

В.А.Гуртовий

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Ключові слова: лімфома Ходжкіна, імуногістохімія, CD15, CD30, CD45, ЕМА.

Надійшла: 16.08.2012

Прийнята: 21.09.2012

УДК 616-006.44:616-018]-076

ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ У ДИФЕРЕНЦІЙНІЙ ДІАГНОСТИЦІ ЛІМФОМИ ХОДЖКІНА

Резюме. У дослідженні на парафінових зрізах вивчали експресію пухлинними клітинами маркерів, найбільш поширених при діагностиці класичної форми лімфоми Ходжкіна, з метою визначення їх діагностичного значення для встановлення діагнозу. Використано уражені лімфатичні вузли від 67 пацієнтів: 19 зразків з лімфоїдним переважанням, 36 – змішаноклітинного варіанту, і 12 – ретикулярного типу варіанту з виснаженням лімфоїдної тканини. Імунопереоксидазним методом проводили вивчення експресії CD15, CD30, CD45 та ЕМА пухлинними клітинами. Розглянуто можливі комбінації зазначених маркерів, характер та інтенсивність мембранного і цитоплазматичного забарвлення у діагностичних клітинах при різних варіантах класичної лімфоми Ходжкіна. Доведена доцільність комплексного імуногістохімічного дослідження з обов'язковим включенням усіх вказаних маркерів. Наголошено, що за частотою виявлення та зручності використання наявність в пухлинних клітинах $s^{+cy}CD30^{+}EMA^{-}$ є найбільш патогномонічною і практичною для встановлення діагнозу класичної форми лімфоми Ходжкіна.

Морфологія. – 2012. – Т. VI, № 3. – С. 5-9.

© В.А.Гуртовий, 2012

Gurtovyy V.A. Diagnostic importance of immunohistochemical markers expression in differential diagnostics of classical Hodgkin Lymphoma.

Summary. In our study expression of the most applicable immunohistochemical markers, such as CD15, CD30, CD45 and EMA, in Hodgkin Lymphoma diagnostics were investigated in order to determine the most useful their combination. Immunoperoxidase staining of formalin-fixed paraffin embedded specimens of affected lymph nodes from 67 Hodgkin lymphoma patients were performed. Various combinations of expressions of mentioned markers by the HRS-cells, membrane and cytoplasmic staining patterns intensity were described in different types of Hodgkin Lymphoma. As were shown in the study, application all of these markers must be done for making diagnosis of Hodgkin Lymphoma. It was determined that expression by tumor cells both $s^{+cy}CD30$ and EMA is the pathognomonic for the diagnosis of classical forms of Hodgkin Lymphoma.

Key words: Hodgkin Lymphoma, immunohistochemistry, CD15, CD30, CD45, EMA.

Вступ

Лімфома Ходжкіна (ЛХ) – захворювання лімфоїдної тканини, що становить близько 1% усіх злоякісних новоутворень у жителів розвинутих країн і є одним з найпоширеніших пухлин серед людей молодого віку (Крячок І. А. та ін., 2009). Розрізняють дві принципово різні форми захворювання за своїми епідеміологічними, клініко-морфологічними, та молекулярно-біологічними ознаками – нодулярний тип лімфоїдного переважання і класичну лімфому Ходжкіна. Остання, в свою чергу, підрозділяється на варіанти з нодулярним характером склерозу, змішаноклітинний, з виснаженням лімфоїдної тканини і багатий лімфоцитами варіанти. Патоморфологічна діагностика лімфоми Ходжкіна вимагає вивчення двох невіддільних компонентів патологічного процесу та їх співвідношення: 1) діагностичних пухлин-

них клітин Ходжкіна та Рид-Штернберга (HRS-клітин), розташованих серед 2) непухлинних клітин та позаклітинного компоненту. Численними дослідженнями встановлено, що HRS-клітини у більшості випадків мають В-клітинне походження, однак експресія CD79 α майже не виявляється, а CD20 експресують менше 40% вивчених пухлин. З іншого боку, майже завжди пухлинні клітини експресують CD15 та CD30 (Ковригіна А.М., Пробатова Н.А., 2007, Schmitz R. et al., 2009). Згідно з рекомендаціями ВООЗ 2008 року на патоморфологічному рівні диференційну діагностику ЛХ слід проводити з дифузною В-крупноклітинною лімфомою (особливо при варіанті з великою кількістю Т-лімфоцитів), первинною медіастинальною В-крупноклітинною лімфомою та анапластичною крупноклітинною лімфомою з Т-/нуль клітин (Swerdlow S.H. et al.,

2008).

