala rozličné variácie v exprimácii. Preto sa pri histopatologickej diagnostike ochorení s využívaním imunohistologických metód jednoznačne odporúča pre každý zložitejší prípad využiť panely protilátok. Pracovať s protilátkami treba na základe firemných návodov.

Nevyhnutnosťou je aj neprestajné štúdium recentných publikácií týkajúcich sa tejto problematiky, osobné konzultácie medzi biptikmi a sledovanie moderného laboratórneho technického pokroku, ktorý umožňuje držať krok s najmodernejším, a teda

Tabuľka 6 • Panel pre karcinóm z Merkelových buniek

Pozitívne markery	Negatívne markery
AE1/AE3	CK7
BerEP4	CK5/6
CEA(P)	Desmín
CK20	S100
CAM5.2	Vimentín
Chromogranín A alebo B	TTF-1
CD44	



Obr. 6 • „Dot like“ paranukleárna pozitivita CK20 v bunkách „Merkel cell“ karcinómu kože

Tabuľka 7 • Rozdiel medzi dermatofibrosarcoma protuberans a dermatofibrómom

Dermatofibrosarcoma protuberans	Dermatofibróm
SMA+	SMA+
Vimentín+	Vimentín+
CD34+	CD34-
Factor XIIIa-	Factor XVIIIa+

najexaktnejším vybavením biptických laboratórií, ako podmienkou korektných diagnóz a z nich vyplývajúcich primeraných terapií.

Literatúra

1. Tacha D. Immunohistochemistry of the skin. Biocare medical laboratory medicine, 2003; 4, vol. 34.
2. Chu PG and Weiss LM. (2002). Keratin expression in human tissues and neoplasms. Histopathology 40(5): 403-439.
3. Chu P, Weiss LM. Modern immunohistochemistry. 2014; 2nd ed., Cambridge University Press, 508.
4. Moll R, Franke WW, Schiller DJ, et al. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Volume 31, Issue 1, November 1982, 11-24.