Мета

Метою дослідження було визначення найбільш значимих імуногістохімічних маркерів для безумовного діагнозу лімфоми Ходжкіна. Для цього вивчали експресію CD15, CD30, CD45 та ЕМА пухлинними клітинами при різних клініко-морфологічних варіантах цієї патології.

Матеріали та методи

Для дослідження було відібрано 67 зразків парафінових блоків лімфатичних вузлів у пацієнтів з класичною формою лімфоми Ходжкіна, отриманих шляхом ексцизійної біопсії. Діагноз і варіант лімфоми Ходжкіна згідно існуючим критеріям (Swerdlow S.H. et al., 2008) встановлювався на світлооптичному рівні, а також підтверджувався імуноморфологічним дослідженням на базі відділу імуноморфології пухлин людини діагностичного центру медичної академії. Було відібрано 19 зразків варіанту з лімфоїдним переважанням, 36 – змішаноклітинного варіанту і, відповідно, 12 – ретикулярного типу варіанту з виснаженням лімфоїдної тканини.

Імуногістохімічні реакції проводили згідно стандартних протоколів (Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2004, Key M., 2006). Парафінові зрізи завтовшки 4 мкм виготовляли за допомогою мікромому Microm HM 315 (Thermo scientific) та наклеювали на адгезивні (Superfrost® Plus) предметні скельця. Використовували моноклональні мишачі та кролячі антитіла (перелік наведений у таблиці 1). Після депарафінізації і промивки в дистильованій воді проводили демаскування антитенів у 0,01M цитратному буфері (рН 6,0) за допомогою мікрохвильової печі. Блокування ен-

догенної пероксидази здійснювалось у 3% розчині H₂O₂ протягом 10 хвилин. Інкубація первинних антитіл у рекомендованих виробником розведеннях проводилась протягом години при кімнатній температурі у вологій камері. Візуалізація здійснювалась системою UltraVision LP Detection System (Thermo scientific), де в якості ферментної мітки використовується пероксидаза хріна, а хромогеном є діамінобензидин (DAB Plus Chromogen).

Таблиця 1
Моноклональні антитіла, використані при імуногістохімічному дослідженні

Антиген	Клон	Розведення
CD15	SPM490, TG-1	1:50, 1:500
CD30	HRS4, M 0751	1:100, 1:500
CD45(LCA)	PD7/26&2B11	1:2000
ЕМА	Е29	1:1400

Належність клітин до пухлинних оцінювали на світлооптичному рівні (гематоксилін-еозин), їхній імунофенотип повинен був задовольняти умовам – (CD15⁺CD30⁺), або (CD30⁺CD45⁻), або (CD30⁺ЕМА⁻) (Вороб'єв А.И., Кременецкая А.М., 2007, Swerdlow S.H. et al., 2008). При встановленому діагнозі, до пухлинних були також віднесені одно- та багатоядерні клітини з ознаками вираженої атипії.

Результати та їх обговорення

Результати досліджень наведені в таблиці 2.

Таблиця 2
Показники експресії діагностичних маркерів клітинами пухлини при різних клініко-морфологічних варіантах лімфоми Ходжкіна

Варіант лімфоми Ходжкіна (класична форма)	Кількість та % спостережень, що експресують							
	s+cyCD15		s+cyCD30		sCD45		sЕМА	
	кількість	%	кількість	%	кількість	%	кількість	%
Лімфоїдне переважання (19 спостережень)	14	73,68	19	100	10 (сумнівна)	52,63 (сумнівна)	1 (сумнівна)	5,26 (сумнівна)
Змішаноклітинний (36 спостережень)	22	61,11	36	100	11 (сумнівна)	30,56 (сумнівна)	1 (сумнівна)	2,78 (сумнівна)
Виснаження лімфоїдної тканини, ретикулярний тип (12 спостережень)	3	25,0	12	100	1 (сумнівна)	8,33 (сумнівна)	0	0
Всього 67 спостережень	39	58,21	67	100	22 (сумнівна)	32,84 (сумнівна)	2 (сумнівна)	2,99 (сумнівна)

Примітка: локалізація експресії: s – мембранна, cy – цитоплазматична.

За нашими даними, експресія маркера CD15 клітинами пухлини при досліджених варіантах класичної форми лімфоми Ходжкіна зустрічається не в 100% випадках. Вона найбільш характерна для лімфоїдного переважання та змішаноклітинного варіанта, найменш – для ретикулярного типу варіанта з виснаженням лімфоїдної тканини (рис. 1 А, Б). Останній варіант, як відомо, складно диференціювати з неходжкінськими крупноклітинними лімфомами. Реакція цитоплазматична, дифузна, різної інтенсивності. Інколи цитоплазматична експресія поєднується з мембранною.

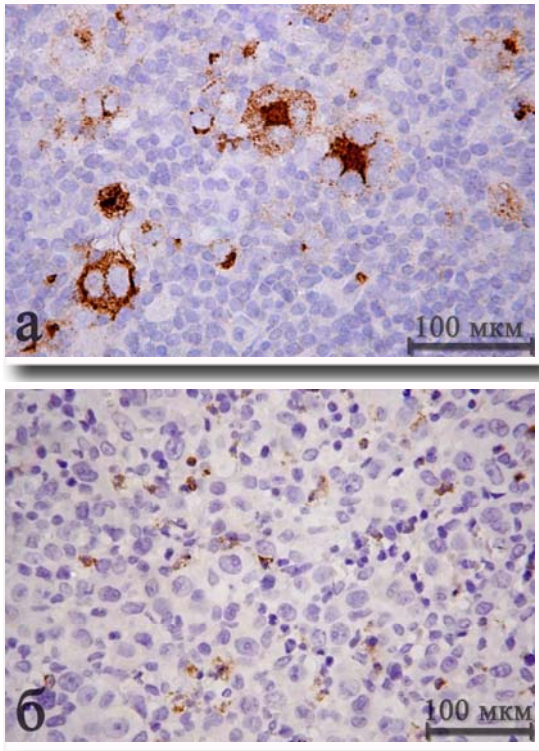


Рис. 1. Експресія CD15 в клітинах пухлини при класичній формі лімфоми Ходжкіна: а) наявність експресії (змішаноклітинний варіант); б) відсутність експресії (ретикулярний тип варіанту з виснаженням лімфоїдної тканини).

Експресія маркера CD30 клітинами пухлини є безперечною в 100% спостережень та не залежить від варіанта лімфоми Ходжкіна. Реакція різної інтенсивності, мембранна та цитоплазматична - дифузна або вогнищева (в зоні розташування комплексу Гольджі) (рис. 2 А, Б).

Маркер CD45 або не виявляється, або має сумнівну реакцію на мембрані клітин, що пов'язано з кількістю та щільністю прилягання до них лімфоцитів мікрооточення. Коли лімфоцити щільно та повністю оточують діагностичну клітину, практично неможливо розрізнити де саме експресія – тільки на мембрані лімфоцита, чи ще і на мембрані пухлинної клітини (рис. 3 А). Найбільше діагностичне значення цей маркер має при ретикулярному типі, коли відбувається виснаження лімфоїдного мікрооточення (рис. 3 Б).

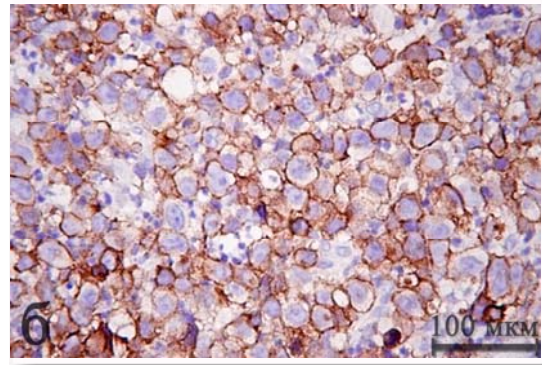
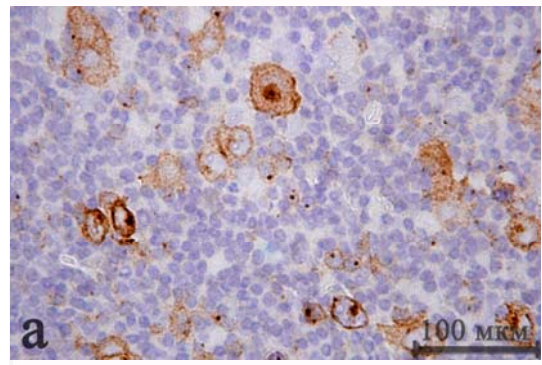


Рис. 2. Експресія CD30 в клітинах пухлини при класичній формі лімфоми Ходжкіна: а) наявність експресії (змішаноклітинний варіант); б) наявність експресії (ретикулярний тип варіанту з виснаженням лімфоїдної тканини).

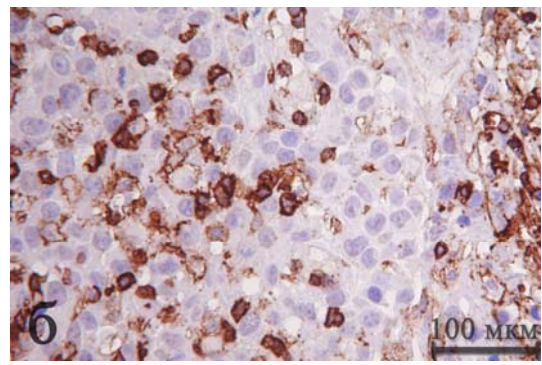
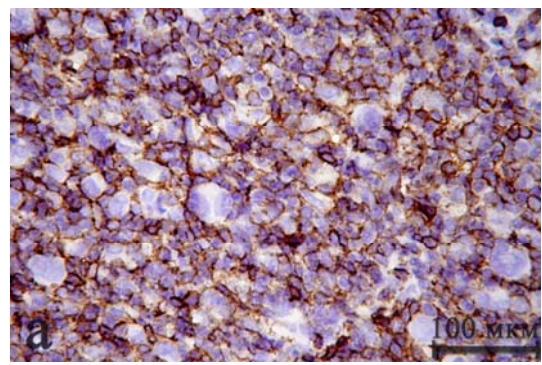


Рис. 3. Експресія CD45 в клітинах пухлини при класичній формі лімфоми Ходжкіна: а) сумнівна експресія (змішаноклітинний варіант); б) відсутність експресії (ретикулярний тип варіанту з виснаженням лімфоїдної тканини).

Експресія маркера EMA відсутня в клітинах пухлини при всіх оцінених варіантах лімфоми Ходжкіна. Інколи, поодинокі діагностичні клітини мають сумнівну реакцію, що знов таки пов'язано з мікрооточенням. Коли поряд з пухлинними клітинами багато клітин, що на мембрані та в цитоплазмі експресують EMA (плазмоцити, гістіоцити, деякі фіброblastи та макрофаги), важко виключити експресію маркера на мембрані діагностичної клітини, як і в випадках з CD45 (рис. 4 А, Б).

Таким чином, неоднозначне виявлення маркерів CD15 і CD45 в клітинах пухлини інколи заважає встановленню вірного діагнозу. А наявність маркера CD30 (при негативному CD15 та сумнівній експресії CD45) може і взагалі призводити до помилкового діагнозу неходжкінської крупноклітинної лімфоми. У таких випадках, як правило, на допомогу приходить відсутність експресії EMA в діагностичних клітинах.

Висновки

Самостійна експресія (або відсутність експресії) кожного з розглянутих маркерів в клітинах пухлини не може вважатись достатньою для діагнозу класичної форми лімфоми Ходжкіна. Для точного встановлення належності діагностичних клітин до цієї патології найбільш доцільним є комплексне імуногістохімічне дослідження з обов'язковим включенням 4 маркерів: CD15, CD30, CD45 та EMA.

За частотою виявлення та зручності використання наявність в пухлинних клітинах $s+cyCD30^+EMA^-$ є найбільш патогномонічною і практичною для встановлення діагнозу класичної форми лімфоми Ходжкіна.

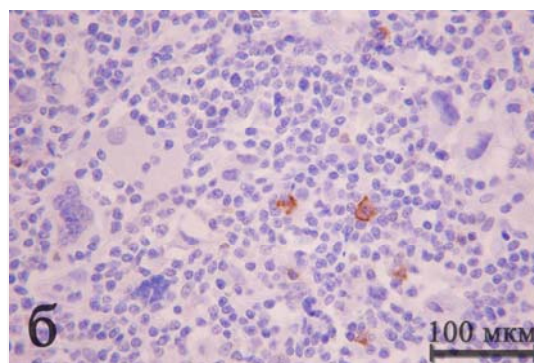
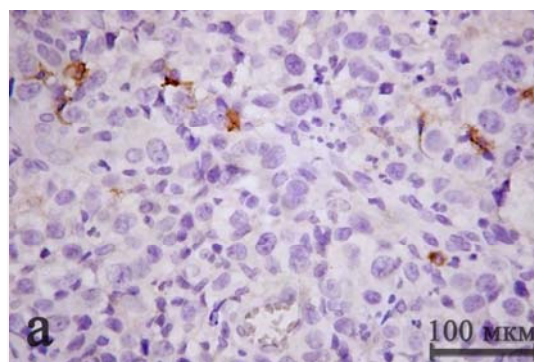


Рис. 4. Експресія EMA в клітинах пухлини при класичній формі лімфоми Ходжкіна: а) сумнівна експресія в поодиноких пухлинних клітинах; б) відсутність експресії.

Перспективи подальших розробок полягають у дослідженні імуногістохімічних маркерів для діагностики новоутворень та їх клініко-морфологічних варіантів.

Літературні джерела

Ковригина А. М. Лимфома Ходжкина и крупноклеточные лимфомы / А. М. Ковригина, Н. А. Пробатова. – М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. – 216 с.

Опухоли лимфатической системы: атлас / под ред. А. И. Воробьева, А. М. Кременецкой. – М. : Ньюдиамед, 2007. – 297 с.

Прогностичні фактори перебігу лімфоми Ходжкіна: сьогодення та майбутнє / І. А. Крячок, І. Б. Титаренко, О. І. Новосад, А. В. Мартинчик // Укр. Мед. Часопис. – 2009. – №6. – С. 88-91.

Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под редакцией

С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. – Казань : Титул, 2004. – 456 с.

Key M. Immunohistochemical Staining Methods / Mark Key. – Ojai, CA, USA : Bimedical Services, 2006. – 174 p.

Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma / R. Schmitz, J. Stanelle, M. L. Hansmann, R. Kuppers // Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. – 2009. – Vol. 4. – P. 151–174.

WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues / S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris [et al.]. – Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008. – 439 p.

Гуртовой В.А. Диагностическое значение экспрессии иммуногистохимических маркеров в дифференциальной диагностике лимфомы Ходжкина.

Резюме. В исследовании на парафиновых срезах изучали экспрессию опухолевыми клетками маркеров, наиболее распространенных при диагностике классической формы лимфомы Ходжкина, с целью определения их диагностического значения для установления диагноза. Использованы поражённые лим-

фатические узлы 67 пациентов: 19 образцов с лимфоидным преобладанием, 36 – смешанноклеточного варианта, и 12 – ретикулярного типа варианта с истощением лимфоидной ткани. Иммунопероксидазным методом проводили изучение экспрессии CD15, CD30, CD45 и ЕМА опухолевыми клетками. Рассмотрены возможные комбинации указанных маркеров, характер и интенсивность мембранного и цитоплазматического окрашивания в диагностических клетках при разных вариантах классической лимфомы Ходжкина. Доказана целесообразность комплексного иммуногистохимического исследования с обязательным включением всех указанных маркеров. Подчеркивается, что по частоте выявления и удобству применения наличие в опухолевых клетках $s+cyCD30^+EMA^-$ является наиболее патогномичным и практичным при установлении диагноза классической формы лимфомы Ходжкина.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, иммуногистохимия, CD15, CD30, CD45, ЕМА.